

UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE
UNITE DE FORMATION et de RECHERCHE de PHARMACIE

ANNEE 2007

N°

THESE

Présentée en vue de l'obtention du grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE REIMS
CHAMPAGNE-ARDENNE**

MENTION : INGENIERIE DE LA SANTE

Spécialité : Biophysique

Soutenue publiquement le 27 novembre 2007

par

Ali TFAYLI

Né le 28 avril 1982 à Nmayriye (LIBAN)

**CARACTERISATION STRUCTURALE ET MOLECULAIRE DE LA PEAU PAR
MICROSPECTROSCOPIES OPTIQUES VIBRATIONNELLES. APPLICATIONS AU
DIAGNOSTIC PRECOCE DES TUMEURS CUTANEES ET A L'ETUDE DE LA
DIFFUSION DE PRINCIPES ACTIFS A VISEE THERAPEUTIQUE**

Jury

Rapporteurs : Pr. BAILLET-GUFFROY Arlette ;

Dr. SCHOOT Bernard ;

Examinateurs : Pr. AUBARD Jean ;

Pr. BERNARD Philippe ;

Dr. HADJUR Christophe ;

Directeurs de thèse : Pr. MANFAIT Michel. ;

Dr. PIOT Olivier ;

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Pr. Michel Manfait

Je vous remercie très sincèrement de m'avoir accueilli dans votre équipe depuis mon DEA. La confiance que vous m'avez accordée pendant ces quatre années m'a permis de progresser rapidement. Je voudrais vous remercier également pour m'avoir donné l'occasion à de multiples reprises de présenter mes travaux dans des congrès internationaux.

Soyez assuré de toute mon estime et de mon profond respect.

A Madame le Pr. Arlette Baillet-Guffroy

Je vous suis très reconnaissant de me faire l'honneur de prendre connaissance de mon travail de thèse et d'en être rapporteur. Veuillez accepter mes plus vifs remerciements pour votre présence dans ce jury et soyez assurée de tout mon respect et de ma profonde gratitude.

A Monsieur le Dr. Bernard Schoot

Je suis très touché de l'honneur que vous me faites en acceptant de juger ce travail et d'en être le rapporteur. Je vous remercie de l'intérêt que vous portez à ce travail et du temps consacré à le lire et le juger. Veuillez accepter l'expression de ma profonde reconnaissance.

A Monsieur le Dr. Christophe Hadjur

Je vous remercie très sincèrement de me faire l'honneur d'accepter de siéger parmi les membres du jury. J'espère également que nous pourrons mettre en commun notre savoir-faire en spectroscopie et en traitement des données spectrales. Veuillez croire en l'expression de ma gratitude.

A Monsieur le Pr. Jean Aubard

Je suis très sensible à l'honneur que vous me faites d'accepter d'examiner mon travail et de siéger parmi les membres du jury.

Je suis très heureux que ce travail puisse être jugé par votre autorité scientifique.

A Monsieur le Pr. Philippe Bernard

Je vous adresse mes remerciements les plus respectueux pour avoir accepter d'examiner mon travail.

Je suis particulièrement honoré de votre présence dans ce jury de thèse

A Olivier Piot

Les remerciements exprimés ici ne seront jamais à la hauteur de ton implication dans ce travail. Je t'exprime toute ma reconnaissance pour ton aide, tes conseils, ton soutien sans limite, ton humour, ta disponibilité, ta confiance en moi, ton dynamisme, et surtout tes qualités humaines. Soit assuré, Olivier, de tout mon respect et de ma profonde gratitude.

Je voudrais remercier le Dr. Franck Pitré et le Dr. Isabelle Pellisson du département de Recherche et Développement de Galderma (Sophia-Antipolis). J'espère que la collaboration avec l'unité MéDIAN initiée dans le cadre de ce travail, va se développer davantage.

Je tiens à remercier les membres du service de Dermatologie du CHU de REIMS pour leur collaboration.

A Florence Draux, "Ma prof de français", merci de m'avoir supporté dans le bureau. Un grand merci pour ta grande sincérité, tes qualités humaines, ton caractère et surtout pour ton amitié. Florence, je n'oublierai jamais le grand soutien que vous m'avez apporté avec Gaël surtout pendant l'été 2006. La preuve de courage que tu montres depuis deux ans ne fait qu'augmenter mon respect à ton égard ; tu mérites le meilleur.

A Franck Bonnier, "Mon coach sportif", je tiens à te remercier pour ton humour, tes idées de détente et ton amitié. Franck, on a commencé ensemble "à ramer dans cette galère" et on s'en sortira ensemble.

A Emmanuelle Corbé-Guillard, un grand merci pour ton grand cœur, pour ta sympathie et ton amabilité.

A Nadia et Céline, un grand merci pour votre humour, votre bonne humeur, et les longs moments de réflexions "scientifiques" pendant les pauses café.

Je remercie aussi Cyril Gobinet pour son aide précieuse sur les traitements statistiques des données.

Je remercie également le Dr. Abdelilah Beljebbar pour son aide et ses précieux conseils.

A Greg, Mohamed, Linda, Rolf, Ganesh, Victoria, Elodie, Karine, Emilie, Mme Pisani et à tous les étudiants, stagiaires et permanents de l'unité MéDIAN. Je vous remercie pour votre aide et pour m'avoir permis de réaliser mon travail dans des bonnes conditions.

Je voudrais saluer mes amis sportifs, et en particulier Céline, Olivier. Je vous remercie de m'avoir aidé "à tenir la cadence" ces derniers mois. Je voudrais remercier aussi mes amis "moins sportifs" Ali, ali et ali, Houssein, Abir, Claudia, Tom, Morena, Annachiara ... et tous les Erasmus pour la bonne ambiance à la résidence.

Je crie un très grand merci à mon père **Mounir**, ma mère **Naziha**, mes sœurs **Hala, Sana** et **Hana** et mon frère **Walid** ; qui ont sacrifié ce qui est le plus cher à leur cœur pour que je puisse arriver là.

Merci pour votre amour sans limite, et votre confiance sans faille.

Je n'oublierai pas de couper le diplôme en morceaux pour vous donner les parts qui vous reviennent de droit.

A tous, merci.

RESUME

La peau est l'organe le plus exposé du corps humain. Elle protège le corps des agents exogènes et représente la première cible des agressions externes. De par son accessibilité et la grande diversité des lésions cutanées, la peau représente un domaine d'investigation particulièrement intéressant.

Les spectroscopies vibrationnelles sont des techniques non-destructives qui permettent d'accéder à des informations d'ordre moléculaire et structural très spécifiques de l'échantillon étudié, et ceci sans préparation particulière de l'échantillon ni utilisation de marquage.

Les études spectrales peuvent être menées à diverses échelles. En effet, à partir de coupes fines de biopsies paraffinées, nous avons montré le potentiel des spectroscopies infrarouge et Raman pour le diagnostic différentiel mélanome (lésion maligne) / naevus (lésion bénigne). Ces travaux ont porté, en grande partie, sur le développement de techniques de traitement des données (analyses statistiques multivariées) pour l'extraction de marqueurs spectroscopiques discriminants. L'analyse des cancers cutanés a été étendue aux approches *in-vivo*, au niveau de patients pris en charge au service de Dermatologie du CHU de Reims, pour des lésions de type carcinome basocellulaire.

A partir de blocs de peau excisée, l'utilisation de la microspectroscopie Raman a permis d'extraire des informations du stratum corneum et de l'épiderme en maintenant la peau dans des conditions de viabilité. Ce montage a également permis d'étudier la diffusion de principes actifs à travers la peau. Les valeurs expérimentales manquant de précision à cause des phénomènes de réfraction des rayons lumineux (laser et Raman), ont pu être corrigées au moyen de modèles mathématiques. Ces derniers tiennent compte des particularités optiques de l'échantillon et des caractéristiques instrumentales (objectifs, ouverture confocale du microscope).

Au niveau cellulaire, l'analyse SERS (Surface Enhanced Raman Scattering) a été développé pour étudier la distribution de principe actif au niveau de cellules vivantes, isolées, de type mélanocyte.

ABSTRACT

The skin is directly exposed to different exogenous agents. It covers and protects the surface of the human body by providing a barrier function against exogenous agents. The direct accessibility and the high diversity of cutaneous lesions and cancers make the skin an interesting field of investigations.

Vibrational spectroscopies are rising and powerful non-destructive techniques that detect characteristic molecular vibrations. In this work, we used vibrational spectroscopies, first, to create a spectral database to index vibration peaks and bands of the skin. Second, we combined these techniques with multivariate statistical tools to discriminate between pigmented nevi and malignant melanomas on paraffin embedded skin samples.

When combined to a confocal aperture, Raman spectroscopy allows information to be obtained from deep layers under the skin surface. This enabled us, in the third part of the thesis, to follow up the diffusion of a drug through the skin. To have more accurate estimation of the depth of repartition of the drug under the skin, we used mathematical corrections developed on the basics of optical laws of refraction.

In addition to the previous works, we present here the feasibility of *in-vivo* clinical application of Raman spectroscopy.

Finally, we showed the potential of surface enhanced Raman spectroscopy to detect medicaments inside single cells from cell cultures.

Ces travaux ont fait l'objet des publications et communications suivantes :

Articles de revues :

TFAYLI A., PIOT O., MANFAIT M. Confocal Raman microspectroscopy on excised human skin: uncertainties in depth profiling and mathematical correction applied to dermatological drug permeation, **Journal of Biophotonics**, Vol. 1, pages 1-14

TFAYLI A., PIOT O., DRAUX F., PITRE F., MANFAIT M. Molecular characterization of reconstructed skin model by Raman microspectroscopy: comparison with excised human skin. **Biopolymers**, Vol. 87, Issue 4 , pages 261-274

TFAYLI A., PIOT O., PITRE F., MANFAIT M. Follow-up of drug permeation through excised human skin with confocal Raman microspectroscopy. **European Biophysical Journal**, 2007, Vol. 36, Issue 8 , pages 1049-1058

VRABIE V., GOBINET C., PIOT O., TFAYLI A., BERNARD P., HUEZ R., MANFAIT M., Independent component analysis of Raman spectra: Application on paraffin-embedded skin biopsies. **Biomedical Signal Processing and Control**, Vol. 2, Issue 1, 2007, pages 40-50

TFAYLI A., PIOT O., DERANCOURT S., BERNARD P., MANFAIT M. In vivo Raman analysis of human skin lesions. **SPIE-The International Society of Optical Engineering, SPIE Newsroom**, 2006, 10.1117/2.1200604.0215

TFAYLI A., PIOT O., DURLACH A., BERNARD P., MANFAIT M. Discriminating nevus and melanoma on paraffin-embedded skin biopsies using FTIR microspectroscopy. **Biochim. Biophys. Acta**, 2005, 1724(3): 262-269

Articles de congrès:

TFAYLI A., PIOT O., DERANCOURT S., CADIOT G., DIEBOLD M.D., BERNARD P., MANFAIT M. In vivo analysis of tissue by Raman microprobe: examination of human skin lesions and esophagus Barrett's mucosa on an animal model. **Proceedings of SPIE Volume 6093**

Biomedical Vibrational Spectroscopy III: Advances in Research and Industry, Anita Mahadevan-Jansen, Wolfgang H. Petrich, Editors, 609312 (Feb. 27, 2006)

TFAYLI A., PIOT O., RUBIN S., BONNIER F., SOCKALINGUM G., DERANCOURT S., BERNARD P., MANFAIT M. A portable Raman Probe for *in vivo* pathological tissues characterisation. In **Proceeding the 6th IFAC Symposium on Modelling and Control in Biomedical Systems of MCBM06**, Reims, 2006.

GOBINET C., VRABIE V., TFAYLI A., PIOT O., R. HUEZ., MANFAIT M. Preprocessing and source separation methods for Raman spectra analysis of biomedical samples. In **Proceedings of the 29th annual conference of the IEEE engineering in medicine and biology societies** (IEEE EMBC'2007) Lyon, France 23-26 august 2007, pp: 6207-6210.

VRABIE V., HUEZ R., GOBINET C., PIOT O., TFAYLI A., MANFAIT M. On the modelling of paraffin through Raman spectroscopy. In *Proceedings of the 6th IFAC Symposium on Modelling and Control in Biomedical Systems MCBMS06*, 2006, Reims France.

GOBINET C., TFAYLI A., PIOT O., VRABIE V., R. HUEZ. A method of digital deparaffining based on Raman spectroscopy and Independent Component Analysis - Application to melanoma early diagnosis. In *Proceedings of the 3rd European Medical & Biological Engineering Conference* (EMBEC'05 Prague, Czech Republic) (Jiri Hozman, Peter Kneppo Eds) 2005, Vol. 11: 3688-3693

GOBINET C., TFAYLI A., PIOT O., VRABIE V., HUEZ R. Independent Component Analysis and Raman spectroscopy on paraffinised non dewaxed cutaneous biopsies: A promising methodology for melanoma early diagnosis. In *Proceedings of the First International Workshop on Biosignal Processing and Classification* (BPC 2005 Barcelona, Spain), 2005.

Communications orales

PIOT O., SOCKALINGUM G.D., TFAYLI A., BONNIER F., WOLTHUIS R., MANFAIT M., Vibrational microspectroscopies and spectral imaging in biomedical applications. *12th European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules (ECSBM)*, septembre 2007, Paris.

TFAYLI A., GOBINET C., PIOT O., VRABIE V., HUEZ R., DURLACH A., BERNARD P., MANFAIT M., Melanoma characterisation on paraffinised biopsies with Raman spectroscopy and independent component analysis. *International Workshop on Data Analysis and Biospectroscopy*, Dataspec 2005, Reims.

PIOT O., TFAYLI A., BERNARD P., MANFAIT M. Caractérisation des lésions de la peau par microspectroscopie vibrationnelle: classification et approche moléculaire. *OPTDIAG 2004 Diagnostic et Imagerie Optique en Médecine / Biologie*, Mai 2004, Paris.

Communications par poster

TFAYLI A., PIOT O., DRAUX, F., PITRE, F., MANFAIT M., Characterization of reconstructed epidermis model by Raman spectroscopy: comparison with excised human skin. *12th European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules (ECSBM)*, septembre 2007, Paris.

DRAUX F., JEANNERESSEN P., BELJEBAR A., TFAYLI A., FOURRE N., MANFAIT M., SULE-SUSO J., SOCKALINGUM G.D., Raman Microspectroscopy of single alive lung cancer cells. A feasibility study. *12th European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules (ECSBM)*, septembre 2007, Paris.

GUILLARD E. CORBE; LAUGEL C.; MERLE C.; BAILLET-GUFFROY A.; TFAYLI A.; PIOT O.; MANFAIT M., Spectral monitoring of photoirradiated skin lipids: MS, IR and Raman approaches: 009. *The stratum corneum V conference*. July 2007, Cardiff, United Kingdom.

M. MANFAIT, F. DRAUX, J. SULE-SUSO, N. FOURRE, A. TFAYLI, P. JEANNERESON, G. D. SOCKALINGUM. Raman Microspectroscopy of single *in-vitro* Growing Lung Cancer Cells, *First Asian Spectroscopy Conference and Asian Biospectroscopy Conference (ASC-2007)*, Department of Inorganic and Physical Chemistry, Indian Institute of Science, janvier 2007, Bangalore, Inde

TFAYLI A., PIOT O., PITRE F., MANFAIT M. Drug penetration through human skin assessed by confocal Raman microspectroscopy. *Skin and Formulation 2nd Symposium (Apqi)*, octobre 2006, Versailles, France

TFAYLI A., PIOT O., PITRE F., MANFAIT M. Follow-up of drug penetration through human skin with Raman confocal spectroscopy. *20^{ème} congrès de la société française de biophysique (SFB)*, octobre 2006, Anglet, France.

TFAYLI A., PIOT O., CADIOT G., DIEBOLD M.D., DERANCOURT S., BERNARD P., MANFAIT M. In vivo analysis of tissue by Raman microprobe: examination of human skin lesions and oesophagus Barrett's mucosa on an animal model. *Photonics West – Biomedical Optics*, January 2006, San Jose (USA).

DRAUX F., FOURRE N., TFAYLI A., JEANNERESON P., MANFAIT M., SULE-SUSO J., SOCKALINGUM G. Micro-Raman Spectroscopy of *In vitro* Growing Single Lung Cancer Cells. *SPEC conference*, mai 2006, Heidelberg, Allemagne.

TFAYLI A., PIOT O., WOLTHUIS R., DERANCOURT S., CADIOT G., DIEBOLD M.D., BERNARD P., MANFAIT M. *In vivo* examination of human skin lesions and oesophagus Barrett's mucosa on an animal model, *SPEC conference*, mai 2006, Heidelberg, Allemagne.

TFAYLI A., PIOT O., DURLACH A., BERNARD P., MANFAIT M. Discriminating nevus and melanoma on paraffin embedded skin biopsies using FTIR microspectroscopy. *11th European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules (ECSBM)*, septembre 2005, Aschaffenburg, Allemagne.

LISTE DES ABREVIATIONS

- **ACP** : Analyse en Composantes Principales.
- **ADN** : Acide Désoxyribonucléique.
- **ARN** : Acide Ribonucléique.
- **BSS** : Blind Source Separation.
- **BCC** : Carcinome Basocellulaire.
- **CCD** : Charged Coupled Device.
- **CSLM** : Microscopie Confocale.
- **DMEM** : Dulbecco's Modified Eagle's Medium.
- **DMSO** : Dimethyl Sulfoxide.
- **EC** : Communauté Européenne.
- **EM** : Microscopie Electronique.
- **EMSC** : Extended Multiplicative Signal Correction.
- **HCA** : Analyse Hiérarchique en Cluster.
- **IC50** : Half Maximal Inhibitory Concentration.
- **ICA** : Analyse en Composantes Indépendantes.
- **IRM** : Imagerie par Résonance Magnétique.
- **IRTF** : Infrarouge à Transformée de Fourier.
- **ISO** : International Organisation for Standardisation.
- **LDA** : Analyse Discriminante Linéaire.
- **MCT** : Mercure Cadmium Telluride.
- **MSC** : Multiplicative Signal Correction.
- **NCLS** : Nonnegatively Constrained Least Square.
- **OCT** : Optical Coherence Tomography.
- **OECD** : Organisation for Economic Co-operation and Development.
- **ON / NA** : Ouverture numérique.
- **PBS** : Phosphate Buffer Solution.
- **PET** : Polyéthylène Terephlate.
- **Phe** : Phénylalanine.
- **REACH** : Registration, Evaluation and Autorisation of Chemicals.
- **SAXS** : Small Angle X-ray Scattering.
- **SDS** : Sodium Dodecyl Sulfate.
- **SCCNFP** : Comité Scientifique des Produits Cosmétiques et des Produits non Alimentaires.
- **SERS / DRES** : Diffusion Raman Exaltée de Surface.
- **SNV** : Normalisation Vectorielle Standard.
- **TPFM** : Microscopie à Deux Photons.
- **Trp** : Tryptophane.
- **Tyr** : Tyrosine.
- **UV** : Ultra Violet.

LISTE DES FIGURES

Figure Ch.I.01 : Schéma descriptif de la peau	18
Figure Ch.I.02 : évolution des keratinocytes à travers les différentes couches de l'épiderme	21
Figure Ch.I.03 : Image colorée présentant l'épiderme (1), et les deux sous-couches du derme : le stratum réticulaire (2) et le stratum papillaire (3).....	24
Figure Ch.I.04 : Diagramme de Jablonski.....	31
Figure Ch.I.05 : Modes de vibration de molécules polyatomiques.....	35
Figure Ch.I.06 : Description du microspectromètre Raman	38
Figure Ch.I.07: Imageur Infrarouge spectrum spotlight 300	40
Figure Ch.I.08 : Spectres des différentes couches de la peau, stratum corneum (en noir), de l'épiderme (en bleu) et du derme (en rouge). a : dans la gamme spectrale 450-1810 cm ⁻¹ , b : dans la gamme spectrale 2750-3060 cm ⁻¹ . Ses spectres sont réalisés sur des coupes de peau congelée.....	42
Figure Ch.I.09: représentation schématique des vibrations moléculaires des lipides, des protéines. a : liaisons peptidiques des protéines. La bande Amide I résulte principalement des étirements du groupement C=O. La bande Amide III est plus complexe impliquant l'étirement des liaisons C-R et C-N ensemble avec une déformation du CNH. b : représentation des conformations <i>trans</i> - et <i>gauche</i> - . Ces conformations sont présentes pour les liaisons C-S et S-S. c : étirement symétrique et asymétrique des liaisons C-H. d : vibrations $\delta(\text{CH}_2)(\text{CH}_3)$. e : chaîne acyl en conformation <i>trans</i> (1) et <i>gauche</i> (2).	49
Figure Ch.II.1 : Evolution de l'incidence et de la mortalité par mélanome en France (Remontet et al. 2003).....	63
Figure Ch.II.2 :Taux comparatif de mortalité par mélanome en 1998-2000 (ORS 2003).....	64
Figure Ch.II.03 : Images pseudo-couleurs d'une coupe de naevus. a : sans prétraitement par EMSC. b : avec prétraitement par EMSC.	95
Figure Ch.II.04: coupe de mélanome. a : Image visible. b : Répartition de l'absorbance totale de l'image brute. c : Reconstruction d'image en pseudo- couleur à partir de clusters.....	96
Figure Ch.II.05 : Image pseudo-couleurs montrant les spectres groupés dans le cluster "épiderme"	97
Figure Ch.II.06: Classification selon les bandes (1200-1215) (1270-1290) (1325-1350) (1390-1410 cm ⁻¹) des spectres de l'épiderme	97

Figure Ch.III.01 : Représentation schématique de l'effet du trou confocal. En bloquant le passage des faisceaux provenant des points A et B, il permet d'améliorer la résolution axiale en limitant le signal provenant du point de focalisation C	124
Figure.Ch.III.02. Déviation de la lumière suite au changement d'indice de réfraction	124
Figure.Ch.III.03. a, b : Peau fixée sur la cellule de Franz par "couture en peau de tambour".....	125
Figure Ch.IV.01 : Schéma de principe d'un spectromètre axial	200
Figure Ch.IV.02 : Dessin d'un spectromètre axial Jobin Yvon	201
Figure Ch.IV.03 : Couplage du spectromètre à une fibre optique	201
Figure Ch.V.01 : Comparaison des spectres Raman de la solution du CD5829 à différentes concentrations après dilution dans le DMSO	228
Figure Ch.V.02 : Comparaison des spectres SERS de la solution du CD5829 à différentes concentrations.....	229
Figure Ch.V.03 : Comparaison des spectres SERS corrigés	229
Figure Ch.V.05 : a : Photo d'une cellule MnT-1 traitée par le CD5829. b : spectres SERS mesurées en différents points de la cellule.....	231
Figure Ch.V.06 : Spectres SERS issus d'une image spectrale sur une cellule MnT-1	232

LISTE DES TABLEAUX

Tableau Ch.I.01 : attribution des raies Raman du stratum corneum, de l'épiderme et du derme	43
Tableau Ch.I.02 : attribution des raies Raman spécifiques aux protéines de la peau	47
Tableau Ch.I.03 : attribution des raies Raman spécifiques aux lipides de la peau	52
Tableau Ch.I.04 : attribution des raies Raman spécifiques aux polysaccharides de la peau ...	54
Tableau Ch.I.06 : attribution des raies Raman spécifiques aux pigments de la peau	54
Tableau Ch.I.05 : attribution des raies Raman spécifiques aux acides nucléiques de la peau .	55
Tableau Ch.I.07 : Détermination de la structure secondaire des protéines à l'état solide (a et b)	56
Tableau Ch.I.08 : Quelques bandes d'absorption IR attribués aux vibrations des protéines ...	57
Tableau Ch.I.09 : Quelques pics d'absorption des phospholipides.....	57
Tableau Ch.I.10 : Bandes d'absorption IR des polysaccharides complexes.....	58
Tableau Ch.I.11 : Principales bandes d'absorption IR de l'ADN	58
Tableau Ch.II.01 : Le soleil et le mélanome (Grob et al. 2004).....	65
Tableau Ch.II.02 : Situations difficiles pour le diagnostic histologique de mélanome (Grob et al. 2004).....	68
Tableau Ch.II.03 : Corrélations entre l'indice de Breslow et la survie à 5 ans (Grob et al. 2004)	69
Tableau Ch.II.04 : profondeur d'invasion en niveaux de Clark et Mihm	69
Tableau Ch.V.01 : Principales bandes Raman et SERS du CD5829 en solution (dans le DMSO pour les mesures Raman et ensuite diluée au millième dans le PBS pour les mesures en SERS)	230

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS.....	2
RESUME.....	5
LISTE DES ABREVIATIONS	10
LISTE DES FIGURES.....	11
LISTE DES TABLEAUX.....	13
SOMMAIRE	14
CHAPITRE I : GENERALITES : LA PEAU ET LES SPECTROSCOPIES VIBRATIONNELLES	17
Ch.I.1 : Description histologique et moléculaire de la peau	18
L'épiderme: (Tortora et al.; Braun-Falco et al. 1991; Burkitt et al. 1993; Schmitt 1997; Dubois 2001; Grob et al. 2004).....	20
<i>Couche basale :</i>	21
<i>Couche épineuse :</i>	22
<i>Couche granuleuse :</i>	22
<i>Couche claire :</i>	22
<i>Couche cornée :</i>	22
<i>Kératinisation de l'épiderme :</i>	23
Derme: (Tortora et al.; Braun-Falco et al. 1991; Burkitt et al. 1993; Schmitt 1997; Dubois 2001; Grob et al. 2004).....	24
<i>Stratum papillaire :</i>	24
<i>Stratum réticulaire :</i>	25
Les pigments de la peau:	25
Les cancers de la peau:.....	26
<i>Les carcinomes:</i>	26
<i>Les mélanomes:</i>	26
Ch.I.2 : Méthodes de mesure appliquées à la peau	27
Caractérisation des constituants cutanés :	27
Etudes de pénétration cutanée:	28
Méthodes utilisées pour détecter les cancers cutanés:	29
Ch.I.3 : Spectroscopies vibrationnelles et la peau.....	30
Ch.I.4 : Principe de la spectroscopie vibrationnelle.....	31
Approche quantique (<i>énergie d'une molécule quantifiée en niveaux</i>).....	31
<i>Spectroscopie infrarouge</i>	32
<i>Spectroscopie de diffusion Raman</i>	33
Approche classique	34
<i>Absorption infrarouge</i>	36
<i>Diffusion Rayleigh</i>	36
<i>Diffusion Raman</i>	36
Règle de sélection.....	36
Ch.I.5 : Instrumentation	38
Spectromètre Raman, Labram.....	38
Imageur infrarouge, Spectrum Spotlight300.....	40
Ch.I.6 : Applications en dermatologie des spectroscopies vibrationnelles	41
Caractérisation de la peau par spectroscopie de diffusion Raman	41
<i>Protéines de la peau</i>	46
<i>Lipides de la peau</i>	52
<i>Les sucres de la peau</i>	54
<i>Pigments de la peau</i>	54
<i>Autres entités moléculaires de la peau</i>	55

Spectroscopie infrarouge.....	56
<i>Les protéines</i>	56
<i>Les lipides</i>	57
<i>Les polysaccharides</i>	58
<i>Les acides nucléiques</i>	58
CHAPITRE II : DISCRIMINATION MELANOME – NAEVUS : ANALYSE DE COUPES TISSULAIRES PARAFFINEES	59
Ch.II.1 : Introduction.....	60
Ch.II.2 : Généralités	63
Epidémiologie des mélanomes:.....	63
<i>Incidence et mortalité</i>	63
<i>Le rôle de l'environnement : l'exposition solaire</i>	64
<i>La prédisposition familiale, les facteurs génétiques (Carli et al. 2004; Grob et al. 2004; Lipsker et al. 2005)</i>	65
<i>Les marqueurs de risque de mélanome (Grob et al. 2004; Lipsker et al. 2005)</i>	65
Diagnostic des mélanomes:.....	66
<i>Diagnostic positif</i>	66
<i>Diagnostic différentiel (Saiag et al. 2002; Grob et al. 2004; Lipsker et al. 2005)</i>	68
Pronostic des mélanomes:	69
<i>Pronostic au stade primaire de la tumeur primitive (Saiag et al. 2002; Grob et al. 2004)</i>	69
<i>Pronostic au stade des métastases en transit et/ou ganglionnaires régionales (Grob et al. 2004)</i>	69
<i>Pronostic au stade métastatique à distance (Grob et al. 2004)</i>	70
Traitement :	70
Ch.II.3 - Discrimination mélanome/naevus sur tissus paraffinés: analyse par microspectroscopie infrarouge	71
Article I: Discriminating nevus and melanoma on paraffin embedded skin biopsies using FTIR microspectroscopy	71
Discrimination mélanome/naevus par microspectroscopie infrarouge : analyse statistique multivariée par technique non supervisée	88
Ch.II.4 – Déparaffinage numérique du signal Raman et discrimination entre mélanome et naevus sur tissus paraffinés.	99
Ch.II.4 Article II: Digital dewaxing of Raman signal: discrimination between nevi and melanomas from paraffin embedded skin biopsies	99
Ch.II.5 – Perspectives.....	117
CHAPITRE III : ETUDES DE PENETRATIONS ET DE PERMEATIONS CUTANÉES PAR MICROSPECTROSCOPIE RAMAN CONFOCALE	118
Ch.III.1 : Introduction	119
Ch.III.2 : Matériels et méthodes.....	125
Ch.III.3 – Suivi de pénétration du Métronidazole à travers la peau excisée par microspectroscopie Raman confocale	126
Article 3: Follow-up of drug permeation through excised human skin with confocal Raman microspectroscopy	126
Ch.III.4 – Caractérisation moléculaire par microspectroscopie Raman d'un modèle de peau reconstruite Episkin®: étude comparative avec un échantillon de peau humaine excisée, suivi de la diffusion d'un principe actif à travers l'épiderme	147
Article 4. Molecular characterization of reconstructed skin model by Raman microspectroscopy: comparison with excised human skin	147
Ch.III.5 – Correction de l'estimation de la profondeur par microscopie confocale Raman	173

Article 5. Confocal Raman microspectroscopy on excised human skin: uncertainties in depth profiling and mathematical correction applied to dermatological drug permeation	173
Ch.III.6 – Perspectives	198
CHAPITRE IV : APPLICATION DE LA SPECTROSCOPIE RAMAN IN VIVO EN MILIEU CLINIQUE : DISCRIMINATION DES LESIONS CUTANEES	199
Ch.IV.1 : Introduction	200
Ch.IV.2 : Description du spectromètre axial (Figure Ch.IV.1).....	200
Ch.IV.3 : Proceeding of SPIE : In vivo analysis of tissue by Raman microprobe: examination of human skin lesions and esophagus Barrett's mucosa on an animal model	202
Ch.IV.4 : Améliorations techniques et perspectives	220
CHAPITRE V : ANALYSE SERS A L'ECHELLE CELLULAIRE : DETECTION D'UN PRINCIPE ACTIF DEPIGMENTANT AU NIVEAU DES CELLULES CUTANEES DE TYPE MELANOCYTES.....	221
Ch. V.1 : Introduction	222
Ch. V.2 : Généralités	222
Pigmentation cutanée: (Lin et al. 2007; Agache)	222
<i>La mélanine</i>	222
<i>Unité épidermique de mélanisation</i>	223
<i>Le rôle photoprotecteur de la mélanine</i>	223
<i>Désordres hyperpigmentaires</i>	224
Diffusion Raman exaltée de surface (SERS) :	225
Les colloïdes	225
Ch. V.3 : Matériels et Méthodes	226
Principe Actif utilisé.....	226
Système biologique :	226
<i>Lignée cellulaire</i>	226
<i>Conditions de culture</i>	226
La microspectroscopie SERS :	227
<i>Préparation du colloïde</i>	227
<i>Instrumentation</i>	227
<i>Acquisition des spectres Raman et SERS</i>	227
Ch. V.3 : Résultats et discussion	228
Vérification de la limite de sensibilité de détection en Raman conventionnelle :	228
Vérification de la limite de sensibilité de détection en SERS :	229
Détection du CD5829 au niveau des mélanocytes :	231
<i>Imagerie spectrale</i>	232
Ch. V.4 : Conclusion	233
CONCLUSION GENERALE	234
REFERENCES	238

CHAPITRE I

GENERALITES : LA PEAU ET LES SPECTROSCOPIES VIBRATIONNELLES



Ch.I.1 : Description histologique et moléculaire de la peau

La peau forme le revêtement continu externe du corps, ou tégument. C'est l'organe le plus volumineux de l'organisme, avec une surface d'environ 2 m² chez l'adulte, et un poids de 4,5 à 5 kg.

Dans les différentes régions du corps, la peau varie par son épaisseur, sa couleur et la présence de poils, de glandes et d'ongles. En dépit de ces différences qui traduisent des besoins fonctionnels variés, tous les types de peau présentent la même structure de base (figure Ch.I.01).

La partie superficielle, la plus mince, est constituée par un épithélium malpigien kératinisé, l'épiderme (épi = sur), dont l'épaisseur varie selon les contraintes et les conditions de déshydratation auxquelles il est soumis.

La partie la plus profonde et la plus épaisse est composée de tissu conjonctif fibro-élastique nourricier, le derme. Le derme est très vascularisé et contient de nombreux récepteurs sensoriels. Il surmonte la couche sous-cutanée, l'hypoderme (hypo = au dessous), qui n'appartient pas à la peau proprement dite. Aussi appelé fascia superficiel, l'hypoderme est composé de tissu aréolaire et de tissus adipeux. Des fibres issues du derme unissent la peau à l'hypoderme et celui-ci se rattache à son tour aux tissus et aux organes sous-jacents. L'hypoderme sert de réserve de tissu adipeux et contient de gros vaisseaux sanguins qui irriguent la peau (Tortora et al.; Braun-Falco et al. 1991; Burkitt et al. 1993; Dubois 2001; Grob et al. 2004).

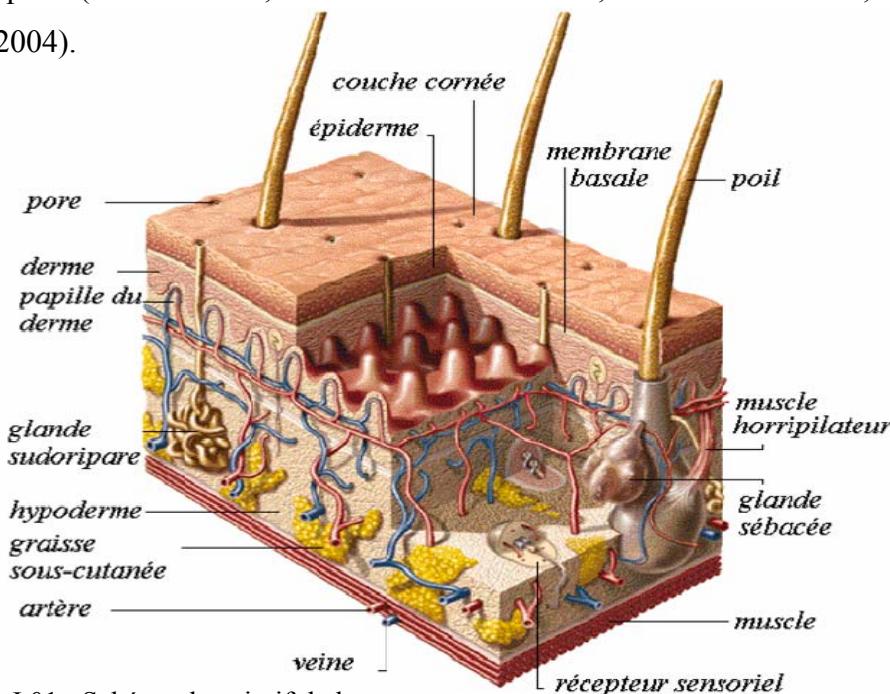


Figure Ch.I.01 : Schéma descriptif de la peau

Les fonctions essentielles de la peau sont (Tortora et al.; Braun-Falco et al. 1991; Dubois 2001; Grob et al. 2004):

- **Protection et fonction barrière:** La peau recouvre le corps et constitue une barrière physique, chimique et biologique. Au point de vue physique, la peau protège les tissus sous-jacents de l'abrasion ; les kératinocytes fermement imbriqués font obstacle aux microbes présents sur la surface de la peau. Les lipides libérés par les granules lamellés ralentissent l'évaporation de l'eau de la surface de la peau et protègent ainsi l'organisme contre la déshydratation ; ils empêchent l'entrée de l'eau dans la peau lorsque nous nageons ou prenons une douche. Le sébum huileux produit par les glandes sébacées prévient l'assèchement de la peau et des poils et contient des substances qui détruisent les bactéries présentes à la surface. La mélanine offre une protection contre les effets nocifs des rayonnements ultraviolets. Les fonctions de protection à caractère biologique relèvent des cellules de Langerhans de l'épiderme et des macrophages du derme. Les premiers signalent au système immunitaire la présence de microbes potentiellement nuisibles, tandis que les seconds phagocytent les bactéries et les virus qui ont réussi à pénétrer la surface de la peau (Burkitt et al. 1993).
- **Sensibilité :** La peau est l'organe sensoriel le plus étendu du corps et renferme des récepteurs très variés pour le toucher, la pression, la douleur et la température.
- **Thermorégulation :** Chez l'homme, la peau est le principal organe responsable de la thermorégulation. Le corps est protégé contre les déperditions caloriques par les poils et les tissus sous-cutanés adipeux. La déperdition de chaleur est facilitée par l'évaporation de la sueur à partir de la surface cutanée et par l'accroissement du débit sanguin dans le riche réseau capillaire du derme.
- **Fonctions métaboliques :** Le tissu adipeux sous-cutané est une réserve importante d'énergie, essentiellement sous la forme de triglycérides. La vitamine D est synthétisée dans l'épiderme et complète celle d'origine alimentaire.

La peau est aussi, et peut être **surtout**, un véritable média qui transmet à l'organisme les informations provenant du milieu environnant. C'est encore par elle que s'exprime, entre autres, nombre de manifestations venues du cerveau : l'émotion, la peur, par exemple.

Capteur, émetteur, protecteur, l'organe -peau a aussi un rôle social puisqu'il est le siège de l'apparence. C'est **la première image que l'on donne de soi**, le premier contact physique que l'on a avec une personne (en se serrant la main, par exemple). Voilà pourquoi l'Homme lui a depuis toujours attaché beaucoup d'importance (Dubois 2001).

Les structures histologiques de la peau sont :

L'épiderme: (Tortora et al.; Braun-Falco et al. 1991; Burkitt et al. 1993; Schmitt 1997; Dubois 2001; Grob et al. 2004)

L'**épiderme** est un épithélium pavimenteux kératinisé. Les quatre principaux types de cellules qui le constituent sont des kératinocytes, les mélanocytes, les cellules de Langerhans et les cellules de Merkel :

- Les **kératinocytes** (*keras* = corne ; *kytos* = cellule) constituent 90% des cellules épidermiques ; ils sont caractérisés par la production de la **kératine**. La kératine est une protéine fibreuse, imperméable et résistante qui protège la peau et les tissus sous-jacents contre la chaleur, les microorganismes et les substances chimiques.
- Les **mélanocytes** (*melas* = noir) constituent environ 8 % des cellules épidermiques et élaborent la mélanine. Leurs prolongements longs et minces s'insinuent entre les kératinocytes et leur transfèrent des granules de mélanine. La **mélanine** est un pigment brun foncé qui colore la peau et absorbe les rayonnements ultraviolets (UV) nocifs. Une fois parvenus à l'intérieur des kératinocytes, les granules de mélanine s'agglutinent pour former un voile protecteur sur la face du noyau qui est tournée vers le milieu extérieur ; ils mettent ainsi l'ADN nucléaire à l'abri des rayonnements ultraviolets.
- Les **cellules de Langerhans**, considérées comme des macrophages intraépidermiques, constituent une faible proportion des cellules de l'épiderme. Elles participent à la défense de l'organisme contre les microbes qui envahissent la peau, et elles sont très sensibles aux rayonnements ultraviolets.
- Les **cellules de Merkel** sont des récepteurs sensoriels qui interviennent dans les sensations tactiles. Ce sont les cellules les moins nombreuses de l'épiderme. Elles sont situées dans la couche la plus profonde de l'épiderme.

L'épiderme se subdivise en plusieurs couches (figure Ch.I.02). Dans la plupart des régions du corps, il en compte quatre, soit la couche basale, la couche épineuse, la couche granuleuse et la couche cornée, très mince. Aux endroits exposés à une friction intense, le bout des doigts, la paume des mains et la plante des pieds, par exemple, l'épiderme comprend une cinquième couche, la couche claire, située entre la couche granuleuse et la couche cornée.

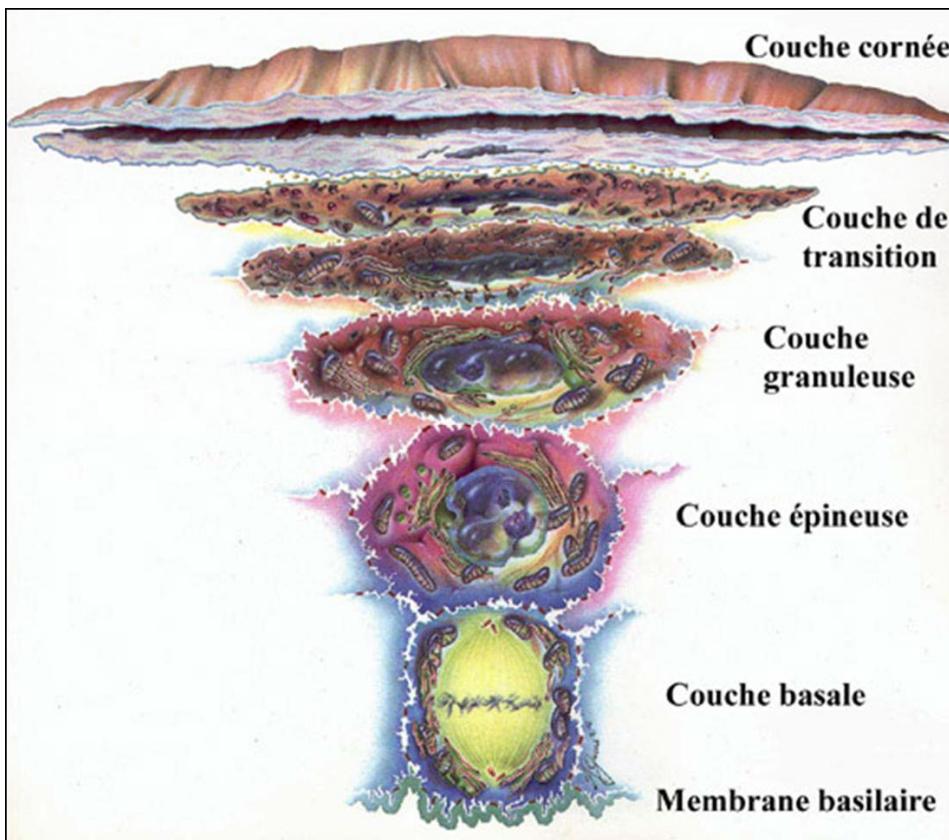


Figure Ch.I.02 : évolution des keratinocytes à travers les différentes couches de l'épiderme

Voyons les caractéristiques de chacune de ces couches.

Couche basale :

La **couche basale**, ou stratum basale ; est la couche la plus profonde de l'épiderme. Elle comprend une rangée de kératinocytes prismatiques ou cuboïdes ; certaines de ces cellules sont des cellules souches qui se divisent pour produire sans cesse de nouveaux kératinocytes. Aussi la couche basale est-elle parfois appelée couche germinative, ou stratum germinativum. Les kératinocytes de la couche basale possèdent un gros noyau ; leur cytoplasme renferme de nombreux ribosomes, un petit complexe de Golgi, quelques mitochondries et une faible quantité de réticulum endoplasmique rugueux. Le cytosquelette des cellules de la couche basale comprend des filaments intermédiaires composés de kératine. Ces filaments s'attachent à des desmosomes qui relient les cellules de la couche basale entre elles et aux cellules de la couche épineuse des hémidesmosomes qui rattachent les kératinocytes à la membrane basale située entre l'épiderme et le derme. En outre, la kératine protège les couches sous-jacentes contre les lésions. Les mélanocytes, les cellules de Langerhans et les cellules de Merkel (avec leurs corpuscules tactiles non capsulés) sont disséminés parmi les kératinocytes de la couche basale.

Couche épineuse :

La **couche épineuse**, ou stratum spinosum, est située au dessus de la couche basale ; elle est formée de 8 à 10 épaisseurs de kératinocytes polyédriques serrés les uns contre les autres. Les kératinocytes s'aplatissent quelque peu dans la partie superficielle de la couche épineuse. Ils possèdent les mêmes organites que les cellules de la couche basale et certains conservent leur capacité à se diviser. Des faisceaux intermédiaires s'insèrent dans les desmosomes, ce qui relie étroitement les cellules entre elles. La couche épineuse contient aussi des prolongements à la fois de cellules de Langerhans et de mélanocytes.

Couche granuleuse :

La **couche granuleuse**, ou stratum granulosum, est située au milieu de l'épiderme ; elle est formée de trois à cinq épaisseurs de kératinocytes aplatis en apoptose. Leurs noyaux et leurs organites commencent à dégénérer et les filaments intermédiaires deviennent de plus en plus apparents. Les cellules de cette couche ont la particularité de renfermer des granules qui prennent une teinte sombre ; ces granules sont formés de kératohyaline, protéine qui regroupe les filaments intermédiaires en faisceaux épais. Les kératinocytes contiennent en outre des granules lamellés recouverts d'une membrane, qui libèrent une sécrétion lipidique permettant de combler les espaces entre les cellules de la couche granuleuse et entre les cellules plus superficielles de l'épiderme. Cette sécrétion sert de revêtement imperméabilisant qui limite la déperdition d'eau et fait obstacle aux substances étrangères. Lorsque les noyaux se dégradent, les réactions métaboliques vitales cessent et les kératinocytes meurent. Aussi la couche granuleuse constitue-t-elle la ligne de démarcation entre les couches profondes actives sur le plan métabolique et les cellules mortes des couches superficielles.

Couche claire :

La **couche claire**, ou stratum lucidum, n'est présente que dans la peau du bout des doigts, de la paume des mains et de la plante des pieds. Elle est formée de trois à cinq épaisseurs de kératinocytes morts transparents et aplatis contenant des filaments intermédiaires entassés et des membranes plasmiques épaisses.

Couche cornée :

La **couche cornée**, ou stratum corneum, est formée de 25 à 30 épaisseurs de kératinocytes morts et aplatis. L'intérieur des cellules contient surtout des filaments intermédiaires entassés et de la kératohyaline. Les cellules sont séparées par des lipides qui, produits par les granules

lamellés de la couche granuleuse, concourent à imperméabiliser la couche cornée. Les kératinocytes morts s'éliminent par desquamation et sont remplacés par des cellules issues de couches sous-jacentes. La couche cornée empêche la pénétration de l'eau et des microorganismes et protège la peau contre les lésions.

Cette structure de l'épiderme est le résultat d'un processus très particulier ; la **kératinisation** :

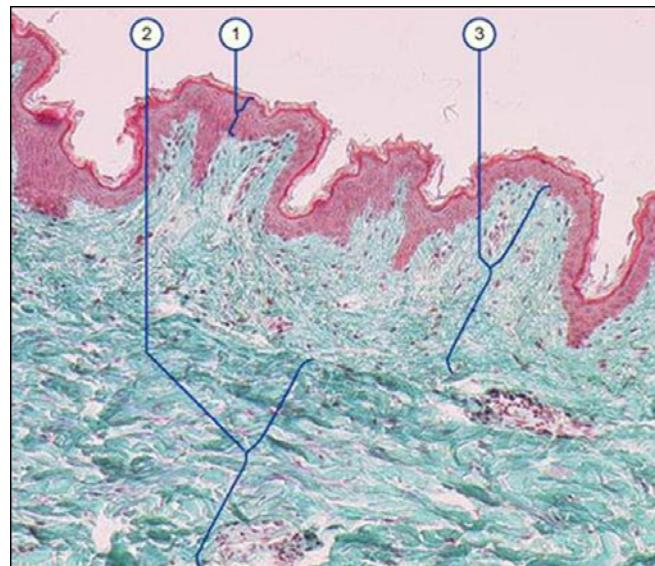
Kératinisation de l'épiderme :

Les cellules nouvellement formées de la couche basale subissent une **kératinisation** au cours de leur développement. A mesure qu'elles montent d'une couche de l'épiderme à une autre, elles accumulent une quantité croissante de kératine. Elles entrent ensuite en apoptose : leur noyau se fragmente, d'autres organites disparaissent et les cellules meurent. Finalement, les cellules kératinisées se détachent et sont remplacées par les cellules sous-jacentes, lesquelles se kératiniseront à leur tour. Le cycle complet (formation des cellules dans la couche basale, ascension vers la surface, kératinisation et détachement) s'étend sur une période d'environ quatre semaines dans un épiderme moyen de 0,1 mm d'épaisseur. Le rythme de la division cellulaire dans la couche basale s'accélère lorsque les couches superficielles de l'épiderme subissent des agressions (abrasions, brûlures).

Les annexes épidermiques sont notamment constituées de glandes sudoripares et de glandes tubulaires exocrines. Celles-ci assurent un rôle fondamental dans la thermorégulation par le biais de la sudation. Elles sont constituées d'un système sécréteur logé dans le derme profond et la jonction dermo-hypodermique, et d'un canal excréteur. Un deuxième type d'annexe est présent : les follicules pilo-sébacés.

L'interface entre l'épiderme et le derme est formée par la **jonction dermo-épidermique**, élaborée conjointement par les kératinocytes basaux et les fibroblastes. Elle joue un rôle fondamental en tant que support mécanique pour l'adhésion de l'épiderme au derme et pour le contrôle des échanges de produits métaboliques entre ces deux compartiments. Par ailleurs, elle sert de support de migration aux kératinocytes lors de la cicatrisation. Elle est aussi traversée par divers types cellulaires (cellules de Langerhans, lymphocytes...) lors de processus immunologiques et inflammatoires. Elle est essentiellement constituée de collagène de type IV, squelette structural de toutes les membranes basales, et contient des fibres collagéniques de type VII (fibres d'ancre).

Derme: (Tortora et al.; Braun-Falco et al. 1991; Burkitt et al. 1993; Schmitt 1997; Dubois 2001; Grob et al. 2004)



FigureCh.I.03 : Image colorée présentant l'épiderme (1), et les deux sous-couches du derme : le stratum réticulaire (2) et le stratum papillaire (3)

La couche profonde de la peau, le **derme**, est formée principalement de tissu conjonctif contenant essentiellement des fibres de collagène (treize variétés de macromolécules organisées en réseau tridimensionnel) et des fibres d'élastine (moins nombreuses, plus fines et formant un maillage souple). Le derme renferme un petit nombre de cellules, principalement des fibroblastes, des macrophages et quelques adipocytes. Le derme possède aussi des vaisseaux sanguins, des nerfs, des glandes et des follicules pileux. Selon sa structure histologique, le derme est divisé en deux parties : le stratum papillaire et le stratum réticulaire (figure Ch.I.03) :

Stratum papillaire :

Le **stratum papillaire**, superficiel, constitue environ un cinquième de l'épaisseur totale du derme. Il est composé de tissu conjonctif aréolaire contenant des fibres élastiques. De petites projections appelées **papilles du derme** (*papilla* = bout du sein) accroissent considérablement sa surface. Ces structures en forme de mamelons donnent à la surface de l'épiderme un relief accidenté et contiennent des boucles de capillaires. Quelques papilles du derme renferment aussi des récepteurs du toucher appelés corpuscules de Meissner, qui sont des terminaisons nerveuses sensibles au contact. Les papilles du derme abritent enfin des terminaisons nerveuses libres.

Stratum réticulaire :

Le **stratum réticulaire** (*reticulum* = réseau), la partie profonde du derme, est composé de tissu conjonctif dense irrégulier contenant des faisceaux de fibres collagènes et quelques grosses fibres élastiques. Les faisceaux de fibres collagènes s'entrelacent à la manière des mailles d'un filet. Les espaces entre les fibres sont occupés par des adipocytes, des follicules pileux, des nerfs, des glandes sébacées ou encore des glandes sudoripares.

L'association de fibres collagènes et de fibres élastiques dans le stratum réticulaire confère à la peau sa résistance, son extensibilité (capacité à s'étirer) et son élasticité (capacité de reprendre sa forme initiale après un étirement).

En plus de ces constituants moléculaires du derme et de l'épiderme, la peau renferme également des pigments.

Les pigments de la peau:

Trois pigments, la mélanine, la carotène et l'hémoglobine, donnent à la peau sa coloration. La **Mélanine**, le pigment situé en majeure partie dans l'épiderme, donne une coloration qui varie du jaune pâle au noir en passant par tous les tons de brun.

Les mélanocytes synthétisent la mélanine à partir de la tyrosine en présence d'une enzyme, la tyrosinase, au sein d'un organite appelé **mélanosome**. L'exposition aux rayonnements ultraviolets intensifie l'activité enzymatique dans les mélanosomes et provoque un accroissement de la production de mélanine. Celle-ci, devenue plus abondante et plus sombre, donne à la peau un aspect bronzé et protège l'organisme contre les rayonnements ultraviolets.

La **carotène** (*carota* = carotte), un pigment orangé, est le précurseur de la vitamine A. Elle se trouve dans la couche cornée ainsi que dans les zones adipeuses du derme et de l'hypoderme.

Un épiderme qui contient peu de mélanine et de carotène paraît translucide. Aussi la couleur de la peau des personnes de race blanche varie-t-elle du rose au rouge, selon la quantité et la teneur en oxygène du sang qui circule dans les capillaires du derme. La couleur rouge est due à l'**hémoglobine**, le pigment qui transporte l'oxygène dans les globules rouges (Tortora et al.; Dubois 2001).

Après cette description de la peau, voyons brièvement les principales tumeurs cutanées.

Les cancers de la peau:

Ce sont les cancers les plus fréquents, mais aussi les plus guérissables. On distingue :

- les carcinomes cutanés ou épithélioma
- les mélanomes

En France, environ 60 000 carcinomes et 7 000 nouveaux cas de mélanomes sont diagnostiqués chaque année. En Europe, aujourd’hui, avec les cancers du poumon, les cancers cutanés sont ceux qui augmentent le plus vite. Leur progression en Europe est de 5 à 7 % par an (Braun-Falco et al. 1991; Bronchud et al. 2004).

Les carcinomes:

Ils se développent au dépend de cellules de l’épiderme ; couche basale (carcinomes basocellulaires) et de la couche épineuse (carcinomes spinocellulaires). Ce sont les lésions cancéreuses les plus fréquentes : 90 % des cancers de la peau dont 70% pour les basocellulaires et 20 % pour les spinocellulaires. Les carcinomes surviennent la plupart du temps après 50 ans et sont facilement guérissables. Les carcinomes basocellulaires ne développent jamais de métastases ; les spinocellulaires assez rarement, principalement dans les ganglions lymphatiques proches de la tumeur (Braun-Falco et al. 1991; Bronchud et al. 2004).

Les mélanomes:

Ils se développent au dépend des mélanocytes. Ces cellules sont nombreuses dans certains « grains de beauté » ou naevus.

Ces cancers sont beaucoup plus rares, mais peuvent survenir assez tôt dans la vie. Il faut les détecter et les traiter rapidement pour en assurer la guérison, car ils présentent un fort risque métastatique (Braun-Falco et al. 1991; Bronchud et al. 2004).

Ch.I.2 : Méthodes de mesure appliquées à la peau

Différentes techniques expérimentales sont utilisées pour caractériser les constituants cutanés, suivre la pénétration de molécules à travers la peau, ou encore pour diagnostiquer et classer les pathologies cutanées.

Caractérisation des constituants cutanés :

Les méthodes le plus souvent utilisées pour étudier la peau sont **invasives** et requièrent l'isolation du tissu ou des constituants de la peau, par exemple en coupant, « strippant » ou encore en extrayant les matériaux à l'aide de solvants.

- **L'extraction ou l'isolation** consiste à séparer les couches et/ou les composantes de la peau. Par exemple, pour le stratum corneum, la méthode la plus communément utilisée pour l'isoler de la peau excisée, consiste à séparer l'épiderme du tissu environnant par immersion dans de l'eau chaude, puis à procéder à une digestion enzymatique des cellules viables. Bien que le stratum corneum apparaisse intact, certains éléments solubles peuvent disparaître par lavage, ce qui peut modifier la structure moléculaire des lipides et des protéines.
- Une méthode de référence pour analyser la peau de façon *ex-vivo* est le **tape stripping**. Cette méthode consiste à prélever les couches successives du stratum corneum par applications successives d'adhésif. Différentes méthodes peuvent ensuite être utilisées pour analyser les échantillons prélevés au moyen des strips, telles que de l'analyse spectroscopique sur les strips (Weigmann et al. 1999; Weigmann et al. 2005), la diffraction électronique (Pilgram et al. 1998), ou l'extraction par solvants couplée à une analyse chromatographique (Pirola et al. 1998; Weigmann et al. 1999). Cette méthode est toutefois destructive et manque de précision.

L'utilisation des **méthodes non invasives** évite non seulement l'altération de la peau mais aussi les incertitudes de mesure inhérentes à la préparation de l'échantillon. Les principales techniques utilisées aujourd'hui sont :

- **L'imagerie par résonance magnétique (IRM)** de la peau peut être utilisée pour distinguer différents tissus (Szayna et al. 1998; Mirrashed et al. 2004; Bittoun et al. 2006) et déterminer leur teneur en eau. Toutefois, pour analyser les différentes couches de la peau, l'IRM manque de résolution spatiale. En effet, un système IRM

conventionnel possède une résolution de l'ordre de plusieurs centaines de microns ce qui est peu résolutif pour des applications dermatologiques.

- La **microscopie confocale** (CSLM) et la **microscopie de fluorescence multiphotons**, ont permis d'imager la peau de façon *in vivo* avec une haute résolution spatiale (inférieure à 1 µm) et un fort contraste. Le contraste en CSLM est lié aux changements d'indice de réfraction entre les différentes structures du tissu (Corcuff et al. 2001; Caspers et al. 2003). En microscopie multiphotons, le contraste repose sur la fluorescence intrinsèque de certains chromophores présents dans la peau. (Masters et al. 1998; So et al. 1998; Lin et al. 2006; Schenke-Layland et al. 2006). Ces deux techniques sont peu informatives en ce qui concerne l'identification de constituants moléculaires.
- L'**OCT (Optical Coherence Tomography)** permet de détecter les photons rétrodiffusés cohérents par interférométrie. La technique permet d'accéder à la longueur des trajets optiques, et donc à localiser les interfaces tissulaires réfléchissantes (présentant des sauts d'indice de réfraction) fonction de la profondeur. L'application de cette technique, dans les domaines d'imagerie biologique a été décrite par (Pircher et al. 2000; Podoleanu et al. 2000; Weissman et al. 2004; Gambichler et al. 2005; Gambichler et al. 2006).

Etudes de pénétration cutanée:

- Les **cellules de diffusion** sont largement utilisées pour les études de pénétration cutanée. Le principe consiste à monter la peau excisée sur une cellule thermostatée dans laquelle la face inférieure de la peau (derme ou hypoderme) est en contact avec un fluide récepteur, les molécules où les médicaments sont appliqués à la surface du stratum corneum. La diffusion du médicament à travers la peau est évaluée en mesurant sa concentration dans le fluide récepteur après un temps de diffusion donné (en général plusieurs heures) (Wagner et al. 2001; van de Sandt et al. 2004; Khan et al. 2005). Cette méthode manque de précision et ne peut pas être utilisée pour des médicaments dont la pénétration est limitée aux couches superficielles de la peau (stratum corneum).
- Le **tape stripping** est également utilisé pour évaluer la perméation cutanée. Il est toutefois limité au stratum corneum.

- Récemment, des techniques biophysiques comme la **microscopie électronique** (EM) (Hofland et al. 1995), la **microscopie confocale** (CLSM) (Veiro et al. 1994; Grams et al. 2004a; Grams et al. 2004b), et la **microscopie à deux photons** (TPFM) (Yu et al. 2003), ont fournis des informations intéressantes concernant la vitesse de diffusion et l'interaction des molécules exogènes avec les différentes structures et composantes de la peau. L'avantage de ces techniques est leur très haute résolution, mais elles sont limitées à certaines molécules.

Méthodes utilisées pour détecter les cancers cutanés:

- Parmi les techniques dédiées au diagnostic des cancers cutanés, la **dermatoscopie** est la méthode la plus communément utilisée pour les lésions pigmentées de la peau. C'est une technique de microscopie de surface, non invasive, qui sert à l'examen *in vivo* des couches superficielles de la peau (MacKie 1971). Elle permet l'observation détaillée des structures anatomiques pigmentées de l'épiderme, de la jonction dermo-épidermique, et de manière plus modeste du derme. Il est donc possible de visualiser de nombreux éléments morphologiques non visibles à l'œil nu qui peuvent orienter le diagnostic des lésions pigmentées de la peau (Serruys 2002).
- Récemment, différentes méthodes biophysiques comme l'imagerie par résonance magnétique **IRM** (Lanka et al. 2005), la **microscopie de fluorescence à deux photons** (Lin et al. 2006; Schenke-Layland et al. 2006), l'**échographie** (Dill-Müller et al. 2007; Lassau et al. 2007), et plus récemment l'**OCT (Optical Coherence Tomography)**, (Busam et al. 2005; Gambichler et al. 2005) (Strasswimmer et al. 2004) ont permis l'identification et la classification de tissus cancéreux.

Cependant, les données fournies par ces techniques se limitent à des critères morphologiques et ne peuvent fournir aucune donnée d'ordre moléculaire. L'examen anatomopathologique reste la technique de référence pour le diagnostic des lésions cancéreuses.

Ch.I.3 : Spectroscopies vibrationnelles et la peau

Avant d'aborder leur principe, nous allons voir les points forts de ces techniques pour l'étude de la peau.

La spectroscopie de diffusion Raman et la spectroscopie d'absorption Infrarouge ont l'avantage de fournir des informations avec une haute spécificité moléculaire, sans l'utilisation de marqueurs externes, permettant d'accéder à des données à visée diagnostique. Le spectre de diffusion (Raman) ou d'absorption IR constitue une véritable empreinte spécifique d'une molécule ou d'un échantillon complexe tel qu'un tissu biologique. Au niveau de la peau, les principales études référencées sont indiquées ci-dessous.

- L'analyse des raies de vibration a permis d'identifier et de **caractériser** la structure des constituants moléculaires de **la peau humaine** (Barry et al. 1992; Fendel et al. 1998; Koljenovic et al. 2005; Mil'Shtein 2006; Bernard et al. 2007).
- De part leur haute spécificité moléculaire, les spectroscopies vibrationnelles ont également été utilisées pour étudier les **gradients de concentration** des molécules endogènes et la **pénétration cutanée** de différentes molécules exogènes (Mendelsohn et al. 2003). A titre d'exemple l'hydratation cutanée et les effets des "moisturising factors" ont été largement étudiés par différents groupes (Potts et al. 1985; Caspers et al. 2001; Caspers et al. 2003; Chrit et al. 2005; Sieg et al. 2006; Chrit et al. 2007). Xiao et al. ont montré qu'il était possible de suivre la pénétration de molécules lipidiques à travers les couches cutanées (Xiao et al. 2004; Xiao et al. 2005a; Xiao et al. 2005b; Mendelsohn et al. 2006). Et plus récemment, nous avons utilisé la spectroscopie Raman pour suivre la diffusion, à travers la peau, d'un médicament appliqué pour le traitement des rosacées(Tfayli et al. 2007).
- De nombreux travaux ont montré ces techniques pour le **diagnostic** des lésions cutanées. Différents types de **cancers cutanés** ont été étudiés et classés sur la base de marqueurs spectroscopiques (Lasch et al. 1998; McIntosh et al. 1999; Nijssen et al. 2002; Gniadecka et al. 2004; Mordechai et al. 2004; Sigurdsson et al. 2004; Stone et al. 2004; Choi et al. 2005; Eikje et al. 2005a; Nijssen et al. 2007).
- Enfin, des développements instrumentaux ont permis de faire évoluer la spectroscopie Raman vers des applications *in vivo* (Shim et al. 1997; Shim et al. 1999; Shim et al. 2000; Eikje et al. 2005b; Motz et al. 2005; Chrit et al. 2006; Li et al. 2007), ce qui offre la possibilité d'une application clinique directe.

Ch.I.4 : Principe de la spectroscopie vibrationnelle

Lorsqu'une onde électromagnétique interagit avec les champs électriques et magnétiques des atomes ou des molécules, on observe différents phénomènes selon l'énergie de cette onde. Les spectroscopies optiques sont des techniques qui permettent de mesurer ces phénomènes d'interaction lumière / matière.

Deux approches, quantique et classique, permettent de décrire ces phénomènes:

Approche quantique (*énergie d'une molécule quantifiée en niveaux*)

Parmi les spectroscopies optiques, on distingue (figure Ch.I.04) la spectroscopie d'émission de fluorescence (et de phosphorescence) et les spectroscopies vibrationnelles, d'absorption infrarouge et de diffusion Raman.

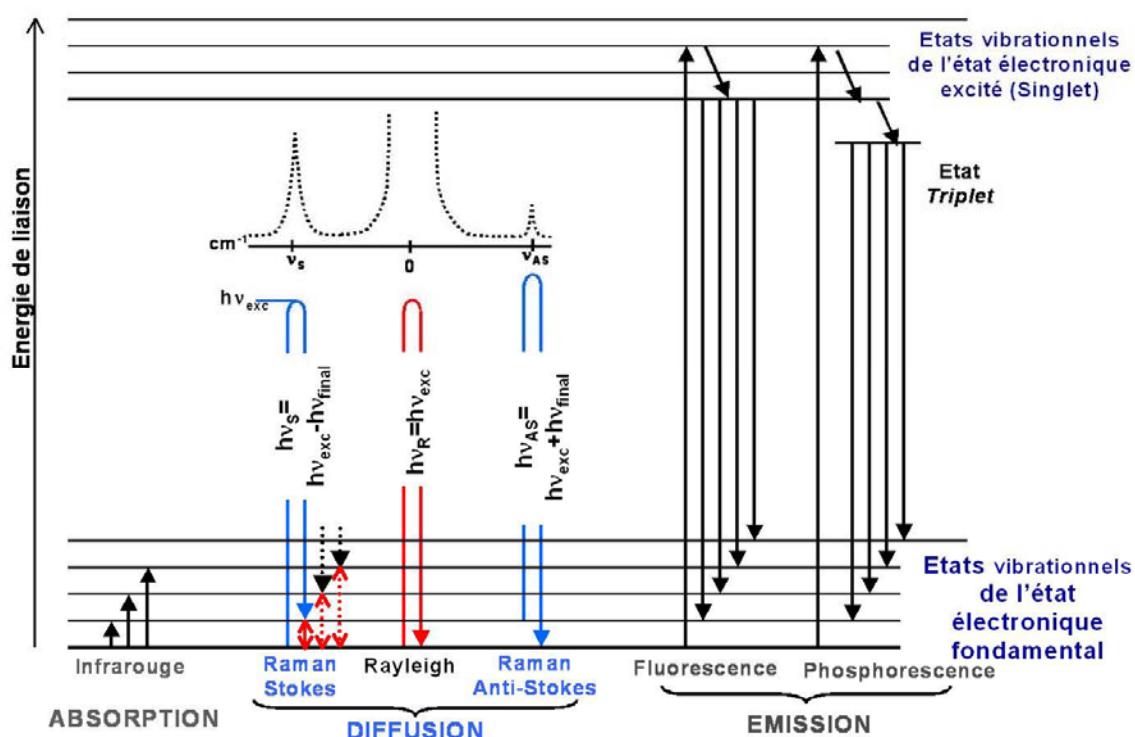


Figure Ch.I.04 : Diagramme de Jablonski.

- En spectroscopie d'émission de fluorescence, un électron passe d'un niveau fondamental à un niveau électronique excité avant de retomber sur un niveau d'énergie intermédiaire (état singulet) et d'être réémis avec une énergie moindre et une longueur d'onde plus importante (figure Ch.I.04).

- Les spectroscopies vibrationnelles, basées sur des transitions entre des niveaux vibrationnels d'un état électronique, consistent à déterminer les fréquences de vibration, proportionnelles à l'énergie, des liaisons entre atomes d'une molécule. Il est donc possible de déduire d'un spectre des informations sur la nature et la structure d'une molécule, sous forme libre ou liée.

Voyons plus en détails le principe de ces spectroscopies vibrationnelles.

Spectroscopie infrarouge

Si le faisceau lumineux incident a une énergie du même ordre de grandeur que l'énergie de vibration des atomes de la molécule, le rayonnement va être absorbé et on enregistrera une diminution de l'intensité réfléchie ou transmise. Le domaine d'énergie de vibration des molécules correspond au domaine de fréquence moyen-infrarouge entre 400 et 4000 cm⁻¹ (longueur d'onde de 2,5 à 25 μm).

Le spectre infrarouge représente donc l'absorbance A (ou la transmittance T) en fonction de la longueur d'onde λ qui est traditionnellement exprimée sous la forme du nombre d'onde ν

$$\nu = \frac{1}{100\lambda} \quad \text{en cm}^{-1} \quad (\text{Equ.Ch.I.01})$$

Avec λ en cm.

Aspect quantitatif de l'analyse : loi de Beer-Lambert :

Lorsqu'une radiation monochromatique traverse un milieu, une partie de son énergie peut être absorbée. La loi de Beer-Lambert donne l'intensité résultante I en fonction de l'intensité initiale I₀, de la concentration c du milieu en substance absorbante, de la longueur l du trajet optique dans le milieu absorbant et du coefficient d'extinction moléculaire ε dépendant de la substance absorbante.

$$I = I_0 \times e^{-\epsilon cl} \quad (\text{Equ.Ch.I.02})$$

De cette relation, on exprime l'absorption par le pourcentage de transmittance :

$$T = \frac{I}{I_0} \times 100 \quad (\text{Equ.Ch.I.03})$$

Ou d'absorbance $A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right)$ (Equ.Ch.I.04)

La proportionnalité entre l'absorbance et la concentration permet d'utiliser les spectroscopies d'absorption comme méthode d'analyse quantitative, du moins dans la limite de linéarité de la loi de Beer-Lambert (pour des absorbances comprises entre 0,3 et 2).

Spectroscopie de diffusion Raman

Lors de l'interaction des photons d'une source monochromatique (laser) avec les molécules d'un échantillon, 1 sur 10^4 photons sont diffusés élastiquement par ces molécules (sans changement d'énergie) et constituent la **diffusion Rayleigh**. Occasionnellement, 1 photon est diffusé inélastiquement (1 sur 10^8) avec une légère variation en énergie, correspondant à la diffusion **Raman**, soit de type **Stokes** lorsque la fréquence de la lumière diffusée ($\nu_0 - \nu_v$) est plus petite que celle de la lumière incidente, ou de type **anti-Stokes** lorsque la fréquence de la diffusion ($\nu_0 + \nu_v$) est plus élevée que celle de la lumière incidente (Figure Ch.I.04).

A une température donnée, la répartition en niveaux d'énergie d'une molécule obéit à la loi de distribution de Maxwell-Boltzmann. Aussi, pour obtenir une diffusion anti-Stokes de type $n \rightarrow n-1$, il faut être en présence de molécules se trouvant dans un état d'énergie vibrationnel excité. Le rapport des intensités des raies Stokes et anti-Stokes s'écrit sous la forme :

$$\frac{I_{\text{anti-Stokes}}}{I_{\text{Stokes}}} = \left(\frac{\nu + \nu_v}{\nu - \nu_v} \right)^4 \exp\left(-\frac{h\nu_v}{kT}\right) \quad (\text{Equ.Ch.I.05})$$

Avec k la constante de Boltzmann ($1,38 \times 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$),

T la température,

ν_0 la fréquence de l'onde excitatrice.

ν_v la fréquence du mode vibrationnel excité.

Ce rapport des intensités des deux diffusions Raman peut être utilisé pour déterminer la température d'un échantillon sans aucun contact matériel.

En pratique, on mesure la diffusion Raman Stokes, d'intensité plus élevée que la diffusion anti-Stokes à température ambiante. En effet, l'état de départ de l'effet Stokes est le plus peuplé en électrons, car c'est un état de moindre énergie et, par conséquent, plus stable.

L'intensité de l'effet Stokes entre les états moléculaires m et n est donnée par l'équation :

$$I_{\text{Stokes}} = K(\nu_0 - \nu_v)^4 I_0 \sum_{ij} |(a_{ij})_{mn}|^2 \quad (\text{Equ.Ch.I.06})$$

Avec a_{ij} : $(\partial\alpha_{ij}/\partial Q)$, dérivée du tenseur de la polarisabilité selon les coordonnées x et y.

Q : coordonnées normales de vibration

K : constante

ν_0 : fréquence de la radiation incidente

ν_v : fréquence du mode vibrationnel excité

I_0 : intensité de la radiation incidente

A partir de cette formule mathématique, on retiendra que l'intensité de la diffusion Raman Stokes augmente avec l'intensité et la fréquence de l'onde incidente. En pratique, on est limité par une fréquence d'excitation maximale qui induit des phénomènes d'émission de fluorescence parasite masquant l'effet Raman.

Approche classique

La lumière est une onde électromagnétique de fréquence ν_0 , dont le champ électrique E peut être exprimé par : $E = E_0 \cos \nu_0 t$ (Equ.Ch.I.07)

Une molécule soumise à une telle onde électromagnétique possède un moment dipolaire μ_{tot} , qui s'exprime par : $\mu_{tot} = \mu_p + \mu_i$ (Equ.Ch.I.08)

Avec μ_p , moment dipolaire permanent et μ_i , moment dipolaire induit ou polarisabilité qui traduit la faculté du nuage électronique à se déformer sous l'influence du champ électrique E . μ_i est défini par : $\mu_i = \alpha \cdot E$ (Equ.Ch.I.09)

Où α représente le tenseur de polarisabilité.

Le moment dipolaire total peut donc se mettre sous la forme :

$$\mu_{tot} = \mu_p + \alpha \cdot E_0 \cos \nu_0 t \quad (\text{Equ.Ch.I.10})$$

Les moments dipolaires permanent et induit varient avec les mouvements de vibration de la molécule. Une molécule de N atomes a $3N$ degrés de liberté, dont 3 correspondent à une translation de la molécule entière et 3 à des rotations (2 pour une molécule linéaire). Les $3N-6$ degrés de liberté restants ($3N-5$ pour les molécules linéaires) correspondent à vibrations (modes normaux) de la molécule (figure Ch.I.05).

Le moment dipolaire permanent et la polarisabilité peuvent s'exprimer par un développement du premier degré autour de la position d'équilibre $\mu_{p(0)}$ et α_0 :

$$\mu_p = \mu_{p(0)} + \sum_{n=1}^{3N-6} \left(\frac{d\mu_p}{dQ_n} \right) Q_n \quad (\text{Equ.Ch.I.11})$$

Et

$$\alpha = \alpha_0 + \sum_{n=1}^{3N-6} \left(\frac{d\alpha}{dQ_n} \right) Q_n \quad (\text{Equ.Ch.I.12})$$

Où Q_n est la coordonnée normale du mode de vibration n ($n = 1, \dots, 3N-6$). Dans l'approximation harmonique, pour une fréquence et une amplitude ν_n et Q_0 on a :

$$Q_n = Q_0 \cos \nu_n t \quad (\text{Equ.Ch.I.13})$$

En introduisant ces expressions dans l'équation du moment dipolaire total, on obtient une équation qui englobe les différents termes d'absorption et de diffusion:

(Equ.Ch.I.14)

$$\mu_{tot} = \mu_{p(0)} + \sum_{n=1}^{3N-6} \left(\frac{d\mu_p}{dQ_n} \right) Q_0 \cos \nu_n t + \alpha_0 (E_0 \cos \nu_0 t) + \frac{1}{2} E_0 \sum_{n=1}^{3N-6} \left(\frac{d\alpha_0}{dQ_n} \right) Q_0 [\cos(\nu_0 - \nu_n)t + \cos(\nu_0 + \nu_n)t]$$

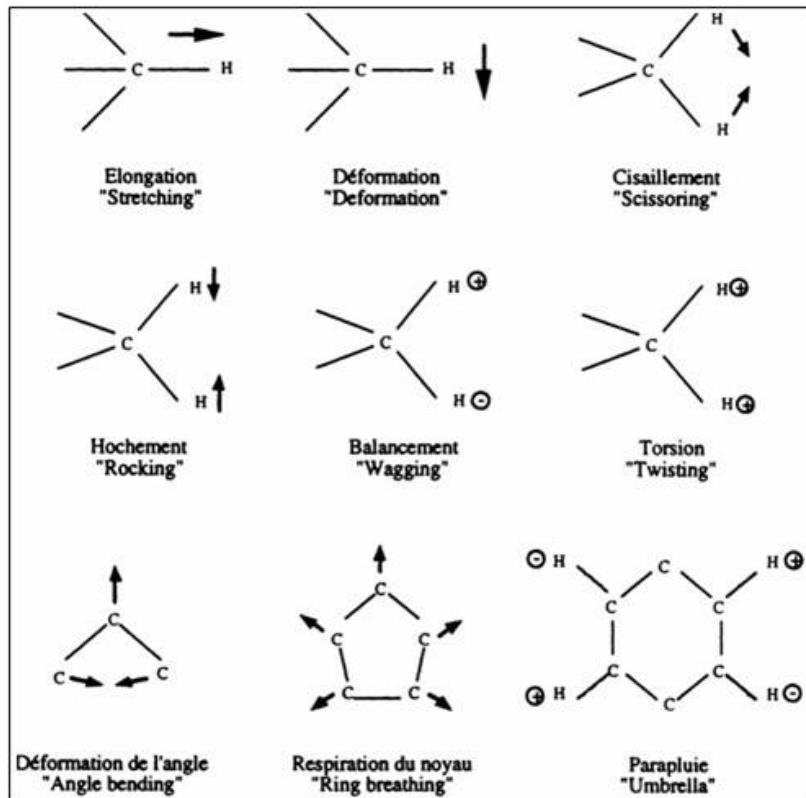


Figure Ch.I.05 : Modes de vibration de molécules polyatomiques

Absorption infrarouge

Le terme $\sum_{n=1}^{3N-6} \left(\frac{d\mu_p}{dQ_n} \right) Q_0 \cos \nu_n t$ de l'équation Ch.I.14 représente l'absorption infrarouge d'un

dipôle vibrant à ν_n (domaine moyen infrarouge: λ de 2.5 à 25 μm).

Ce terme existe si $\left(\frac{d\mu_p}{dQ_n} \right) \neq 0$: la vibration doit induire une ***variation du moment dipolaire permanent***.

Diffusion Rayleigh

Le terme $\alpha_0 (E_0 \cos \nu_0 t)$ de l'équation 14 est à l'origine de la diffusion Rayleigh, diffusion élastique de la lumière incidente.

Diffusion Raman

Le terme $\frac{1}{2} E_0 \sum_{n=1}^{3N-6} \left(\frac{d\alpha_0}{dQ_n} \right) Q_0 [\cos(\nu_0 - \nu_n)t + \cos(\nu_0 + \nu_n)t]$ de l'équation Ch.I.14 correspond

à la diffusion inélastique Raman d'un dipôle oscillant soit à $\nu_0 + \nu_n$ (diffusion Raman anti-Stokes), soit à $\nu_0 - \nu_n$ (diffusion Raman Stokes).

Ce terme existe si $\left(\frac{d\alpha}{dQ_n} \right) \neq 0$: la vibration doit induire d'**une variation de la polarisabilité**.

Règle de sélection

Dans le diagramme énergétique de Jablonski, l'énergie gagnée par la molécule est identique, qu'elle soit obtenue par effet Raman (stokes) ou par absorption infrarouge, cela signifie que les fréquences IR et Raman, caractérisant les niveaux de vibration sont identiques, mais avec des intensités différentes selon les règles de sélection basées sur les valeurs des dérivées du moment dipolaire ou de la polarisabilité des liaisons atomiques. Comme nous venons de le voir au dessus, un mode de vibration IR est actif si la dérivée du moment dipolaire est non nulle. En Raman, un mode de vibration est actif si la dérivée de la polarisabilité est non nulle.

De l'équation Ch.I.14 on peut tirer quelques règles importantes :

- Si la molécule possède un centre de symétrie, il n'existe aucune vibration commune au spectre infrarouge et au spectre Raman. Les vibrations symétriques par rapport à ce centre seront actives en Raman mais inactives en infrarouge. Les vibrations

antisymétriques par rapport à ce centre seront inactives en Raman mais actives en infrarouge. C'est la règle de l'exclusion mutuelle.

- Certaines vibrations peuvent n'apparaître ni en spectroscopie Raman, ni en spectroscopie infrarouge.
- Si la molécule possède au moins un axe de symétrie d'ordre supérieur à deux, des modes dégénérés apparaissent. Les modes de vibrations dégénérés sont alors confondus en une seule raie.
- Les vibrations totalement symétriques sont toujours actives en Raman. Les raies correspondantes sont polarisées et souvent très intenses. A titre d'exemple, on peut noter la respiration (pulsation) symétrique du cycle benzène à 992 cm^{-1} . Durant cette vibration, tous les atomes de carbone et d'hydrogène s'approchent ou s'éloignent en phase du centre du cycle. Les autres modes de vibration (antisymétriques ou dégénérés) lorsqu'ils sont actifs en Raman donnent des raies dépolarisées.

Ces règles de sélection ont été établies dans l'approximation harmonique. Or, dans les spectres réels, on observe parfois des bandes peu intenses correspondant à des harmoniques de fréquence $n\nu_v$ ou des combinaisons de fréquence $\nu_v + \nu'_v$.

Ch.I.5 : Instrumentation

Spectromètre Raman, Labram

La figure Ch.I.06 représente un descriptif des systèmes optiques qui entrent dans la composition d'un microspectromètre Raman. Pour réaliser nos expérimentations, nous avons utilisé un microspectromètre LabRam (Jobin Yvon, Horiba, Lille, France).

Les différents éléments qui constituent le système d'analyse sont indiqués ci dessous :

- Un laser comme source excitatrice à 785 nm dans notre cas.

En spectroscopie Raman, au niveau des échantillons biologiques, le choix de la longueur d'onde d'excitation résulte d'un compromis : plus l'onde est énergétique (longueur d'onde basse ou fréquence élevée), plus la diffusion est intense, mais plus on induit de fluorescence parasite. L'intensité de diffusion est rappelée par la formule suivante établie dans le cadre du traitement quantique du phénomène :

$I_{\text{Stokes}} = K' (v_0 - v_r)^4$ avec K' une constante dépendant de l'intensité du rayonnement incident et des variations de la dérivée de la polarisabilité de la liaison chimique.

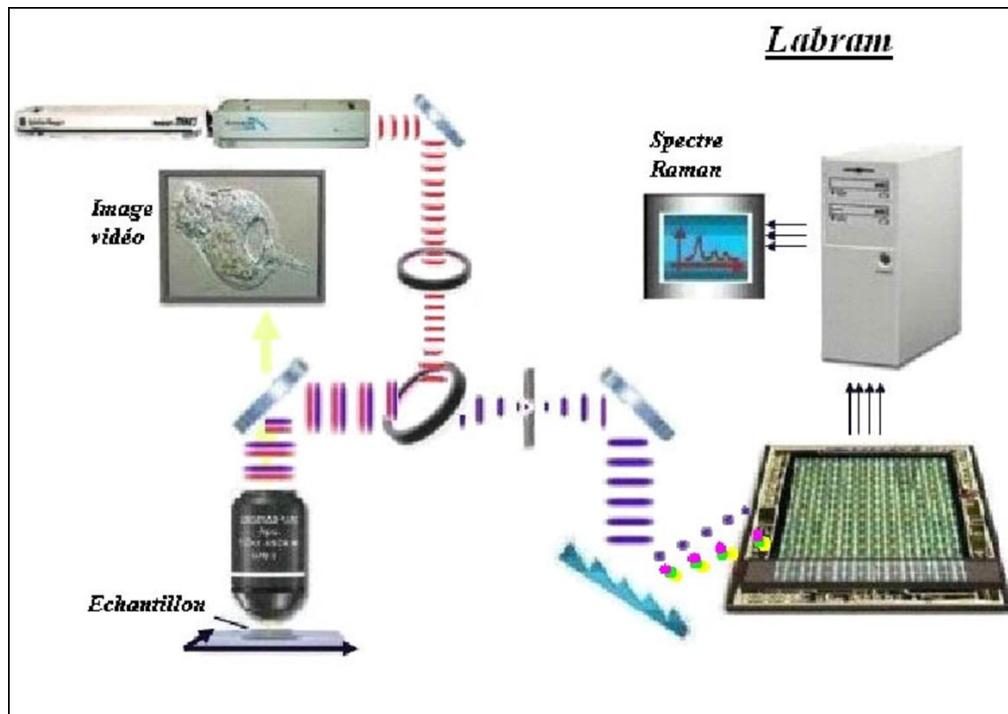


Figure Ch.I.06 : Description du microspectromètre Raman

- Le rayon laser est focalisé sur l'échantillon au moyen d'un microscope optique de type Olympus BX40.
- Ce couplage entre le spectromètre et le microscope constitue une des caractéristiques importantes de la technique, il permet d'atteindre une résolution spatiale de l'ordre du micromètre.
- Un jeu de filtres atténuateurs permet de réduire, selon les besoins, l'intensité du rayonnement incident, ce qui évite dans certains cas une dégradation thermique de l'échantillon.
- Un filtre Notch permet d'éliminer la raie excitatrice laser (réflexion) et la diffusion Rayleigh (beaucoup plus intense que la diffusion Raman) de même longueur d'onde que l'excitatrice.
- Le signal émis est dirigé vers le spectromètre en passant au travers d'un trou confocal. Ce trou permet de sélectionner le signal émis par un point particulier de l'échantillon. Dans le cas d'un échantillon transparent multicouches, le trou permet de sélectionner et d'analyser une couche de cet échantillon.
- Le signal est ensuite focalisé sur la fente d'entrée du spectrographe. La largeur de la fente définit la résolution spectrale de l'appareil, mais lorsqu'on réduit l'ouverture de la fente, on diminue aussi l'intensité du signal à analyser.
- Le système dispersif est équipé de deux réseaux dispersifs holographiques de 950 traits/mm ou de 600 traits/mm selon la fenêtre spectrale et la résolution spectrale souhaitées. Plus le réseau est fin (nombre de traits par mm plus élevé = réseau plus dispersif), meilleure est la résolution spectrale, mais plus la fenêtre spectrale analysable est étroite.
- Le spectre Raman est analysé au moyen d'un détecteur multicanal CCD (Charged-Couple Device) de 1064x256 pixels. Ce système permet de mesurer simultanément l'intensité des différentes longueurs d'onde du spectre.
- Pour déplacer l'échantillon, on utilise une platine motorisée. Cet équipement est indispensable pour l'enregistrement de l'image spectrale à partir de spectres régulièrement espacés. Le pas de déplacement minimal est de 0,1 µm.

Imageur infrarouge, Spectrum Spotlight300

Pour l'enregistrement des spectres et des images infrarouge, l'appareil utilisé est le Spotlight300 (Perkin Elmer, Courtabœuf France) illustré par la figure Ch.I.07.

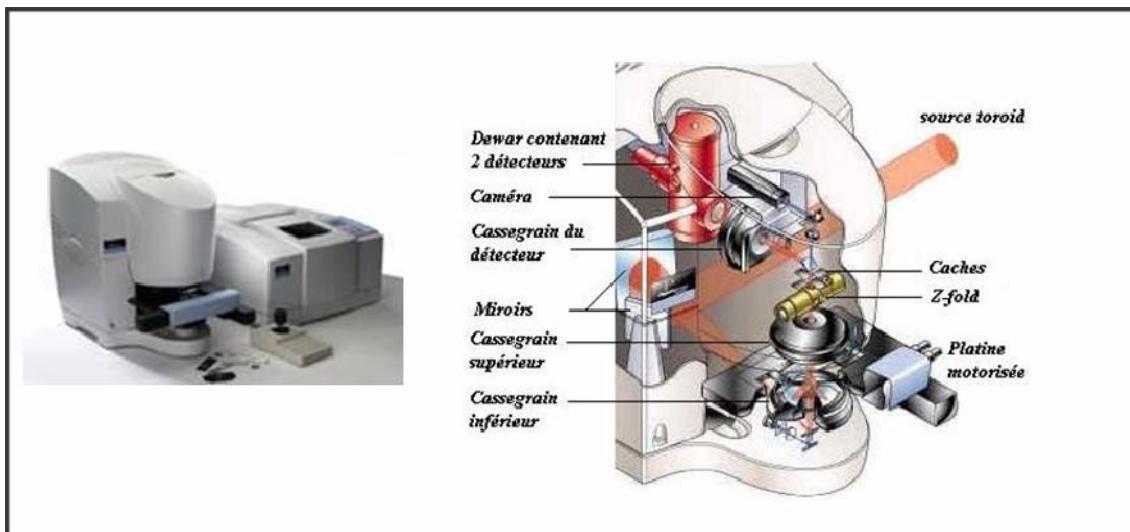


Figure Ch.I.07: Imageur Infrarouge spectrum spotlight 300

Ce microspectromètre est constitué d'une source de lumière polychromatique (dans le moyen Infrarouge), d'objectifs Cassegrain qui assurent la focalisation du faisceau sur l'échantillon (mode transmission), d'une platine motorisée (pas minimum de 156 nm), d'un système optique Z-fold qui permet de passer de la résolution spatiale de 25 µm à 6,25 µm et d'un système de deux détecteurs de type MCT (Mercure Cadmium Telluride). L'un composé de 16 éléments de 6,25 x 6,25 µm en ligne est utilisé pour l'imagerie spectrale, l'autre de 100 x 100 µm en mode point.

La mesure des intensités des différentes longueurs d'onde transmises ou absorbées est réalisée avec un interféromètre (de Michelson), le spectre résulte du calcul de la transformée de Fourier de l'interférogramme.

Le logiciel utilisé pour l'acquisition est Spotlight (Perkin Elmer, GB), il permet d'une part le réglage des paramètres d'acquisition, et d'autre part, le traitement des données (correction atmosphérique, normalisation, calcul des dérivées et reconstruction d'images spectrales).

Ch.I.6 : Applications en dermatologie des spectroscopies vibrationnelles

Les spectroscopies vibrationnelles sont des méthodes d'investigation de la structure et de la composition moléculaire des échantillons. Nous avons vu qu'une molécule de N atomes possède $3N-6$ modes de vibration. Pour une macromolécule, ce nombre peut facilement atteindre plusieurs millions. Il y a donc une superposition considérable de pics.

L'interprétation des spectres est de ce fait compliquée et nécessite l'emploi de méthodes de traitement spectral. Un spectre vibrationnel est une « empreinte digitale » caractéristique d'un échantillon biologique dont on cherche à extraire certaines informations : constitution moléculaire, étude des interactions entre les composants ou encore suivi de réactions biochimiques. De plus, le caractère non destructif des spectroscopies vibrationnelles rend ces outils particulièrement adaptés à l'étude des relations structure-fonction des échantillons biologiques.

Voyons d'abord l'apport de la spectroscopie Raman pour la caractérisation de la peau.

Caractérisation de la peau par spectroscopie de diffusion Raman

La peau est un système complexe, hétérogène, contenant un mélange de protéines, lipides, polysaccharides, acides nucléiques et autres composés organiques. La signature Raman présente la somme des informations englobant les différents composants. Le spectre est donc très riche en informations. Les attributions des principales bandes, du stratum corneum, de l'épiderme et du derme sont présentées dans le tableau Ch.I.01. Ces attributions sont basées sur les travaux de recherche de différents groupes (Frushour et al. 1975; Barry et al. 1992; Akhtar et al. 1997; Benevides et al. 1997; Camacho et al. 2001; Fabian et al. 2002; Ermakov et al. 2004a; Ermakov et al. 2004b; Benevides et al. 2005; Brauner et al. 2005; Eikje et al. 2005a; Enejder et al. 2005; Ermakov et al. 2005; Bitar et al. 2006; Dehring et al. 2006; Bernard et al. 2007; Biswas et al. 2007; Corbe et al. 2007); (Koenig et al. 1972; Mathlouthi et al. 1986b; Mathlouthi et al. 1986a; Gordon et al. 1993; Neubert et al. 1997; Wegener et al. 1997; Gniadecka et al. 1998a; Gniadecka et al. 1998b; Lawson et al. 1998; Tsuboi et al. 1998; Hata et al. 2000; Rodríguez-Cabello et al. 2000; Sett et al. 2000; Holtje et al. 2001; Percot et al. 2001; Uzunbajakava et al. 2003; Yu et al. 2003; Grob et al. 2004; Stone et al. 2004; Hammond et al. 2005; Krafft et al. 2005; Kuzuhara 2005a; Kuzuhara 2005b; Kuzuhara et al.

2005; Lambert et al. 2005; Nogueira et al. 2005; West et al. 2005; Chen et al. 2006; Izutsu et al. 2006; Kirkpatrick et al. 2006; Kuzuhara 2006; Sieg et al. 2006; Tsen et al. 2006; Zhu et al. 2006; Gooris et al. 2007; Li et al. 2007; Norlen et al. 2007; Tfayli et al. 2007; Parker 1983)

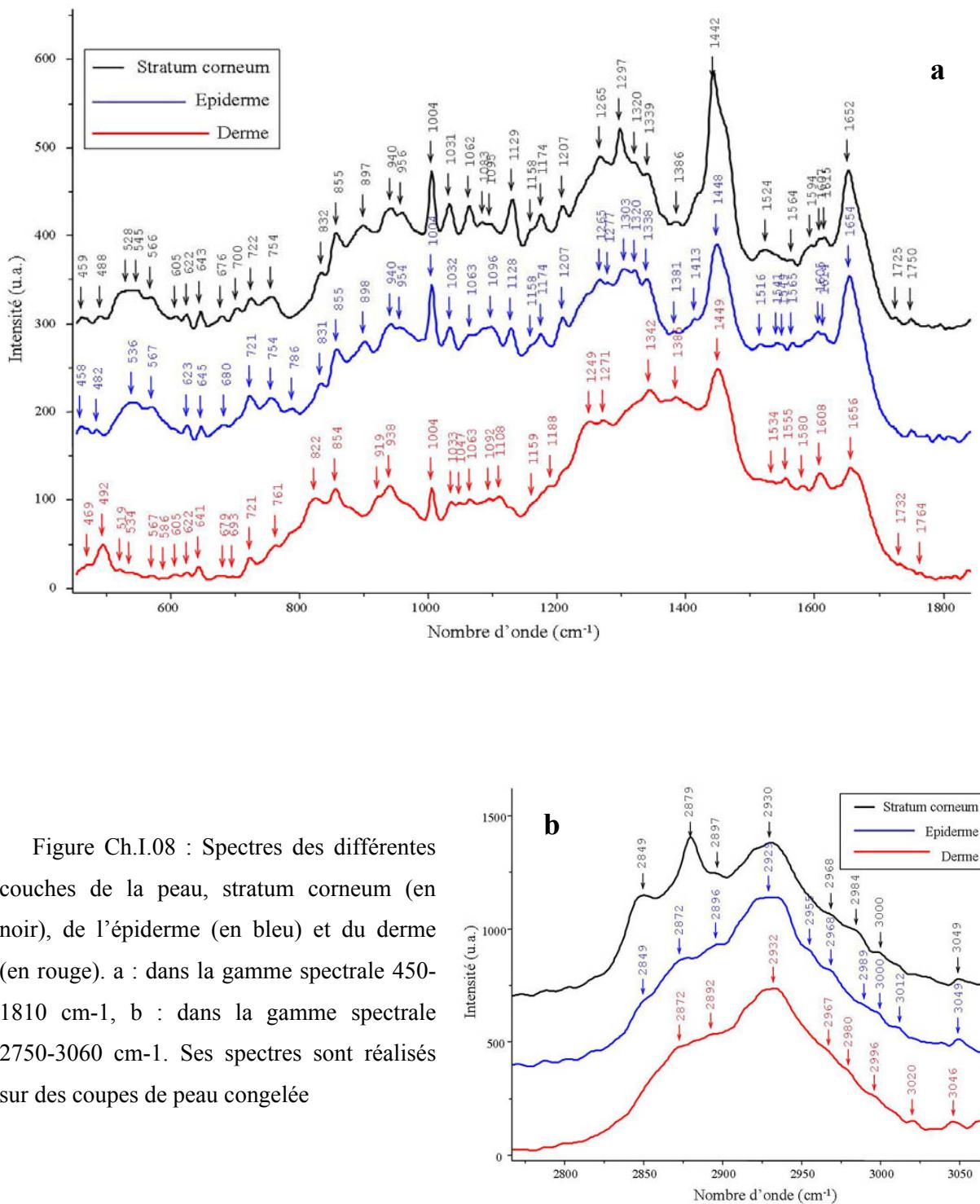


Tableau Ch.I.01 : attribution des raies Raman du stratum corneum, de l'épiderme et du derme

NOMBRE D'ONDES (cm ⁻¹)			ATTRIBUTION DES BANDES
SC	Epiderme	Derme	
459	458		Probablement squelette des saccharides
469	469	469	
	482		Glycogène Kératine
488			Glycogène S-S kératine
	492		S-S protéines
	519		Phospholipides
528	528		v(SS) trans-gauche-gauche (protéines) Céramides
		534	v(SS) Cholestérol ester
545	545		Probablement squelette des saccharides
			Cholestérol
566			Cholestérol ARN C=O bend (C,G)
	567	567	Polysaccharides
		586	
605	605	605	ρ(H) balancement ; lipides Glycérol
622		622	v(CS), cycle phe tyr (CC) torsion phe
	623		G A
		641	v(CS); amide IV; (CC) torsion tyrosine
643			C A T
	645		v C-S Cystéine trans Saccharides
676		679	Respiration du cycle du Guanine
	680		Respiration du cycle du Guanine
		693	v C-S Cystéine v -H deformation amide V
700			v C-S Cystéine gauche Cholestérol, Cholestérol ester Saccharides, Polysaccharides
722	721	721	CH phospholipides v C-S Cystine trans
754	754		Respiration symétrique tryptophane ARN respiration du cycle (C T) ADN Polysaccharides
		761	Respiration symétrique tryptophane Phospholipides C
786	786		ADN, ARN: (OPO), cytosine, uracile, thymine cycle v ADN respiration cycle (C) Phospholipides
	822		v(C-C) du squelette des chaînes carbonées O-P-O des phospholipides

v : élongation ; γ_w : balancement ; δ : déformation ; ρ : hochement (rocking)

Tableau Ch.I.01 (suite)

NOMBRE D'ONDES (cm^{-1})			ATTRIBUTION DES BANDES
SC	Epiderme	Dermé	
	831	831	Doublet de Fermi de la Tyr (cycle)
832			Respiration hors plan du cycle de la tyrosine (OPO) étirement de l'ADN O-P-O des phospholipides
		854	Doublet de Fermi de la Tyr (cycle) respiration du cycle de la tyrosine et (CC) élongation du cycle des prolines
855	855		ARN ribose O-P-O v Polysaccharides
850-1200	850-1200	850-1200	Polysaccharides
897	898		ADN cycle désoxyribose $\rho(\text{CH}_2)$ protéine
		919	v (CC) du cycle de proline ; collagène glucose/acide lactique cycle désoxyribose
940	940	938	$\rho(\text{CH}_3)$ terminal; v(CC) hélice α Polysaccharides
		954	v P-O ADN v C-C (hélice α et aléatoire) caroténoïdes cholestérol δ CCH oléfinique
956			
		972	CH=CH bending v C-O (perpendiculaire)
1004	1004	1004	Respiration sym. du cycle de Phe
1031	1032	1033	v(CC) du squelette des lipides (CH) in plane bending mode phénylalanine
		1047	v C-C Glycine v C-O ARN
1062	1063	1063	Lipides : chaîne hydrocarbonée <i>trans</i> Céramides v C-O ADN ARN Acides gras
1083	1083		Lipides : chaîne hydrocarbonée gauche Céramides Polysaccharides
1095		1092	Lipides : chaîne hydrocarbonée gauche PO ₂ ⁻ v sym ADN
	1096		Polysaccharides
		1108	
1129	1128		Lipides : chaîne hydrocarbonée <i>trans</i> Polysaccharides
1158	1158	1159	v C-C, ρ CH ₃ , C-C vibration du squelette v C-C caroténoïdes C
1174	1174		CH Tyr, Phe v sym C-O-C Lipides A U G C
		1188	Cytosine, guanine, adénine
1207	1207		v C-C ₆ -H ₅ , Phe, Trp, Tyr, amide III T Polysaccharides

v : élongation ; γ_w : balancement ; δ : déformation ; ρ : hochement (rocking)

Tableau Ch.I.01 (suite)

NOMBRE D'ONDES (cm^{-1})			ATTRIBUTION DES BANDES
SC	Epiderme	Dermé	
1249	1249	1249	Amide III (structures aléatoires) Cycle ARN P=O phospholipides
1265	1265		$\nu(\text{CN})$ et $\delta(\text{NH})$ amide III hélice α globulaire $(=\text{CH})$ in plane bending (lipide) C Polysaccharides
	1271		$\nu(\text{CN})$ and $\delta(\text{NH})$ amide III hélice α globulaire CH ₂ phospholipides
	1277		Amide III hélice α globulaire
1297			Amide III fibrillaire CH ₂ phospholipides Céramides acide oléique ARN cycle C A Saccharides
	1303		$\delta(\text{CH}_2)$ (lipides) ADN adénine, cytosine, ARN
1320	1320	1320	C=C cycle de Guanine ΔCH protéines
	1338		$\nu \text{ CC, CH bend}$ Phe, Trp
1339			Chaîne polynucléotidique (bases purine d'ADN) Adenine Guanine ARN
	1342		Polysaccharides
1369	1369	1369	Trp (protéine), porphyrines, lipides
	1381		CH ₃ bend, δCH_3 Mélanine ν linéaire des C-C du cycle Saccharides ???
1386		1385	$\delta(\text{CH}_3)$ symétrique; (CH_3) bend ARN cycle (A G C)
1413	1413		$\delta(\text{CH}_3)$
1442			ΔCH protéines et lipides (céramides et ac oléique à 1438, cholestérol à 1440, coll et élastine à 1451)
1448		1449	Proline ΔCH protéines et lipides
	1516		$\nu -\text{C}=\text{C}-$ Caroténoïdes A
1524			$\nu -\text{C}=\text{C}-$ Caroténoïdes ARN cycle (A, C)
	1534		
	1541		C=C $\delta \text{N-H}$
	1549		Tryptophane N-H bend
	1555		Tryptophane
1564	1565		
	1580		Cycles pyrimidiques (acides nucléiques) et hème protéique Mélanine dans le plan ν du cycle aromatique
1594			
1607	1605		$\nu(\text{C}=\text{C})$ olefinic; phe, tyr
	1608		

 ν : élongation ; γ_w : balancement ; δ : déformation ; ρ : hochement (rocking)

Tableau Ch.I.01 (suite)

NOMBRE D'ONDES (cm^{-1})			ATTRIBUTION DES BANDES
SC	Epiderme	Derme	
1615	1614	1614	$\nu(\text{C}=\text{C})$ tyr et tryptophane
1652	1654	1656	$\nu(\text{C}=\text{O})$ Amide I protéines en hélice α $\nu(\text{C}=\text{C})$ lipide (a gras insaturés)
		1670	$\nu(\text{C}=\text{O})$ Amide I $\nu(\text{C}=\text{O})$ ARN ADN
1725			$\nu \text{ C=O}$ ARN (G)
		1732	$\nu \text{ C=O}$ phospholipides
1750	1750		$\nu(\text{COO})$ (lipides)
		1764	$\nu(\text{COO})$ (lipides)
2771	2770		
2788	2787		
2816	2816		
2849	2849		$\nu(\text{CH}_2)$ symétrique lipides (céramides)
	2872	2872	$\nu(\text{CH}_2)$ asymétrique Protéines
2879			$\nu(\text{CH}_2)$ asymétrique Protéines (céramides)
		2892	$\nu(\text{CH}_2)\text{C-H}$ asymétrique (lipides) autres
2897	2896		(lipides) céramides autres
2930	2929	2932	$\nu(\text{CH}_3)$ symétrique (lipides) autres céramides cholestérol
	2955		$\nu(\text{CH}_3)$ symétrique protéines
2968	2968	2967	$\nu(\text{CH}_3)\text{C-H}$ asymétrique (lipides) autres
2984		2980	
	2989		Collagène
		2996	
3000	3000		
	3012		
		3020	$\nu(\text{CH}_3)\text{C-H}$ asymétrique (lipides) autres
		3046	
3049	3049		

ν : élongation ; γ_w : balancement ; δ : déformation ; ρ : hochement (rocking)

La spectroscopie Raman permet donc d'accéder à des informations sur la structure des principaux constituants moléculaires de la peau tels que le protéines, les lipides, les sucres et les pigments.

Protéines de la peau

A partir des spectres de la figure Ch.I.08, il est possible d'obtenir un certain nombre d'informations sur la composition en acides aminés et sur la structure secondaire du contenu protéique des différentes couches de la peau. Les bandes de vibration spécifiques aux protéines sont indiquées dans le tableau Ch.I.02.

Tableau Ch.I.02 : attribution des raies Raman spécifiques aux protéines de la peau

NOMBRE D'ONDES (cm^{-1})			ATTRIBUTION DES BANDES
SC	Epiderme	Derme	
488	482		Kératine et autres protéines S-S
528			$\nu(\text{SS})$ trans-gauche-gauche (protéine)
	536	534	$\nu(\text{SS})$
622	623	622	$\nu(\text{CS})$ Cycle phe; cycle tyr; (CC) torsion phe
643	645	641	$\nu(\text{CS})$ amide IV; (CC) torsion tyrosine
676			ν C-S Cystéine <i>trans</i>
693	693	693	ν C-S Cystéine ν -H bend amide V
700			ν C-S Cystéine <i>gauche</i>
722	721	721	ν C-S Cystine <i>trans</i>
754	754		Respiration symétrique trp
	761		Respiration symétrique trp
832	831	831	Doublet de Fermi de la Tyr (cycle) Respiration 'hors du plan' tyrosine
855	855	854	Doublet de Fermi de la Tyr (cycle) Respiration du cycle Tyr et ν (CC) stretch du cycle de proline
897	897		$\rho(\text{CH}_2)$ protéine
	919		(CC) étirment du cycle de proline ; collagène
940	940	938	$\rho(\text{CH}_3)$ terminal; $\nu(\text{CC})$ hélice α
956	954		ν C-C (hélice α et aléatoire)
1004	1004	1004	Respiration sym. du cycle de Phe
1031	1032	1033	(CH) "dans le plan" Phe
1174	1174		CH Tyr, Phe
1207	1207		ν C-C ₆ -H ₅ , Phe, Trp, Tyr, amide III
1249	1249	1249	Amide III (random coil)
1265	1265		$\nu(\text{CN})$ et $\delta(\text{NH})$ amide III hélice α globulaire
	1271		$\nu(\text{CN})$ et $\delta(\text{NH})$ amide III hélice α globulaire
	1277		Amide III hélice α globulaire
1297			Amide III hélice α fibrillaire
1320	1320	1320	Δ CH protéines
1339	1338		ν CC, CH bend Phe, Trp
1369	1369	1369	Trp (protéine),
1386	1381	1385	$\delta(\text{CH}_3)$ symétrique; (CH_3) bend
1442	1448	1449	Δ CH protéines (Collagène et élastine à 1451)
1541			C=C δ N-H
1549			Trp N-H bend
	1555		Trp
1607	1605	1608	$\nu(\text{C}=\text{C})$ phe, tyr
1615	1614	1614	$\nu(\text{C}=\text{C})$ tyr et trp

ν : élongation ; γ_w : balancement ; δ : déformation ; ρ : hochement (rocking)

Tableau Ch.I.02 (suite)

NOMBRE D'ONDES (cm^{-1})			ATTRIBUTION DES BANDES
SC	Epiderme	Derme	
1652	1654	1656	$\nu(\text{C=O})$ Amide I protéines en hélice α
		1670	$\nu(\text{C=O})$ Amide I
	2872	2872	$\nu(\text{CH}_2)$ asymétrique Protéines
2879			$\nu(\text{CH}_2)$ asymétrique Protéines
		2892	$\nu(\text{CH}_2)\text{C-H}$ asymétrique
2930	2929	2932	$\nu(\text{CH}_3)$ symétrique
		2955	$\nu(\text{CH}_3)$ symétrique protéines
2968	2968	2967	$\nu(\text{CH}_3)\text{C-H}$ asymétrique
2984		3020	$\nu(\text{CH}_3)\text{C-H}$ asymétrique

ν : élongation ; γ_w : balancement ; δ : déformation ; ρ : hochement (rocking)

Plusieurs raies de vibration permettent de mettre en évidence la présence de la phénylalanine, de la tyrosine et du tryptophane ainsi que d'autres acides aminés dans les couches cutanées.

Pour la **phénylalanine (Phe)**, on repère principalement 3 raies à **620, 1003 cm^{-1}** (respiration du cycle), et 1030 cm^{-1} (C-H). La phénylalanine contribue aussi aux vibrations situées à 1175, 1207, 1339 et 1698 cm^{-1} (Akhtar et al. 1997; Tfayli et al. 2007).

Pour la **tyrosine (Tyr)**, on note les raies à **641 cm^{-1}** (respiration du cycle) et le **doublet à 831 et 855 cm^{-1}** , correspondant à la **résonance de Fermi** entre la vibration du cycle (vibration symétrique d'étirement) et les harmoniques des vibrations d'étirement des liaisons C-C et C-O. Le rapport des intensités I_{831}/I_{855} est indicateur de la formation des liaisons hydrogènes. Pour les différentes couches de la peau, la vibration à **855 cm^{-1}** étant plus intense, on peut en déduire que le groupement hydroxyle est accepteur de liaison hydrogène, c'est-à-dire que ce groupement est exposé et non pas enfoui. Ce qui est favorable à la formation de liaisons intermoléculaires entre la tyrosine et d'autres molécules. La tyrosine présente également des raies de vibrations d'intensité plus faible à 1031, 1207, 1606 et 1615 cm^{-1} .

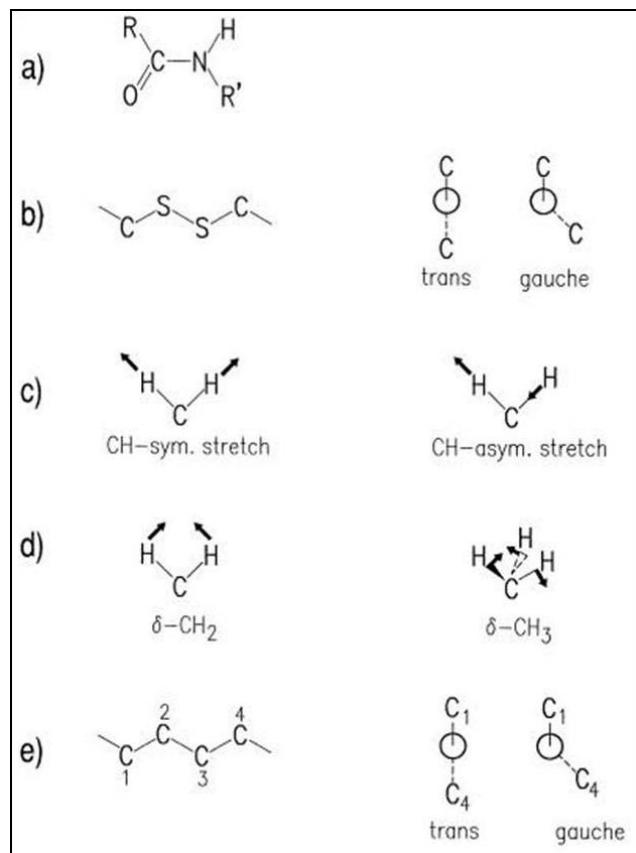
Le rapport des intensités des bandes de vibrations à 620 cm^{-1} (Phe) et 642 cm^{-1} (Tyr) est généralement utilisé pour estimer le rapport du nombre de chacun de ces 2 acides aminés présents dans chaque couche. Ici, une telle information n'est pas possible, car les cystéines, acides aminés majoritaires de la kératine, présentent une raie de vibration à 643 cm^{-1}

correspondant à l'étirement des C-S (Bell et al. 1983; Akhtar et al. 1997; Tfayli et al. 2007; Parker 1983).

Le **tryptophane (Trp)** possède une raie de vibration à **754 cm⁻¹** pour le stratum corneum et l'épiderme, décalée vers **761 cm⁻¹** pour le derme, d'autres raies attribuées au tryptophane sont présentes à **897, 1339, 1369 et 1615 cm⁻¹** sur le spectre de l'épiderme ainsi qu'un pic à **1549 cm⁻¹** décalé à **1555 cm⁻¹** pour le derme. Le Trp contribue aussi aux raies à **1004 et 1207 cm⁻¹**. **La présence d'une raie de vibration à 1369 cm⁻¹ montre que le cycle indole du Trp est enfoui et donc inaccessible aux molécules d'eau.** (Bell et al. 1983; Barry et al. 1992; Tfayli et al. 2007; Parker 1983)

Sur le spectre du derme, deux raies de faible intensité à **919 et 1449 cm⁻¹** mettent en évidence la présence de **proline** du collagène du derme. Ces deux raies sont absentes sur les spectres du stratum corneum et de l'épiderme.

Figure Ch.I.09: représentation schématique des vibrations moléculaires des lipides, des protéines. a : liaisons peptidiques des protéines. La bande Amide I résulte principalement des étirements du groupement C=O. La bande Amide III est plus complexe impliquant l'étirement des liaisons C-R et C-N ensemble avec une déformation du CNH. b : représentation des conformations *trans*- et *gauche*- . Ces conformations sont présentes pour les liaisons C-S et S-S. c : étirement symétrique et asymétrique des liaisons C-H. d : vibrations δ(CH₂)(CH₃). e : chaîne acyl en conformation *trans* (1) et *gauche* (2).



La **cystéine**, acide aminé le plus abondant des fibres de kératine (Baden et al. 1968; Akhtar et al. 1997; Gniadecka et al. 1998a; Gniadecka et al. 1998b) et son dérivé cystine jouent un rôle très important car ils sont responsables de la formation des ponts disulfures (liaison S-S). Cette liaison covalente est plus stable que les liaisons d'hydrogènes, les liaisons ioniques et les liaisons de van der Waals.

Les raies caractéristiques des cystéines se trouvent à **622, 643, 676, 693 et 722 cm⁻¹** (**étirement C-S trans**) (figure Ch.I.09.b) pour les trois couches de la peau. De plus, sur le spectre du stratum corneum, on peut distinguer une vibration **d'étirement C-S gauche** à 700 cm⁻¹.

La comparaison des spectres de la figure Ch.I.08.a permet de mettre en évidence un massif peu intense dans la gamme spectrale 500-600 cm⁻¹, caractéristiques des ponts disulfures. Ce massif est présent sur les spectres de l'épiderme et du stratum corenum et absent sur le spectre du derme.

Les raies de vibration des ponts disulfures sont également informatives sur leur conformation (figure Ch.I.09.b) : selon la fréquence des raies de vibrations des S-S la conformation peut être *gauche –gauche –gauche* et donc stable (510 cm⁻¹), *gauche –gauche –trans*, conformation moins stable (525 cm⁻¹) ou même *trans –gauche –trans*, encore moins stable (540 cm⁻¹) (Gniadecka et al. 1998a; Tfayli et al. 2007). Sur le spectre du stratum corneum, la position de la bande S-S est à 528 cm⁻¹ ce qui refléterait une conformation *gauche –gauche –trans* peu stable. Pour le derme et l'épiderme, les vibrations du pont disulfure sortent à 534 et 536 cm⁻¹ respectivement, ce qui indique une conformation *trans –gauche –trans*, moins stable.

En ce qui concerne la structure secondaire, la spectroscopie Raman permet de déterminer le type de structure (hélice α , feuillet β , coude β , structure aléatoire ou random coil...) et de quantifier leur importance relative par décompositions des bandes Amide I et Amide III (Akhtar et al. 1997; Gniadecka et al. 1998a; Gniadecka et al. 1998b; Dehring et al. 2006; Zhu et al. 2006).

La bande Amide I (1630-1700cm⁻¹) correspond principalement à la vibration d'étirement du groupement carbonyl (C=O) des CONH, avec une contribution de la vibration d'étirement "out-of-plane" du groupement CN, et de déformation des CCN (figure Ch.I.09.a). Pour la bande Amide I, les structures en hélices α donnent une vibration à 1650 cm⁻¹. Les feuillets β sortent entre 1660 et 1679 cm⁻¹.

La bande Amide III ($1230\text{-}1310\text{cm}^{-1}$) résulte d'une combinaison des vibrations de déformation "dans le plan" du groupement NH (in-plane bending), avec des vibrations d'étirement des C-N, d'étirement du groupement CC ainsi que les vibrations de déformation dans le plan du groupement CO (figure Ch.I.09.a). Sur la bande Amide III, les structures de type aléatoire sortent vers 1250 cm^{-1} , et les hélices α vers 1285 cm^{-1} .

Amide I : Au niveau des spectres de la figure Ch.I.08, la bande Amide I est centrée à 1652 et 1654 cm^{-1} pour le stratum corneum et l'épiderme respectivement. Ceci révèle une prédominance des hélices α par rapport aux autres conformations. Sur le spectre du derme, le maximum de la bande Amide I est légèrement décalé (1656 cm^{-1}), ce qui indique une plus forte contribution des autres structures. L'épaulement à 1670 cm^{-1} de la bande Amide I du derme reflète une contribution importante des feuillets β .

Amide III : En ce qui concerne la bande Amide III, le rapport d'intensité I_{1265}/I_{1249} (hélice α et structures aléatoires respectivement) est égal à $1,3$ pour les spectres du stratum corneum et de l'épiderme. Ceci confirme la prédominance des hélices α dans la structure secondaire de ces deux couches cutanées.

Sur le spectre du derme ce rapport est égal à 1 , ce qui indique une contribution plus importante des structures aléatoires dans les protéines du derme par rapport au stratum corneum et l'épiderme.

Les hélices α sont aussi mises en évidence par la bande à 940 cm^{-1} sur les 3 couches cutanées, et la raie à 954 cm^{-1} sur le spectre du stratum corneum.

Le niveau de repliement et de dépliement des protéines peut être reflété par la position des vibrations symétriques et asymétriques des CH_3 (1415 et 2900 cm^{-1} déformation et étirement respectivement).

Sur les spectres des trois couches, la raie à 1415 cm^{-1} est décalée vers 1385 cm^{-1} . Celle à 2900 cm^{-1} est décalée vers 2892 cm^{-1} pour le derme. Ceci pourrait refléter un dépliement des protéines dermiques et une exposition plus ou moins importante de leur chaîne aliphatique aux molécules d'eau (Gniadecka et al. 1998a).

Lipides de la peau

Tableau Ch.I.03 : attribution des raies Raman spécifiques aux lipides de la peau

NOMBRE D'ONDES (cm ⁻¹)			ATTRIBUTION DES BANDES
SC	Epiderme	Derme	
		519	Phospholipides
528	528		Céramides
	536	534	Cholestérol ester
545	545		Cholestérol
566	567	567	Cholestérol
605	605	605	ρ (H) balancement (lipides)
	700		Cholestérol, Cholestérol ester
	761		Phospholipides
	786	786	Phospholipides
	822		ν (C-C) du squelette ; O-P-O des phospholipides
832	831	831	O-P-O des phospholipides
956	954		Cholestérol ; δ CCH oléfinique
	972		CH=CH bending ; ν C-O (perpendiculaire)
1031	1032	1033	ν (CC) du squelette ; lipides
1062	1063	1063	Lipides : chaîne hydrocarbonée <i>trans</i> Céramides Acides gras
1083	1083		Lipides : chaîne hydrocarbonée gauche Céramides
1095	1096	1092	Lipides : chaîne hydrocarbonée gauche Céramides
1129	1128		Lipides : chaîne hydrocarbonée <i>trans</i> Céramides
1158	1158	1159	ν C-C, ρ CH ₃ , C-C vibration du squelette
1174	1174		ν sym C-O-C Lipides
1249	1249	1249	P=O phospholipides
1265	1265		(=CH) in plane bending (lipide)
	1271		CH ₂ phospholipides
1297			CH ₂ Céramides acide oléique
	1303		δ (CH ₂) (lipides)
1369	1369	1369	Lipides
1442			Δ CH lipides (céramides et ac oléique à 1438, cholestérol à 1440)
1448	1449		Δ CH lipides
1607	1605	1608	ν (C=C) olefinic;
1652	1654	1656	ν (C=C) lipide (a gras insaturés)
	1732		ν C=O phospholipides
1750	1750		ν (COO) (lipides)
2849	2849		ν (CH ₂) symétrique lipides (céramides)
	2872	2872	ν (CH ₂) asymétrique
2879			ν (CH ₂) asymétrique (céramides)
	2892		ν (CH ₂)C-H asymétrique (lipides)
2897	2896		Céramides
2930	2929	2932	ν (CH ₃) symétrique (lipides) céramides cholestérol
	2955		ν (CH ₃) symétrique (lipides)
2968	2968	2967	ν (CH ₃)C-H asymétrique (lipides)
	3020		ν (CH ₃)C-H asymétrique (lipides)

ν : élongation ; γ_w : balancement ; δ : déformation ; ρ : hochement (rocking)

Les lipides de la peau sont constitués principalement de céramides, cholestérol, acides gras et phospholipides membranaires des cellules des couches profondes.

Les lipides se présentent sous différentes conformations allant de la forme cristalline jusqu'aux solutions. La fluidité des lipides augmente avec la diminution des liaisons latérales des chaînes acyles ; ce qui est accompagné d'une désorganisation des lipides. Cette fluidité peut être étudiée en suivant l'intensité des raies dans la région 1000-1150 cm⁻¹ (Lippert et al. 1971; Akhtar et al. 1997; Neubert et al. 1997; Wegener et al. 1997; Gniadecka et al. 1998a).

Dans l'état cristallin, toutes les chaînes ont une conformation *trans* représentée par les bandes à 1062 cm⁻¹ et 1130 cm⁻¹ (figure Ch.I.09.e). La désorganisation des lipides correspond à une transition vers une conformation *gauche* (figure Ch.I.09.e), ce qui induit par la disparition des pics à 1062 cm⁻¹ et 1130 cm⁻¹ et l'apparition de pics à 1083 cm⁻¹ et 1096 cm⁻¹ (Barry et al. 1992; Neubert et al. 1997; Wegener et al. 1997; Gniadecka et al. 1998a).

Sur les spectres de l'épiderme et du stratum corneum, les 4 bandes sont présentes mais avec une prédominance des bandes à 1062 cm⁻¹ et 1129 cm⁻¹ pour le spectre du stratum corneum, indiquant une organisation des composés lipidiques. Au niveau de l'épiderme, les raies à 1063 et 1129 cm⁻¹ présentent une intensité moindre, ce qui indique une structure moins organisée des lipides épidermiques. Pour le derme, l'intensité de ces raies (figure Ch.I.08.a) traduit une organisation nettement moins structurée.

Le rapport d'intensité des modes de vibrations (asymétriques et symétriques) du groupement méthylène (ν CH), I_{2890}/I_{2850} est directement lié au degré d'organisation et aux interactions latérales des chaînes acyles des lipides. Ce degré (S_{lat}) est calculé suivant l'équation suivante (Gniadecka et al. 1998a; Gniadecka et al. 1998b; Holtje et al. 2001):

$$S_{lat} = \frac{|I_{CH_2}(\text{échantillon}) - 0,7|}{1,5} \quad (\text{Equ.Ch.I.15})$$

Avec I_{CH_2} le rapport d'intensité I_{2890}/I_{2850} .

Si $S_{lat}=1$, les lipides sont dans l'état cristallin ($I_{CH_2}=2,2$)

Si $S_{lat}=0$, les lipides sont dans l'état liquide ($I_{CH_2}=0,7$)

Ce paramètre révèle la structure intermoléculaire des lipides. Il diminue selon l'ordre suivant : lipide lamellaire, cristallin hexagonal ou cubique, solution micellaire et solution.

Pour le stratum corneum, le S_{lat} est légèrement inférieur à 1, indiquant que la majorité de ses lipides sont dans un état cristallin.

Les **phospholipides** sont principalement présents au niveau des couches profondes de la peau, ils présentent des raies Raman à 519, 722, 761, 722 cm⁻¹ (CH₂), 786, 831, 822 cm⁻¹ (O-P-O) et à 1732 cm⁻¹ (CO).

Les sucres de la peau

Tableau Ch.I.04 : attribution des raies Raman spécifiques aux polysaccharides de la peau

NOMBRE D'ONDES (cm⁻¹)			ATTRIBUTION DES BANDES
<i>SC</i>	<i>Epiderme</i>	<i>Derme</i>	
459			Probablement squelette des saccharides
		534	Probablement squelette des saccharides
	567	567	Polysaccharides
676			Saccharides
		700	Saccharides, Polysaccharides
754		754	Polysaccharides
	855	855	Polysaccharides
800-1150	800-1150	800-1150	Polysaccharides
		919	glucose/acide lactique
940	940	938	Polysaccharides
1083	1083		Polysaccharides
1095	1096	1092	Polysaccharides
1129	1128		Polysaccharides
1207	1207		Polysaccharides
1265	1265		Polysaccharides
1297			Saccharides
		1342	Polysaccharides
	1381		Saccharides

v : élongation ; γ_w : balancement ; δ : déformation ; ρ : hochement (rocking)

Les raies de vibrations associées aux polysaccharides sont généralement masquées par le signal des lipides et des protéines. La contribution des sucres est mise en évidence par la présence du massif entre 800 et 1150 cm⁻¹ correspondant aux étirements C-O-C (Zhu et al. 2006; Parker 1983)

Pigments de la peau

Tableau Ch.I.06 : attribution des raies Raman spécifiques aux pigments de la peau

NOMBRE D'ONDES (cm⁻¹)			ATTRIBUTION DES BANDES
<i>SC</i>	<i>Epiderme</i>	<i>Derme</i>	
1158	1158		v C-C caroténoïdes
	1381		Mélanine v linéaire des C-C du cycle
	1516		v -C=C- Caroténoïdes
1524			v -C=C- Caroténoïdes

v : élongation ; γ_w : balancement ; δ : déformation ; ρ : hochement (rocking)

Les **caroténoïdes** jouent un rôle important dans le système anti-oxydant de la peau (Hata et al. 2000). Molécules lipophiles, les caroténoïdes agissent comme anti-oxydants ("chain-breaking") protégeant les acides gras poly-insaturés de la peroxydation (Krinsky et al. 1982). Les principales raies de vibration des caroténoïdes cutanés se trouvent à **1158, 1516 et 1524 cm⁻¹** (Hata et al. 2000).

La **Mélanine** présente une raie de vibration à **1381 cm⁻¹** (Li et al. 2007). Au niveau des spectres Raman, elle contribue aussi sous la forme d'un fond de fluorescence même pour des excitations proche infrarouge (785, 830 nm).

Autres entités moléculaires de la peau

- Acides nucléiques :

Tableau Ch.I.05 : attribution des raies Raman spécifiques aux acides nucléiques de la peau

NOMBRE D'ONDES (cm⁻¹)			ATTRIBUTION DES BANDES
<i>SC</i>	<i>Epiderme</i>	<i>Derme</i>	
	567	567	ARN C=O bend (C, G)
	623		G A
	680	679	Respiration du cycle de Guanine
		761	C
	786	786	DNA, ARN: (OPO), cytosine, uracile, thymine ring v ADN respiration cycle (C)
		919	cycle désoxyribose
		1047	v C-O ARN
		1188	Cytosine, guanine, adénine
	1303		ADN adénine, cytosine, ARN
	1338	1342	Chaîne polynucléotidique (bases purine d'ADN) Adenine Guanine ARN
	1516		A
	1580		Pyrimidine ring (acides nucléiques) et hème protéique
	1670		v(C=O) ARN ADN

v : élongation ; γ_w : balancement ; δ : déformation ; ρ : hochement (rocking)

Les vibrations attribuées aux acides nucléiques sont de faible intensité et généralement masquées par les raies de vibration d'autres constituants. On distingue néanmoins des raies qui pourraient être attribuées à des vibrations qui leur sont spécifiques (tableau Ch.I.05).

Après cette analyse des structures cutanées par Raman, nous allons à présent voir l'apport de la spectroscopie Infrarouge dans cette caractérisation de la peau.

Spectroscopie infrarouge

La spectroscopie d'absorption Infrarouge permet d'apporter des informations complémentaires à celles obtenues par spectroscopie Raman au niveau des différents constituants moléculaires de la peau.

Les protéines

La liaison peptidique possède de nombreux modes de vibration et donne des bandes (notées amide I à amide VII). Parmi ces vibrations, les bandes amide I et amide II sont particulièrement actives en infrarouge (tableau Ch.I.07). L'analyse fine de leur position et de leur décomposition spectrale par déconvolution et curve-fitting, donnent des informations sur la structure de la protéine étudiée, notamment le pourcentage des différentes structures secondaires, hélice α , feuillet β , coude β ou encore les structures aléatoires (random coil)...

Tableau Ch.I.07 : Détermination de la structure secondaire des protéines à l'état solide (a et b)

Structure secondaire	Fréquence (cm^{-1}) (a)	
	Amide I	Amide II
Hélice α	1650-1652	1516-1540
Feuillet β : chaînes antiparallèles	1630-1645	1530-1550
Feuillet β : chaînes parallèles	1632-1685	1530
Random coil	1656	1535

Fréquences (cm^{-1})	Vibrations de la bande Amide I (b)
1613, 1621	Pelote statistique (aggregated strands)
1630	Feuillet β
1641, 1649	Pelote statistique
1659	Hélice α
1668, 1680	Tournant
1695	Feuillet β anti-parallèle

Les vibrations Infrarouge des chaînes latérales des acides aminés permettent également d'accéder certaines informations (tableau Ch.I.08)

Tableau Ch.I.08 : Quelques bandes d'absorption IR attribués aux vibrations des protéines

Vibrations de la liaison peptidique		Vibrations des chaînes latérales	
Fréquence (cm ⁻¹)	Attribution	Fréquence (cm ⁻¹)	Attribution
3250-3300	Amide A (résonance de Fermi ν (N-H) avec amide II)	1716	ν _{as} (C=O) de COO ⁻ de l'aspartate
3090-3100	Amide B (résonance de Fermi ν (N-H) avec amide II)	1712	ν _{as} (C=O) de COO ⁻ du glutamate
1600-1700	Amide I ν (C=O) couplé avec ν (C-N) et δ (N-H)	1622	δ (CH ₂) de l'asparagine
1550	Amide II δ (N-H) couple avec ν (C-N)	1596	Histidine (mouvement du cycle)
625-767	Amide IV δ (O=C-N) et autres modes	2400-2700	Cystéine ν (S-H)
640-800	Amide V δ (O=C-N-H) et autres modes	3486-3491	Tryptophane ν (N-H du noyau indole)
537-606	Amide VI δ (N-H) hors du plan		
200	Amide VII (torsion du squelette)		

ν : élongation ; γ_w : balancement ; δ : déformation ; ρ : hochement (rocking)

Les lipides

L'attribution des bandes spectrales des lipides cutanés peut être réalisée à partir de spectres enregistrés sur des molécules pures. En raison de leur largeur et de leurs chevauchements, l'attribution des bandes reste l'une des difficultés majeures de l'analyse des spectres infrarouges. Le tableau Ch.I.09 présente les attributions des bandes Infrarouges des phospholipides cutanées uniquement.

Tableau Ch.I.09 : Quelques pics d'absorption des phospholipides

Fréquence (cm ⁻¹)	Attribution	Fréquence (cm ⁻¹)	Attribution
2950-2960	ν _{as} (C-H) de CH ₃	1470-480	δ (C-H) de CH ₂
2920-2930	ν _{as} (C-H) de CH ₂	1460	δ (C-H) de CH ₃
2865-2880	ν (C-H) de CH ₃	1230	ν _{as} (P=O) de PO ₂
2840-2860	ν (C-H) de CH ₂	1170-1200	ν (C-O-C) des esters
1730-1760	ν (C=O) des esters	1080	ν (P=O) de PO ₂

ν : élongation ; γ_w : balancement ; δ : déformation ; ρ : hochement (rocking)

Les polysaccharides

Les principales bandes de vibrations des sucres sont présentées dans le tableau Ch.I.10.

Tableau Ch.I.10 : Bandes d'absorption IR des polysaccharides complexes

Fréquence (cm ⁻¹)	Attribution	Fréquence (cm ⁻¹)	Attribution
1700-1730	v (C=O) de COOH	1050-1070	
1600-1650	Amide I v (C=O) + v (C-N)	1030	
1540-1560	Amide II δ (N-H) + v (C-N)	1016-1024	α-glucose
1420	v _s (COO ⁻)	966	C-C désoxyribose
1160-1170	v (C-O-C), v (C-C) β-glucose	930	Vibration du cycle
1120-1150	v (C-O-C), v (C-C) α-glucose	830	δ (C-H)
1105		805-812	α et β-mannanes
1080	v (C-O-C) β-glucose		

v : élongation ; γ_w : balancement ; δ : déformation ; ρ : hochement (rocking)

Les acides nucléiques

Ce sont les groupes phosphates et les riboses qui donnent naissance aux vibrations les plus actives en infrarouge (tableau Ch.I.11).

Tableau Ch.I.11 : Principales bandes d'absorption IR de l'ADN

Fréquence (cm ⁻¹)	Attribution
ADN	
1710	v (C=O) carbonyle
1240	v _{as} (P=O)
1090	v (P=O)
810-820	OPO diester
665 – 675	Guanine, respiration du noyau

v : élongation ; γ_w : balancement ; δ : déformation ; ρ : hochement (rocking)

CHAPITRE II
DISCRIMINATION MELANOME – NAEVUS : ANALYSE DE COUPES
TISSULAIRES PARAFFINEES



Ch.II.1 : Introduction

Les cancers cutanés, y compris les carcinomes basocellulaires, les carcinomes spinocellulaires et les mélanomes, comptent parmi les formes les plus fréquentes de cancer.

Le mélanome est la forme la plus agressive des cancers de la peau de par son fort risque métastatique, et cause trois quarts des décès par cancers cutanés (Braun-Falco et al. 1991; Bronchud et al. 2004; Grob et al. 2004; Lipsker et al. 2005; Chen et al. 2001). C'est une tumeur maligne qui se développe aux dépends des mélanocytes, les cellules qui fabriquent la mélanine.

Le diagnostic précoce du mélanome constitue un des plus grands défis de la cancérologie : déceler les tumeurs en phase précoce est crucial afin de prévenir la dissémination métastatique et la mort (Fitzpatrick et al. 1995; Eikje et al. 2005a).

Actuellement, la sensibilité du diagnostic d'un mélanome varie entre 40% pour les non dermatologues et 80% pour les dermatologues expérimentés (Bastuji-Garin et al. 2002). La difficulté du diagnostic du mélanome (cf. diagnostic différentiel) vient de sa ressemblance avec d'autres lésions cutanées, plus particulièrement avec des lésions bénignes de type nævus. A l'heure actuelle, les informations fournies par les outils utilisés pour l'aide au diagnostic (total body photography et dermatoscopie ...), se limitent à des critères morphologiques et ne comportent aucune donnée d'ordre moléculaire. L'examen anatomopathologique après exérèse reste la technique de référence. Mais enlever toute lésion suspecte est inacceptable pour les patients, du fait du grand nombre de taches pigmentées telles que les grains de beauté. Parallèlement, on estime que 80% des biopsies des lésions suspectées malignes se sont révélées être bénignes (Braun-Falco et al. 1991; Bastuji-Garin et al. 2002; Grob et al. 2004; Eikje et al. 2005a).

Le développement d'une nouvelle méthode non invasive d'aide au diagnostic des mélanomes serait donc une avancée significative.

Les spectroscopies vibrationnelles, infrarouge et Raman, donnent une « empreinte digitale » globale de la composition chimique d'un échantillon biologique, et par conséquent, permettent de déterminer des signatures spectrales caractéristiques de la nature et de l'état physiopathologique de cet échantillon (marqueurs spectroscopiques). De part la sensibilité (en terme d'informations moléculaires) de ces marqueurs spectroscopiques, les spectroscopies

vibrationnelles sont des outils particulièrement bien adaptés à l'étude des changements moléculaires associés au développement d'une pathologie ; notamment pour les cancers.

Plusieurs publications font référence à l'utilisation de ces techniques pour la caractérisation de différents types de cancers : poumons, cerveau, colon, peau, col d'utérus (Barry et al. 1992; Fendel et al. 1998; Lasch et al. 1998; McIntosh et al. 1999; Dukor 2002; Koljenovic et al. 2002; Nijssen et al. 2002; Gniadecka et al. 2004; Koljenovic et al. 2004; Lasch et al. 2004; Mordechai et al. 2004; Sigurdsson et al. 2004; Stone et al. 2004; Wood et al. 2004; Choi et al. 2005; Eikje et al. 2005a; Mourant et al. 2005; Andrus 2006; Bitar et al. 2006; Petibois et al. 2006; Bogomolny et al. 2007; Matousek et al. 2007; Nijssen et al. 2007). Plus particulièrement, les tumeurs cutanées ont attiré l'attention des spectroscopistes du fait de leur accessibilité et de leur diversité. Différents types de cancers cutanés ont été alors étudiés et classés sur la base de marqueurs spectroscopiques spécifiques (Lasch et al. 1998; McIntosh et al. 1999; Nijssen et al. 2002; Gniadecka et al. 2004; Mordechai et al. 2004; Sigurdsson et al. 2004; Stone et al. 2004; Choi et al. 2005; Eikje et al. 2005a; Nijssen et al. 2007). En 1997 Fendel et al. (Fendel et al. 1998) ont montré la possibilité de discriminer une peau normale d'une peau tumorale. En 1999, McIntosh et al. (McIntosh et al. 1999) ont mis en évidence des changements au niveau du contenu protéique et au niveau des acides nucléiques, liés au cancer. En 2002 Nijssen et al. (Nijssen et al. 2002) ont associé la diminution du signal du collagène à un état prélysionel dans le cas des carcinomes basocellulaires. En 2007, ces mêmes auteurs ont mis en évidence des marqueurs spectroscopiques permettant de diagnostiquer un carcinome basocellulaire.

Tous ces travaux ont été menés soit sur des tissus frais, soit sur des tissus congelés. Jusqu'à lors, très peu d'études ont été menées sur des tissus paraffinés. Ceci est dû à la forte contribution de la paraffine dans la signature spectrale, avec des bandes de la paraffine superposées avec celles de la peau. Ceci accroît la complexité de l'analyse.

Cependant, l'inclusion dans la paraffine représente une méthode très largement utilisée pour la conservation des tissus. Elle permet une conservation de longue durée et de bonne qualité. De plus, les tissus paraffinés sont facilement manipulables.

Le grand nombre de tissus paraffinés conservés dans les tumorothèques représente donc une banque d'échantillons indispensable à l'identification de marqueurs spectraux à visée diagnostique ou pronostique, à condition d'extraire l'information spectrale du tissu biologique

en dépit du signal de la paraffine.

Le déparaffinage chimique permet d'éliminer la paraffine des coupes tissulaires. Mais, ce processus est relativement lourd et peut altérer la structure des tissus biologiques. De plus, Faolain et al. ont montré que l'efficacité du déparaffinage chimique est limitée et que des traces résiduelles parasitent toujours les spectres Raman des tissus (Faolain et al. 2005a; Faolain et al. 2005b).

L'objectif de ce chapitre est de montrer, en analysant de coupes de peau paraffinées, le potentiel des spectroscopies vibrationnelles pour le diagnostic différentiel des lésions malignes de type mélanome et bénignes de type nævus.

Les résultats seront présentés selon deux parties : la première concerne les mesures en infrarouge et la seconde est relative aux analyse en Raman.

- Analyse de coupes paraffinées en infrarouge :

Dans cette étape, on va montrer **dans un premier temps**, que, malgré le signal de la paraffine en IRTF, une simple **sélection** visuelle de **bandes fines** et « non polluées » par la paraffine permet une **bonne discrimination** entre nævus et mélanomes. On met aussi en évidence des changements au niveau des acides nucléiques et de la mélanine entre ces deux lésions.

Dans un deuxième temps, on applique des **méthodes statistiques multivariées** pour tout d'abord, corriger les spectres et diminuer la variabilité liée à la paraffine dans les images spectrales. Ensuite, reconstruire des **images pseudo-couleur** comparables aux images des coupes histologiques colorées. L'utilisation des méthodes statistiques multivariées permet l'automatisation de l'analyse ce qui donne accès à des études à plus grande échelle.

- Analyse de coupes paraffinées en Raman :

La contribution de la paraffine dans les spectres Raman (90% du signal total) est beaucoup plus importante comparée à la spectroscopie IRTF. Le signal de la paraffine présente, sur la totalité de la gamme spectrale d'étude, des bandes fines mais fortement intenses. L'approche de détection visuelle des bandes discriminantes n'étant pas envisageable, des méthodes statistiques poussées (Analyse en composantes indépendante ICA et non-negativity constraint least square NCLS) ont été utilisées. Ces méthodes permettent d'éliminer le signal de la paraffine et de rendre le signal exploitable pour des études spectroscopiques classiques.

Ch.II.2 : Généralités

Epidémiologie des mélanomes:

Incidence et mortalité

L'**incidence** des mélanomes double environ tous les 10 ans dans les pays à population essentiellement blanche (figure Ch.II.1) (Remontet et al. 2003). En France, on estime l'incidence de 5 à 10 nouveaux cas / 100000 habitants par an (Braun-Falco et al. 1991; Grob et al. 2004; Lipsker et al. 2005). En Champagne-Ardenne, ce taux est de 13 cas pour 100 000 hab./an (Bernard et al. 2007).

De grandes différences s'observent en fonction de la latitude (soleil) et des caractéristiques ethniques des populations. Cette incidence atteint des sommets (40 nouveaux cas / 100 000 habitants par an) chez les blancs en Australie, alors qu'elle est très faible dans les pays où les sujets sont noirs ou jaunes.

C'est une tumeur qui touche **tous les âges**, en dehors de l'enfant chez qui le mélanome est exceptionnel (Fitzpatrick et al. 1995).

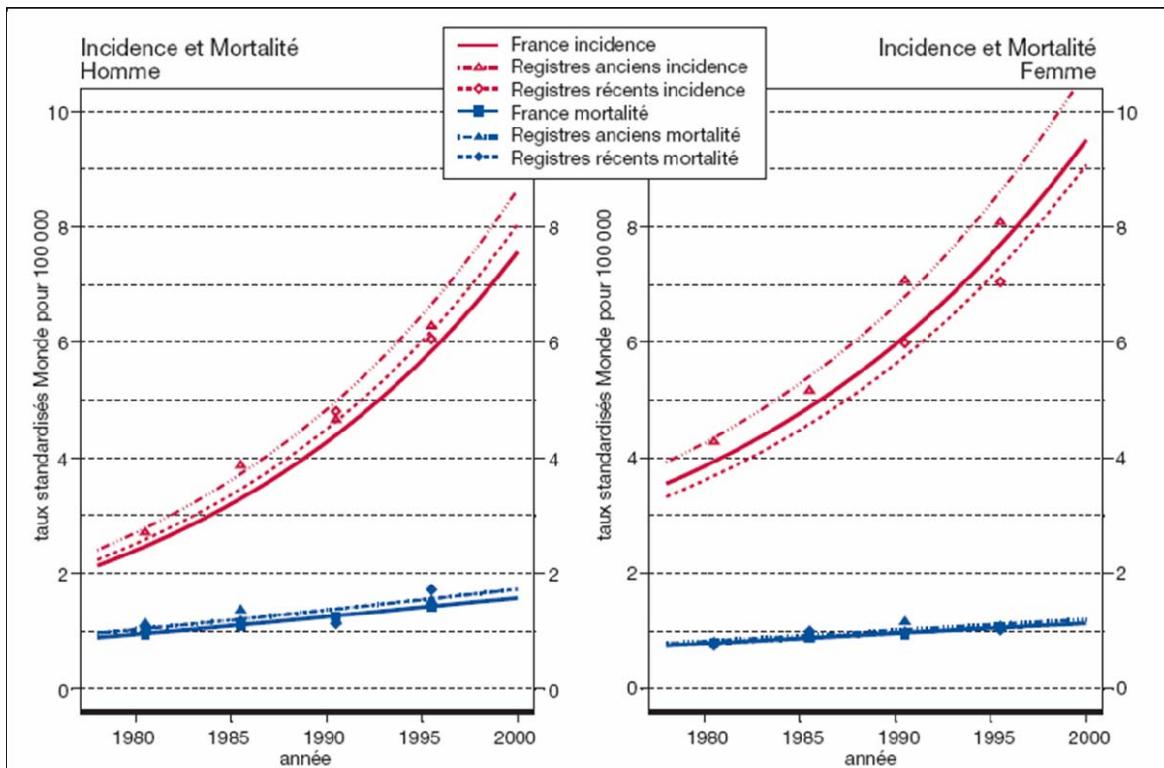


Figure Ch.II.1 : Evolution de l'incidence et de la mortalité par mélanome en France (Remontet et al. 2003)

La mortalité (1,6 à 2,8 /100000 en France, autour de 5 en Australie) tend à augmenter moins que l'incidence, ce qui peut être attribué au diagnostic plus précoce (figure Ch.II.1, Ch.II.2) (Fitzpatrick et al. 1995; Saiag et al. 2002; Serruys 2002; ORS 2003; Grob et al. 2004; Lipsker et al. 2005).

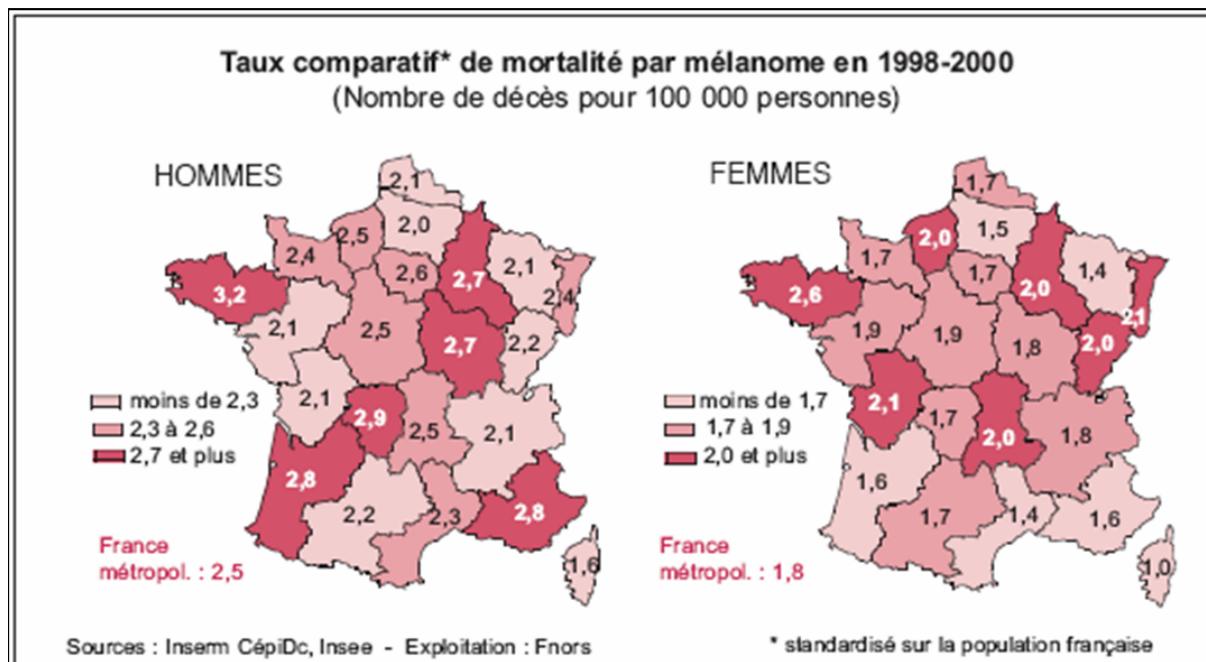


Figure Ch.II.2 :Taux comparatif de mortalité par mélanome en 1998-2000 (ORS 2003)

Le rôle de l'environnement : l'exposition solaire

Le soleil est le **seul** facteur d'environnement impliqué dans l'épidémiologie du mélanome. De nombreuses études d'épidémiologie descriptive attribuent un rôle majeur aux expositions intermittentes et à celles reçues dans l'enfance et écartent le rôle des expositions cumulatives. Les mélanomes du sujet âgé, survenant en fin de vie sur les zones exposées en permanence au soleil (mélanome de Dubreuilh), sont à l'évidence liés aux expositions chroniques cumulatives ; les mélanomes des paumes et des plantes, qui ne sont pas liés aux expositions solaires, montrent que tous les mélanomes ne répondent pas aux mêmes règles épidémiologiques (Crepy 2004; Grob et al. 2004; Lipsker et al. 2005) (Tableau Ch.II.1).

Tableau Ch.II.1 : Le soleil et le mélanome (Grob et al. 2004)

Arguments en faveur du rôle joué	Par le soleil	Par les expositions intermittentes plus que par les expositions régulières ou cumulatives	Particulièrement par les expositions dans l'enfance
Géographiques (irradiation ambiante)	L'incidence augmente quand la latitude baisse		
Phénotypiques (origine ethnique, capacité à bronzer)	Risque plus élevé - Chez les Caucasiens - Chez les sujets à peau très blanche		
Anatomiques	Risque plus élevé sur les régions du corps exposées au soleil que non exposées	Risque plus élevé sur les zones exposées occasionnellement qu'en permanence	
Chronologies (âge)		L'incidence n'augmente pas avec l'âge	Risque plus élevé chez les sujets ayant émigré tôt en pays très ensoleillé
Sociologiques (mode de vie)	Risque lié aux expositions en cabine de bronzage	Risque - non lié aux expositions solaires professionnelles - lié aux expositions de loisirs - lié à la fréquence des coups de soleil	Risque lié aux antécédents de coups de soleil pendant l'enfance

La prédisposition familiale, les facteurs génétiques (Carli et al. 2004; Grob et al. 2004; Lipsker et al. 2005)

Ils sont au moins aussi importants que le soleil. Environ **10%** des mélanomes surviennent dans un **contexte familial**, défini comme au moins 2 mélanomes sur 3 générations. La plupart des facteurs de risque identifiés (phénotype clair, nombre de naevus, etc.)

Sont génétiquement transmises :

- La sensibilité au soleil qui s'exprime par le phototype
- La capacité à générer un grand nombre de naevus qui se traduit par le phénotype **naevique**, c'est-à-dire le nombre, la taille et l'aspect des naevi

Les marqueurs de risque de mélanome (Grob et al. 2004; Lipsker et al. 2005)

Ils découlent des facteurs épidémiologiques et sont :

- les antécédents **familiaux** de mélanome
- les antécédents **personnels** de mélanome (les mêmes causes produisent les mêmes effets)

- la couleur claire de la **peau** et des cheveux et en particulier le marqueur **roux** avec des éphélides, cheveux roux, blond vénitien ou auburn.
- un **nombre élevé de naevi** : le risque augmente avec le nombre de naevi et le “Syndrome du naevus atypique” représente l’extrême du phénotype naevique à risque.
- des antécédents d'**expositions solaires intenses**, avec coups de soleil.

Diagnostic des mélanomes:

Diagnostic positif

Le diagnostic du mélanome est **anatomoclinique** et l’interprétation anatomopathologique est souveraine dans l’affirmation du diagnostic, la prise de décision thérapeutique et l’évaluation du pronostic.

1- Diagnostic clinique (Saiag et al. 2002; Grob et al. 2004; Lipsker et al. 2005)

Il repose sur l’analyse morphologique d’une lésion cutanée habituellement pigmentée et sur l’histoire de cette lésion rapportée par le malade, selon les règles de l’ABCDaire.

Un mélanome se présente habituellement sous la forme d’une lésion **asymétrique (A)**, à **bords (B) irréguliers**. La **couleur (C)** est inhomogène variant du brun au noir.

L’évolutivité, se traduit par un **diamètre (D)** de la lésion supérieur à 6 mm ou l’augmentation de ce diamètre et par la notion d'**évolution ou extension (E)** permanente de la lésion, changeant non seulement de taille, mais aussi de forme, de couleur et de relief. Ce critère E peut quelquefois être documenté par des photographies comparatives.

La microscopie de surface ou **dermatoscopie** permet de préciser les caractères morphologiques des bords (B) et des nuances de couleur (C).

Toute lésion suspecte de mélanome doit être excisée en vue d’un examen histopathologique.

La **biopsie-exérèse** doit être complète, emportant la tumeur dans son entier et ses berges.

2- Diagnostic histologique (Saiag et al. 2002; Grob et al. 2004; Lipsker et al. 2005)

L'**histogenèse** des mélanomes suit la théorie **biphasique**, qui postule que les mélanomes évoluent dans une première phase “horizontalement” en nappe, au dessus de la membrane basale (phase intraépidermique) puis dans le derme superficiel (phase microinvasive), et dans une deuxième phase “verticalement” pénétrant profondément le derme (phase invasive). Le mélanome a donc en règle :

- une **composante intraépidermique** faite de mélanocytes qui constituent une nappe ou des thèques irrégulières le long de la couche basale, avec souvent un **envahissement des couches superficielles de l'épiderme**.
- et une **composante dermique invasive** associée à une **inflammation**

L'examen histologique permet d'affirmer la nature **mélanocytaire** de la tumeur. Les mélanocytes tumoraux produisent du pigment mélânique et la formation de thèques est évocatrice. Pour la mise en évidence du pigment mélânique, l'utilisation de marqueurs phénotypiques (protéine S100, anticorps monoclonal HMB45) peut être utile dans les mélanomes peu différenciés.

L'examen histologique permet ensuite d'affirmer la **malignité** de la tumeur.

Il permet enfin d'évaluer le degré d'invasion de la tumeur en profondeur et de mesurer son épaisseur (indice de Breslow) qui est le principal facteur pronostique.

3- Classification anatomoclinique (Saiag et al. 2002; Grob et al. 2004; Lipsker et al. 2005)

La classification anatomoclinique vise à regrouper les différents profils évolutifs du mélanome à 5 catégories :

- mélanome **superficiel extensif** ; évolution initialement horizontale, intraépidermique ou dermique superficielle, puis « verticale », invasive dans le derme.
- mélanome **nodulaire** ; évolution très rapidement verticale.
- mélanomes **lentigineux** ; évolution horizontale pendant des mois et années.
- mélanome **acral** ; des paumes, plantes et ongles.

mélanome **de Dubreuilh** ; des zones cutanées atrophiées par des expositions solaires régulières pendant des décennies (visage du sujet âgé).

Diagnostic différentiel (Saiag et al. 2002; Grob et al. 2004; Lipsker et al. 2005)

Tableau Ch.II.2 : Situations difficiles pour le diagnostic histologique de mélanome (Grob et al. 2004)

Situation	Raison de la difficulté
Naevus simulant un mélanome	
Naevus de Splitz	Atypies cytologiques Inflammation
Naevus « displasique » de Clark	Atypies cytologiques Irregularité des thèques
Poussée évolutive d'un grand naevus	Profondeur invasion Cellularité Atypies
Naevus bleu cellulaire	Profondeur invasion Cellularité Atypies
Naevus de l'enfant	Migration intraépidermique de mélanocytes Atypies
Naevus à « pénétration profonde »	Cellules fusiformes qui s'enfoncent profondément en coin dans le derme et l'hypoderme sans gradient de maturation
Récidive d'un naevus (exérèse incomplète)	Migration intraépidermique de mélanocytes isolés
Mélanome simulant un naevus	
Mélanome naevioidé	Cytologie uniforme Peu d'atypies
Mélanome régressif	Disparition partielle ou totale des éléments diagnostiques
Mélanome ou autre cancer ?	
Mélanome intraépithélial achromique	Peut simuler une maladie de bowen
Mélanome desmoplastique	Tumeur à cellules fusiformes
Mélanome, naevus ou métastase ?	
Mélanome dermique - Mélanome sur naevus bleu - Mélanome + régression superficielle	Tumeurs mélanocytaires cytoligiquement malignes mais absence de contingent intra-épithéliéal
Micrométastase à type de naevus bleu	Image typique de naevus bleu
Métastase épidermotrope	Pseudomélanome primitif

Il doit écarter les autres tumeurs noires qui sont considérablement plus fréquentes que le mélanome (Tableau Ch.II.2) :

- **Les naevus** : les naevus “cliniquement atypiques” qui répondent souvent aux critères de mélanomes débutants (A, B, C) et posent un vrai problème, car ils sont très fréquents.
- **Les kératoses séborrhéiques**, qui répondent aux critères B et C, mais dont la surface est rugueuse, mate, quadrillée avec des microkystes.
- **Les carcinomes basocellulaires "tatoués"**, qui sont identifiables par leur aspect perlé.
- **Les histiocytofibromes pigmentés** caractéristiques par leur palpation ferme et en pastille.
- **Les angiomes thrombosés** qui peuvent donner le change à un mélanome nodulaire

Pronostic des mélanomes:

Pronostic au stade primaire de la tumeur primitive (Saiag et al. 2002; Grob et al. 2004)

Les marqueurs pronostics sont surtout histologiques.

Ils sont dominés par l'**épaisseur tumorale selon Breslow** ou indice de Breslow (Tableau Ch.II.3), qui est la mesure à l'oculaire micrométrique sur coupe histologique standard de l'épaisseur maximum comprise entre les cellules superficielles de la couche granuleuse épidermique et la base de la tumeur (cellule maligne le plus profonde), mais en évitant les régions périannexielles. L'épaisseur est vraisemblablement une appréciation de la masse de la tumeur. Il existe une corrélation presque linéaire entre épaisseur et mortalité.

Tableau Ch.II.3 : Corrélations entre l'indice de Breslow et la survie à 5 ans (Grob et al. 2004)

Epaisseur tumorale	% de survie à 5 ans
< 0,75 mm	96 %
0,76 à 1,49 mm	87 %
1,50 à 2,49	75 %
2,50 à 3,99 mm	66 %
> 4 mm	47 %

La profondeur d'invasion en niveaux de Clark et Mihm est basée sur le concept de franchissement de « barrière anatomique » : barrière basale qui définit des mélanomes sans risque métastatique (niveau I) et, concept plus discutable, de barrières entre le derme papillaire et le derme réticulaire (niveau III-IV), et entre le derme et l'hypoderme (niveau IV-V) (Tableau Ch.II.4).

Tableau Ch.II.4 : profondeur d'invasion en niveaux de Clark et Mihm

Niveau I	Mélanome intraépidermique, prolifération cantonnée à l'épiderme et à la gaine épithéliale des annexes
Niveau II	Invasion d'une partie du derme papillaire
Niveau III	Invasion de tout le derme papillaire, ne dépassant pas l'interface avec le derme réticulaire
Niveau IV	Invasion du derme réticulaire
Niveau V	Invasion de l'hypoderme

Pronostic au stade des métastases en transit et/ou ganglionnaires régionales (Grob et al. 2004)

A ce stade, le délai de récidive est très court (médiane <1 an). Les marqueurs histologiques, comme le nombre de ganglions atteints et les ruptures capsulaires, sont les meilleurs marqueurs péjoratifs.

Pronostic au stade métastatique à distance (Grob et al. 2004)

La survie médiane est entre 6 et 9 mois. Néanmoins, quelques malades ont une survie très prolongée mais ils ne sont pas vraiment identifiables *a priori*. Les malades avec un site métastatique viscéral unique, ont en règle une survie plus prolongée, tandis que ceux qui développent rapidement de multiples métastases viscérales ont une survie très courte quel que soit le traitement.

Traitement :

L'exérèse demeure le traitement principal et permet la guérison des mélanomes de stade primaire non métastatique. Au stade métastatique, il n'existe aucun traitement efficace, les espoirs actuels reposent sur la découverte de vaccins ou de protocoles mixtes d'interférons et de chimiothérapie.

Par conséquent, le seul moyen pour réduire la morbidité et la mortalité du mélanome est le dépistage précoce efficace.

Ch.II.3 - Discrimination mélanome/naevus sur tissus paraffinés: analyse par microspectroscopie infrarouge

Article I: Discriminating nevus and melanoma on paraffin embedded skin biopsies using FTIR microspectroscopy

Contexte

La microspectroscopie Infrarouge, associée à une analyse statistique des spectres, permet de caractériser les tissus biologiques et de discriminer un tissu sain d'un tissu tumoral. Parmi les organes examinés, la peau constitue un terrain d'investigation intéressant de par la diversité des lésions, bénignes (naevus) et plus ou moins malignes (carcinomes, mélanomes) qu'il est crucial de pouvoir identifier correctement. En effet, le mélanome constitue un des cancers les plus dangereux, particulièrement chez les jeunes adultes, mais qui reste sans complication lorsqu'il est diagnostiqué à temps. Ne pas méconnaître un mélanome en le confondant avec un naevus est le point clé de ce diagnostic. Notre objectif est de montrer le potentiel des spectroscopies vibrationnelles comme outils d'aide au diagnostic précoce des lésions cutanées.

Méthodes

Les analyses en Infrarouge ont été réalisées à partir de biopsies de naevus et de mélanome, incluses dans la paraffine. L'étude a été effectuée totalement en aveugle, aucune information sur les types de lésions n'était disponible, et c'est après la réalisation du travail que la nature des lésions (3 mélanomes et 3 nævi) nous a été révélée.

Résultats

Bien que la paraffine possède des raies de vibration de forte intensité, il est possible de sélectionner des régions spectrales sur lesquelles des classifications peuvent être réalisées. Des images spectrales ont d'abord été enregistrées afin de localiser les différentes couches de la peau (épiderme et derme). A partir de ces images, des spectres ont été extraits afin de réaliser des classifications, permettant de discriminer les lésions bénignes (naevus) des mélanomes.

Conclusion

Ce travail montre le potentiel de la microspectroscopie Infrarouge pour différentier deux types de lésions cutanées bénigne (naevus) et maligne (mélanome), pouvant être souvent confondues lors du diagnostic clinique. Les résultats ont été obtenus sur des tissus paraffinés. Ce qui constitue une première dans ce domaine de recherche. Malgré le signal parasite de la paraffine, quatre bandes spectrales de faible intensité, attribuées à la mélanine et aux acides nucléiques, se sont révélées pertinentes pour différentier ces lésions. Ces bandes ne se trouvent pas nécessairement parmi les raies les plus intenses, ou les plus différentes en terme de distance interspectrale.



Available online at www.sciencedirect.com



Biochimica et Biophysica Acta 1724 (2005) 262 – 269



<http://www.elsevier.com/locate/bba>

Regular paper

Discriminating nevus and melanoma on paraffin-embedded skin biopsies using FTIR microspectroscopy

Ali Tfayli^a, Olivier Piot^{a,*}, Anne Durlach^b, Philippe Bernard^c, Michel Manfait^a

^aMéDIAN Unit, CNRS UMR 6142, Faculty of Pharmacy, Reims Champagne Ardenne University, 51 rue Cognacq Jay, 51096 Reims cedex, France

^bDepartment of Pathology Pol Bouin, Reims University Hospital Maison Blanche, 51 rue Cognacq Jay, 51096 Reims cedex, France

^cDepartment of Dermatology, Reims University Hospital Robert Debré, Avenue du Général Koenig, 51092 Reims cedex, France

Received 28 February 2005; received in revised form 19 April 2005; accepted 21 April 2005

Available online 10 May 2005

Abstract

FTIR microspectroscopy in combination with cluster analysis has been used to characterise skin tissues, in order to discriminate cancerous from non-cancerous ones. The main objective of this in-vitro study was to demonstrate the applicability of infrared spectral imaging to separate, on paraffinised biopsies, pigmented nevi (benign skin lesions) from melanomas (malignant skin lesions). Infrared spectra were collected from paraffin embedded samples of nevi and melanomas, without deparaffinisation. Despite the important contribution of the paraffin in these spectra, it was possible to find meaningful and discriminating spectral regions. Spectral imaging was first performed to localize different skin layers (dermis and epidermis). Spectra extracted from the images, were subjected to hierarchical classification algorithm, which allowed the discrimination of melanomas from nevi, using selected spectral windows that correspond to vibrations of DNA and melanin content. Diversity of skin lesions and direct accessibility to the skin make this organ an interesting field of investigation using this technique.

Keywords: paraffinised tissues, skin lesions, melanoma, nevus, infrared microspectroscopy, cluster analysis.

1. Introduction

The skin is a stratified organ composed of three layers: epidermis, dermis and hypodermis. The outermost layer, the epidermis, with an average thickness of 120 µm but it could be much thicker on the palm and the sole. The epidermis is constituted of cells arranged in several layers, the keratinocytes, which produce keratin and are responsible for the barrier function. Skin pigmentation derives from melanocytes which produce melanin. Both proliferating keratinocytes and melanocytes are located within the basal cell layer of the epidermis, overlying the superficial dermis; the main molecular constituents of the epidermis are keratin and melanin. Under the epidermis, the dermis consists of a 1200 µm thick structure, mainly composed of collagen fibres (type I&III), and elastin fibres [1]. The deepest part of the skin, the subcutaneous layer (hypodermis), consists of loose connective tissue and adipocytes.

Including malignant melanoma, basal cell carcinoma, and squamous cell carcinoma, skin cancer is the cancer with the highest incidence worldwide [2]. Cutaneous melanoma is the most severe skin cancer and accounts for three-quarters of all skin cancer deaths [3-4]. Malignant melanoma is a cancer whose incidence and mortality rates are rising in many parts of the world where light-skinned populations live [4].

Whereas carcinomas derive from keratinocytes, melanomas, as benign pigmented nevi, originate from melanocytes. Developpment of most melanomas includes an intra-epidermal and superficial dermis phase (lateral growth), followed by a second step with vertical growth into the dermis (invasive phase) [5-6]. Prognosis of melanoma is related to early detection, which is difficult in numerous cases, particularly due to the difficulty to separate it from atypical nevi. Therefore new and efficient non-invasive tools for early diagnosis of melanomas remain of crucial interest in clinical practice. Several studies have reported the potential of vibrational spectroscopies, infrared absorption and Raman scattering, to characterise biological tissues. Moreover, in the last few years many investigations were carried out to differentiate cancerous from benign tissues on sections of colon [7, 8], cervix [9-10], stomach [11-12], breast [13], skin [10], oral carcinoma [14] and also, *in vivo* by dedicated infrared or Raman probe, for detection of colorectal cancer [15] and Barrett's epithelium in rat's oesophagus [16]. Generally, multivariate statistical treatment is applied to spectral data in order to extract relevant information, criteria that can be considered as functional spectroscopic descriptors of a particular pathology. In skin tumours, Raman spectra have been treated by neural network to discriminate four different types of skin lesions [17-

18]. Pseudo-colour cluster images can be reconstructed to map precisely melanotic zone [19] or basal cell carcinoma [20]. The clusters are determined by principal components or artificial neural network analysis of the spectra, associated with a classification method. In addition to cancer characterisation, vibrational microspectroscopic investigations were performed on the skin to determine molecular concentration profiles and to map the distribution of exogeneous [21] and endogeneous molecules [22-23].

In view of developping a spectroscopic tool dedicated to early diagnosis of melanomas, we carry out here a retrospective study to assess the feasibility of nevus / melanoma discrimination by FTIR imaging in combination with hierarchical cluster analysis.

Generally, in case of formalin fixed paraffin embedded tissues, spectroscopists eliminate chemically the paraffin before any measurements because paraffin presents intense vibration bands, in both infrared and Raman signals. Despite the paraffin signal, our choice was to employ paraffinised tissue sections without deparaffinisation and rehydration and to use regions of the spectra where the paraffin signal is absent, so as to avoid possible chemical alterations of the biological constituents.

2. Materials and methods

2.1. Tissue sample preparation

Ten micron thick tissue sections were cut from paraffin embedded biopsies. For this first investigation, which has been led as a blind study, six biopsies were supplied by the Dermatology Department of Reims University Hospital. The true nature of the samples was histopathologically revealed only after infrared analysis, they presented three different types of melanomas: lentiginous malignant melanoma (strictly intra-epidermal), superficial spreading melanoma (Breslow 0.75 mm), and acrolentiginous melanoma (Breslow 4 mm). The Breslow's index corresponds to the maximal thickness of the melanotic zone in the dermis. The three other samples presented two types of nevi, composed and junctional nevi.

Sectioning was done in such a way that all sections presented epidermis totally affected by proliferating melanocytes. Thus, no normal zones were present inside the epidermis of all studied samples as histolgically controlled. Sections were fixed on ZnSe slides, suitable for infrared transmission analysis, either with a droplet of albumin (egg albumin diluted in water) usually employed in histopathological examination, or with a droplet of distilled water. Both fixation solutions were used to verify their possible effect on the spectral data.

2.2. Infrared instrument

The samples were analysed by a Perkin Elmer Spectrum Spotlight 300 FTIR Imaging System, using the "image" mode of the instrument. For each tissue section, an area of 2x2 mm² was defined to cover all the structures of the skin, and an IR image was produced using a liquid nitrogen cooled, 16-pixel mercury cadmium telluride (MCT-A) line detector at a 25 microns/pixel resolution. The Possibility of acquiring an IR image at a higher spatial resolution (6.25 µm/pixel) is offered when more detailed structure is required on particular smaller area. An absorbance spectrum was recorded for each pixel in transmission mode. Before capturing the IR image the ZnSe window is measured as a reference and a background spectrum was collected for each of the 16 pixels. All spectra were recorded in the mid infrared region (4000 – 720 cm⁻¹) at 32 scans per pixel and spectral resolution of 4 cm⁻¹, these conditions allowed to obtain good quality spectral data with acceptable recording time (4 hours to map a 2x2 mm² surface). A visible image of the sample was also collected and the sampled zone chosen from it.

Spectra of reference products, such as melanin or type I collagen, were recorded using the "point" mode of the apparatus (this mode uses a second MCT detector placed in the same Dewar), with an aperture of 100 x 100 µm² (covering the whole detector surface) and with similar acquisition parameters than those of the "image" mode.

2.3. Statistical analysis of the FTIR data

Hierarchical Cluster Analysis (HCA) was performed with the OPUS software (Bruker Optik GmbH, Germany) to classify spectral data. HCA aims at clustering data according their degree of similarity (resemblance). The method consists in calculating the Euclidean distance between all the set of data.

The merging process (result) can be visualized in a tree-like diagram, which is called a dendrogram, presenting the regrouping of the spectra in clusters according to a heterogeneity scale. Inter-spectral distances are first calculated with first derivatives of amide I normalised spectra, and on one or a combination of several spectral windows that have to be selected by the operator. Intra-cluster heterogeneity is assessed by Ward's minimum-variance algorithm. The final partition of objects is defined by cutting the dendrogram. Thorough description of this statistical analysis can be found in references [24-26].

3. Results

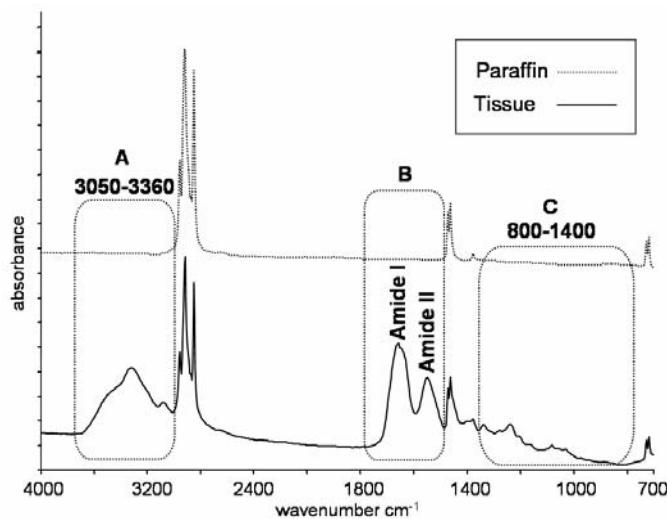


Fig.1: Comparison of infrared spectra of paraffin (dotted line) and paraffined tissue (full line). Three spectral regions without paraffin contribution can be identified: (A) from 3050 to 3360 cm⁻¹, (B) from 1500 to 1810 cm⁻¹ containing the amide I & II bands, and (C) from 800 to 1440 cm⁻¹. Spectra are recorded in transmission mode with 4 cm⁻¹ spectral resolution and 32 scans / pixel.

First, we compared an infrared absorption spectrum recorded on a thin section of paraffinised skin tissue with that of paraffin (Fig. 1). Both spectra were extracted from particular points ($25 \times 25 \mu\text{m}^2$) of an infrared image. On the tissue spectrum, spectral windows without contribution of paraffin can be easily identified. Three spectral zones, noted A, B and C, were found corresponding respectively to 3050 - 3360 cm⁻¹, 1485 - 1800 cm⁻¹ containing amide I and amide II bands of protein dipeptide bonds, and 800 - 1440 cm⁻¹. In the last zone, C, a weak vibration band of paraffin appears at 1378 cm⁻¹, therefore a narrow window from 1370 to 1385 cm⁻¹ has been withdrawn. Zone B is used to normalise the spectra. The choice of this spectral window for normalisation has been guided by the absence of paraffin vibration bands and by the fact that zone B corresponds purely to protein content, the major constituent of the paraffinised tissue since the paraffinisation protocol eliminates lipid content. Normalising the spectra on the amide I and amide II bands is equivalent to considering the protein content identical in every recording or in each point of the sample in case of a spectral image, therefore to consider the total protein content to be homogenous in the tissue. Differences in sectioning thickness were in this manner corrected. Normalisation on the amide I band has previously been used on spectra of normal and malignant human gastric tissues [12].

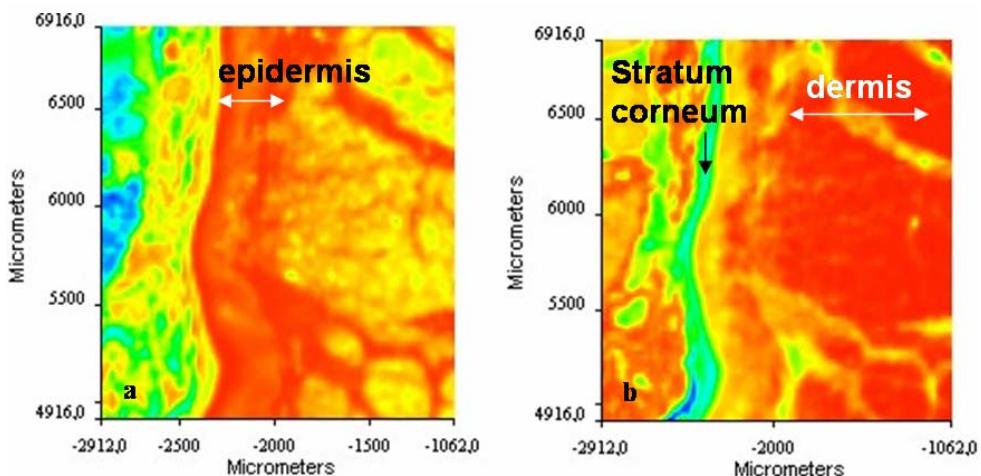


Fig.2: Spectral imaging of a skin sample. Image (a): infrared image reconstructed on the variation of the integrated intensity around 3295 cm^{-1} , specific of the epidermis. Image (b): infrared image reconstructed on the variation of the integrated intensity around 3309 cm^{-1} , specific of the dermis.(resolution = $25\text{ }\mu\text{m}$)

In the zone A ($3050\text{-}3360\text{ cm}^{-1}$), spectra of epidermis and dermis presented a wavenumber shift (spectra not shown) that could be attributed to the contribution of collagen present only in dermis (see introduction). For dermis spectra the maximum of the band is on 3309 cm^{-1} , for the epidermis it is on 3294 cm^{-1} . It can be shown by subtracting pure collagen spectrum from a dermis spectrum that the shift is due to the collagen contribution. The maximum of the resulting spectrum corresponds to 3294 cm^{-1} (the wavenumber of the maximum of epidermis spectra in zone A). Therefore, this zone was useful to distinguish between the two layers but not to classify the samples according to the type of the lesion (data not shown). Based on the integrated intensity around 3295 cm^{-1} and 3309 cm^{-1} , the localisation of epidermis and dermis was respectively mapped by reconstructing spectral images (Fig. 2). Such spectral images covering both epidermis and dermis were recorded on each of the six different samples in order to extract with accuracy spectra of epidermis and dermis without misidentification.

Due to the fact that most nevi and melanomas usually affect the epidermis in their first step of development [5, 6], and with the aim of distinguishing nevi spectra from those of melanomas, HCA (hierarchical cluster analysis) was performed on a set of spectra of the epidermis of the six samples. Results were obtained with HCA on different spectral windows of infrared spectra recorded on epidermis, and are presented as dendograms. Statistical analysis was performed at the same time on spectra extracted from spectral images and on "average spectra" corresponding at the average calculated from a $250 \times 250\text{ }\mu\text{m}^2$ surface. The spectra extracted from spectral images will be considered as "point spectra".

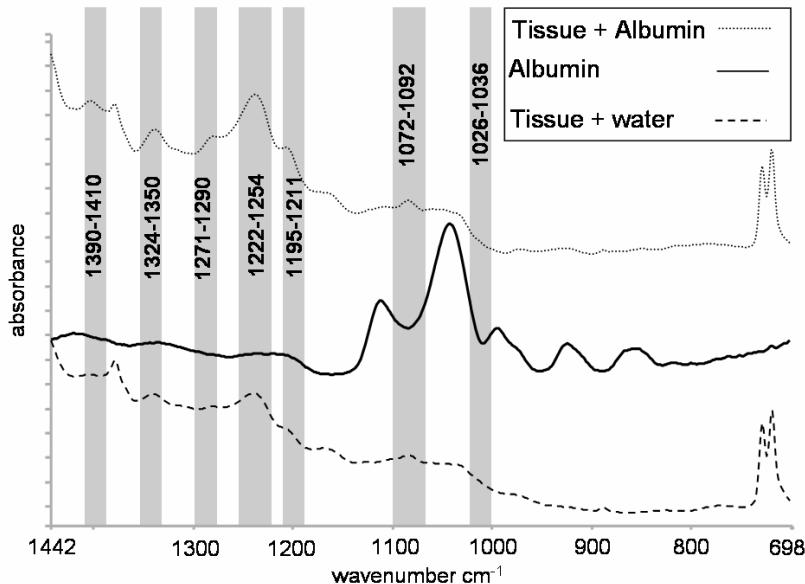


Fig.3: Comparison of spectra of albumin (full line), tissue section fixed with albumin (dotted line) and tissue section fixed with water (dashed line). Seven narrow bands without albumin contribution can be selected: (1026-1036 cm^{-1}), (1072-1092 cm^{-1}), (1195-1211 cm^{-1}), (1222-1254 cm^{-1}), (1271-1290 cm^{-1}), (1324-1350 cm^{-1}), and (1390-1410 cm^{-1}).

Similar results were obtained in all cases regardless to the pattern of spectra, "point spectra" or "average spectra". The results described here are relative to "average spectra".

In order to distinguish epidermis infrared spectra of nevus and melanoma, HCA was performed on zone C, from 800 to 1440 cm^{-1} , without the 1370 – 1385 cm^{-1} window which contains a weak paraffin vibration band. First HCA treatment led to a classification of epidermis spectra into two clusters but without any clustering of spectra of the same samples (results not shown): the first cluster corresponded to sections fixed on ZnSe slide with a diluted albumin droplet and the second cluster to sections fixed with a water droplet. In order to avoid contribution of the fixing liquid on the classification, we eliminated the vibration bands of albumin (860, 922, 996, 1043 and 1112 cm^{-1}) and retained the most intense absorption bands of the zone C: seven bands were finally retained to perform HCA (Fig. 3).

For each biopsy sample, their spectra were classified in the same cluster. So, for the six samples, six clusters were obtained, each containing spectra of the same sample, regardless to the nature of the tumour (nevus or melanoma). Histological examination allowed diagnosis of nevus in three cases, and melanomas in the three other cases (as illustrated on fig.4). These seven bands of zone C led to a good classification of the samples but do not lead to a nevus / melanoma discrimination, as the clinician or dermatologist would expect.

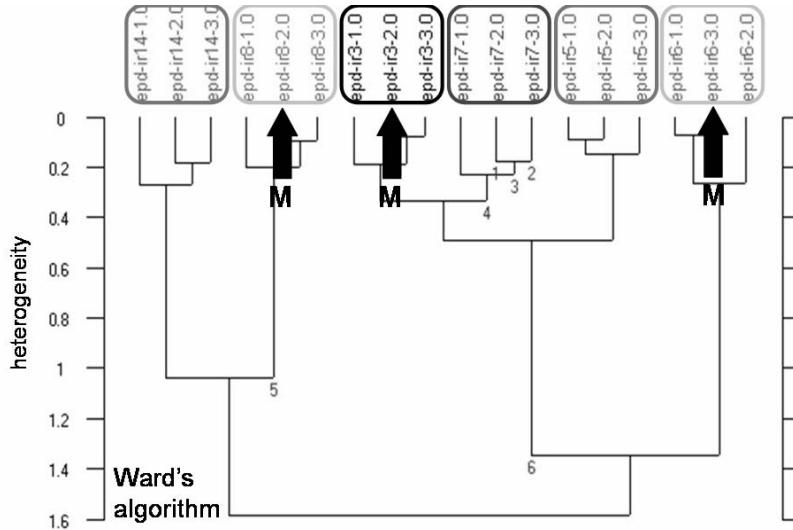


Fig.4: Dendrogram of the hierarchical cluster analysis (Ward's algorithm), using the first derivative infrared spectra, on the seven spectral bands previously selected. For each sample, spectra are classified in the same cluster without any classification according to the lesion type. The letter M indicates samples corresponding to melanoma. Note that the bigger the separation between clusters indicated by connecting lines, the weaker is the similarity between the spectra.

Given that both lesions derives from melanocytes, and do not affect the keratinocytes functions, therefore, to guide the classification for melanoma / nevus discrimination, keratin was not taken into account by looking among the seven previously selected spectral windows for bands with no keratin contribution. To identify the keratin vibration bands, we used a spectrum recorded on the stratum corneum layer, as reference spectrum (Fig. 5).

Since stratum corneum is a layer constituted of anucleous cells, the spectrum does not present DNA vibration bands, and the phospholipid content is eliminated by the paraffinisation process (presence of phospholipids would be detected by a band around 1745 cm^{-1} where there is no paraffin contribution). Therefore we considered that the spectrum of stratum corneum presented only keratin contribution in zone C where paraffin has no infrared absorption bands, with three bands at $1222 - 1254\text{ cm}^{-1}$, $1072 - 1092\text{ cm}^{-1}$ and $1026 - 1036\text{ cm}^{-1}$. Finally, four narrow spectral windows were retained: $1390 - 1410$, $1325 - 1350$, $1270 - 1290$, $1200 - 1215\text{ cm}^{-1}$. Figure 6 shows the dendrogram of the first derivative of spectra recorded on the epidermis, constructed on these four spectral bands. Three groups of spectra could be discerned. Cluster 1 gathered together spectra of the three nevi, clusters 2 and 3 grouped spectra of the three melanomas with a particular cluster (cluster 2) for one melanoma

(acrolentiginous melanoma). Classification analysis with one, two, or three among the four used spectral bands were attempted, but did not provide a correct classification.

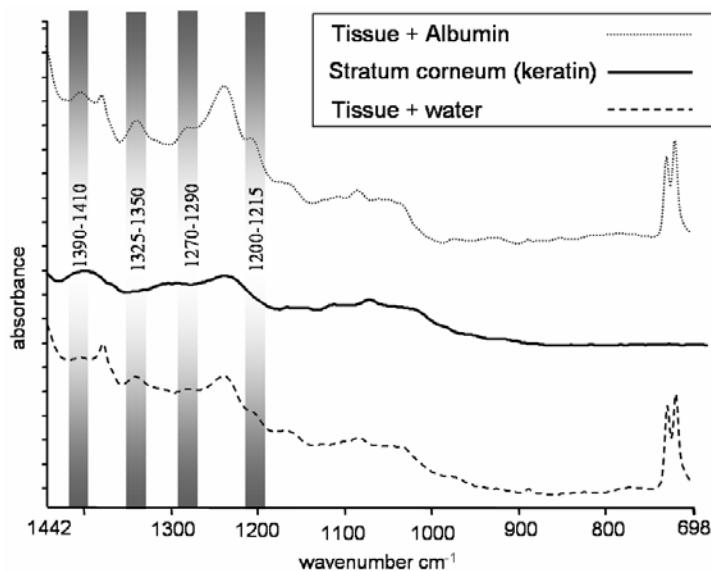


Fig.5: Comparison of spectra of stratum corneum (full line), recorded on tissue section fixed with albumin (dotted spectrum) and on tissue section fixed with water (dashed spectrum). Among the seven spectral bands previously selected, only four with no keratin contribution were retained.

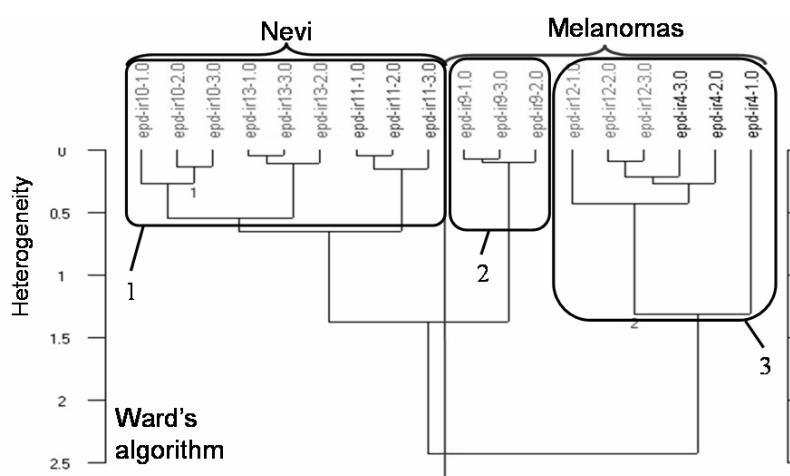


Fig.6: Dendrogram representing the hierarchical cluster analysis (Ward's algorithm), using the first derivative infrared spectra, on four spectral bands retained for having no keratin signal. Three clusters can be discerned, cluster 1: spectra of all nevus samples, clusters 2 and 3: spectra of melanoma samples (cluster 2 corresponds to the acrolentiginous melanoma, relatively thick, Breslow 4 mm).

Identification of the molecular vibrations associated with the four discriminating spectral bands was attempted. The assignment was done after recording of reference products and by means of vibrational wavenumber table [27]. Two bands, 1200 - 1215 and 1270 - 1290 cm^{-1} , could be assigned to vibrations of PO_2^- groups of DNA nucleic acids. The two others bands, 1325 - 1350 and 1390 - 1410 cm^{-1} , could be assigned to melanin (spectrum not shown).

Similar treatment was performed with dermis spectra, but HCA did not lead to satisfying clustering to discriminate between nevi and melanoma, on the six samples that we have studied. The contribution of the collagen in the dermis spectrum, particularly in the zone between 1200 and 1290 cm^{-1} could explain this misclassification.

4. Discussion

The present work is a feasibility study on a small number ($n = 6$) of skin samples, it shows the ability of FTIR microspectroscopy associated with hierarchical cluster analysis to discriminate on the epidermis nevi from melanomas, by analysing paraffin embedded tissues without previous deparaffinisation.

To the best of our knowledge, we have not found any previous work reported on paraffinised samples without deparaffinisation. Tissue analyses by vibrational spectroscopy are generally conducted on fresh snap frozen tissues. The advantage of this kind of tissues is preservation of lipids that can be discriminating markers between normal and cancerous structures.

On formalin fixed paraffin-embedded tissues, few studies are referenced and they are all led on deparaffinised and rehydrated tissues. Wood et al. [9] and Mordechai et al. [10], have shown that cervical cancer and normal tissue can be differentiated by the means of their infrared microspectra. Mordechai et al. identified infrared biomarkers such as the vibration wavenumber of nucleic acids phosphates, the intensity of amide I band, RNA (1121 cm^{-1}) and DNA (1020 cm^{-1}) intensity ratio, which can be associated with cancerous and non cancerous states. Wood et al. [9] employed unsupervised hierarchical cluster methods to map the cancerous zones in cervical epithelium and revealed different stages of the disease.

All these studies focused on discriminating normal and cancerous tissues. In the present study, we were interested in discriminating melanomas from nevi that are considered as benign tumours of the skin. Mordechai et al. [10] failed to distinguish between melanoma and nevus using the common spectroscopic markers, which they found pertinent for cervical cancer. On fresh tissues, Fendel et al [29] used hierarchical clustering analysis on Raman spectra of nevus and melanoma, but unsuccessfully.

Nevertheless, discrimination between melanoma and nevus is possible on fresh tissue by Raman analysis in combination with multivariate statistical treatment. Sigurdur et al. [17] developed neural network analysis to classify spectra of five types of skin tissue, normal tissue and four lesions including melanoma and nevus with a correct classification rate over 80% for melanomas and over 92% for nevi. Gniadecka et al. [18] confirmed the efficiency of neural network for classification of skin lesions and showed that the discriminating vibrational bands are specific to lipid content (around 1310 and 1330 cm⁻¹) and of protein secondary structure (amide I and C-C stretching vibration at 935 cm⁻¹ for α -helix conformation). These bands are eliminated or highly affected in case of formalin fixed paraffin embedded tissues. Lipids are solubilized by alcohol-xylol treatment of tissues, and their signal is consequently absent in the infrared spectrum. Formalin modifies protein intramolecular bonds, and affects the secondary structure. This is why, we did not take into account, for the statistical analysis, amide I and II bands, informative of the protein secondary structure [30], although certain authors such as Wood et al. [9] showed on deparaffinised cervix tissues that these two bands are important in correlating histopathological features to spectral clusters. In addition to that, and as shown in Figure 1, spectral zones with contribution of paraffin vibrations had to be excluded.

Statistically, Wood et al. [9] achieved satisfying results by hierarchical clustering (Ward's technique) of infrared spectra of deparaffinised cervix tissue. Lasch et al. [8] showed that hierarchical cluster imaging is better than fuzzy C-means and k-means clustering to localize malignant zones in the case of colorectal carcinoma. This statistical approach seemed to us efficient to treat spectral data. The first derivative of normalised spectra, rather than raw or baseline corrected spectra, are commonly used in the statistical treatment software. On paraffinised tissues of skin lesions, we have not found any application example of hierarchical classification analysis on infrared or Raman spectra. In 1998, Fendel and Schrader [29] published in their work conclusion that "*a really typical melanoma spectrum [recorded on fresh tissue] has not yet been found and a cluster analysis [using Ward's algorithm] is not sensitive enough for its discrimination [from nevus]*". They chose to perform classifications in spectral regions, amide III band and protein backbone vibration, which are informative of the protein secondary structure, but which are certainly not pertinent for discrimination although they present high variability between nevus and melanoma spectra. They did not include lipid bands contrary to Sigurdur et al. [17] and Gniadecka et al. [18] who have discriminated skin lesions by analysing Raman spectra with neural network. A comparison between methods is however difficult because the different studies were led with different experimental conditions,

starting by the spectral resolution: 8 [17], 4 [18] or 2 cm^{-1} [29] in Raman spectroscopy and 8 cm^{-1} [8] or 6 cm^{-1} [9, 13, 19] in infrared spectroscopy. However, spectral resolution could be a crucial parameter if spectral differences between tissues are very weak and if the discriminating spectral regions correspond to a unique vibration band. For example, Fujioka et al. [12] showed that discriminant analysis succeeds in differentiating normal and malignant gastric tissues from infrared spectra of cryosections, using linear combination of ten precise absorption bands between 925 and 1660 cm^{-1} . These bands were determined after a student t-test for difference between absorbance in normal and cancer tissue at each wavenumber of spectra recorded with a spectral resolution of 2.5 cm^{-1} . The possible effect of the spectral resolution on spectra classification could be verified in further experiments.

We showed that the selection of the spectral zones for hierarchical classification is very important and can influence the results of clustering. In this study, we have used for classifications, narrow spectral zones (around 20 cm^{-1} width) that can correspond each to a molecular constituent of the tissue.

Compared to other studies, discriminating spectral windows are indeed very narrow, Lasch et al. [19] used either principal components analysis on a window from 900 to 1450 cm^{-1} for infrared cluster imaging of melanotic tissue, or artificial neural network on four spectral windows of 20 , 55 , 65 and 115 cm^{-1} width for the same tissue characterisation. The example of albumin contribution illustrates the sensitivity of the statistical treatment towards the spectroscopic recordings. Home-made software calculating inter-spectral distance and indicating wavenumbers where the inter-spectral distance is maximum was applied on infrared spectra (normalised on integrated amide I and II intensities) of paraffinised nevus and melanoma samples. Apart from paraffin vibrations, no particular wavenumbers were determined for the set of spectra. Nevertheless, bands assigned to keratin appeared often as the most variable in absorption intensity between the different samples (not shown). This is correlated with the clustering of the first dendrogram (Fig. 4) where spectra are well classified (one cluster for each sample) by using some keratin bands, but this does not lead to satisfying nevus / melanoma discrimination. Correct classification was obtained by eliminating keratin vibrations. The keratin contribution was withdrawn according the hypothesis that nevus and melanoma do not affect the keratin amount and structure. The four remaining spectral windows correspond to particular and specific constituents of the tissue, melanin and DNA. And, these four bands have to be taken together to achieve nevus / melanoma discrimination;

i.e., hierarchical analysis with only melanin or DNA bands does not lead to satisfactory clustering.

The four spectral zones, defined as being nevus / melanoma discriminant, are different from the common biomarkers of carcinogenesis mentioned by Mordechai et al. [10], which correspond to vibrations of carbohydrate (glycogen) and DNA. These markers failed for nevus versus melanoma discrimination, certainly because of the particular nature of the lesions "non-malignant versus malignant", and "not normal versus malignant".

In infrared spectroscopy, we have shown that melanin vibrations are useful to discriminate nevi and melanomas. For the same nevus / melanoma discrimination by Raman spectroscopy, either on paraffinised or fresh tissue sections, or in the frame of in vivo melanoma diagnosis by dedicated Raman probe, the melanin spectral contribution should be also important.

The dendrogram of the figure 6, obtained with 6 different skin lesions, show that nevi and melanoma can be separated, with an intermediate cluster (number 2) corresponding to a particular melanoma type. This result consist on a first step in our feasibility study. Further investigations should be undertaken on large numbers of biopsies relating to homogeneous groups in order to identify specific biomarkers for each aspect of the lesions, especially for melanomas with a low Breslow index and junctional nevi and in order to achieve full separation between nevi and melanomas. Direct access to these biomarkers by an in-vivo investigation could be crucial for clinical applications. Furthermore, superficial dermis components should be taken into account by using additionnal spectral regions (zone A) and by reconstructing false colour images based on clusters representative of the biological constituents of the skin [8-9, 13,19-20]. Such images could be useful to localize precisely malignant zones of the sample.

5. Conclusion

To the best of our knowledge, this is the first study that shows the potential of FTIR microspectroscopy to discriminate nevi from melanomas using paraffinised tissue sections without previous deparaffinisation. This could open the possibility to perform analysis with a retrospective point of view on large number of paraffin-embedded biopsies stored in tumour banks. The multivariate treatment of spectral data has to be performed by selecting pertinent spectral windows that correspond to biological features (DNA and melanin content) of the

samples. The knowledge of these molecular characteristics is therefore essential to obtain satisfying results, more especially that the discriminating spectral zones are not among the most intense or the most variable in terms of interspectral distance.

Acknowledgements:

We are particularly thankful to Mrs C. Lecki for her help with the choice of the lesions biopsies and for the sectioning, and to Dr G. Sockalingum for his precious advices.

References

- [1] H. Schaefer, Skin barrier: principles of percutaneous absorption, ed., Karger 1996.
- [2] R. Greinert, B. Volkmer, A. Wende, S. Voss, and E. W. Breitbart, Prevention of skin cancer. Necessity, implementation and success, Hautarzt 54 (2003) 1152-1163.
- [3] S. Bastuji-Garin, and T. L. Diepgen, Cutaneous malignant melanoma, sun exposure, and sunscreen use: epidemiological evidence, Br J Dermatol 146 Suppl 61 (2002) 24-30.
- [4] S. Gandini, H. Merzenich, C. Robertson, and P. Boyle, Meta-analysis of studies on breast cancer risk and diet: the role of fruit and vegetable consumption and the intake of associated micronutrients, Eur J Cancer 36 (2000) 636-646.
- [5] J.-J. Grob, J. H. Saurat, E. Grosshans, J.M.Lachapelle, D. Lipsher, L. Thomas, J. P. Lacour, J. M. Naeyaert, D. Salemon, and R.Braun, Dermatologie et infections sexuellement transmissibles, Masson , Paris 2004,pp 660-667.
- [6] P. Saiag, J. J. Grob, and E. Grosshans, Epithelial and melanotic skin tumors. Melanomas, Ann Dermatol Venereol 129 (2002) S143-148.
- [7] N. Stone, C. Kendall, J. Smith, P. Crow, and H. Barr, Raman spectroscopy for identification of epithelial cancers, Faraday Discuss 126 (2004) 141-157; 169-183.
- [8] P. Lasch, W. Haensch, D. Naumann, and M. Diem, Imaging of colorectal adenocarcinoma using FT-IR microspectroscopy and cluster analysis, Biochim Biophys Acta 1688 (2004) 176-186.
- [9] B. R. Wood, L. Chiriboga, H. Yee, M. A. Quinn, D. McNaughton, and M. Diem, Fourier transform infrared (FTIR) spectral mapping of the cervical transformation zone, and dysplastic squamous epithelium, Gynecol Oncol 93 (2004) 59-68.
- [10] S. Mordechai, R. K. Sahu, Z. Hammody, S. Mark, K. Kantarovich, H. Guterman, A. Podshyvalov, J. Goldstein, and S. Argov, Possible common biomarkers from FTIR microspectroscopy of cervical cancer and melanoma, J Microsc 215 (2004) 86-91.
- [11] X. Ling, Y. Xu, S. Weng, W. Li, Z. Xu, R. Hammaker, W. Fateley, F. Wang, X. Zhou, R. Soloway, J. Ferraro, and J. Wu, Investigation of normal and malignant tissue samples from the human stomach using Fourier Transform Raman spectroscopy, Applied Spectroscopy 53 (2002).
- [12] N. Fujioka, Y. Morimoto, T. Arai, and M. Kikuchi, Discrimination between normal and malignant human gastric tissues by Fourier transform infrared spectroscopy, Cancer Detect Prev 28 (2004) 32-36.
- [13] H. Fabian, P. Lasch, M. Boese, and W. Haensch, Mid-IR microspectroscopic imaging of breast tumor tissue sections, Biopolymers 67 (2002) 354-357.
- [14] C. Murali Krishna ; G.D. Sockalingum ; Jacob Kurien ; Lakshmi Rao ; L. Venteo ; M. Pluot ; M. Manfait ; V.B. Kartha, Micro-Raman Spectroscopy for Optical Pathology of Oral Squamous Cell Carcinoma, Appl Spectrosc. 58 (2004) 1128-35.
- [15] Q. B. Li, Z. Xu, N. W. Zhang, L. Zhang, F. Wang, L. M. Yang, J. S. Wang, S. Zhou, Y. F. Zhang, X. S. Zhou, J. S. Shi, and J. G. Wu, In vivo and in situ detection of colorectal

- cancer using Fourier transform infrared spectroscopy, *World J Gastroenterol* 11 (2005) 327-330.
- [16] I. A. Boere, T. C. B. Schut, J. V. D. Boogert, R. W. F. D. Bruin, and G. J. Puppels, Use of fiber optic probes for detection of Barrett's epithelium in the rat oesophagus by Raman spectroscopy, *vibrational spectroscopy* 32 (2003) 47-55.
- [17] S. Sigurdsson, P. A. Philipsen, L. K. Hansen, J. Larsen, M. Gniadecka, and H. C. Wulf, Detection of skin cancer by classification of Raman spectra, *IEEE Trans Biomed Eng* 51 (2004) 1784-1793.
- [18] M. Gniadecka, P. A. Philipsen, S. Sigurdsson, S. Wessel, O. F. Nielsen, D. H. Christensen, J. Hercogova, K. Rossen, H. K. Thomsen, R. Gniadecki, L. K. Hansen, and H. C. Wulf, Melanoma diagnosis by Raman spectroscopy and neural networks: structure alterations in proteins and lipids in intact cancer tissue, *J Invest Dermatol* 122 (2004) 443-449.
- [19] P. Lasch, and D. Naumann, FT-IR microspectroscopic imaging of human carcinoma thin sections based on pattern recognition techniques, *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 44 (1998) 189-202.
- [20] A. Nijssen, T. C. Bakker Schut, F. Heule, P. J. Caspers, D. P. Hayes, M. H. Neumann, and G. J. Puppels, Discriminating basal cell carcinoma from its surrounding tissue by Raman spectroscopy, *J Invest Dermatol* 119 (2002) 64-69.
- [21] R. Mendelsohn, H.C. Chen, M.E. Rerek, D.J. Moore, Infrared microspectroscopic imaging maps the spatial distribution of exogenous molecules in the skin, *J Biomed Opt.* 8 (2003) 185-90.
- [22] P.J. Caspers, G.W. Lucassen, E.A. Carter, H.A. Bruining, G.J. Puppels, In vivo Confocal Raman Microspectroscopy of the skin: Noninvasive determination of molecular concentration profiles, *J Invest Dermatol* 116 (2001) 434-442.
- [23] T.R. Hata, T.A. Scholz, I.V. Ermakov, R.W. McClane, F. Khachik, W. Gellerman, L.K. Pershing, Non-invasive Raman spectroscopic detection of carotenoids in human skin, *J Invest Dermatol* 115 (2000) 441-448.
- [24], OPUS/IDENT Reference Manual, ed., Autorenkollektiv Ettlingen, Germany 1996.
- [25], <<http://www.statsoftinc.com/textbook/stcluan.html>>.
- [26] W. J.H., Hierarchical grouping to optimise an objective function, *J. Am. Stat. Assoc.* 58 (1963) 236-244.
- [27] F. Parker, Applications of Infrared, Raman and Raman Resonance spectroscopy in biochemistry, Plenum Press, New York, 1983.,
- [28] P. Crow, N. Stone, C. Kendall, J. Uff, J. Farmer, H. Barr, and M. Wright, the use of raman spectroscopy to identify and grade prostatic adenocarcinoma in vitro, *british journal of cancer* 89 (2003) 106-108.
- [29] S. Fendel, and B.Schrader, Investigation of skin lesions by NIR-FT-Raman spectroscopy, *J Anal Chem* 360 (1998) 609-613.
- [30] O. Piot, J. C. Autran, and M. Manfait, Spatial distribution of protein and phenolic constituents in wheat grain as probed by confocal Raman microspectroscopy, *Journal of Cereal Science* 32 (2000) 57-71.

Discrimination mélanome/naevus par microspectroscopie infrarouge : analyse statistique multivariée par technique non supervisée

Introduction

Le but de la partie précédente était de démontrer la faisabilité de discriminer entre mélanomes et naevi à partir de blocs de peau paraffinée. Malgré la forte contribution de la paraffine, des fenêtres spectrales "non polluées" par le signal de la paraffine permettent : 1/ de reconstruire des images spectrales associées aux structures cutanées (stratum corneum, épiderme et derme), et 2/ de trouver des marqueurs spectroscopiques discriminants entre naevi et mélanomes. En effet, la combinaison de 4 bandes de vibration, correspondant à l'ADN (PO_2^- des acides nucléiques à $1200\text{-}1215 \text{ cm}^{-1}$ et $1270\text{-}1290 \text{ cm}^{-1}$) et à la mélanine (deux faibles vibrations à $1325\text{-}1350 \text{ cm}^{-1}$ et $1390\text{-}1410 \text{ cm}^{-1}$), permet une séparation de ces 2 types de lésions cutanées à partir des spectres Infrarouge extraits d'images spectrales.

A notre connaissance, ce travail a été le premier à être réalisé à partir des tissus paraffinés sans aucun déparaffinage préalable. Cependant, l'extraction des spectres et leur traitement pour la réalisation des dendrogrammes de classification se sont fait "manuellement" de façon supervisée sur un nombre limité de spectres. De plus, l'extraction des spectres fait perdre l'information spatiale contenue dans les images spectrales.

Ces méthodes supervisées demandent beaucoup de temps et limitent l'applicabilité de ce travail à un nombre restreint d'échantillons.

Dans cette partie, nous avons appliqué les méthodes de classification sur les images spectrales correspondant aux mêmes échantillons de naevi et mélanomes que ceux de la partie précédente (chII.3.2).

Dans la littérature, plusieurs études ont démontré l'efficacité des méthodes statistiques multivariées pour classer, discriminer et surtout cartographier les tissus cancéreux. Différentes techniques telle que l'analyse en composantes principales (ACP) et la classification selon les K-means ont été utilisées pour caractériser des tumeurs du cerveau (Amharref et al. 2006), du col de l'utérus (Lasch et al. 2004) ou du poumon (Koljenovic et al. 2004). Dans le domaine de la peau, différentes approches ont été employées : Gniadecka et al. ont utilisé les réseaux de neurones pour le diagnostic des mélanomes (Gniadecka et al. 2004). D'autres auteurs ont employé l'ACP, la classification selon les K-means, l'analyse discriminante linéaire (LDA)

ou l'analyse hiérarchique en cluster (HCA), pour détecter, cartographier et discriminer différents types de lésions cutanées (Lasch et al. 1998; Nijssen et al. 2002; Sigurdsson et al. 2004; Wood et al. 2004; Choi et al. 2005; Nijssen et al. 2007).

Il est important de rappeler, que les travaux précédemment cités ont été menés, soit sur des tissus frais (Gniadecka et al. 2004) ou congelés (Lasch et al. 1998; Nijssen et al. 2002; Koljenovic et al. 2004; Lasch et al. 2004; Sigurdsson et al. 2004; Choi et al. 2005; Amharref et al. 2006; Nijssen et al. 2007), soit sur des tissus déparaffinés chimiquement (Wood et al. 2004).

Dans notre approche sur tissus paraffinés, l'obstacle principal au développement des méthodes statistiques multivariées est la présence de la paraffine avec sa forte contribution dans le signal du tissu. En effet, pour une exploitation optimale des données spectroscopiques, l'ensemble de la gamme spectrale doit être pris en compte dans les traitements statistiques. De ce fait, sans correction de la contribution de la paraffine, toute analyse serait biaisée par l'effet de la paraffine et ne pourrait pas être représentative de l'état biologique.

En plus d'être une opération longue, le déparaffinage chimique présente l'inconvénient de provoquer une éventuelle altération des structures tissulaires. En outre, Faolain et al. ont montré que l'efficacité des méthodes de déparaffinage chimique est limitée et que des résidus de paraffine sont toujours présents au sein de l'échantillon, affectant ainsi le signal tissulaire (Fabian et al. 2002).

Pour s'affranchir de l'effet de la paraffine sur le traitement statistique multivarié des données collectées au niveau des tissus paraffinés, nous avons combiné l'ACP (analyse en composantes principales) et l'EMSC (extended multiplicative signal correction) (Kohler et al. 2005). L'EMSC a pour effet de réduire la variabilité due aux interférences (principalement le signal de la paraffine dans notre cas), ainsi que de corriger d'autres artéfacts physiques et chimiques. Ce qui permet d'éliminer les spectres de paraffine pure.

Une fois les images spectrales des tissus prétraitées par EMSC, des images pseudos-couleurs ont été reconstruites par classification des spectres selon la méthode des k-means. Ces images sont exploitées après comparaison avec des coupes histologiques colorées. Ceci a permis de localiser avec précision les clusters groupant les spectres de l'épiderme (partie de la peau où se développent mélanomes et naevi). Il est alors possible, pour les différents échantillons,

d'extraire automatiquement ces spectres de façon à les analyser ultérieurement par HCA (hierarchical cluster analysis).

Matériels et méthodes

- Aspect expérimental

Les mêmes échantillons de naevi et de mélanomes ont été utilisés pour cette analyse, les coupes sont déposées sur des lames de CaF₂. les paramètres d'acquisition sont les mêmes que l partie précédente (chII.3.2).

- Prétraitement du signal

Une correction atmosphérique a été réalisée pour minimiser le signal de la vapeur d'eau et du CO₂ environnants. Les spectres sont ensuite convertis de transmittance en absorbance. Rappelons que :

$$A(\nu) = -\log(T(\nu)) = -\log\left[\frac{I(\nu)}{I_0(\nu)}\right] \quad (\text{Equ.Ch.II.01})$$

Avec, pour un nombre d'onde donné ν : A l'absorbance, T la transmittance, I₀ l'intensité d'irradiation incidente, et I l'intensité transmise.

Lissage :

Tous les spectres ont été lissés selon la méthode de Savitzky-Golay (Savitzky et al. 1964; Luo et al. 2005). Cette méthode consiste à trouver en chaque point du spectre une fonction polynomiale (ex. : $y = a_3.x^3 + a_2.x^2 + a.x + a_0$) qui modélise le mieux le spectre au voisinage du point considéré.

Normalisation :

Après lissage, les spectres sont normalisés selon la méthode de normalisation vectorielle standard (SNV). Cette méthode centre la valeur moyenne des spectres à zéro et ramène leur écart-type à 1 (Bertrand et al. 1992; Chalus et al. 2002).

EMSC : extended multiplicative signal correction (Kohler et al. 2005; Chen et al. 2006; Thennadil et al. 2006; Kohler et al. 2007)

EMSC est une technique de traitement des données conçue pour séparer et caractériser l'information physique et chimique des spectres infrarouges, elle prend en compte les phénomènes d'absorption et de diffusion de la lumière.

Pour mieux comprendre cette méthode, partons de la loi de Beer-Lambert, selon laquelle l'absorbance peut être représentée suivant l'équation suivante :

$$A(\nu) = K(\nu)c.b \quad (\text{Equ.Ch.II.02})$$

$K(\nu)$ est l'absorptivité caractéristique de l'échantillon à un nombre d'onde ν , b la longueur du chemin optique (b représente généralement l'épaisseur de l'échantillon multipliée par son indice de réfraction n) et c la concentration.

Si on considère maintenant un mélange de J constituants. L'absorbance peut être représentée sous la forme :

$$A(\nu) = \left[\sum_{j=1}^J K_j(\nu)c_j \right] b \quad (\text{Equ.Ch.II.03})$$

Avec $K_j(\nu)$ le spectre et c_j la concentration du constituant j du mélange.

Si la lumière transmise collectée par le détecteur varie, un autre effet physique est introduit. Ceci peut être dû à des variations de diffusion au sein de l'échantillon. Cette variation peut être représentée par une constante "multiplicative" α .

Dans ce cas la transmission peut être exprimée sous la forme :

$$T(\nu) = \frac{\alpha \cdot I(\nu)}{I_0(\nu)} \quad (\text{Equ.Ch.II.04})$$

Et l'absorbance sous la forme :

$$A(\nu) = -\log \left[\frac{\alpha \cdot I(\nu)}{I_0(\nu)} \right] = -\log[\alpha] - \log \left[\frac{I(\nu)}{I_0(\nu)} \right] \quad (\text{Equ.Ch.II.05})$$

$$A(\nu) = b \left[\sum_{j=1}^J K_j(\nu)c_j \right] + a \quad (\text{Equ.Ch.II.06})$$

(MSC : multiplicative signal correction)

La variation de la diffusion peut avoir d'autres effets dépendant du nombre d'onde. Ces effets peuvent être modélisés par des fonctions polynomiales et non linéaires (fonctions du nombre d'ondes). Ils peuvent donc être estimés en ajoutant une fonction polynomiale à l'équation (Ch.II.06). Si on ajoute par exemple une fonction du second ordre, l'absorbance sera représentée sous la forme suivante :

$$A(\nu) = b \cdot \left[\sum_{j=1}^J K_j(\nu) \cdot c_j \right] + a + d \cdot \nu + e \cdot \nu^2 \quad (\text{Equ.Ch.II.07})$$

La connaissance des paramètres a, b, d et e permet donc une correction optimale et l'accès à une évaluation des spectres des constituants moléculaires.

En pratique, il est nécessaire de déterminer un spectre de référence (spectre cible, en règle générale on prend la moyenne des spectres), ainsi que des spectres d'interférences (constituants indésirables, le signal de la paraffine par exemple).

ACP : Analyse en composantes principales

Une analyse en composantes principales est réalisée sur des images spectrales de coupes de paraffine seule déposées sur un support identique à celui utilisé pour les coupes de tissus (CaF_2). Les composantes les plus représentatives sont utilisées comme des spectres d'interférence pour EMSC.

En ACP, chaque spectre est considéré comme un point dans un espace de n dimensions, avec n le nombre de spectres. L'ensemble des spectres constitue alors un nuage de points dans cet espace.

Le principe de l'ACP consiste à trouver un nouveau système (espace) en réalisant des rotations des n axes de coordonnées. Le premier axe représente la direction de la variance inter-spectrale maximale (première composante), le deuxième représente la direction de la variance suivante (deuxième composante), et ainsi de suite (Yeung et al. 2001; Koljenovic et al. 2002; Lasch et al. 2004).

Les spectres seront représentés donc par des nouvelles coordonnées, ces coordonnées représentent les coefficients de mélange ou les scores. Les scores des premières composantes représentent la quasi-totalité de la variance totale.

Dans notre étude on a utilisé les 8 premières composantes dont les scores représentent 99% de la variance totale. Ces composantes ont été injectées dans EMSC comme spectres d'interférences.

- Traitement du signal :

- a. K-means :

Cette méthode permet de regrouper les spectres possédant des caractéristiques communes (clusters). Au départ, le nombre de clusters dans lesquels les spectres vont être classés est

déterminé par l'utilisateur. Pour chaque cluster, un spectre est sélectionné au hasard pour agir comme centre initial du cluster.

Tous les spectres sont ensuite comparés sur la base de distances interspectrales avec les centres de clusters et seront classés dans le cluster auquel ils se rapprochent le plus. Des nouveaux centres sont alors calculés en moyennant les spectres de chaque cluster. Cette procédure est ensuite réitérée jusqu'à atteindre une solution stable.

Une couleur sera attribuée à chaque cluster, chaque point de l'image spectrale aura alors la couleur attribuée au cluster auquel son spectre appartient.

b. HCA (classification hiérarchique en cluster):

Ce traitement permet de classer les spectres selon leur ressemblance statistique. Le résultat est visualisé par un dendrogramme représentant le regroupement des spectres en clusters selon "une échelle d'hétérogénéité". Les distances inter-spectrales sont d'abord calculées. Puis les deux spectres les plus proches sont rassemblés dans un groupe. Ensuite, plutôt que de recalculer la distance inter-spectrale entre ce groupe ou cluster et les autres spectres, les degrés d'hétérogénéité des différentes combinaisons de spectres et de clusters sont évalués par la technique de Ward. Les deux unités les plus proches (minimisant le degré d'hétérogénéité) sont alors placées dans un nouveau cluster.

Résultats et discussion

Le but de ce travail, consiste à compléter les résultats de la partie précédente (ch.II.3.1) afin de vérifier le potentiel des méthodes statistiques multivariées de prétraitement et de traitement pour classer, caractériser et discriminer des lésions cutanées sur tissus paraffinés. Les résultats seront présentés selon deux volets :

- Reconstruction d'images pseudo-couleurs : séparation des différentes couches cutanées et caractérisation de la répartition des lésions dans les tissus.
- Classification des spectres des épidermes des différentes coupes selon le type de la lésion.
- Reconstruction d'images pseudo-couleurs :
 - a- Séparation des couches de la peau

Les spectres lissés et normalisés ont été corrigés par EMSC dans la région spectrale allant de 900 à 1900 cm⁻¹. La zone spectrale 2800-3200 cm⁻¹, présentant des bandes de paraffine qui saturent, a été écartée de l'étude pour ne pas influencer les corrections.

Le traitement par EMSC ne permet pas d'éliminer la contribution de la paraffine dans les spectres du tissu. Cependant, il permet d'éliminer les spectres de paraffine pure des images spectrales, et de minimiser la variabilité du signal de la paraffine au niveau des spectres du tissu.

Pour caractériser les différentes couches de la peau, toutes les images spectrales corrigées par EMSC ont été traitées en utilisant les K-means. Différents nombres de clusters ont été testés pour la reconstruction d'images pseudo-couleur (résultats non présentés), le traitement selon 4 clusters s'est avéré le plus représentatif, avec des images pseudo-couleurs résultantes donnant la meilleure représentation des différentes couches cutanées (figure Ch.II.03.b).

Le même traitement a été réalisé sur les images spectrales non corrigées par EMSC sur la base de 5 clusters (figure Ch.II.03 a). Nous considérons un cluster supplémentaire par rapport à l'image précédente (figure Ch.II.03 b) pour tenir en compte de la paraffine. En effet, la plupart des spectres de la paraffine sont regroupés dans un seul cluster (en vert).

Bien que la paraffine soit séparée des autres constituants, les 4 clusters attribués à la peau ne permettent pas une bonne identification des couches cutanées. Par exemple, Les spectres de l'épiderme et de la couche profonde du derme sont classés dans le même groupe.

Sur la figure Ch.II.03 b, l'image corrigé par EMSC présente une bonne séparation entre la couche cornée (en noir), l'épiderme (en vert), et le derme dont les spectres sont groupés en deux clusters différents (en rouge et en bleu). Ceci montre que l'effet du prétraitement par EMSC ne se limite pas à retirer les spectres aberrants (la paraffine) de l'image, mais influe aussi sur le clustering en faisant diminuer la variabilité due à la contribution de la paraffine dans les spectres de la peau.

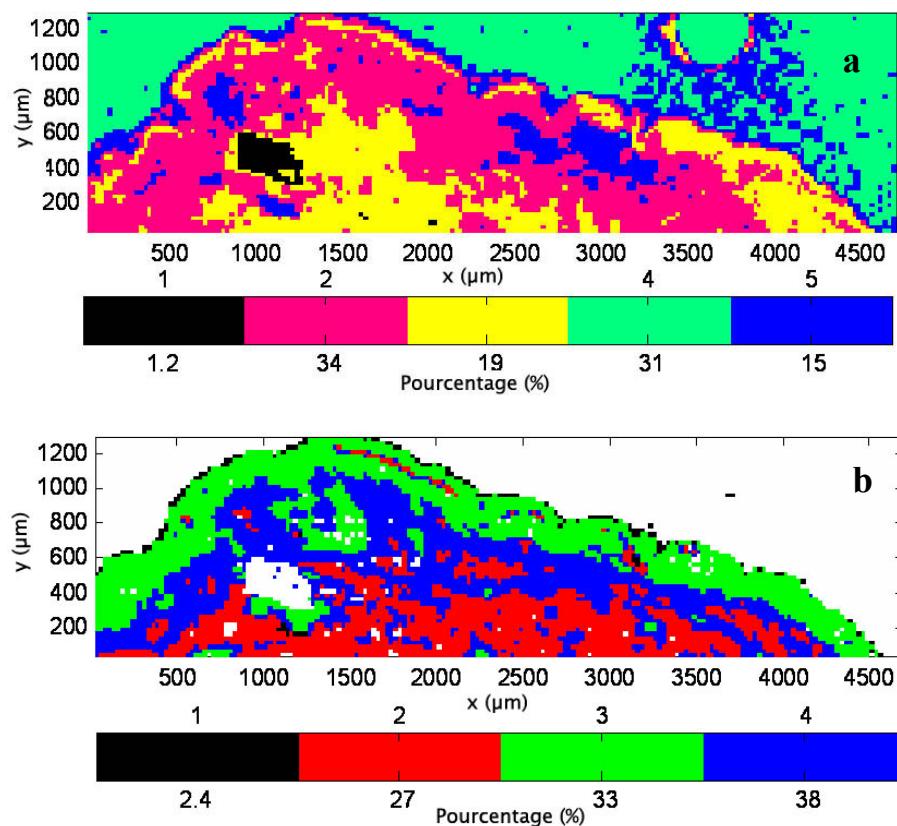


Figure Ch.II.03 : Images pseudo-couleurs d'une coupe de naevus. a : sans prétraitement par EMSC. b : avec prétraitement par EMSC.

b- Caractérisation de la répartition des lésions dans les tissus

Les images pseudo-couleurs reconstruites à partir de clusters (définis par les k-means) ont permis la représentation de la répartition des lésions au niveau des couches cutanées. La Figure Ch.II.04 c montre l'invasion du mélanome de l'échantillon 9. Sur cette figure, on peut remarquer que le mélanome, visualisé par le cluster en vert, affecte non seulement la totalité

de l'épiderme, mais se développe également de façon invasive au niveau du derme. Ceci pourrait expliquer, le fait que, dans la partie précédente (Ch.II.3.1), certains spectres du derme de l'échantillon 9 ont été classés avec les spectres des épidermes.

En comparant l'image pseudo-couleurs de la figure Ch.II.04.c avec la photo de la coupe (figure Ch.II.04.a), on peut conclure que le clustering par les k-means ne permet pas uniquement de reproduire la représentation des structures des images visibles, mais aussi de mettre en évidence des changements dans l'information spectrale, reflétant des changements de structure non détectables à l'œil sur les images visibles.

La figure Ch.II.04.b montre la répartition de l'absorbance totale sur les différents points de l'image brute. Sur cette figure, aucune structure n'est identifiable, les variations de l'intensité sont liées directement à la contribution de la paraffine dans les spectres.

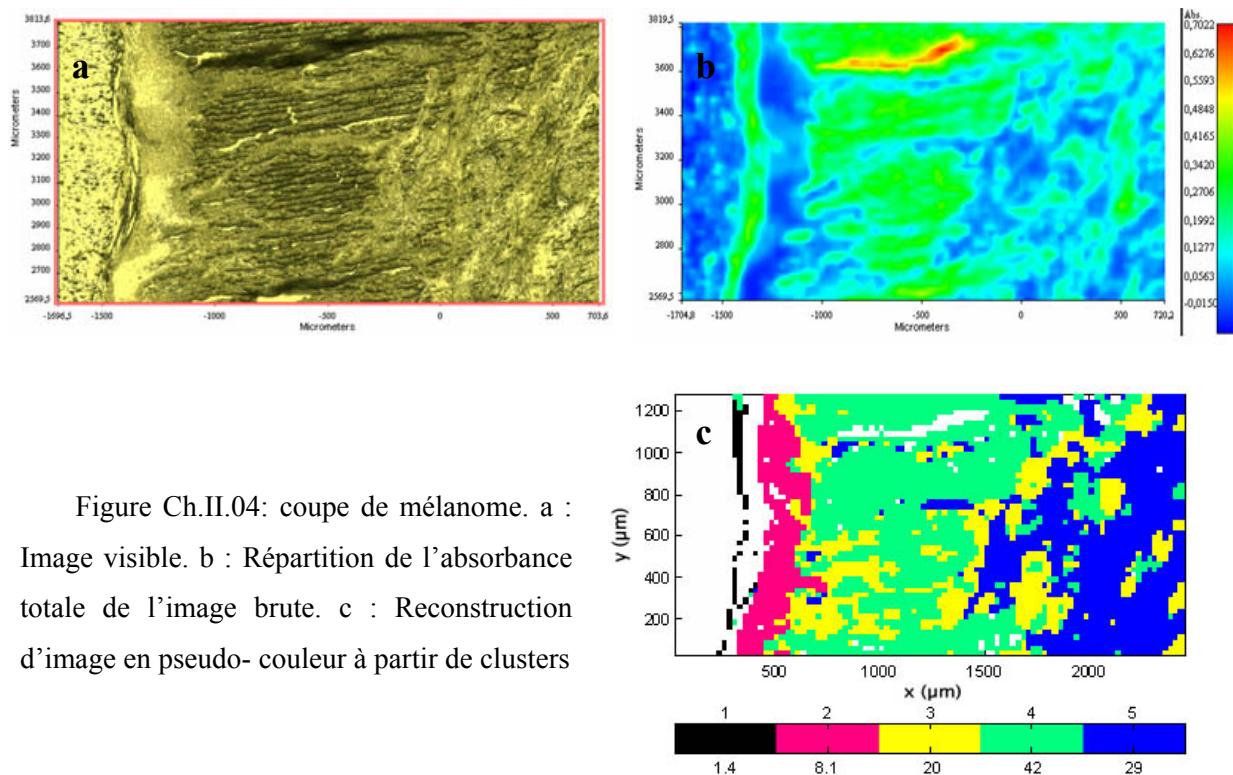


Figure Ch.II.04: coupe de mélanome. a : Image visible. b : Répartition de l'absorbance totale de l'image brute. c : Reconstruction d'image en pseudo- couleur à partir de clusters

- Classification des spectres des épidermes selon les types de lésion

Etant donné que les mélanomes et les naevi sont des lésions qui proviennent d'un disfonctionnement des mélanocytes de l'épiderme, cette couche de la peau a été isolée à partir des images pseudo-couleurs de façon à extraire des spectres représentatifs (figure Ch.II.05).

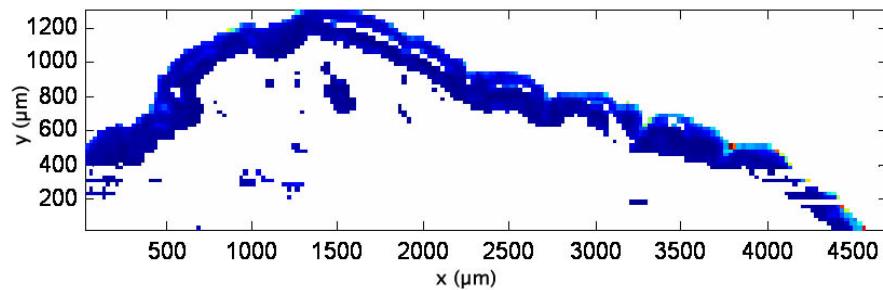


Figure Ch.II.05 : Image pseudo-couleurs montrant les spectres groupés dans le cluster "épiderme"

Ensuite, on a utilisé la classification hiérarchique par cluster pour regrouper les spectres extraits selon leur degré d'hétérogénéité.

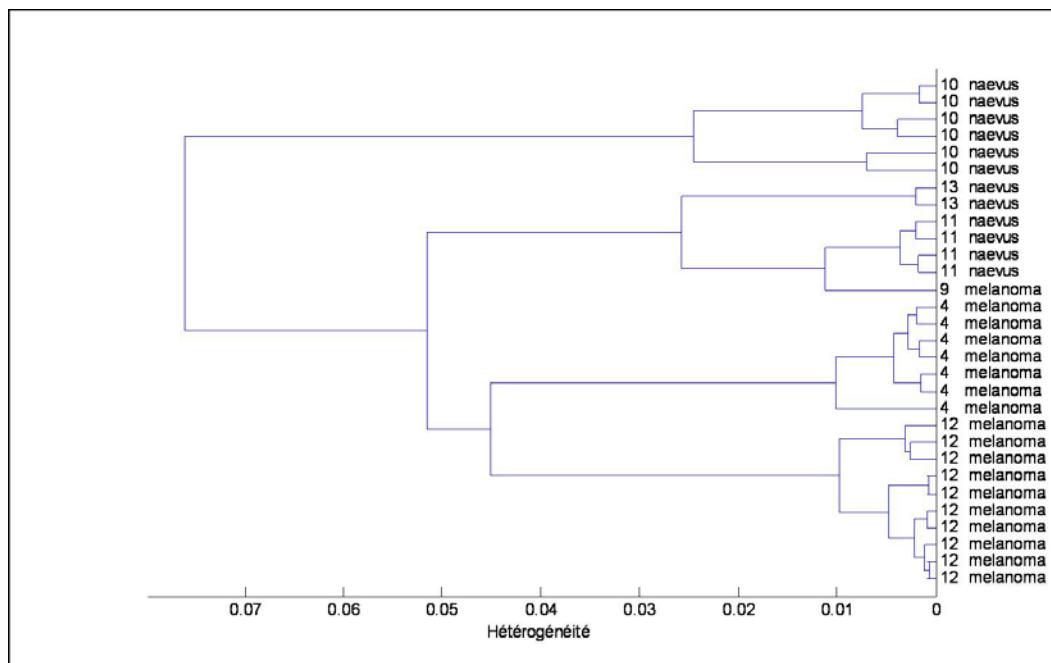


Figure Ch.II.06: Classification selon les bandes (1200-1215) (1270-1290) (1325-1350) (1390-1410 cm⁻¹) des spectres de l'épiderme

La figure Ch.II.06 montre le dendrogramme de classification des spectres des épidermes des différentes coupes, selon les quatre bandes discriminantes ($1200-1215 \text{ cm}^{-1}$, $1270-1290 \text{ cm}^{-1}$, $1325-1350 \text{ cm}^{-1}$ et $1390-1410 \text{ cm}^{-1}$) utilisées dans la partie précédente.

Le dendrogramme montre une bonne classification avec une séparation entre les épidermes des naevi et ceux des mélanomes, à l'exception d'un échantillon (mélanome 9). L'examen anatomopathologique a révélé que cet échantillon présentait une lésion particulière de type mélanome acro-lentigineux (Indice Breslow: 4 mm).

En conclusion, ce travail montre le potentiel des méthodes statistiques multivariées pour caractériser les différentes couches de la peau et discriminer entre mélanome et naevus à partir des images Infrarouges réalisées sur de tissus paraffinés.

Le prétraitement des données par EMSC permet de diminuer l'influence de la paraffine sur la variabilité des spectres. L'application de la classification par les k-means a permis dans un premier temps de caractériser la répartition des lésions dans les tissus. La reconstruction des images pseudo-couleurs a mis en évidence la présence de métastases au niveau du derme. Dans un second temps, la classification hiérarchique en cluster (HCA) a permis d'avoir une bonne classification des spectres selon le type de la lésion.

Pour confirmer les résultats de ces méthodes statistiques, il est important de comparer ces données aux résultats anatomopathologiques, ce qui permettra de mettre en évidence des marqueurs spectroscopiques plus précis, liés à chaque type de lésion.

Une étude plus étendue, sur un nombre plus grand d'échantillons, homologuant l'analyse spectrale et des analyses histologiques permettra de compléter ce travail, et de mieux comprendre l'aspect biologique relié à l'information spectrale.

Ch.II.4 – Déparaffinage numérique du signal Raman et discrimination entre mélanome et naevus sur tissus paraffinés.

Ch.II.4 Article II: Digital dewaxing of Raman signal: discrimination between nevi and melanomas from paraffin embedded skin biopsies

Contexte

Le potentiel de la spectroscopie Raman pour caractériser les lésions cutanées a été largement étudié. Cependant, toutes les études en Raman se limitent à des coupes de peau fraîche, congelée ou déparaffinée. La contribution de la paraffine dans les spectres Raman est beaucoup plus importante que dans les spectres infrarouges. Dans un signal Raman de peau paraffinée, 80 à 90 % du signal est dû à la paraffine. Cette dernière présente des raies de vibrations tout au long de la gamme spectrale, en masquant différentes bandes caractéristiques des constituants cutanés.

Les méthodes chémométriques utilisées pour les données infrarouge (EMSC) ne permettent pas de corriger les interférences spectrales (paraffines essentiellement) au niveau des spectres Raman. Face à cette limitation, de nouveaux outils statistiques ont été développés permettant de modéliser le signal de la paraffine et d'éliminer sa contribution des images spectrales.

Matériels et Méthodes

Les analyses en Raman ont été réalisées à partir de biopsies de naevi et de mélanomes, incluses en paraffine. Des coupes de 10 µm d'épaisseurs ont été réalisées et déposées sur des supports de CaF₂. Ces fenêtres ne présentent aucune vibration Raman dans la gamme spectrale étudiée (500-1810 cm⁻¹).

Résultats

Le signal de la paraffine est tout d'abord décomposé en trois sources indépendantes par ICA. Ensuite, la contribution positive de chacune de ces sources est calculée (NCLS) pour chaque spectre de l'image. Ceci permet de modéliser la contribution de la paraffine dans chaque pixel de l'image spectrale. Cette contribution est finallement soustraite du spectre correspondant.

Conclusion

Bien que la paraffine possède une très forte contribution au signal Raman, l'application des méthodes statistiques permet de corriger les spectres individuellement

DIGITAL DEWAXING OF RAMAN SIGNAL: DISCRIMINATION BETWEEN NEVI AND MELANOMAS FROM PARAFFIN EMBEDDED SKIN BIOPSIES

Ali TFAYLI¹, Cyril GOBINET², Valeriu VRABIE², Regis HUEZ², Franck BONNIER¹, Anne DURLACH³, Philippe BERNARD⁴, Olivier PIOT¹ and Michel MANFAIT¹

¹ MeDIAN Unit, CNRS UMR 6142, Faculty of Pharmacy, University of Reims Champagne – Ardenne (URCA), 51 rue Cognacq Jay, 51096 Reims, France.

² CReSTIC, University of Reims Champagne – Ardenne (URCA), Chaussée du port, BP 541, 51012 Châlons en Champagne, France.

³ Department of Pathology Pol Bouin, Reims University Hospital Maison Blanche, 51 rue Cognacq Jay, 51096 Reims cedex, France.

⁴ Department of Dermatology, Reims University Hospital Robert Debré, Avenue du Général Koenig, 51092 Reims cedex, France.

To be submitted

Abstract

Malignant melanoma (MM) is the most severe tumour affecting the skin and accounts for three quarters of all skin cancer deaths.

Vibrational spectroscopy is a promising non-destructive tool that has been increasingly used for characterization of the molecular features of cancerous tissues. Different techniques of multivariate statistical analysis are used in order to extract relevant information that can be considered as functional spectroscopic descriptors of a particular pathology.

Paraffin embedding (waxing) is a high efficacy process used to conserve biopsies in tumour banks for several years. However, the use of paraffin embedded tissues for vibrational spectroscopic investigations remains very restricted. This is due to the energetic signal of paraffin, especially in Raman spectroscopy where it masks important vibrations of the biological tissues. Chemical dewaxing methods are not efficient, in particularly they leave traces of the paraffin in tissues, which affects the Raman signal.

In the present study, we use Independent Component Analysis on Raman spectral images collected on melanoma and nevus samples. The sources obtained from these images are then used to eliminate, using NCLS (nonnegativily constrained least squares), the paraffin contribution from each individual spectrum of spectral images of nevi and melanomas. Spectra of both types of lesion were compared and classified into dendrogram with HCA.

Keywords: Raman spectroscopy, paraffin, digital dewaxing, Independent Component Analysis, Nonnegatively Constrained Least Square.

Introduction

Malignant melanoma (MM) is the most severe tumour affecting the skin and accounts for three quarters of all skin cancer deaths [1-4]. Its behaviour is characterized not so much by the local aggressiveness of the primary tumour, but rather by the pronounced and often very early tendency to produce metastases with a lethal outcome [2].

MM occurs mostly in whites; it is very rare in blacks. Its frequency is about 4-14 / 100000 per year in European countries and has dramatically increased in recent years. This increase has led dermatologists to have a great need for fast and reliable techniques that can detect cancer in the early stages and predict the risk of precancerous lesion progression [5,6].

Challenges relating to diagnosis of MM include differentiation of cancer from benign tumours (nevi) that resemble the MM closely [6,7].

Vibrational spectroscopy has received much attention from the medical community as a promising tool for non-destructive characterization of the molecular features of cancer, due to the fact that vibrational spectra are sensitive to structures of biological molecules and to their changes induced by the malignancy [6,8,9]. Over the last years, studies using vibrational spectroscopy have been led on various human cancers, including skin cancers [10-31].

Actually, different techniques of multivariate statistical analysis are used in order to extract relevant information that can be considered as functional spectroscopic descriptors of a particular pathology. Several methods like neural network analysis, principal components analysis, linear discriminant analysis and K-means clustering were used, on skin sections cut from fresh, cryo-fixed or dewaxed biopsies, to image, identify and characterize skin cancers [12,13,17,20-23,28], by reconstructing pseudo-colour images permitting to map cancerous zones.

Paraffin embedding (waxing) is a high efficacy process used to conserve biopsies in tumour banks for several years. However, the use of paraffin embedded tissues for vibrational spectroscopic investigations remains very restricted. This is due to the energetic signal of paraffin, especially in Raman spectroscopy where it masks the most of vibrations of the biological tissues.

Some works were reported on chemically dewaxed and rehydrated tissues [23], this treatment aims at eliminating the paraffin and consequently the paraffin signal from Raman and IR measurements. Meanwhile, the chemical dewaxing, first, is time and reagent consuming; second, can alter tissues structures; and third, is not totally efficient, leaving traces of the paraffin in tissues, which is sufficient to affect the Raman signal [32,33].

Tfayli et al. [10] have successfully used the FT-IR spectroscopy to discriminate nevi and melanomas on paraffin embedded non dewaxed skin sections. The discrimination relied on the selection of very specific narrow IR bands localised in a spectral range where the paraffin has no contribution.

In Raman spectroscopy, the very high contribution of the paraffin over the spectral range used for the analysis of biological specimens, made impossible to select non "paraffin-contaminated" vibrations.

In previous works [34-37], we have reported the use of Independent Component Analysis (ICA) to digitally dewax the Raman spectra collected on skin sections. This chemometric analysis permitted to model the paraffin by three different sources and to extract one source corresponding perfectly to the skin signal. This technique allowed to discriminate malignant and benign skin tumours using the specific sources extracted from each type of tissues.

In the used procedure, the skin signal is represented by only one source, without revealing the heterogeneity of the tissue. For example, the different skin signatures associated to the epidermis, the dermis and the stratum corneum, cannot be retrieved, which makes impossible to map the tumour spreading by reconstruction of spectral clusters based images.

Other innovative source separation methods must therefore be investigated in order to take into account the different skin signatures and the different histopathological states (healthy, benign, and malignant) of the tissular structure.

In the present study, we use ICA on Raman spectral images collected from "pure paraffin" sections [37] to obtain model sources of the paraffin. These sources were then used to eliminate, by combining ICA and nonnegativily constrained least squares (NCLS), the paraffin contribution from each individual spectrum of spectral images collected on nevus and on melanoma specimens.

NCLS [41] is a spectral unmixing method that aims to estimate the concentrations (or abundance fractions) of spectral signatures of known chemical species into measured linear mixings of these signatures. The originality of this method is to add to the classical least square procedure a positivity constraint on the abundance fractions in order to minimize the estimation error.

Dewaxed spectra of both types of lesions were also classified by HCA in order to assess the discriminative potential of the Raman analysing approach at the level of paraffin embedded skin biopsies.

Materials and methods

Tissue sample preparation:

Ten micrometer thick tissue sections were cut from formalin fixed paraffin embedded biopsies, corresponding to three melanomas and three nevi. The melanoma specimens represented three different types: lentiginous malignant melanoma (strictly intra-epidermal), superficial spreading melanoma (Breslow 0.75 mm), and acrolentiginous melanoma (Breslow 4 mm). The Breslow's index corresponds to the maximal thickness of the melanotic zone in the dermis. The nevi specimens represented two types: composed and junctional nevi.

Sections were deposited on CaF₂ slides. These slides are optimized for Raman spectroscopy; they do not give any signal in the spectral region (500 – 1810 cm⁻¹) of interest.

Spectral images were collected using a 10 µm step in X and Y lateral directions. The acquisition protocol is detailed in the instrumentation section.

Instrumentation, Raman spectrometer

Raman spectral acquisitions were performed with a Labram microspectrometer (Horiba Jobin Yvon, Lille France). The excitation source is a diode (TOPTICA PHOTONICS, Germany) generating 300 mW single mode laser at 785 nm. Such a wavelength allows a good penetration of the light deeply in the skin, and minimizes parasite fluorescence and does not cause any photochemical or thermal degradation. The power of the laser beam focalized on the sample was measured and maintained at 50 mW; which is non-destructive for biological samples.

The microspectrometer is equipped with an Olympus microscope and all measurements were recorded using a 100X objective (NA= 0.9). The nominal spot size at the sample was assessed to be 4 µm. Light scattered by the tissue is collected through the same objective. Rayleigh elastic scattering is intercepted by a Notch filter which reduces its intensity by a 10⁶ factor. A confocal pinhole rejects signals from out-of-focus regions in the sample. A multichannel CCD detector (Coupled Charge Device) (1024 x 256 pixels) detects the Raman Stokes signal dispersed with a 4 cm⁻¹ spectral resolution by a holographic grating (950 grooves/mm). The spectral range of the analysis was from 500 to 1810 cm⁻¹, the acquisition time of each spectrum was 2 times 10 seconds and the confocal pinhole was adjusted to 150 µm.

*Statistical analysis of Raman data:**Baseline removal*

To reduce the influence of the instrument response in the spectra, firstly, we corrected the collected signal by subtracting the black current signal (the signal collected on the CCD detector with the laser switched off). Secondly, the instrument response was corrected by dividing spectra by the black body (white light) signal. The remaining fluorescence-like background was corrected using a polynomial function [34-37].

Peaks alignment

Uncertainties on the exact wavenumber position of the maxima of paraffin peaks were corrected following the method described by Gobinet et al. [34,35]. It consists of computing the intercorrelation between the up-sampled versions of the current peak and a reference peak (automatically selected). The frequency shift between the two peaks corresponds to the position (x axis) of the maximum of the intercorrelation function. To optimize the results, these calculations are performed using the Fourier space.

Peak width homogenization

An additional artefact affected the Raman signal of the paraffin was the variation of the Raman peak width from one recording point to another. This effect; particularly visible on large biopsies, can false the ICA calculations. Therefore, a peak width homogenization pre-processing has been applied [42]. The procedure is crucial for an efficient correction of the paraffin contribution.

Normalisation

All spectra were normalised and centred using the standard normal variation (SNV) algorithm.

Independent component analysis (ICA):

Blind Source Separation (BSS) is a research field in signal processing. It aims to recover unobserved signals (called sources or spectral signatures in our case) and their associated concentrations from several observed linear mixtures of these sources (called observations) [36-38]. As no information is available about the mixture, additional assumptions must be done on sources statistics to achieve this goal.

The Independent Component Analysis (ICA) is a BSS method that is only based on the mutual statistical independence assumption of the unknown sources [38-40]. This assumption is sufficient to estimate the sources from the only knowledge of the observations; however with the condition that no more than one source is allowed to be Gaussian.

Mutual statistical independence of sources means that all higher-order cross cumulants of sources vanish (note here that the second order cross cumulant represents the covariance). However, only fourth order cumulants are usually used for instantaneous mixtures.

An efficient ICA method to estimate independent sources is the Joint Approximate Diagonalization of Eigenmatrices (JADE) algorithm [38]. For more details about ICA and its other algorithms, the reader can refer to [40].

Nonnegatively Constrained Least Square (NCLS):

The ICA is firstly used to estimate from spectral images recorded on "pure paraffin" sections the independent sources that model the Raman signal of the paraffin. This ensures that the extracted sources are not affected by the signal of biological molecules that is recorded on paraffin embedded biopsies.

For each spectrum of the image, the positive abundance fractions of paraffin sources are estimated individually thanks to the NCLS algorithm. The paraffin contribution is then computed as the linear combination of paraffin sources weighted by their respective abundance fractions.

Finally, the skin signatures are estimated in each acquisition point of spectral images by removing the computed paraffin contribution.

Computational details about NCLS are reported in [41].

Results and discussion:

Digital dewaxing

Digital dewaxing with ICA

In the dewaxing procedure described in our previous works [34-36,42], the spectral information from images was reduced to four sources. Three of them represent the paraffin, and a fourth represents the skin. This method does not take into account the histological heterogeneity of the tissue and the molecular and structural changes associated to the development of a malignancy.

To eliminate the paraffin contribution from each individual spectrum, we tried to reconstruct the images, this time by discarding the paraffin sources already identified with ICA.

By this procedure, the image reconstruction follows the changes in the intensity of contribution of the remaining source (skin source). This method shows acceptable results on paraffin embedded skin spectra (in term of elimination of paraffin contribution) (data not shown). Meanwhile, when we apply this procedure to spectra where only the paraffin is present (outside of the tissue), a residual signal is generated (Figure 01). These residues are due to errors in the paraffin sources estimation within spectral images from paraffin embedded skin sections.

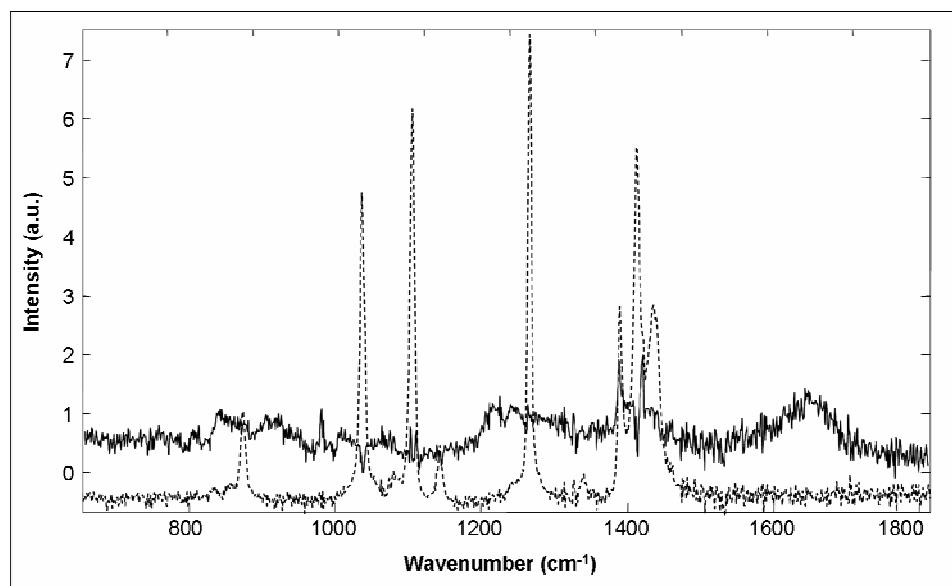


Figure 01: Pure paraffin spectrum, before elimination of ICA sources contribution (dotted line), and spectrum after elimination of paraffin sources multiplied by a factor of three (full line).

Digital dewaxing with NCLS

The NCLS dewaxing procedure consists of estimating the contribution of each individual band from the paraffin sources directly at the level of each spectrum in the image. The three paraffin sources being estimated with ICA. Then, using NCLS, a linear combination of all three sources was created. This combination is calculated for each individual spectrum in the image in a way that no negative values are obtained after subtraction. This method permits to preserve the spectral differences due to the biological structures.

Estimation of paraffin sources with ICA

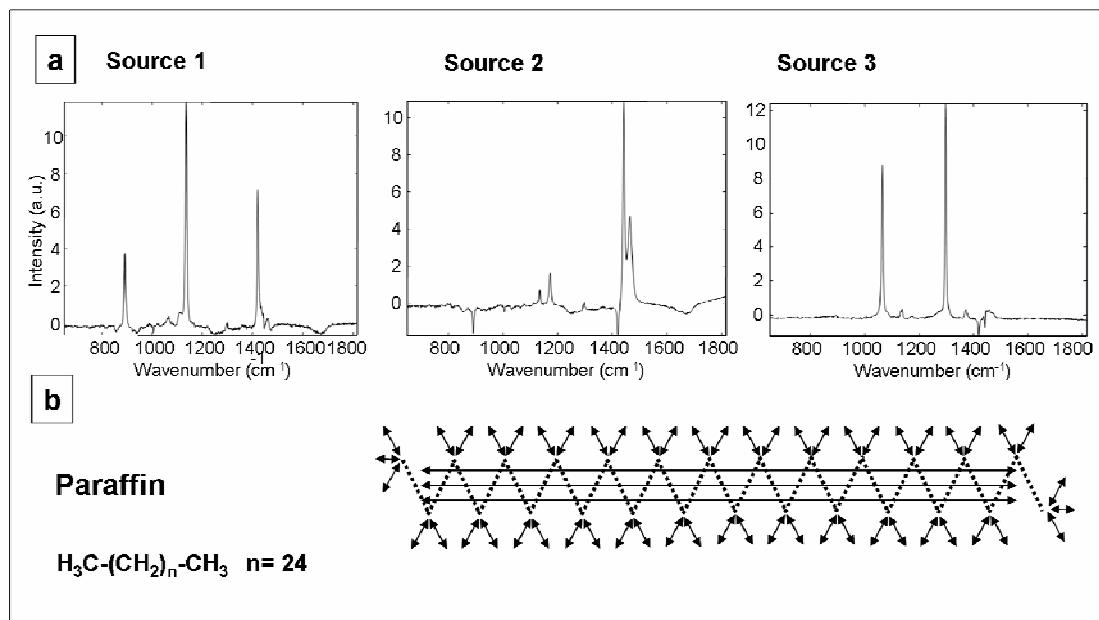


Figure 02: a. Independent components of the paraffin estimated by a three sources model. b. paraffin molecule and representation of the main paraffin vibrations

Table 01: Assignment of the main paraffin vibrations.

Raman shift cm ⁻¹	Assignment	Source number
890	CH ₂ wag	1
1062	C-C stretch	1 / 3
1170	CH ₂ twist	2
1294	CH ₂ deformation	3
1420	CH ₃ deformation	1
1442	CH ₂ deformation	2
1465	CH ₂ bending	2

The first step in this dewaxing procedure was the extraction of the paraffin sources. ICA was therefore applied to spectral images collected on "pure paraffin" sections. The Raman paraffin signal can then be decomposed in three independent sources (Figure 02a).

The main vibrations of the paraffin molecules are presented in figure 02a, and assigned in table 01.

Paraffin elimination with NCLS

For each paraffin source, the associated abundance fraction into the measured Raman spectra is estimated by NCLS algorithm. The computed Raman signal of the paraffin is then removed from recorded spectra (Figure 03) in each point of spectral images.

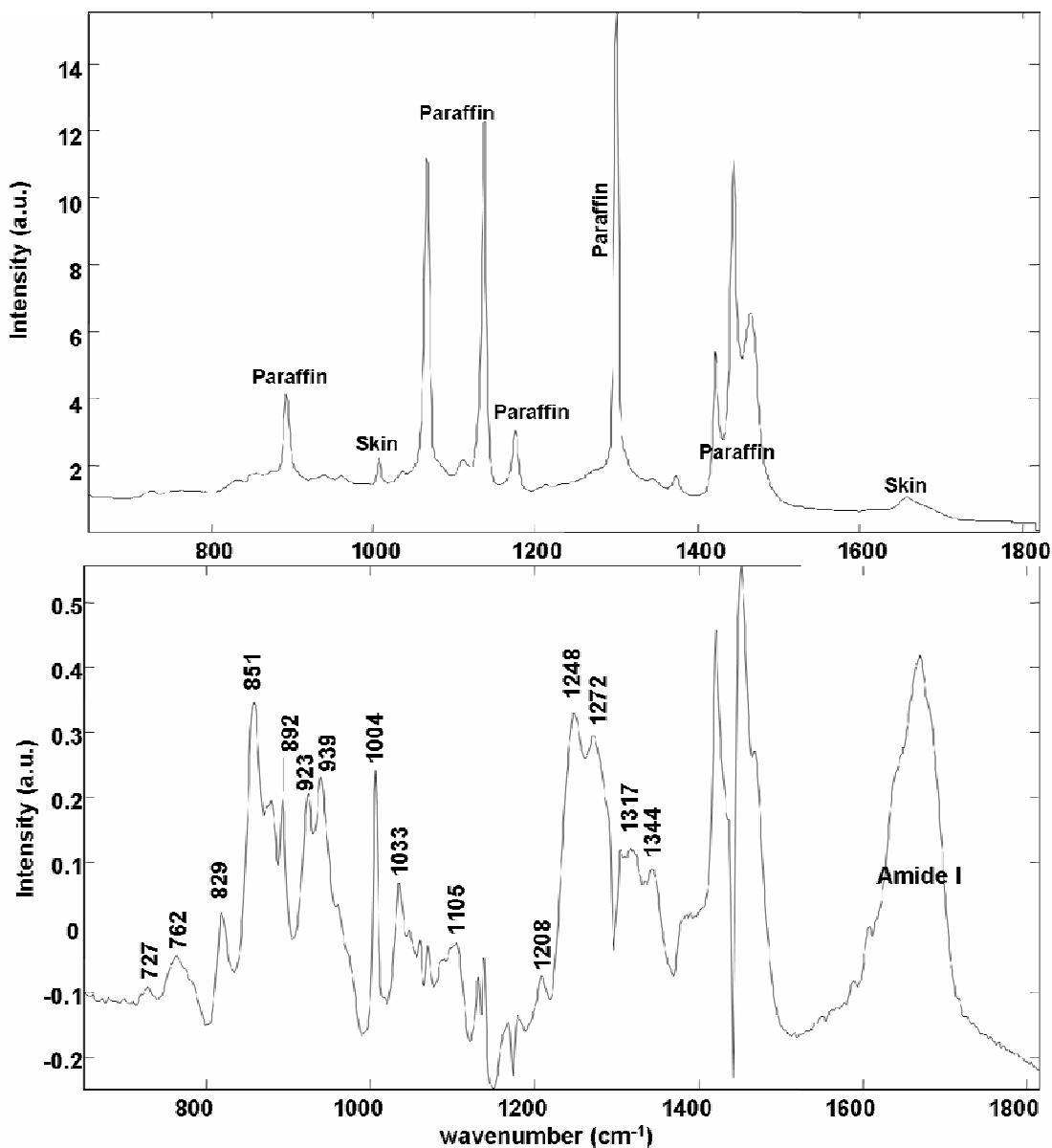


Figure 03: a: raw Raman spectrum of paraffin embedded skin. b: skin spectrum after elimination of the computed signal of paraffin using NCLS

Although the skin signal is rather weak in the raw spectrum the figure 03b shows that the elimination of paraffin contribution with NCLS is very efficient, except for the band at 1445 cm^{-1} corresponding to CH deformation vibrations.

Table 02: Assignment of the main Raman bands identified on a corrected spectrum

Wavenumber cm^{-1}	Assignment
727	ν C-S Cystine <i>trans</i>
762	Sym cycle breathing Trp
829	Tyr Fermi Doublet (ring)
851	Tyr Fermi Doublet (ring)
876	Trp
892	$\rho(\text{CH}_2)$ protein or paraffin residue
923	(CC) ν proline ; collagen
939	$\rho(\text{CH}_3)$ terminal; $\nu(\text{CC})$ α helix
1004	sym. ring breathing Phe
1033	(CH) in plane bend Phe
1105	
1208	ν C-C ₆ -H ₅ , Phe, Trp, Tyr
1248	Amide III random coil (secondary structure)
1272	$\nu(\text{CN})$ and $\delta(\text{NH})$ Amide III α helix (globular)
1317	C=C, CH protein DNA, RNA
1344	N CC, CH bend Phe, Trp DNA RNA
1670	$\nu(\text{C=O})$ Amide I

ν : stretch ; δ : deformation ; ρ : rocking

From the spectrum in the figure 03b and the band assignment in table 02, it is possible to obtain some information about the amino acids composition and the secondary structure of

proteins in this skin specimen. In particular, vibrations of phenylalanine, tyrosine, and tryptophane can be unambiguously identified.

For the phenylalanine (Phe), 2 bands, at 1004 cm^{-1} (ring breathing) and 1033 cm^{-1} (C-H) can be identified. The phenylalanine also contributes to the 1208 cm^{-1} and 1344 cm^{-1} vibrations.

The presence of tyrosine (Tyr) is highlighted by the doublet at 817 and 857 cm^{-1} , this doublet is due to Fermi resonance between the ring breathing vibration, and the overtone of the nonplanar ring vibration at 413 cm^{-1} . The intensity ratio I_{829}/I_{851} is related to the state of the phenolic hydroxyl group. In the figure 03, the 851 cm^{-1} vibration is more intense which indicates that the phenolic OH group is an acceptor of hydrogen bonds; and that the tyrosil residues are exposed and not "buried" within the protein. Such a configuration tends to form intermolecular bonds rather than intramolecular bonds.

The tryptophane (Trp) vibrational bands are present at 762 cm^{-1} , 876 cm^{-1} , 1208 cm^{-1} and 1344 cm^{-1} .

The Cysteine, can be identified by the band at 726 cm^{-1} (stretching C-S).

Concerning the secondary structure of the proteins, Raman spectroscopy can be used to determine *in-situ* the structure type (α helix, β sheet, β turn, random coil, etc) by studying the Amide I (1670 cm^{-1}) and Amide III (1272 cm^{-1}) bands.

Nevi and melanoma discrimination

Figure 04 presents the corrected average spectra, one originating from a melanoma section and the other from a nevus section.

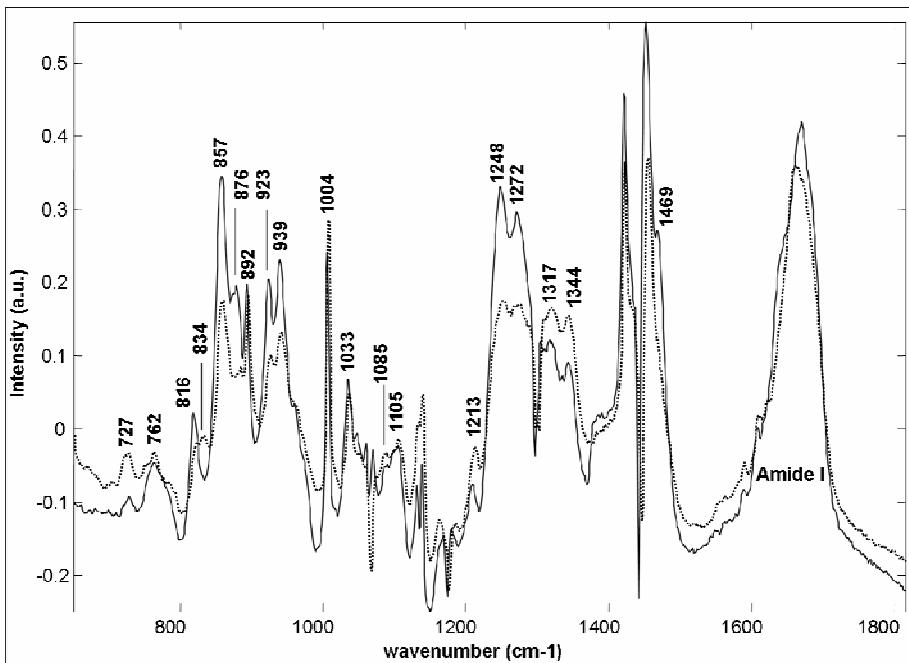


Figure 04: Spectra originating from melanoma section (dotted line) and from nevus (full line).

Table 03: Assignment of the main differences in Raman bands, identified on the corrected spectra from nevi and melanomas

Wavenumber cm ⁻¹	Intensity		Assignment
	Nevus	Melanoma	
727	w	m	v C-S Cystine <i>trans</i>
762	m	m	Sym cycle breathing Trp
782	-	shoulder	
816	to s	-	Tyr Fermi Doublet (ring)
834	-	m	Tyr Fermi Doublet (ring) DNA, RNA
857	s	m	Tyr Fermi Doublet (ring)
876	s	m	Trp
892	s	s	$\rho(\text{CH}_2)$ protein
923	s	s	(CC) v praline ; collagen
939	m	m	$\rho(\text{CH}_3)$ terminal; v(CC) α helix
1004	s	s	sym. ring breathing Phe
1018	-	very small shoulder	
1033	m	m	(CH) in plane bend Phe
1085	w	w	
1105	w	w	
1208	m	-	v C-C ₆ -H ₅ , Phe, Trp, Tyr Polysaccharides
1213	-	m	v C-C ₆ -H ₅ , Phe, Trp, Tyr Polysaccharides
1248	s	m	Amide III random coil (secondary structure)
1272	s	m	v(CN) and $\delta(\text{NH})$ Amide III α helix (globular)
1317	m	m	C=C, CH proteins
1344	m	m	DNA, RNA N CC, CH bend Phe, Trp DNA RNA
1469	shoulder	-	
1645	shoulder	-	
Amide I	centered at 1671	centered at 1663	v(C=O) Amide I

v : stretch ; δ : deformation ; ρ : rocking, w: weak, m: medium, s: strong

The comparison of the nevi and melanoma spectra shows that both lesions present some common Raman vibrations, but also some significant differences (Figure 04, table 03).

At 727 cm⁻¹, the difference in the intensity (Table 03) can be due to the difference of cysteine residues content (C-S bonds). The increase of the vibrations of the C-S bonds could be related

not only to an increase of the quantity of cysteine residues in the protein content, but also to a conformational change at the level of C-S bonds. Actually, the frequency of these vibrations changes with the conformation of these bonds, since the frequency is proportional to the energy of the bonds.

The difference in the intensity of the band at 762 cm^{-1} may be due to a difference in the tryptophane content. This may be also the cause of the shift from 1208 cm^{-1} for the nevus to 1213 cm^{-1} for the melanoma.

The inspection of the Amide I band can reveal information on the secondary structure of proteins. The Amide I band is centered at 1671 cm^{-1} for nevi and at 1663 cm^{-1} for melanomas, which reveals differences in the secondary structure, mainly the predomination of the β sheet conformation in the melanoma. The shoulder at 1645 cm^{-1} for the nevi spectrum highlights the α helix contribution. On normal skin the dominating secondary structure is α helix and the Amide I band is centered at 1650 cm^{-1} . The differences in the secondary structure can be quantified by the decomposition of the amide I band by using Gaussian-Loretzian functions to model vibration peaks.

Differences in protein secondary structure can be also detected at the level of the Amide III band, with differences in the intensity ratio $1248\text{ cm}^{-1}/1272\text{ cm}^{-1}$.

The integrated intensity of the band between 850 cm^{-1} and 980 cm^{-1} assigned to polysaccharides C-O-C and C-C stretching vibration appears to be more intense for nevi than melanomas.

The nucleic acids contents can be detected by peaks at 1317 and 1344 cm^{-1} , both bands have higher intensity for melanomas, which may reveal a higher cells proliferation activity. The nucleic acids contribution in the melanoma spectrum could also be the origin of the shift of the band from 817 cm^{-1} for nevi to 834 cm^{-1} .

All these differences can be used as discriminant markers for the differential diagnosis of melanomas versus nevi.

Hierarchical Cluster Analysis (HCA):

To distinguish nevi spectra from those of melanomas, HCA (hierarchical cluster analysis) was performed on a set of 50 corrected spectra extracted from both lesions. HCA was performed on $825-843\text{ cm}^{-1}$ and $1194-1221\text{ cm}^{-1}$ spectral regions. Results are presented on a tree-like dendrogram (Figure 05).

This dendrogram shows clear separation between both types of lesions.

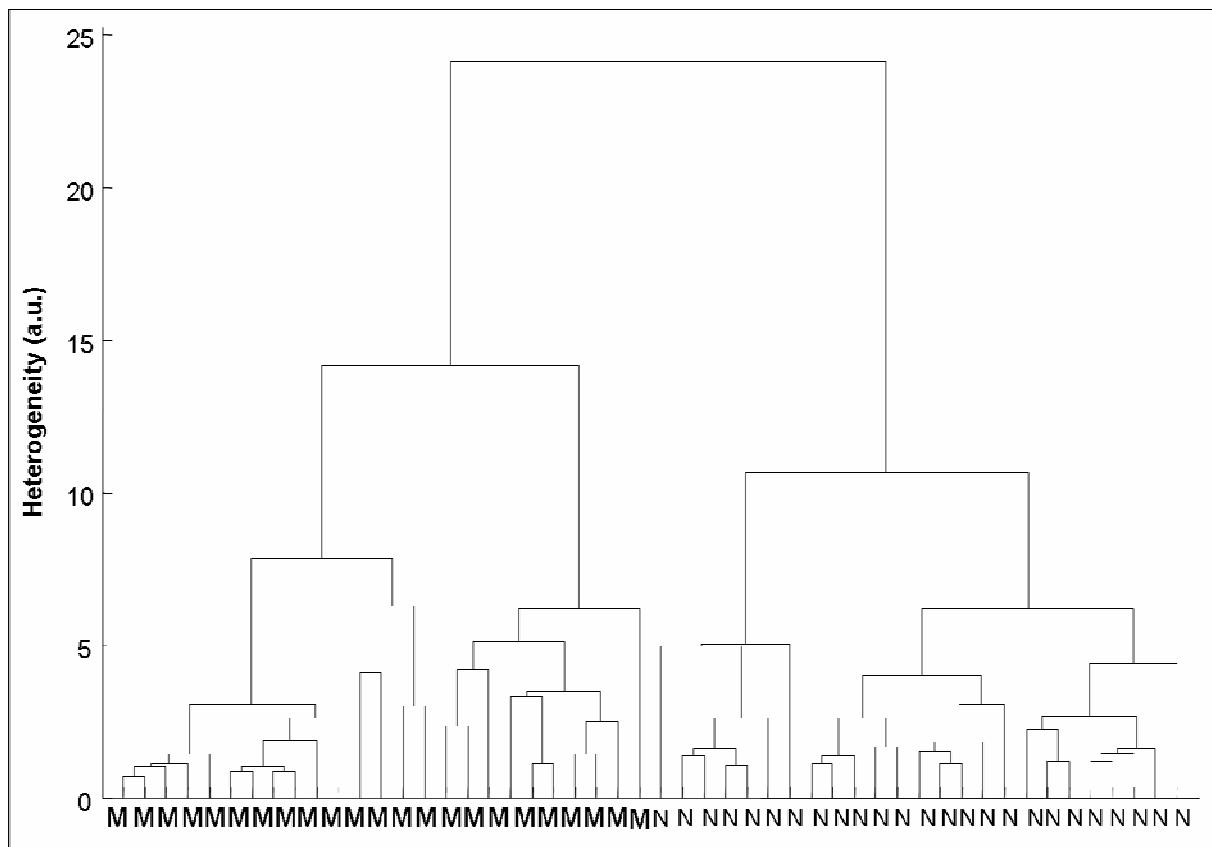


Figure 03: Dendrogram of the HCA, using the difference bands identified on table 03. The letter M indicates a melanoma and the letter N a nevus.

In conclusion, the association of ICA and NCLS leads to an efficient digital dewaxing of Raman spectra collected on paraffin embedded biopsies. The method is based on the decomposition of the paraffin signal, using ICA, into three sources. The paraffin contribution is then computed as the linear combination of paraffin sources weighted by their respective abundance fractions (NCLS). The skin signatures are then estimated in each acquisition point of spectral images by removing the computed paraffin contribution.

This data processing permits to extract specific spectral signatures associated to melanoma and nevus lesions, which can be used for the differential diagnosis of these two skin lesions by Raman spectroscopy.

References

1. Bastuji-Garin S, Diepgen TL: Cutaneous malignant melanoma, sun exposure, and sunscreen use: epidemiological evidence. *Br J Dermatol* 2002;146 Suppl 61:24-30.
2. Braun-Falco O, Plewig G, Wolff HH, Winkelmann RK: *Dermatology*. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag, 1991.
3. Gandini S, Merzenich H, Robertson C, Boyle P: Meta-analysis of studies on breast cancer risk and diet: the role of fruit and vegetable consumption and the intake of associated micronutrients. *Eur J Cancer* 2000;36:636-646.
4. Greinert R, Volkmer B, Wende A, Voss S, Breitbart EW: [Prevention of skin cancer. Necessity, implementation and success]. *Hautarzt* 2003;54:1152-1163.
5. Bronchud MH, Foote MA, Giaccone G, Olopade O, Workman P: *Principles of Molecular Oncology*. ed 2, New Jersey, Humana Press Inc., 2004.
6. Eikje NS, Aizawa K, Ozaki Y: Vibrational spectroscopy for molecular characterisation and diagnosis of benign, premalignant and malignant skin tumours. *Biotechnol Annu Rev* 2005;11:191-225.
7. McIntosh LM, Jackson M, Mantsch HH, Mansfield JR, Crowson AN, Toole JWP: Near Infrared spectroscopy for dermatological applications. *Vibrationnal Spectroscopy* 2002;28:53-58.
8. Grob J-J, Saurat JH, Grasshans E, J.M.Lachapelle, Lipsher D, Thomas L, Lacour JP, Naeyaert JM, Salemon D, R.Braun: *Dermatologie et maladies sexuellement transmissibles*. ed Masson, Paris, 2004.
9. Saiag P, Grob JJ, Grosshans E: Epithelial and melanotic skin tumors. *Melanomas*. Ann Dermatol Venereol 2002;129:S143-148.
10. Tfayli A, Piot O, Durlach A, Bernard P, Manfait M: Discriminating nevus and melanoma on paraffin-embedded skin biopsies using FTIR microspectroscopy. *Biochim Biophys Acta* 2005;1724:262-269.
11. Bitar RA, Martinho Hda S, Tierra-Criollo CJ, Zambelli Ramalho LN, Netto MM, Martin AA: Biochemical analysis of human breast tissues using Fourier-transform Raman spectroscopy. *J Biomed Opt* 2006;11:054001.
12. Nijssen A, Bakker Schut TC, Heule F, Caspers PJ, Hayes DP, Neumann MH, Puppels GJ: Discriminating basal cell carcinoma from its surrounding tissue by Raman spectroscopy. *J Invest Dermatol* 2002;119:64-69.
13. Nijssen A, Maquelin K, Santos LF, Caspers PJ, Bakker Schut TC, den Hollander JC, Neumann MH, Puppels GJ: Discriminating basal cell carcinoma from perilesional skin using high wave-number Raman spectroscopy. *J Biomed Opt* 2007;12:034004.
14. Stone N, Kendall C, Smith J, Crow P, Barr H: Raman spectroscopy for identification of epithelial cancers. *Faraday Discuss* 2004;126:141-157; discussion 169-183.
15. Amharref N, Beljebbar A, Dukic S, Venteo L, Schneider L, Pluot M, Vistelle R, Manfait M: Brain tissue characterisation by infrared imaging in a rat glioma model. *Biochim Biophys Acta* 2006;1758:892-899.
16. Choi J, Choo J, Chung H, Gweon DG, Park J, Kim HJ, Park S, Oh CH: Direct observation of spectral differences between normal and basal cell carcinoma (BCC) tissues using confocal Raman microscopy. *Biopolymers* 2005;77:264-272.
17. Gniadecka M, Philipsen PA, Sigurdsson S, Wessel S, Nielsen OF, Christensen DH, Hercogova J, Rossen K, Thomsen HK, Gniadecki R, Hansen LK, Wulf HC: Melanoma diagnosis by Raman spectroscopy and neural networks: structure alterations in proteins and lipids in intact cancer tissue. *J Invest Dermatol* 2004;122:443-449.

18. Koljenovic S, Bakker Schut TC, van Meerbeeck JP, Maat AP, Burgers SA, Zondervan PE, Kros JM, Puppels GJ: Raman microspectroscopic mapping studies of human bronchial tissue. *J Biomed Opt* 2004;9:1187-1197.
19. Koljenovic S, Choo-Smith LP, Bakker Schut TC, Kros JM, van den Berge HJ, Puppels GJ: Discriminating vital tumor from necrotic tissue in human glioblastoma tissue samples by Raman spectroscopy. *Lab Invest* 2002;82:1265-1277.
20. Lasch P, Haensch W, Naumann D, Diem M: Imaging of colorectal adenocarcinoma using FT-IR microspectroscopy and cluster analysis. *Biochim Biophys Acta* 2004;1688:176-186.
21. Lasch P, Naumann D: FT-IR microspectroscopic imaging of human carcinoma thin sections based on pattern recognition techniques. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 1998;44:189-202.
22. Sigurdsson S, Philipsen PA, Hansen LK, Larsen J, Gniadecka M, Wulf HC: Detection of skin cancer by classification of Raman spectra. *IEEE Trans Biomed Eng* 2004;51:1784-1793.
23. Wood BR, Chiriboga L, Yee H, Quinn MA, McNaughton D, Diem M: Fourier transform infrared (FTIR) spectral mapping of the cervical transformation zone, and dysplastic squamous epithelium. *Gynecol Oncol* 2004;93:59-68.
24. Barry BW, Edwards HGM, Williams AC: Fourier transform Raman and infrared vibrational study of human skin: assignment of spectral bands. *Raman Spectroscopy* 1992;23:641-645.
25. Stone N, Prieto MCH, Kenall CA, Shetty G, Barr H: Raman spectroscopic biochemical mapping of tissues. In Mahadevan-Jansen A, Petrich WH (eds): *Proceedings of SPIE Volume 6093, Biomedical Vibrational Spectroscopy III: Advances in Research and Industry*. San Jose, 2006.
26. Choo-Smith LP, Edwards HG, Endtz HP, Kros JM, Heule F, Barr H, Robinson JS, Jr., Bruining HA, Puppels GJ: Medical applications of Raman spectroscopy: from proof of principle to clinical implementation. *Biopolymers* 2002;67:1-9.
27. Petibois C, Deleris G: Chemical mapping of tumor progression by FT-IR imaging: towards molecular histopathology. *Trends Biotechnol* 2006;24:455-462.
28. McIntosh LM, Jackson M, Mantsch HH, Stranc MF, Pilavdzic D, Crowson AN: Infrared spectra of basal cell carcinomas are distinct from non-tumor-bearing skin components. *J Invest Dermatol* 1999;112:951-956.
29. Fendel S, B.Schrader: *Investigation of skin lesions by NIR-FT-Raman spectroscopy*. *J Anal Chem* 1998;**360** 609-613.
30. Dukor RK: *Vibrational Spectroscopy in the Detection of Cancer*. Illinois USA, John Wiley & Sons Ltd, 2002.
31. Andrus PG: Cancer monitoring by FTIR spectroscopy. *Technol Cancer Res Treat* 2006;5:157-167.
32. Faolain EO, Hunter MB, Byrne JM, Kelehan P, Lambkin HA, Byrne HJ, Lyng FM: Raman spectroscopic evaluation of efficacy of current paraffin wax section dewaxing agents. *J Histochem Cytochem* 2005;53:121-129.
33. Faolain EO, Hunter MB, Byrne JM, Kelehan P, McNamara M, Byrne HJ, Lyng FM: A study examining the effect of tissue processing on human tissue sections using vibrational spectroscopy. *Vibrationnal Spectroscopy* 2005;38:121-127.
34. Gobinet C, Tfayli A, Piot O, Vrabie V, Huez R: Independent Component Analysis and Raman spectroscopy on paraffinised non dewaxed cutaneous biopsies: A promising methodology for melanoma early diagnosis. In International Workshop on Biosignal Processing and Classification BPC. Barcelona, Spain, 2005.

35. Gobinet C, Tfayli A, Piot O, Vrabie V, Huez R: A method of digital deparaffining based on Raman spectroscopy and Independent Component Analysis - Application to melanoma early diagnosis. In Jiri Hozman PK (ed): European Medical & Biological Engineering Conference EMBEC 05. Prague, Czech Republic, 2005:3688-3693.
36. Vrabie V, Gobinet C, Piot O, Tfayli A, Bernard P, Huez R, Manfait M: Independent component analysis of Raman spectra: Application on paraffin-embedded skin biopsies. Biomedical Signal Processing and Control 2007;2:40-50.
37. Vrabie V, Huez R, Gobinet C, Piot O, Tfayli A, Manfait M: On the modelling of paraffin through Raman spectroscopy. In IFAC Symposium on Modelling and Control in Biomedical Systems MCBMS06. Reims, 2006.
38. Cardoso JF, Souloumiac A: Blind beamforming for non-Gaussian signals Proceedings of the IEEE 1993;140:362-370.
39. Cardoso JF: Blind signal separation: statistical principles. Proceedings of the IEEE 1998;86:2009-2025.
40. Hyvärinen A, Karhunen J, Oja E: Independent Component Analysis. New York, Wiley, 2001.
41. Chang CI, Heinz DC: Constrained subpixel target detection for remotely sensed imagery. IEEE Transactions on Geoscience and Remote Sensing 2000;38.
42. Gobinet C, Vrabie V, Tfayli A, Piot O, Huez R, Manfait M: Preprocessing and source separation methods for Raman spectra analysis of biomedical samples. In 29th annual conference of the IEEE engineering in medicine and biology societies (IEEE EMBC'2007) Lyon, France, 2007:6207-6210.

Ch.II.5 – Perspectives

Pour compléter, valider et renforcer ces travaux, des études plus poussées peuvent être envisagées ; plus particulièrement sur :

- La recherche de marqueurs spectroscopiques Raman et infrarouge associés aux différents grades des mélanomes ;
- Une multiplication du nombre d'échantillons, afin de vérifier la sensibilité et la spécificité de la méthodologie indépendamment de la variabilité "inter-individu", en vue de réaliser une banque de données de marqueurs spectroscopiques ;
- L'analyse de tissus frais pour vérifier si les zones spectrales discriminantes déterminées sur les tissus paraffinés, restent valables sur les tissus frais, et par conséquent *in-vivo* ;

A retenir :

- **Le choix de zones spectrales infrarouges, non polluées par le signal de la paraffine, permet d'identifier les différentes couches de la peau.**
- **Quatre bandes de vibration infrarouge de faibles intensités, localisées entre 1200 et 1410 cm⁻¹ et attribuées à la mélanine et aux acides nucléiques, se sont révélées pertinentes pour différentier les mélanomes et les naevi.**
- **L'application de méthodes chimiométrique telle que l'EMSC permet de diminuer la variabilité due à la contribution de la paraffine dans l'information spectrale infrarouge.**
- **La classification selon les K-means, des données IR prétraitées par EMSC, permet de cartographier les structures de la peau et de localiser avec précision les zones cancéreuses sur des coupes de biopsies paraffinées.**
- **En spectroscopie Raman, la contribution de la paraffine est plus importante qu'en IR, l'application de l'EMSC sur des spectres de tissus paraffinés n'est pas suffisante pour corriger l'influence de la paraffine.**
- **L'application des méthodes de traitement de données, telles que la séparation de sources (ICA) et de "fittage" de données (NCLS), permet d'éliminer la contribution de la paraffine dans chaque spectre.**

CHAPITRE III

ETUDES DE PENETRATIONS ET DE PERMEATIONS CUTANEES PAR MICROSPECTROSCOPIE RAMAN CONFOCALE



- **Suivi de pénétration du Métronidazole à travers la peau excisée par microspectroscopie Raman confocale.** (Tfayli et al. EBJ 2007).
- **Caractérisation moléculaire par microspectroscopie Raman d'un modèle de peau reconstruite Episkin®** (Tfayli et al. Biopolymers 2007).
- **Correction de l'estimation de la profondeur des analyses Raman confocales** (Tfayli et al. Biophotonics 2007).

Ch.III.1 : Introduction

L'épiderme humain est particulièrement bien adapté à la fonction essentielle de "barrière", il limite l'entrée des agents extérieurs. De par l'importance de sa surface, la peau constitue quantitativement l'organe le plus important en contact avec le milieu extérieur. Cette "barrière protectrice" toutefois n'est pas absolue, elle est perméable à pratiquement toutes les substances, seul le degré de perméabilité varie. Cette perméabilité est liée principalement à l'état physiologique de la peau, aux propriétés physico-chimiques des composés dont elle est supposée restreindre l'entrée et à la nature de "l'environnement" (excipient, véhicule, air ambiant...) par lequel ces substances sont amenées au contact de la peau (Scheuplein et al. 1971; Thivolet et al. 1989; Humbert et al. 2001; Marty 2006; Walters 2006).

L'état physiologique de la peau est un élément prédominant à considérer : une peau saine, intacte, constitue une barrière naturelle à la pénétration des substances exogènes ; toute altération de la surface cutanée par agression mécanique ou chimique facilite le passage vers les structures cutanées profondes et le compartiment sanguin systémique. Il en résulte une modification de la biodisponibilité qui, dans certains cas, est mise à profit pour optimiser une action thérapeutique, mais dans d'autres cas peut s'avérer néfaste avec apparition d'effets toxiques (Thivolet et al. 1989).

Il est important de connaître le sort des substances chimiques appliquées sur la peau afin, d'évaluer la fraction de la dose appliquée réellement absorbée exerçant une activité pharmacologique ou toxique de type systémique. Les études de pharmacocinétique percutanée permettent de préciser le devenir du produit lors de sa diffusion dans le tégument : rétention sur la couche cornée, fixation spécifique ou aspécifique sur les protéines cutanées, métabolisme épidermique et/ou dermique, accumulation dans les structures cutanées profondes. Ces données sont utiles pour évaluer l'efficacité ou la toxicité locale (irritation, sensibilisation, phototoxicité et photoallergie) et/ou systémique.

La connaissance des modalités de diffusion et d'absorption des substances chimiques au niveau la peau et des particularités pharmacocinétiques de la diffusion percutanée (absence de premier passage hépatique, site d'application externe) permet de comprendre les spécificités liées à une contamination par contact avec la peau mais également de mettre en place des systèmes de protection spécifique pour diminuer l'impact d'un contact répété ou prolongé entre une substance toxique et la peau (Scheuplein et al. 1971; Thivolet et al. 1989; Humbert et al. 2001; Marty 2006; Walters 2006).

L'absorption percutanée correspond au transfert d'une substance à travers la peau depuis le milieu extérieur jusqu'au sang. Elle peut être définie comme la somme de deux phénomènes : une pénétration des molécules au sein de la peau entière, suivie d'une résorption par la circulation sanguine ou lymphatique depuis le derme papillaire puis le derme profond. L'étape de pénétration, en terme physique, est une diffusion passive à travers chaque structure du tégument : couche cornée, épiderme, derme et annexes cutanées. Une fois absorbée, la substance est distribuée dans l'organisme puis, après avoir été ou non métabolisée, elle est éliminée. Les étapes succédant à l'absorption percutanée sont similaires à celles qui sont rencontrées pour toute autre voie de contamination.

Anatomiquement, deux voies distinctes permettent la pénétration : l'une, à travers les espaces intercellulaires de la couche cornée et à travers les cellules cornées elles-mêmes (voie transépidermique), l'autre empruntant les annexes cutanées (follicules pilo-sébacés et/ou glandes sudoripares). Ces deux voies sont généralement simultanées : la pénétration globale est la résultante d'un passage transépidermique et d'un passage par les annexes (Humbert et al. 2001; Marty 2006).

Au sein de l'épiderme, la couche cornée assure la fonction de barrière à la diffusion, *in vitro* elle présente une résistance à l'absorption pratiquement identique à celle de la peau entière. L'élimination totale du stratum corneum par délamination avec un ruban adhésif (*stripping*) conduit à l'obtention d'une perte insensible en eau équivalente à celle intervenant à la surface de l'eau libre, et à l'augmentation de la pénétration des agents chimiques. La résistance de l'épiderme à la diffusion est très faible comparativement à celle de la couche cornée mais lorsque celle-ci est éliminée par *stripping*, l'épiderme de composition chimique hydrophile peut jouer un rôle de barrière notamment vis à vis de molécules très hydrophobes. Les structures dermiques, pour une peau non lésée, ne participent que très modestement à la fonction globale de "barrière", la vascularisation de la papille dermique favorise la résorption des molécules en provenance de l'épiderme (Scheuplein et al. 1971; Thivolet et al. 1989; Walters 2006).

La couche cornée est constituée des cellules cornées, de nature hydrophile par leur contenu en protéines, entourées d'un "ciment" lipophile formé par les lipides qui remplissent les espaces extracellulaires. La diffusion à travers la couche cornée dans ces conditions peut s'effectuer soit par voie transcellulaire, directe, avec traversée successive des cellules et des espaces extracellulaires, soit par voie intercellulaire au niveau des espaces laissés libres entre les

cornéocytes. L'analyse structurale de la couche cornée montre que les lipides expulsés (stérols libres ou estérifiés, acides gras libres, triglycérides et sphingolipides) dans les espaces intercellulaires lors de l'étape finale de la différenciation épidermique sont organisés en bicouches orientées séparant des zones "hydrophiles" et des zones "lipophiles". Ce qui crée ainsi un domaine de diffusion lamellaire aux propriétés physico-chimiques opposées. Les molécules polaires pourraient se diriger vers les régions "hydrophiles" des couches lipidiques intercellulaires alors que les régions "hydrophobes" de ces mêmes chaînes permettraient la diffusion des molécules moins polaires (Scheuplein et al. 1971; Humbert et al. 2001; Marty 2006).

Ces observations montrent que la fonction barrière cutanée doit être considérée comme un ensemble résultant d'interactions anatomiques, morphologiques et physico-chimiques.

La pharmacocinétique cutanée est une discipline primordiale pour l'industrie cosmétique, pour l'évaluation de la pénétration des crèmes, des écrans solaires et autres produits cosmétiques.

Dans le domaine médical, trois grands domaines s'intéressent à la pharmacocinétique cutanée :

- En toxicologie, avec la pénétration de polluants atmosphériques, de pesticides ou encore l'effet toxique systémique de produits pharmaceutiques topiques mais distribués dans l'organisme.
- En thérapeutique moderne, où la voie transdermique est utilisée comme substitut à d'autres voies d'administration systémique, afin d'éviter la dégradation métabolique au niveau du foie ;
- En dermatologie ; en effet, certaines maladies cutanées, comme les dermatoses modifient la perméabilité de la couche cornée.

Récemment, de nouvelles réglementations européennes (REACH : Registration, evaluation and autorisation of chemicals) incitent à utiliser des procédures de validation des produits chimiques existants et dont les profils toxicologiques n'ont toujours pas été établis. Dans ce contexte, les études sur l'absorption cutanée deviennent indispensables. On estime à 30000 le nombre de produits chimiques à analyser (Schreiber et al. 2005). De plus le rapport du comité scientifique des produits cosmétiques et des produits non alimentaires (SCCNFP) a mis en évidence la nécessité de validation et d'évaluation des effets des produits cosmétiques (SCCNFP 2003).

Les principales techniques utilisées pour l'étude de la pénétration cutanée sont citées dans le chapitre I. Rappelons :

- Les **cellules de diffusion** (cellules de Franz par exemple).
- Le **tape stripping**.
- Les techniques biophysiques comme la **microscopie électronique** (EM) (Hofland et al. 1995), la **microscopie confocale** (CLSM) (Veiro et al. 1994; Grams et al. 2004a; Grams et al. 2004b), et la **microscopie à deux photons** (TPFM) (Yu et al. 2003).

Parmi les techniques utilisées actuellement pour caractériser la peau, la microspectroscopie Raman confocale représente les avantages d'être non destructive, de permettre une analyse structurale et moléculaire en temps réel et de ne pas nécessiter de préparation ni marquage de l'échantillon. Ce qui la rend très attractive pour des études des tissus cutanés à grande échelle. La microspectroscopie Raman confocale a été utilisée pour suivre les effets induits par des principes actifs a été montré par différentes équipes (Barry et al. 1992; Caspers et al. 2001), d'autres travaux ont établi des profils de concentration (en profondeur en partant de la surface) de différentes molécules (eau et molécules endogènes) (Neubert et al. 1997; Wegener et al. 1997; Gniadecka et al. 1998a; Caspers et al. 2001; Caspers et al. 2003; Chrit et al. 2005; Kalasinsky et al. 2005; Sieg et al. 2006), d'autres auteurs ont également suivi, en temps réel, la diffusion des produits exogènes à travers les couches de la peau (Xiao et al. 2005a; Xiao et al. 2005b).

Profitant de ces capacités techniques, nous avons **suivi, dans un premier temps, la pénétration du Métronidazole**, un principe actif produit par Galderma pour le traitement des rosacées, au niveau des couches cutanées (article 3). Dans cet article, en premier lieu, une **caractérisation spectrale de la peau et du Métronidazole** a été réalisée. Ce qui a permis **d'identifier des marqueurs spectraux permettant de détecter le principe actif dans la peau**. Ensuite, des profiles verticaux (en Z) ont été enregistrés pour suivre la pénétration du médicament sur des blocs de peau excisée, maintenue en conditions de survie au moyen d'une cellule de Franz. Des images spectrales sur des sections transversales de peau congelée ont également été enregistrées.

Les sources de peau humaine excisée étant limitées, il devient donc nécessaire de trouver des systèmes de substitution face aux tests de validation à réaliser (absorption percutanée, étude de risques toxicologiques, développement des médicaments, étude de sûreté pour les produits cosmétiques) tels que des peaux animales (rat et porc en particulier), ou des modèles

d'épiderme reconstruit à partir de cultures de kératinocytes et des mélanocytes. L'utilisation de ces échantillons de peau reconstruite a été approuvée par le document réglementaire n° 28 de l' OECD (Organization for Economic Co-operation and Development) (OECD 2003).

Les premiers modèles d'épiderme reconstruit sont apparus en 1983 (Bell et al. 1983; Prunieras et al. 1983), et les premiers kits commercialisés en 1990. Leur utilisation a été approuvée par l'OECD en 2004 pour des tests de corrosivité sur la peau (OECD 2004c). Depuis, différents modèles de peau reconstruite ont été étudiés (Portes et al. 2002; Rehder et al. 2004; Françoise 2005; Schreiber et al. 2005; Martinhao Souto et al. 2006). Ces peaux synthétiques ont été caractérisées et comparées par différentes techniques à la peau naturelle : peau humaine excisée (Lotte et al. 2002; Ponec et al. 2002).

Dans le but d'évaluer le potentiel de la spectroscopie Raman pour des études sur des échantillons de peau reconstruite, nous avons cherché, dans la **deuxième partie** de ce chapitre (Article 4), à établir une **caractérisation spectrale d'un modèle d'épiderme synthétique**, **Episkin®**, reconstruit à partir d'une culture de kératinocytes sur une matrice de collagène de type I. Nous nous sommes intéressés aux **différences spectrales entre la signature de l'Episkin® et celle de l'épiderme humain issu d'une peau excisée**. Une étude portant sur le **suivi de la pénétration du Métronidazole dans la peau reconstruite** a été également menée.

La microspectroscopie Raman confocale résulte du couplage entre un spectromètre Raman et un microscope confocal. Le rôle du trou confocal est d'éliminer le signal provenant des plans inférieurs et supérieurs au plan de focalisation. Ce qui permet, dans le cas d'échantillons transparents au rayonnement, une analyse en profondeur des structures (optical sectioning = tranchage optique) (Figure Ch.III.01).

En théorie, selon Juang et al (Juang et al. 1988), la résolution axiale limite RL, dans un milieu homogène donc sans changement d'indice de réfraction, est donnée par l'équation suivante :

$$RL = \frac{2.2\pi\lambda}{n(ON)^2} \quad (\text{Equ.Ch.III.01})$$

Où λ est la longueur d'onde du laser incident, ON l'ouverture numérique de l'objectif et n l'indice de réfraction du milieu

A partir de cette équation on peut accéder à une résolution limite de l'ordre du micromètre.

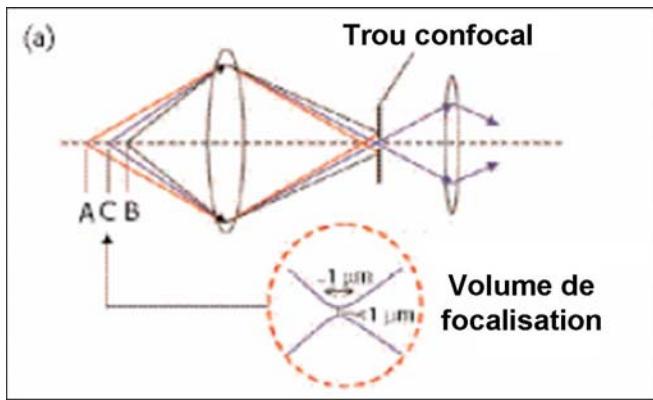


Figure Ch.III.01 : Représentation schématique de l'effet du trou confocal. En bloquant le passage des faisceaux provenant des points A et B, il permet d'améliorer la résolution axiale en limitant le signal provenant du point de focalisation C

L'équation (Equ.Ch.III.01) représentée ci-dessus est valable uniquement dans le cas des milieux homogènes. Elle n'est pas applicable pour des systèmes présentant des interfaces avec des sauts d'indice de réfraction. Le changement d'indice induit une déviation du faisceau lumineux (lois de Descartes) et par conséquent un déplacement du spot de focalisation de l'objectif au niveau de l'échantillon (Figure.Ch.III.02). Ce changement induit non seulement une variation de la résolution axiale, mais également une estimation erronée de la profondeur de la mesure (Everall 2000b; Everall 2000a; Everall 2004).

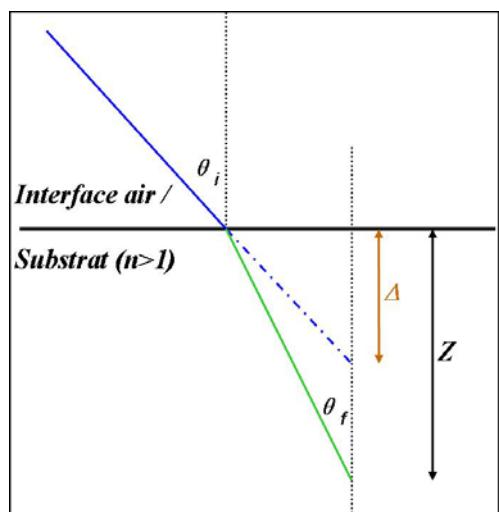


Figure Ch.III.02. Déviation de la lumière suite au changement d'indice de réfraction

Δ : déplacement axial de l'objectif du microscope

Z : déplacement du plan de focalisation

θ_i : angle d'incidence

θ_f : angle de réfraction

$$Z / \Delta = \tan \theta_i / \tan \theta_f$$

Si θ_i tend vers zéro, Z/Δ tend vers n et plus θ_i augmente, Z/Δ augmente.

Dans une dernière partie (Article 5), des modèles mathématiques ont été utilisés pour corriger ces effets de réfraction au niveau des rayons lumineux (laser et effet Raman). Ce qui permet d'accéder à une meilleure estimation de la résolution axiale et de la profondeur de mesure. Des mesures confocales suivant l'axe Z ont été menées sur des coupes de peau

d'épaisseurs connues et des films de polyéthylène téréphthalate (PET), déposés sur des plaques de silicium et des fenêtres de CaF₂. Ces mesures ont permis de valider les modèles théoriques, qui ont été appliqués pour corriger les profils de pénétration expérimentaux du Métronidazole.

Ch.III.2 : Matériels et méthodes

Un morceau de peau entière (Biopredic international, Rennes, France) de 1,5x1,5 cm² de surface est posé sur une cellule de Franz (Figure.Ch.III.03.a), la peau est fixée sur la cellule par "couture en peau de tambour" et au moyen de rondelles (Figure. .Ch.III.03.a , b). La partie interne de la cellule de Franz est remplie de tampon PBS avec du Tensioactif, solution qui reste en contact avec la peau. La température de la peau est maintenue à 37° C grâce à un système de circulation d'eau thermostatée (Figure.Ch.III.03.c). Ce montage permet de maintenir la peau dans des conditions de viabilités pendant plusieurs heures.

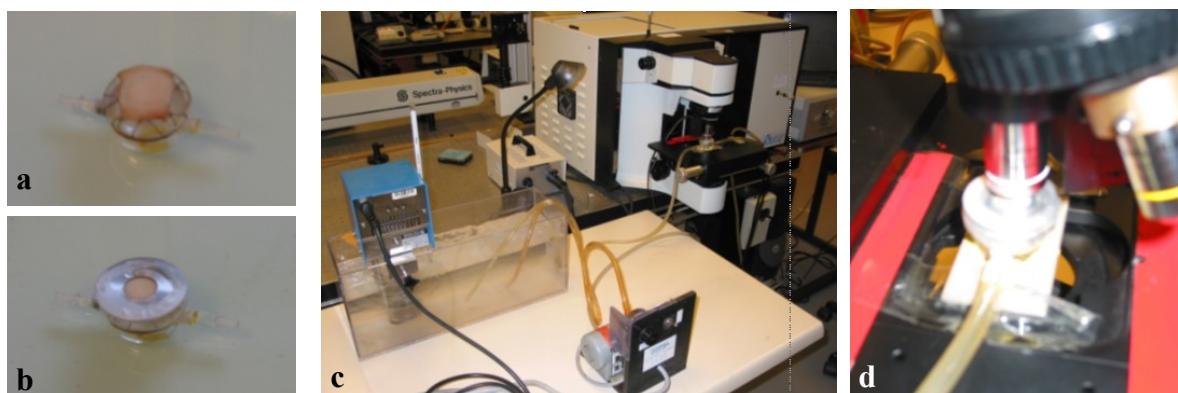


Figure.Ch.III.03. a, b : Peau fixée sur la cellule de Franz par "couture en peau de tambour"
c: Système de thermostat (37° C). d : La cellule sous l'objectif du microspectromètre.

Pour l'acquisition des spectres Raman, la cellule de Franz est montée sur la platine du microspectromètre (Figure.Ch.III.03.d). Pour les tests de pénétration, une goutte de la solution de principe actif est déposée à la surface de la peau, et des profils en Z sont réalisés, par déplacement de l'objectif selon l'axe optique avec un pas de 4µm au moyen d'un système piezoélectrique. Les mesures sont enregistrées de -10µm jusqu'à +40 µm, la surface de la peau étant à zéro. Chaque profil comprend 16 spectres. Le temps d'acquisition de chaque spectre est de 30 secondes avec 2 accumulations par spectre, l'ouverture confocale est réglée à 150 µm.

Ch.III.3 – Suivi de pénétration du Métronidazole à travers la peau excisée par microspectroscopie Raman confocale

Article 3: Follow-up of drug permeation through excised human skin with confocal Raman microscopy

Contexte

La spectroscopie Raman est une technique d'analyse non destructive qui permet d'identifier les constituants moléculaires d'un échantillon et de caractériser leur structures et agencements au sein de l'échantillon. Cette technique est utilisée pour le diagnostic et la caractérisation de différents types de cancer.

De par son accessibilité, la peau présente un système d'investigation intéressant en spectroscopie. Le couplage d'un système Raman avec un système confocal donne la possibilité de réaliser du "tranchage optique" en analysant des volumes de quelques μm^3 .

L'objectif de ce travail est d'identifier la signature spectrale d'un principe actif, le Métronidazole (principe actif produit par Galderma), et de déterminer ses propriétés de diffusion dans les couches de la peau.

Matériels et Méthodes

Des blocs de peau humaine excisée provenant de la chirurgie plastique ont été déposés sur des cellules de diffusion, le principe actif a été ensuite déposé à la surface de la peau. Des mesures Raman confocales ont été réalisées en déplaçant par pas régulier l'objectif du microscope en Z. La peau a ensuite été congelée pour réaliser des coupes transversales de façon à enregistrer des images spectrales en deux dimensions selon X et Y.

Résultats

Les résultats de cet article apparaissent selon cet ordre :

- Détermination de la signature spectrale Raman du Métronidazole
- Profils de pénétration du principe actif dans la peau
- Imagerie spectrale sur des coupes transversales pour les profils de pénétration
- Effet du Métronidazole au niveau des constituants cutanés

Conclusion

L'utilisation de la microspectroscopie Raman confocale permet non seulement de suivre la diffusion des molécules exogènes à travers les couches cutanées, mais aussi de mettre en évidence des changements moléculaires au niveau des constituants cutanés résultant d'interactions entre les molécules exogènes et la peau. L'information peut être obtenue *in-situ*, sans aucune préparation préalable. Ce qui permet donc un développement *in-vivo* de cette technique.

Follow-up of drug permeation through excised human skin with confocal Raman microspectroscopy

Ali Tfayli · Olivier Piot · Franck Pitre · Michel Manfait

Received: 12 February 2007 / Revised: 9 May 2007 / Accepted: 15 May 2007
© EBSA 2007

Abstract

Skin is a multilayered organ which covers and protects the surface of human body by providing a barrier function against exogenous agents.

Meanwhile, the efficacy of several topically applied drugs is directly related to their penetration through the skin barrier.

Several techniques are commonly used to evaluate the rate, the speed and the depth of penetration of these drugs, but few of them can provide real-time results. Therefore, the use of nondestructive and structurally informative techniques permits a real breakthrough in the investigations on skin penetration at a microscopic scale.

Confocal Raman microspectroscopy is a nondestructive and rapid technique which allows information to be obtained from deep layers under the skin surface, giving the possibility of a real-time tracking of the drug in the skin layers. The specific Raman signature of the drug enables its identification in the skin.

In this study, we try to follow the penetration of Metronidazole, a drug produced by Galderma as a therapeutic agent for Rosacea treatment, through the skin. The first step was the spectral characterization of Metronidazole in the skin. Then micro-axial profiles were conducted to follow the penetration of the drug in the superficial layers, on excised human skin specimens. For more accurate information, transverse sections were cut from the skin and spectral images were conducted, giving information down to several millimeters deep.

Moreover, the collected spectra permit us to follow the structural modifications, induced by the Metronidazole on the skin, by studying the changes in the spectral signature of the skin constituents.

Keywords: confocal Raman microspectroscopy, drug penetration, Metronidazole, skin.

Introduction

Transdermal drug delivery systems have been increasingly used in the past 20 years, the cutaneous application of drugs offers obvious advantages such as: avoidance of the hepatic first-pass metabolic effect which is a serious consequence of oral administration, zero order absorption for local cure in case of skin pathologies, controlled drug release, non invasive drug delivery, and improved patient compliance (Barry 1987; Fujiwara et al. 2005; Song et al. 2005; Wagner et al. 2001).

The skin is a multilayered biomembrane with particular absorption characteristics. It is a dynamic, living tissue, and the process by which a drug is transported across the skin is a complex process. The absorption is influenced by many factors e.g. physicochemical properties of the drug, vehicle, occlusion, concentration, exposure pattern, skin site on the body, etc... (EC 2002). Reproducible data and an exact knowledge of the local distribution of a drug topically applied to the skin are decisive prerequisites to understand and optimize the mode of action of drugs, particularly in dermatopharmacokinetics (EC 2002; van de Sandt et al. 2004; Weigmann et al. 2005).

In this perspective, recent changes in European Union policy encourage the use of *in-vitro* methods and the use of excised human skin has been adopted by the “Guideline test” 428 of the OECD (Organization for Economic Co-operation and Development) (OECD 2004a). This approach offers the possibility to perform several replicate measurements from the same or a number of different subjects, and avoids ethical problems.

In fact, several techniques are used for evaluating drug delivery and diffusion into the skin and skin structures. A wide-spread method is diffusion cells, in which, the excised skin is mounted on the cell, and the drug preparation is applied to the surface of the skin. The underside of the skin is in contact with a receptor fluid. The diffusion of the drug through the skin is evaluated by measuring its concentration in the receptor fluid after a given time of diffusion (generally several hours) (Khan et al. 2005; van de Sandt et al. 2004; Wagner et al. 2001). This method lacks accuracy and can not be used for drugs whose penetration is limited to the outermost layers (stratum corneum) of the skin.

Another widely used technique is “tape-stripping” which consists of removing the stratum corneum step-by-step with an adhesive tape (Kalia et al. 1998; Rawlings et al. 1994; Weigmann et al. 2005). This method is destructive and lacks spatial resolution.

Recently, biophysical techniques like Electron Microscopy (EM) (Hofland et al. 1995), Small Angle X-ray Scattering technique (SAXS) (Bouwstra et al. 1991), Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) (Grams et al. 2004a; Grams et al. 2004b; Veiro and Cummins 1994), and Two Photon Microscopy (TPFM) (Yu et al. 2003), have provided invaluable information about the speed and depth of penetration and the interaction of exogenous molecules and substances with the skin. The advantage of these methods is the high resolution that can be achieved; however, they do not provide molecular nor structural information.

Vibrational spectroscopy presents the advantage of providing molecular information directly from the skin. Infrared spectroscopy (IR) has been used to study the stratum corneum hydration and permeability (Potts et al. 1985), and more recently, for tracking lipid permeation into skin (Mendelsohn et al. 2006; Xiao et al. 2005b).

Raman spectroscopy is a powerful laser spectroscopic technique that detects, like IR spectroscopy, the characteristic vibrational energy levels of a molecule. When light irradiates a molecule, most of the photons are scattered elastically. This elastically scattered light, which has the same frequency as the incident light, is termed Rayleigh scattering. A small amount of light, however, is scattered inelastically. The inelastically scattered light, termed Raman (Stokes and anti-Stokes) scattering, exhibits frequency shifts with respect to the incident light. These shifts correspond exactly to the vibrational energy transitions of the molecule. They can be analyzed by an optical dispersive system to be represented as spectra. The Raman spectrum can be considered as a spectral fingerprint of the molecule (Koningsten 1971). The additional advantage of Raman spectroscopy compared to IR is its ability to provide confocal information presenting the possibility of *in-vivo* analysis and, for example here, a real-time evaluation of drug permeation mechanisms.

Several works have used confocal Raman spectroscopy to study the skin and skin hydration by assessing water concentrations and the effects of moisturizing factors (Caspers et al. 2001; Caspers et al. 2003; Chrit et al. 2005; Sieg et al. 2006). Temporal and spatial variations of the penetration-enhancer DMSO in the stratum corneum were also studied (Caspers et al. 2002). More recently, Xiao et al. used the same technique for tracking phospholipids permeation into the skin (Xiao et al. 2004; Xiao et al. 2005a; Xiao et al. 2005b).

In this work, we attempt to follow-up the penetration of Metronidazole, a drug produced by Galderma (Sophia Antipolis, France) as a therapeutic agent for Rosacea treatment. Rosacea is common but still misunderstood skin disorder affecting middle-aged and older adults. It is estimated to affect 45 million people worldwide. Often called "adult

"acne" but potentially far more serious. Rosacea primarily affects the skin of the face and typically first appears as a transient flushing or blushing on the nose, cheeks, chin or forehead, and is usually discovered at its early and mildest stages.

Metronidazole is a molecule used for the treatment of Rosacea. Its mechanism of action is unclear, it is poorly absorbed after topical application and is shown to have an anti-inflammatory effect in Rosacea (Zip 2006).

In our study, the first step was to determine the spectral signature of Metronidazole in its solid and liquid form dissolved in a Transcutol solution. After the determination of spectral features which will be used to detect the Metronidazole-Transcutol solution, the drug solution was deposited on the skin surface and axial Z profiles were recorded to follow-up its penetration. The Z profiles consist of an in-depth scanning with a given increment through the skin. Afterwards, the skin was then frozen and cut into thin transverse slices in order to perform Raman imaging complementing the confocal experiments. In a final step, we investigated the effect of the Metronidazole on the skin molecular constituents by studying the spectral changes at the level of certain vibrations, specific for the lipid or protein content.

Materials and methods

Excised human skin:

Full thickness human skin (Biopredic International, Rennes, France), obtained from plastic surgery around the abdomen, was used. The skin was stored at -80°C until the date of the study.

For confocal Raman analysis, a 1.5x1.5 cm² square of skin were cut. The underside of the skin was plunged in a PBS medium (Invitrogen, UK) to maintain the hydration of the skin, and the epidermis was exposed to the air. Each spectral recording was 10 minutes long. Details about spectral acquisition are presented in the instrumentation paragraph.

Once the in-depth confocal measurement was performed, the skin was cryo-fixed and 20 µm transverse sections were cut by cryo-microtome, and deposited on CaF₂ slides. These slides are optimized for Raman spectroscopy, they do not give rise to any signal in the spectral region (620 – 1810 cm⁻¹) of interest.

Spectral images were obtained using a 5 µm step in X and Y lateral directions. The acquisition protocol is detailed in the instrumentation section.

Metronidazole solution:

The Metronidazole is a drug marketed by Galderma (Sophia Antipolis, France) for Rosacea treatment. It mainly acts against pathogenic cutaneous anaerobic bacteria suspected to be the cause of the disease. For our analysis, 18 µg of Metronidazole were dissolved in 1 ml of Transcutol (Diethylene Glycol Monoethyl). Spectra of pure Metronidazole in the solid state, Transcutol and Metronidazole dissolved in Transcutol (Gattefossé, France), were measured to identify the vibrational peaks of the molecule and the solvent.

To study the penetration of the solution through the excised human skin, 20 µl of the solution were deposited on the skin surface, the time of diffusion was 1 hour for the first sample and 2 hours for the second, for each test, we analyzed an untreated skin sample as a blank test. The same analysis was repeated four times. After the diffusion period, the skin surface was cleaned with a dry cotton swab, before that axial Z profiles were recorded. The Z profiles consist of an in-depth scanning through the skin. Raman spectra were collected at different focus points, from -10 µm (above the skin surface) to 40 µm (under the skin surface) with a 4 µm step.

Instrumentation, Raman spectrometer

Raman spectral acquisitions were performed with a Labram microspectrometer (Horiba Jobin Yvon, Lille France). The excitation source was a titanium sapphire laser (Spectra Physics) generating single mode laser light at 785 nm. Such a wavelength allows a good penetration of the light deeply into the skin, minimizes parasite fluorescence and does not cause any photochemical or thermal degradation. The power of the laser beam focalized on the sample was measured and maintained at 50 mW; which is non-destructive for biological samples.

The microspectrometer is equipped with an Olympus microscope and all measurements were recorded using a 100X objective (NA= 0.9). The nominal spot size at the sample was assessed to be 4 µm. To obtain Z profiles, the objective was mounted on a high precision piezoelectric focusing drive which allows vertical movements with a minimal step of 50 nm.

Light scattered by the tissue is collected through the same objective. Rayleigh elastic scattering is intercepted by a Notch filter which reduces its intensity by a 10^6 factor. A confocal pinhole rejects signals from out-of-focus regions in the sample. A multichannel CCD detector (Coupled Charge Device) (1024 x 256 pixels) detects the Raman Stokes signal dispersed with a 4 cm^{-1} spectral resolution by a holographic grating (950 grooves/mm). The

spectral range was from 620 to 1810 cm^{-1} , the acquisition time of each spectrum was 2 times 10 seconds and the confocal pinhole was adjusted to 150 μm .

Spectral acquisition and pre-processing were performed using LabSpec software (Horiba Jobin Yvon, Lille, France).

To reduce the influence of the instrument response in the spectra, firstly, we corrected the collected signal by subtracting the black current signal (the signal collected on the CCD detector with the laser switched off). Secondly, the detector response was corrected by dividing spectra by the black body (white light) signal. Finally, the CaF_2 and/or the optical system signals were subtracted.

All spectra were smoothed using a 5 points average smoothing, and baseline corrected using an automatic polynomial function. For spectral image treatment, the set of spectra were vector normalized on the whole spectral range.

Results:

Spectral signature of Metronidazole:

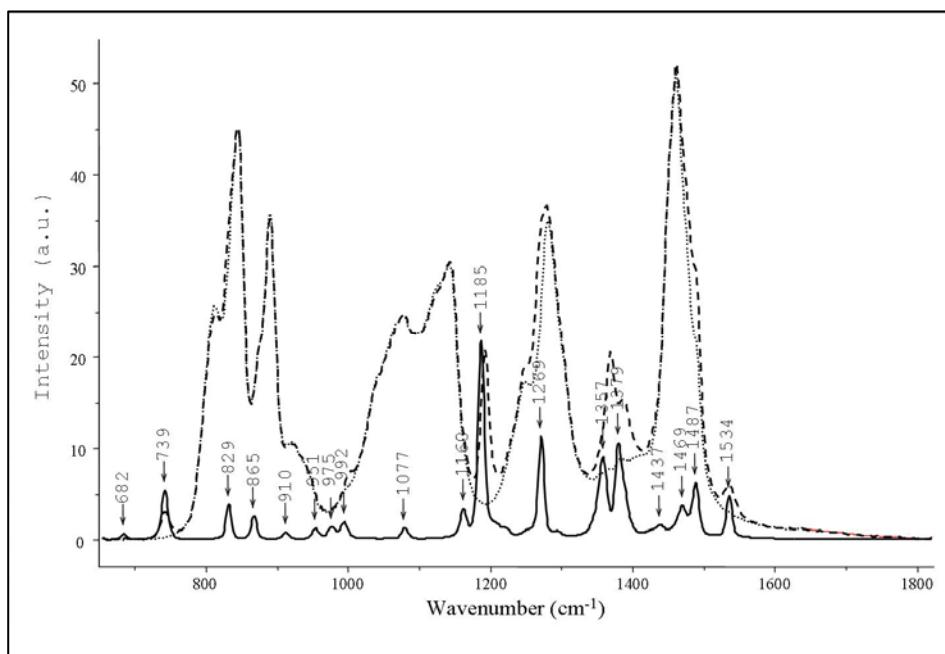


Figure 01: Comparison between spectra of Metronidazole in its solid state (full line), Metronidazole solution in Transcutol (dashed line), and Transcutol (dotted line). Three vibrational peaks (1191 and 1368 cm^{-1}) were selected to be used as Metronidazole markers in the skin.

Table 01: assignment of Metronidazole vibrations

Raman shift (cm^{-1})		
Metronidazole in solid state	Metronidazole solution	Assignment
681	684	
739	739	CH_2 rock (VPL)
829	buried in the Transcutol signal	Ring breathing (Tsuboi et al. 1998)
865	buried in the Transcutol signal	CH_3 rock, $\gamma_t \text{CH}_2$ (VPL)
910	buried in the Transcutol signal	$\gamma_w \text{CH}_2$ (Parker 1983) CH_2 rocking (VPL)
951	buried in the Transcutol signal	$\delta \text{ OH}$
972	buried in the Transcutol signal	
992	Shoulder at 1004	CH out of plane bend, ν ring (VPL)
1077	buried in the Transcutol signal	CH (Frost 2004)
1160	buried in the Transcutol signal	$\nu \text{C-C}$ (Schulte et al. 1995) CH (VPL) νCH_2 (Parker 1983)
1185	1191	559 + 646 (Frost 2004; Schulte et al. 1995) $\nu \text{C-N}$ (Parker 1983)
1269	buried in the Transcutol signal	N-O (VPL)
1357	1368	$\nu \text{C-N}$ (aromatic) (Parker 1983; VPL)
1379	1392	CH_2 scissor (Schulte et al. 1995) δCH_3 (Sett et al. 2000)
1436	buried in the Transcutol signal	δCH_3 , CH_2 scissor, C-O (VPL)
1469	buried in the Transcutol signal	CO (Frost 2004) δ asym. CH_3 (Sett et al. 2000)
1487	Shoulder	ν and δ of Ring (VPL) CO (Frost 2004)
1534	1534	C=C

ν stretching γ_w wagging γ_t twisting δ deformation

The first part of our study consisted of establishing spectral signatures specific for the Metronidazole and for the Metronidazole solution in the Transcutol (figure 1 and table 1). This enabled us to determine the most pertinent spectral features to detect the drug on the skin. Given that the quantity of remaining drug on and/or in the skin was very small, it was evident that the signal for Metronidazole is very weak in intensity compared to the skin signal.

Therefore, it was crucial to find some vibrations of the Metronidazole in spectral regions where the skin does not present any Raman signal. Figure 1 and the comparison with skin spectrum (data not shown) enabled us to select two vibration bands located at 1191 and 1368 cm^{-1} which can be used as markers for the drug.

Confocal Raman line maps:

Although the acquisition time for each spectrum of confocal in depth profiles was limited to only 10 seconds, the quality of the obtained spectra is relatively good. Figure 2 shows a spectrum collected at a depth of 10 μm under the skin surface, spectral features arising from both the skin and the Metronidazole - Transcutol solution are clearly observed. For example, the 841 cm^{-1} and the 887 cm^{-1} bands correspond to the Metronidazole in Transcutol.

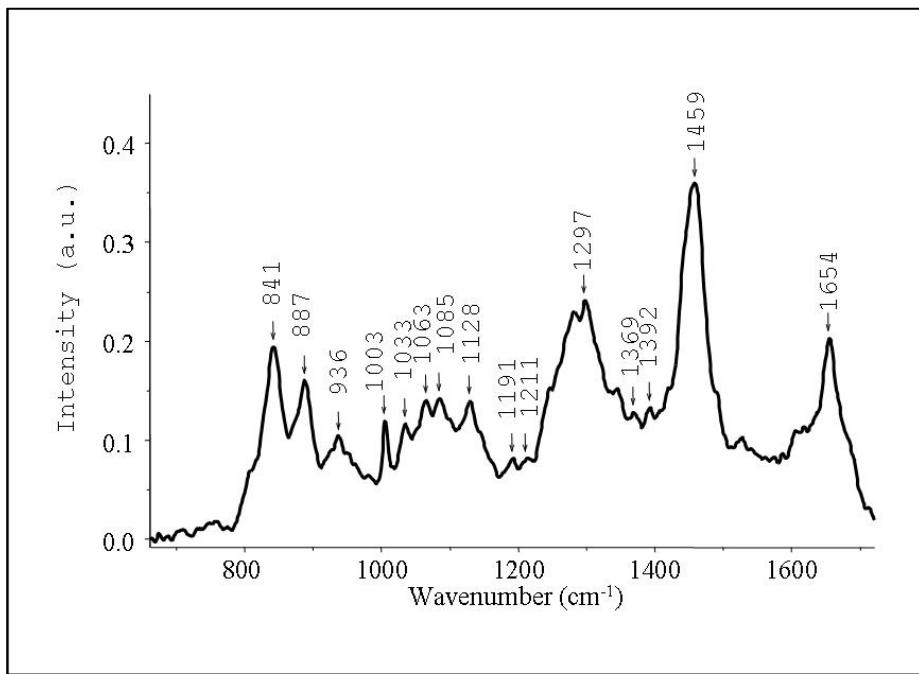


Figure 02: Spectrum of Metronidazole solution in the skin.

Endogenous lipids of the skin can be identified by the 936 cm^{-1} and 1297 cm^{-1} bands, corresponding respectively to the phospholipids and the ceramides. Spectral features arising from lipid conformation in the skin clearly appear at 1063 cm^{-1} (hydrocarbon chain, *trans* conformation), and at 1085 and 1128 cm^{-1} (hydrocarbon chain, *gauche* conformation). The Raman CH deformation signal associated with lipids and proteins is present at 1459 cm^{-1} (Parker 1983).

Protein content of the skin can be visualized by the Amide I and Amide III bands and several other weaker vibrations. Other features of current interest are the sharp phenylalanine-ring breathing vibration around 1003 cm^{-1} , suitable for studying the protein content of the skin.

For this study, the most important features are the 1191 and 1369 cm^{-1} ($\nu\text{ C-N}$) stretching vibrations of the Metronidazole solution. The relative intensity of these bands, with respect of the skin protein bands intensities, indicates the relative concentration of Metronidazole, and the variation in their intensities reveals the deposition of the drug at different depths.

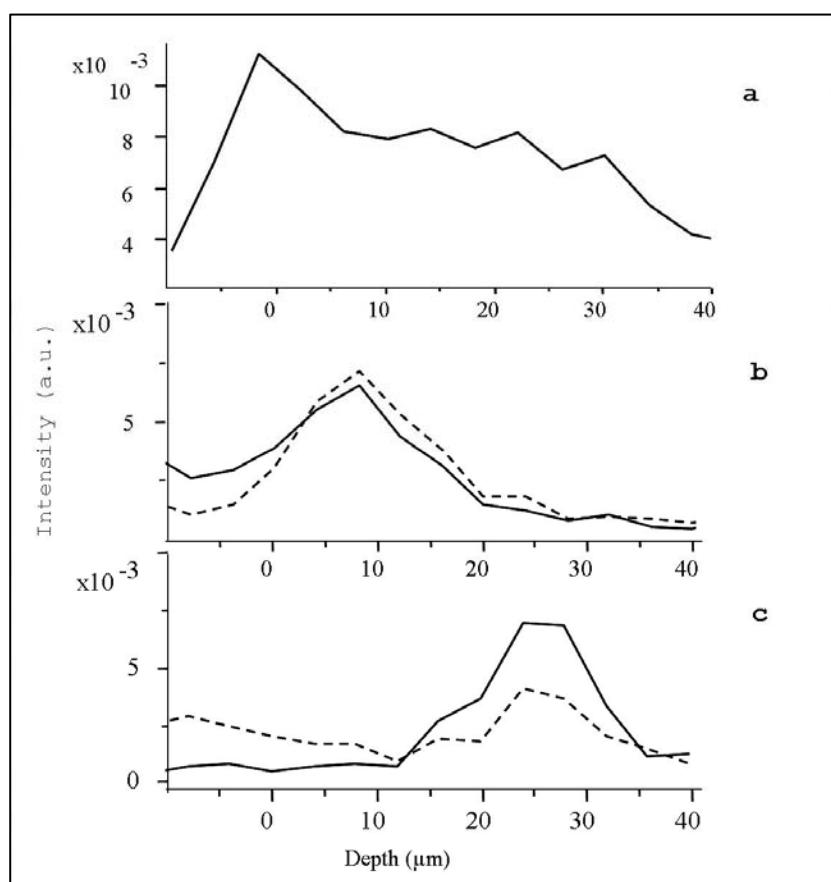


Figure 03: (a) Confocal line map following the phenylalanine intensity variation through the skin. (b) Confocal line maps following the intensity of the bands at 1191 cm^{-1} (full line) and 1369 cm^{-1} (dashed line), 1 hour after topical application of the Metronidazole solution on the skin surface. (c) Confocal line maps following the intensity of the bands at 1191 cm^{-1} (full line) and 1369 cm^{-1} (dashed line), 2 hours after topical application of the Metronidazole solution on the skin surface.

To evaluate the Metronidazole penetration, we needed to determine the exact position of the skin/air interface (depth=0). For this, the zero position was determined by focusing the laser spot on the skin surface. Moreover, a Raman-based feature (phenylalanine of the skin at 1003 cm^{-1}) was used to verify the skin/air interface position; the confocal line map, shown in figure 3a, follows the phenylalanine intensity profile from $-10\text{ }\mu\text{m}$ to $40\text{ }\mu\text{m}$. And it appears that the phenylalanine intensity increases from $-10\text{ }\mu\text{m}$ to $-2\mu\text{m}$ and then starts to decrease progressively until $40\text{ }\mu\text{m}$. Since the spectra are not normalised, the absolute intensity normally decreases with the depth and the higher intensity is obtained on the surface. This confirmed to us that the skin/air interface is precisely at $-2\mu\text{m}$. The phenylalanine signal detected on the spectra from -10 to $-2\text{ }\mu\text{m}$ (i.e. in the air) is due to the contribution of the skin surface.

The phenylalanine profile is compared with confocal line maps of the Metronidazole permeation, one hour (figure 3b) and two hours (figure 3c) after the topical application of the solution on the skin. This comparison gives semi-quantitative information about the drug deposition into the skin.

After one hour diffusion, the Metronidazole is present under the skin surface and is detected down to $20\text{ }\mu\text{m}$. One hour later, the Metronidazole is mainly detected between 14 and $34\text{ }\mu\text{m}$.

The difference of the refractive index between the air and the skin, but also between the different skin layers, induce a deviation of the light beam; which gives an incorrect estimate of the depth value. This problem was studied and described by many groups (Baldwin and Batchelder 2001; Bruneel et al. 2002; Everall 2000a; Everall 2000b; Everall 2004a, 2004b), and a recent study by Xiao et al., using multilayered systems constituted with polymer films with refractive indexes close to those of the human skin, showed that the error in the measurement lead to an underestimation of the depth value of 15 to 20 % (Xiao et al. 2004). Therefore, in the one hour confocal line map the Metronidazole is more likely to be present down to $23\text{-}24\text{ }\mu\text{m}$ rather than $20\text{ }\mu\text{m}$. Similarly, in the two hour confocal line map, it is more likely to be present between 15 and $40\text{ }\mu\text{m}$ rather than 14 and $34\text{ }\mu\text{m}$.

Figure 4 shows a series of 14 Raman spectra of Metronidazole in the skin, measured with a $4\text{ }\mu\text{m}$ increment from $-10\text{ }\mu\text{m}$ down to $40\text{ }\mu\text{m}$ under the surface (following the direction of the black arrow). These spectra were extracted from the 2 hour line map. As the absolute intensity of spectra decreases with the depth, all spectra of this figure were vector normalized on the whole spectral range for a better visualisation. The spectra quality is still good even at

depth, and different spectral features can still be identified. Several spectral variations can be distinguished, especially at 840 and 870 cm^{-1} , in the deeper spectra; these changes are due to the presence of Metronidazole-Transcutol solution. These bands mask the signal of the tyrosine Fermi doublet of the endogenous skin protein at 830 - 850 cm^{-1} ; and the tryptophan vibration at 883 cm^{-1} . Other spectral differences can be seen at 1191 and 1369 cm^{-1} assigned to the stretching C-N vibrations of Metronidazole.

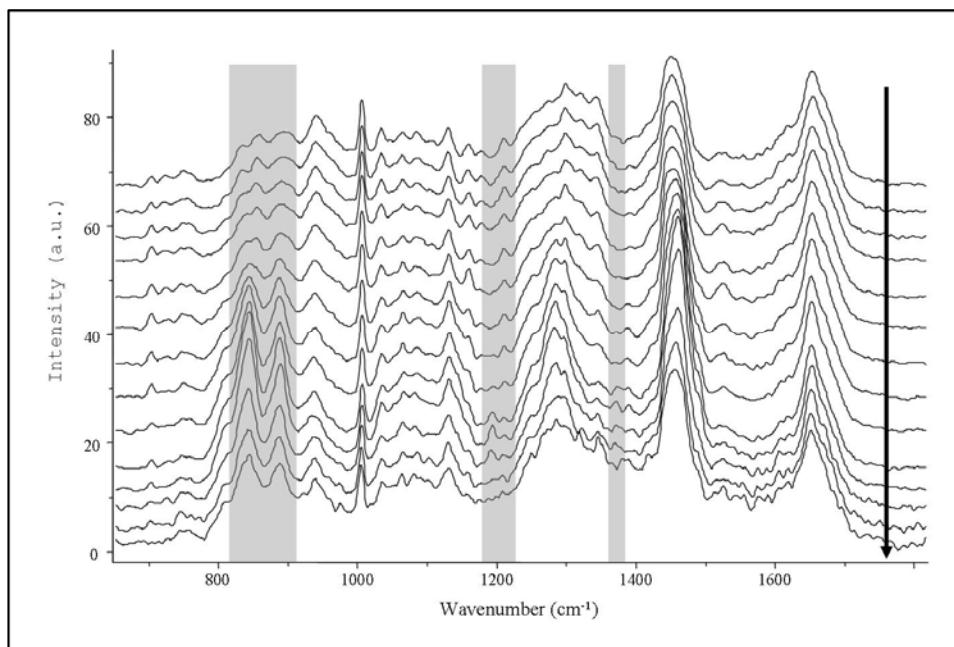


Figure 04: Raman spectra from the 2 hours line map showing the repartition of the Metronidazole in the skin.

Figure 4 shows also the evolution of relative intensities of the 1191 cm^{-1} band of the drug and of the 1211 cm^{-1} band of the skin (phenylalanine, tryptophan and tyrosine). At the surface, the 1211 cm^{-1} band is more intense than 1191 cm^{-1} band. The deeper we progress into the skin, then the less intense is the 1211 cm^{-1} feature and the higher is the intensity of the drug feature, especially between 16 and $40\text{ }\mu\text{m}$ (14 to $34\text{ }\mu\text{m}$ on the measuring scale).

Spectral imaging:

To evaluate uncertainties in the confocal line map measurement induced by the difference in the refractive index between the air and the skin, skin samples were frozen and $20\text{ }\mu\text{m}$ thin slices were cut and deposited on CaF_2 slides. Spectral Raman images were then obtained. In figure 05, the image represents a section of skin one hour after topical application of the Metronidazole solution. Figure 5b displays the variation of the integrated intensity of the 1191

cm^{-1} Metronidazole vibration. A hair follicle is clearly seen, located perpendicular to the air/skin interface in this image. The reconstructed spectral image permits us to see that the Metronidazole is present down to 40-45 μm in the hair follicle, and to 25 μm for the stratum corneum. This is in agreement with the results obtained from confocal line map.

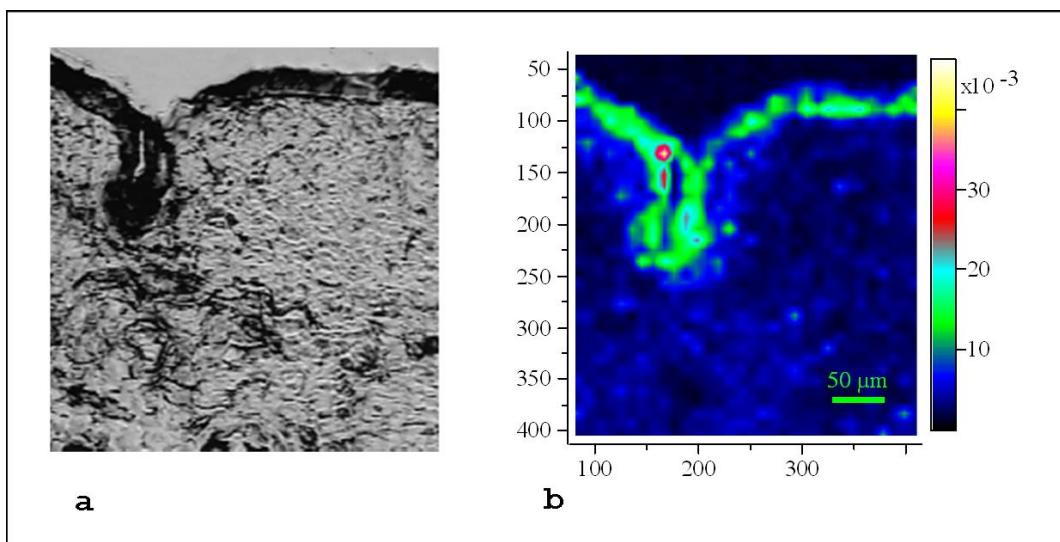


Figure 05: (a) White light image. (b) Spectral image reconstructed on the integrated intensity of the 1191 cm^{-1} feature.

Effect of the Metronidazole - Transcutol solution on the skin:

To inspect the effect of the Metronidazole - Transcutol solution on the skin structure, the spectra of in-depth profiles after two hours of permeation were compared with spectra of the reference skin (untreated skin maintained for two hours in similar conditions). In both cases the skin surface was cleaned with a dry cotton swab directly before the measurement. In figure 6, spectra from superficial layers (stratum corneum) of both samples are presented. The absence of the 1191 cm^{-1} feature indicates the absence of Metronidazole in the analyzed layers. Consequently, all spectral changes observed between the two specimens can be considered as a result of the effect of the drug on the skin constituents and not to the contribution of the drug in the skin signal.

No differences in the phenylalanine features are visible between the two models. This reveals that the protein content is similar in both samples. No variations were detected in the Amide I and Amide III bands which may lead us to conclude that there are no detectable changes in the protein secondary structure.

On the other hand, some changes are noted at 830 and 850 cm^{-1} vibrations. The $830/850$ ratio of Fermi doublet of tyrosine is greater for the skin treated with the drug solution

(figure 7a) than for the untreated sample. This doublet results from the Fermi resonance between the ring breathing vibration, and the overtone of the nonplanar ring vibration at 413 cm^{-1} . The intensity ratio I_{829}/I_{851} is related to the state of the phenolic hydroxyl group (Parker 1983). For both samples, the 851 cm^{-1} vibration is more intense which indicates that the phenolic OH group is an acceptor of hydrogen bonds; and that the tyrosyl residues are exposed and not "buried" within the protein. Such a configuration tends to form intermolecular bonds rather than intramolecular bonds.

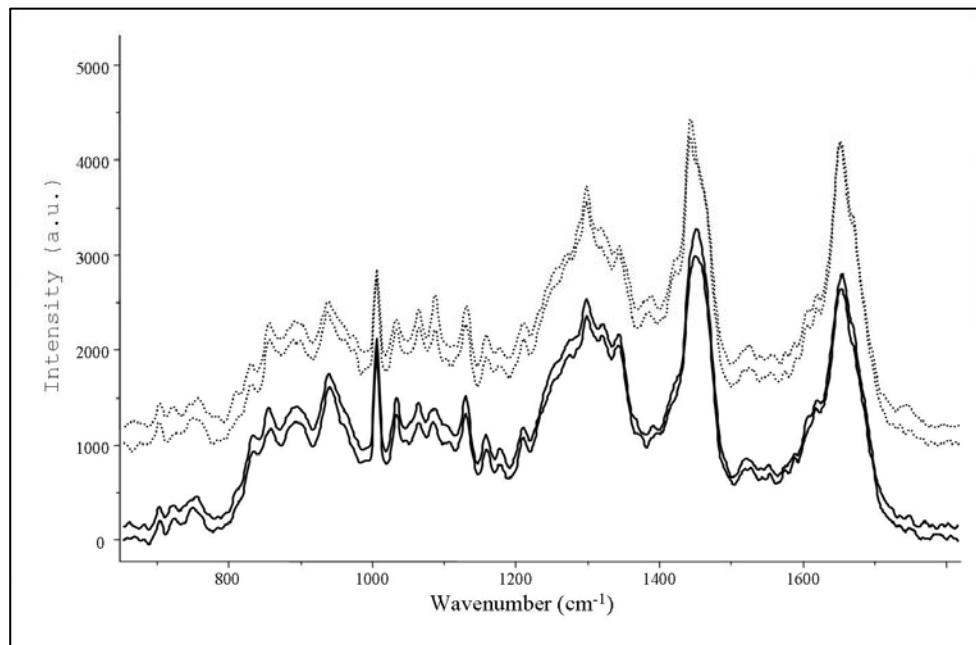


Figure 06: Series of spectra from skin treated with Metronidazole solution (full lines), and from untreated skin (dotted lines).

The 883 cm^{-1} vibration is also more intense when skin is treated with Metronidazole - Transcutol solution (figure 7a). This feature is assigned to the tryptophan; it is shifted in frequency (from 873 cm^{-1} to 883 cm^{-1}) when the residue is in aqueous liquid (Barry et al. 1992; Parker 1983; Piot 2000; Piot et al. 2000). The changes on the tyrosine and the tryptophan may be due to interactions between the solution and these residues.

Unlike the proteins, the endogenous lipid content and conformation are directly affected by the drug application. Figure 7a and figure 7b highlight the major changes induced by the Metronidazole - Transcutol solution. The 937 cm^{-1} vibration of lipids has a higher intensity on treated samples (figure 7a). Moreover, the CH deformation vibrations of lipids are clearly affected. This can be seen by the intensity of bands at 1382 and 1420 cm^{-1} (figure 6), these features remarkably are weaker for the treated skin. The frequency shift at the level

of the maximum of the CH deformation band (around 1450 cm^{-1}) confirms the involvement of the lipids. For the treated skin, the maximum is at 1452 cm^{-1} whereas for untreated samples it is at 1440 cm^{-1} (figure 7b).

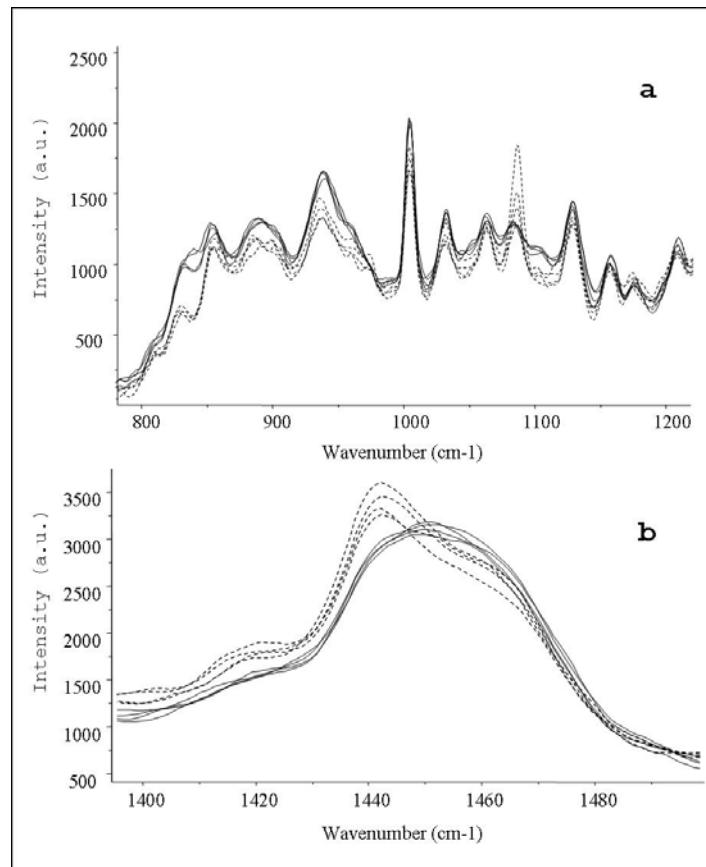


Figure 07: Comparison between spectra of untreated skin (dashed lines) and treated skin (full lines) in the $800-1220\text{ cm}^{-1}$ region (a) and the $1400-1490\text{ cm}^{-1}$ region (b).

The lipids present different conformations corresponding to different levels of organization. For example, the lipid fluidity increases with the decreasing number of the lateral bonds in the acyl chains, that is also associated with an increase of lipid disorganization (Gniadecka et al. 1998; Neubert et al. 1997; Wegener et al. 1997).

This fluidity and the intramolecular conformation can be studied by analysing the peak intensity in the $1000-1150\text{ cm}^{-1}$ region (Akhtar and Edwards 1997; Gniadecka et al. 1998; Lippert and Peticolas 1971; Neubert et al. 1997; Wegener et al. 1997).

In the crystalline state, all the chains have a *trans* conformation, revealed by the presence of the 1062 cm^{-1} and the 1127 cm^{-1} peaks. The lipids disorganization corresponds to a transition towards a *gauche* conformation, which is proved by the disappearance of the 1062 cm^{-1} and the 1127 cm^{-1} peaks simultaneously with the appearance of the 1086 cm^{-1} and the 1102 cm^{-1} peaks (Barry et al. 1992; Gniadecka et al. 1998; Neubert et al. 1997; Wegener et al. 1997).

In the both samples, the four features are present, but the treated skin presents weaker intensity for the 1084 cm^{-1} feature (figure 07a), which indicates a decrease in the organized conformations of the lipid content of the skin.

Discussion

The possibility of tracking exogenous molecules in the skin has been demonstrated by previous works (Caspers et al. 2002; Xiao et al. 2005a; Xiao et al. 2005b). In their studies Xiao et al. used deuterated phospholipids. Labelling molecules with deuterium facilitates their detection, since C-D bonds arise between 2000 and 2250 cm^{-1} . A spectral domain free of vibrations from biological structures. The deuteration results in a chemical modification that is likely to affect some interaction mechanisms between the skin and the molecule. Therefore, in our study, we used a non-modified drug, solubilized in Transcutol, a common organic solvent employed by the pharmaceutical industry for drug formulation.

Since the drug and the solvent, both, present vibrations in the $600\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$ region, it was very important to determine the pertinent spectral features that could be used as signature for the Metronidazole solution.

The 1191 cm^{-1} and the 1369 cm^{-1} features were selected despite their relative weak intensity compared to other features of the drug solution. These two vibrations appear at wavenumbers where the skin does not present any Raman signal. These features enables us to detect the drug in the skin despite the very small concentrations employed for topical application.

Confocal line maps enabled: firstly, us to determine the position of the skin/air interface using Raman-based parameters. This was achieved by following the phenylalanine ring breathing at 1003 cm^{-1} . Secondly, the Metronidazole penetration was determined by following the variation of the integrated intensity of the stretching C-N vibrations of the drug at 1191 and 1369 cm^{-1} . One hour after the application of the Metronidazole on the skin surface, it is detected at a depth of $23\text{-}24\text{ }\mu\text{m}$ and one hour later it has been observed between 16 and $40\text{ }\mu\text{m}$.

The uncertainties in the analysis depth, induced by the difference in the refractive index as described by previous works (Baldwin and Batchelder 2001; Bruneel et al. 2002; Everall 2000a; Everall 2000b; Everall 2004a, 2004b), were taken into account, and the measured value was considered to lead to an underestimation of the real depth by a factor of 15-20 %. Therefore, the measured values were corrected by adding a 15-20 % to each measurement. It is important to note that a high accuracy correction of the depth value is impossible. The estimated corrected value is considered as an approximation with a $2\text{ }\mu\text{m}$ margin of error.

The spectral imaging on the same samples, frozen directly after confocal measurements, enabled us to obtain more accurate values. The deposition of Metronidazole, after a one hour period of permeation, was found in the stratum corneum, around 25 µm from surface; which confirms the results obtained from the confocal maps. The permeation was greater for the hair follicle.

The series of Raman spectra extracted from the two hours line maps show that the signal of the Metronidazole-Transcutol solution is not detected at the level of the superficial layers. Therefore, the changes in the skin spectral features on these lines are due to the effect of the drug solution on the skin components. There is no contribution of the drug in the signal.

Several changes were detected due to the application of the Metronidazole-Transcutol solution on the skin, especially for tyrosine and tryptophan vibrations. But the most important changes were observed on the lipid vibrations, such as the vibrations associated to CH bonds at 1392, 1420 and 1445 cm⁻¹, and the lipid feature at 937 cm⁻¹.

The lipid conformation was also affected, as revealed by a decrease in the intensity of the 1084 cm⁻¹ features (hydrocarbon chain: *gauche* conformation). This corresponds to a decrease in the organisation of the lipid content of the skin.

As a conclusion, using confocal Raman spectroscopy for such analysis presents multiple advantages. First, it enables the detection and the follow-up of exogenous molecules, or the determination of concentration profiles for endogenous molecules. Second, it enables information to be obtained about structures under the skin surface at a micrometric resolution. Third, there is no need for any special preparation. It is not destructive for the skin, and it can be used for *in-vivo* measurements.

Finally, it gives direct structural information, and enables the changes in the skin to be monitored following the topical application of drug.

References

- Akhtar W, Edwards HG (1997) Fourier-transform Raman spectroscopy of mammalian and avian keratotic biopolymers. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 53A:81-90
- Baldwin KJ, Batchelder DN (2001) Confocal Raman Microspectroscopy through a Planar Interface. *Applied Spectroscopy* 55:517-524(8)
- Barry BW (1987) Mode of action of penetration enhancers in human skin. *Journal of Controlled Release* 6:85-97
- Barry BW, Edwards HGM, Williams AC (1992) Fourier transform Raman and infrared vibrational study of human skin: assignment of spectral bands. *Raman Spectroscopy* 23:641-645
- Bouwstra JA, de Vries MA, Gooris GS, Bras W, Brussee J, Ponec M (1991) Thermodynamic and structural aspects of the skin barrier. *Journal of Controlled Release* 15:209-219
- Bruneel JL, Lassègues JC, Sourisseau C (2002) In-depth analyses by confocal Raman microspectrometry: experimental features and modeling of the refraction effects. *Journal of Raman Spectroscopy* 33:815-828
- Caspers PJ, Lucassen GW, Carter EA, Bruining HA, Puppels GJ (2001) In vivo confocal Raman microspectroscopy of the skin: noninvasive determination of molecular concentration profiles. *J Invest Dermatol* 116:434-42
- Caspers PJ, Lucassen GW, Puppels GJ (2003) Combined in vivo confocal Raman spectroscopy and confocal microscopy of human skin. *Biophys J* 85:572-80
- Caspers PJ, Williams AC, Carter EA, Edwards HG, Barry BW, Bruining HA, Puppels GJ (2002) Monitoring the penetration enhancer dimethyl sulfoxide in human stratum corneum in vivo by confocal Raman spectroscopy. *Pharm Res* 19:1577-80
- Chrit L, Hadjur C, Morel S, Sockalingum G, Lebourdon G, Leroy F, Manfait M (2005) In vivo chemical investigation of human skin using a confocal Raman fiber optic microprobe. *J Biomed Opt* 10:44007
- Cohen AF, Tiemstra JD (2002) Diagnosis and Treatment of Rosacea. *JABFP* 15:214-217
- EC (2002) Health consumer protection directorate, Directorate E, Guidance document on dermal absorption, vol Sanco/222/2000 rev.6. European commission
- Everall NJ (2000a) Confocal Raman Microscopy: why the depth resolution and spatial accuracy can be much worse than you think. *J. Applied Spectroscopy* 50
- Everall NJ (2000b) Modeling and measuring the effect of refraction on the depth resolution of Confocal Raman Microscopy. *J. Applied Spectroscopy* 54
- Everall NJ (2004a) Depth profiling with confocal Raman Microscopy, Part I. *Spectroscopy* 19
- Everall NJ (2004b) Depth profiling with confocal Raman Microscopy, Part II. *Spectroscopy* 19
- Frost RL (2004) Raman spectroscopy of natural oxalates. *Analytica Chimica Acta* 517:207-214
- Fujiwara A, Hinokitani T, Goto K, Arai T (2005) Partial ablation of porcine stratum corneum by argon-fluoride excimer laser to enhance transdermal drug permeability. *Lasers Med Sci* 19:210-7
- Galderma <http://www.galderma.com/>. Galderma laboratories
- Gniadecka M, Faurskov Nielsen O, Christensen DH, Wulf HC (1998) Structure of water, proteins, and lipids in intact human skin, hair, and nail. *J Invest Dermatol* 110:393-8
- Grams YY, Whitehead L, Cornwell P, Bouwstra JA (2004a) On-line visualization of dye diffusion in fresh unfixed human skin. *Pharm Res* 21:851-9
- Grams YY, Whitehead L, Cornwell P, Bouwstra JA (2004b) Time and depth resolved visualisation of the diffusion of a lipophilic dye into the hair follicle of fresh unfixed human scalp skin. *Journal of Controlled Release* 98:367-378

- Hofland HE, Bouwstra JA, Bodde HE, Spies F, Junginger HE (1995) Interactions between liposomes and human stratum corneum in vitro: freeze fracture electron microscopical visualization and small angle X-ray scattering studies. *Br J Dermatol* 132:853-66
- Kalia YN, Pirot F, Potts RO, Guy RH (1998) Ion mobility across human stratum corneum in vivo. *J Pharm Sci* 87:1508-11
- Khan GM, Frum Y, Sarheed O, Eccleston GM, Meidan VM (2005) Assessment of drug permeability distributions in two different model skins. *International Journal of Pharmaceutics* 303:81-87
- koningsten JA (1971) introduction of the theory of the Raman effect. D. Reidel publishing
- Lippert JL, Peticolas WL (1971) Laser Raman investigation of the effect of cholesterol on conformational changes in dipalmitoyl lecithin multilayers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68:1572-6
- Mendelsohn R, Flach CR, Moore DJ (2006) Determination of molecular conformation and permeation in skin via IR spectroscopy, microscopy, and imaging. *Biochim Biophys Acta* 1758:923-33
- Neubert R, Rettig W, Wartewig S, Wegener M, Wienhold A (1997) Structure of stratum corneum lipids characterized by FT-Raman spectroscopy and DSC. II. Mixtures of ceramides and saturated fatty acids. *Chem Phys Lipids* 89:3-14
- OECD (2004a) Test Guideline 428: Skin absorption: in vitro method. Paris, France
- Parker F (1983) Applications of Infrared, Raman and Raman Resonance spectroscopy in biochemistry, New York
- Piot O (2000) Caractérisation par microspectroscopie Raman des espèces moléculaires responsables de la cohésion des grains de blé tendre Pharmacy, vol Doctor. University of Reims Champagne - Ardenne, Reims
- Piot O, Autran JC, Manfait M (2000) Spatial distribution of protein and phenolic constituents in wheat grain as probed by confocal Raman microspectroscopy. *Journal of Cereal Science* 32:57-71
- Potts RO, Guzek DB, Harris RR, McKie JE (1985) A noninvasive, in vivo technique to quantitatively measure water concentration of the stratum corneum using attenuated total-reflectance infrared spectroscopy. *Arch Dermatol Res* 277:489-95
- Rawlings AV, Scott IR, Harding CR, Bowser PA (1994) Stratum corneum moisturization at the molecular level. *J Invest Dermatol* 103:731-41
- Schulte A, Bradley L, Williams C (1995) Equilibrium Composition of Retinal Isomers in Dark-Adapted Bacteriorhodopsin and Effect of High Pressure Probed by Near-Infrared Raman Spectroscopy. *Applied Spectroscopy* 49:80-83(4)
- Sett P, Chattopadhyay S, Mallick PK (2000) Raman excitation profiles and excited state molecular configurations of three isomeric phenyl pyridines. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 56:855-75
- Sieg A, Crowther J, Blenkiron P, Marcott C, Matts PJ (2006) Confocal Raman microspectroscopy - Measuring the effects of topical moisturisers on stratum corneum water gradients in vivo. In: Mahadevan-Jansen A, Petrich WH (eds) The international society of optical engineering
- Song Y, Xiao C, Mendelsohn R, Zheng T, Strekowski L, Michniak B (2005) Investigation of iminosulfuranes as novel transdermal penetration enhancers: enhancement activity and cytotoxicity. *Pharm Res* 22:1918-25
- Tsuboi M, Ezaki Y, Aida M, Suzuki M, Yimit A, Ushizawa K, Ueda T (1998) Raman scattering tensors of tyrosine. *Biospectroscopy* 4:61-71
- van de Sandt JJM, van Burgsteden JA, Cage S, Carmichael PL, Dick I, Kenyon S, Korinth G, Larese F, Limasset JC, Maas WJM, Montomoli L, Nielsen JB, Payan JP, Robinson E, Sartorelli P, Schaller KH, Wilkinson SC, Williams FM (2004) In vitro predictions of

- skin absorption of caffeine, testosterone, and benzoic acid: a multi-centre comparison study. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 39:271-281
- Veiro JA, Cummins PG (1994) Imaging of skin epidermis from various origins using confocal laser scanning microscopy. *Clin Lab Invest* 189:16–22
- VPL <http://vpl.ipac.caltech.edu/spectra/allmoleculeslist.htm>. VPL Molecular Spectroscopic Database
- Wagner H, Kostka K-H, Lehr C-M, Schaefer UF (2001) Interrelation of permeation and penetration parameters obtained from in vitro experiments with human skin and skin equivalents. *Journal of Controlled Release* 75:283-295
- Wegener M, Neubert R, Rettig W, Wartewig S (1997) Structure of stratum corneum lipids characterized by FT-Raman spectroscopy and DSC. III. Mixtures of ceramides and cholesterol. *Chem Phys Lipids* 88:73-82
- Weigmann H-J, Jacobi U, Antoniou C, Tsikrikas GN, Wendel V, Rapp C, Gers-Barlag H, Sterry W, Lademann J (2005) Determination of penetration profiles of topically applied substances by means of tape stripping and optical spectroscopy: UV filter substance in sunscreens. *Journal of Biomedical Optics* 10:014009-7
- Xiao C, Flach CR, Marcott C, Mendelsohn R (2004) Uncertainties in depth determination and comparison of multivariate with univariate analysis in confocal Raman studies of a laminated polymer and skin. *Appl Spectrosc* 58:382-9
- Xiao C, Moore DJ, Flach CR, Mendelsohn R (2005a) Permeation of dimyristoylphosphatidylcholine into skin - structural and spatial information from IR and Raman microscopic imaging. *Vibrational Spectroscopy* 38:151-158
- Xiao C, Moore DJ, Rerek ME, Flach CR, Mendelsohn R (2005b) Feasibility of tracking phospholipid permeation into skin using infrared and Raman microscopic imaging. *J Invest Dermatol* 124:622-32
- Yu B, Kim KH, So PT, Blankschtein D, Langer R (2003) Visualization of oleic acid-induced transdermal diffusion pathways using two-photon fluorescence microscopy. *J Invest Dermatol* 120:448-55
- Zip C (2006) An update on the role of topical metronidazole in rosacea. *Skin Therapy Lett* 11:1-4

Ch.III.4 – Caractérisation moléculaire par microspectroscopie Raman d'un modèle de peau reconstruite Episkin®: étude comparative avec un échantillon de peau humaine excisée, suivi de la diffusion d'un principe actif à travers l'épiderme

Article 4. Molecular characterization of reconstructed skin model by Raman microspectroscopy: comparison with excised human skin

Contexte

Dans le but d'évaluer le potentiel de la spectroscopie Raman pour des analyses sur des échantillons de peau reconstruite (étude de l'absorption percutanée, étude des risques toxicologiques, développement de médicaments, étude de sûreté pour les produits cosmétiques, étude de l'effet des agressions environnementales comme les rayonnements UV) nous avons établis dans un premier temps une caractérisation spectrale d'un modèle d'épiderme synthétique, Episkin®, reconstruit à partir d'une culture de kératinocytes sur une matrice de collagène de type I. Ensuite, nous nous sommes intéressés aux différences spectrales entre l'Episkin® et l'épiderme humain issu d'une peau excisée. Après cette analyse des raies de vibration de l'Episkin®, nous avons réalisé une étude de faisabilité montrant le suivi de pénétration d'un principe actif à travers la peau reconstruite a été menée.

Matériels et Méthodes

Le modèle Episkin®, consiste en une culture dite organotypique composée de kératinocytes humains. Après une période de 13 jours de culture, un épiderme stratifié se forme, avec à la surface, une couche cornée.

Le kit Episkin® comprend 12 unités d'épiderme reconstruit de 1,07 cm² de surface, fournies avec les milieux de culture nécessaires. Pour l'analyse Raman, chaque unité est placée indépendamment des autres dans un milieu de culture incolore fourni avec le kit, de façon à ce que seule la matrice de collagène soit submergée. Le temps d'une analyse ne dépasse pas les 10 minutes. Les prétraitements des spectres sont rappelés dans la partie instrumentation

Résultats

Les résultats de cette étude sont présentés dans cet ordre :

- Caractérisation spectrale de l'Episkin
- Comparaison des signatures Raman de l'Episkin et de la peau normale

- Comparaison des signaux du collagène, des couches profondes de la peau (derme) et de la matrice sous jacente de l'Episkin
- Comparaison des signaux de l'Episkin collecté à la surface et de la matrice sous jacente
- Comparaison des spectres collectés au cours de la diffusion du principe actif.

Conclusion

Malgré la complexité du système étudié, ce travail a aboutit à une caractérisation spectrale Raman du modèle Episkin®, permettant, d'établir une référence spectrale indispensable à toute étude ultérieure sur ce modèle de peau reconstruite.

Dans un second temps, la comparaison des spectres de l'Episkin et de la peau excisée a mis en évidence des différences spectrales, traduisant des différences structurales qui pourraient affecter les interactions principe actif / modèle biologique utilisé. Ce qui influencerait la vitesse de diffusion de ces principes actifs.

Les marqueurs spectroscopiques spécifiques des différentes structures de l'Episkin (surface et matrice sous jacente) peuvent être utilisés *i*- pour contrôler la profondeur d'analyse et, *ii*- pour contrôler la qualité du modèle étudié.

Remarque

Concernant l'étude de diffusion du Métronidazole à travers l'Episkin®, les conditions de travail (problèmes techniques liés à l'instrumentation au moment de la livraison de l'Episkin®) ont limité l'exploitation des spectres à des profondeurs maximales de 15 µm.

Molecular Characterization of Reconstructed Skin Model by Raman Microspectroscopy: Comparison with Excised Human Skin

Ali Tfayli,¹ Olivier Piot,¹ Florence Draux,¹ Franck Pitre,² Michel Manfait¹

¹ MeDIAN Unit, CNRS UMR 6142, Faculty of Pharmacy, University of Reims Champagne—Ardenne, France

² Formulation Laboratory, Department of Pharmaceutical Development, Galderma R&D, Sophia—Antipolis, France

Received 2 July 2007; revised 20 August 2007; accepted 23 August 2007

Published online 30 August 2007 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI 10.1002/bip.20832

Biopolymers Volume 87 / Number 4

Abstract.

Human skin is directly exposed to different exogenous agents. Many research works have studied the diffusion, the interactions, the absorption mechanisms and/or the toxicity of these agents towards different cutaneous structures.

With the use of living animals for such tests being more and more rejected; and the number of human volunteers being limited; different types of skin models are used. In the last few years, reconstructed epidermis from cell cultures has been frequently employed, and recent changes in the European chemical policy have approved and encouraged the use of these reconstructed models for skin related research works and assessments.

Among the techniques used actually to study the skin, Raman microspectroscopy is a rising and powerful non-destructive technique that detects characteristic molecular vibrations. In this study, we created a spectral database to index the vibration peaks and bands of a well-known reconstructed epidermis model, the Episkin®. The comparison with a native epidermis signal enabled us to put in evidence several spectral differences associated with molecular and structural differences between the skin and the reconstructed model, both maintained in living conditions. In addition to that, we have showed the feasibility of tracking the penetration of a pharmaceutical molecule through the Episkin® model.

Keywords: Reconstructed epidermis, confocal Raman spectroscopy, vibrational database, drug tracking.

1 Introduction

The skin, the largest and the most external organ of the human body, is daily and directly exposed to several exogenous agents, from UV radiation to drugs, cosmetics and sunscreens, including several chemical products such as pesticides, detergents and other products to which our body can be exposed.

More and more studies are carried out to better understand the effects of these exogenous agents, their interaction, their absorption mechanism and/or their toxicity towards the different cutaneous structures.

Recent changes in the European chemicals policy (REACH : Registration, evaluation and authorization of chemicals) were the major stimulus to develop a validation process. In the near future, within 15 years, all existing chemicals which have not been notified with documented toxicological profiles will have to be assessed. This will amount to a total number of about 30000 substances¹. In addition to that, the scientific committee on cosmetic products and non-food products intended for consumers (SCCNFP)'s notes the high relevance of validation and evaluation of cosmetic products' effects².

The *in vivo* studies using healthy volunteers are usually limited by obvious ethical reasons and practical restrictions³. Furthermore, the 7th amendment to the European Union cosmetic directive prohibits the use of living animals to test cosmetic products and their ingredients⁴. The *in vitro* approach that consists in the use of excised or reconstructed skin for validation tests (percutaneous absorption, toxicological risks, development of drugs, safety studies for cosmetic products) appears to be therefore inevitable^{1,5}. This approach has been adopted by the "guideline test" 428 of the OECD (organisation for economic co-operation and development)⁶.

The present sources for excised human skin are not sufficient to cover the need, therefore animal skin mainly from rat and pig are used instead. Epidermis models, reconstructed from keratinocytes and melanocytes cultures can also be employed. The use of reconstructed skin models has been approved by the OECD Guidance document n° 28⁷.

The first synthetic epidermis models were reconstructed in the early nineteen eighties (1983)^{8,9}, and the first commercialized models were available in the market since 1990. In 2004 the OECD approved their use for corrosivity tests¹⁰. Since then, different models of reconstructed skin were developed, studied and commercialized^{1,3,5,11,12}. These models were

characterized and compared by several techniques to natural skin, excised human skin, and animal model skin (rat and pig)^{13,14}.

Among the techniques actually used to study the skin, Raman spectroscopy presents the advantages of being non destructive, it also allows a real-time structural and molecular analysis, without requiring any sample preparation. The direct accessibility of the skin makes this tissue an interesting field for Raman spectroscopic investigations on a large scale.

Raman spectroscopy is a powerful laser spectroscopic technique that detects the characteristic vibrational energy levels of a molecule. When light irradiates a molecule, most photons are scattered elastically. This elastically scattered light, which has the same frequency as the incident light, is termed Rayleigh scattering. A small amount of light, however, is scattered inelastically. The inelastically scattered light, termed Raman (Stokes and anti-Stokes) scattering, exhibits frequency shifts with respect to the incident light. These shifts correspond exactly to the vibrational energy transitions of the molecule. They can be analyzed by an optical dispersive system to be represented as spectra. The Raman spectrum can be considered as a spectral fingerprint of the molecule¹⁵.

The potential of Raman spectroscopy to discriminate pathologic from healthy skin structures, and to classify different types and grades of cutaneous lesions has been demonstrated by several studies¹⁶⁻²⁴. Other research works studied the molecular composition of the skin^{25,26}, followed the effects induced by different types of drugs^{25,27}, and established in depth concentration profiles (starting from the surface and going deeper into the skin) of different molecules (water and endogenous molecules)²⁷⁻³⁴. The follow-up, in real-time analysis, of the diffusion of the exogenous products through skin layers has also been performed³⁵⁻³⁷.

In order to evaluate the potential of the Raman spectroscopy for future investigations on reconstructed skin samples, such as percutaneous absorption studies, toxicological risks investigations, drugs development, cosmetic products safety and assessment of the effect of environmental aggressions like UV radiations, we have tried in a first time to establish a vibrational identity and a spectral characterization of a synthetic epidermis model, Episkin®, reconstructed from a culture of keratinocytes on a type I collagen matrix. In a second time, we have realized a comparative study between the spectral signature of Episkin® and the signature of human epidermis from excised skin. Finally, we have studied the feasibility of tracking the penetration through the reconstructed skin of Metronidazole, a pharmaceutical molecule, produced by Galderma (Sophia Antipolis, France) for rosacea treatment.

2 Materials and Methods

2.1 *Epidermis model:*

The Episkin® model provided by Episkin SNC (Lyon, France), is a reconstructed organotypic culture composed of human adult keratinocytes reproducing, after a 13-days culture period, a human stratified epidermis with a horny layer.

Seeded on a dermal substitute, consisting of type I collagen matrix, coated by a thin layer of type IV collagen (to substitute the basal cell layer), human adult keratinocytes are grown immersed for 3 days in culture medium, then exposed for 10 days at the air-liquid interface giving rise to a fully differentiated epidermis.

The Episkin® model is presented as a kit composed of 12 epidermal units (1.07 cm^2 surface each), with the necessary culture medium. It is obtained from a standardised large-scale production according to ISO 9001 standard (International Organisation for Standardisation).

The epidermal cells are obtained from healthy volunteer donors, negative for the antibodies anti HIV1 and 2 and hepatitis C and for the antigen hepatitis B. Each Episkin® batch was controlled by the manufacturer, all biological components in the epidermis, and culture media were tested before use for viral, bacterial, fungal and mycoplasmic contamination. The histological structural analysis and the control of the sodium dodecyl sulphate (SDS)'s inhibition concentration were also provided by the supplier:

IC50 of sodium dodecyl sulphate (SDS) after 18h at 37°C and 5 % CO_2 .

For the Raman analysis, each unit was moved to a colorless culture medium (provided by the supplier). Only the collagen matrix was submerged and the epidermis was exposed to the air. Each spectral recording took 10 minutes. Details about spectral acquisition are presented in the instrumentation paragraph (III.D).

For the collagen matrix analysis, the Episkin® surface was removed and spectra were collected.

2.2 *Excised human skin:*

Full thickness human skin (Biopredic International, Rennes, France), obtained from plastic surgery around the abdomen, was used. The skin was stored at -80°C until the date of the study. For the comparison with the Episkin® surface signal, a $1.5 \times 1.5 \text{ cm}^2$ square of skin was cut. The underside of the skin was plunged in a PBS medium (Invitrogen, UK) to maintain the hydration of the skin, the epidermis was exposed to the air; and the signal was measured on the surface of the skin.

20 μm transversal sections were cut by cryo-microtome, and deposited on CaF_2 slides. Spectral images were realized with a 5 μm step in X and Y lateral directions. Mean spectra were realized of each layer of the skin.

Spectral signatures of the different cutaneous layers were collected. The acquisition protocol is detailed in the instrumentation chapter.

2.3 Metronidazole:

Metronidazole is a drug produced by Galderma (Sophia Antipolis, France) for rosacea treatment. It mainly acts against pathogenic cutaneous anaerobic bacteria suspected to be the cause of the disease. For our analysis, 18 μg of Metronidazole were dissolved in 1 ml of Transcutol (Diethylen Glycol Monoethyl). Spectra of pure Metronidazole in solid state, Transcutol and Metronidazole dissolved in Transcutol, were measured to identify the vibrational peaks of the molecule and the solvent.

To study the penetration of the solution through the Episkin[®], 20 μl of the solution were deposited at the skin surface and axial Z profiles were recorded. The Z profiles consist of an in-depth scanning through the skin. Raman spectra were collected at different focus points, from -10 μm (above the skin surface) to 15 μm (under the skin surface) with a 5 μm step.

2.4 Instrumentation, Raman spectrometer:

Raman spectral acquisitions, were performed with a Labram microspectrometer (Horiba Jobin Yvon, Lille France). The excitation source is a diode (TOPTICA PHOTONICS, Germany) generating 300 mW single mode laser at 785 nm. Such a wavelength allows a good penetration of the light deeply in the skin, and minimizes parasite fluorescence. The power of the laser beam focalized on the sample was measured at 40 mW, non-destructive for biological samples.

The microspectrometer is equipped with an Olympus microscope and all measurements were recorded using a 100X objective (NA 0.9). The nominal spot size at the sample was assessed to 4 μm . In order to obtain Z profiles, the objective is attached to a high precision piezoelectric focusing drive which allows vertical movements with a minimal step of 0.05 μm .

Light scattered by the tissue is collected through the same objective. Rayleigh elastic scattering is intercepted by a Notch filter which reduces its intensity by a 10^6 factor. A confocal pinhole rejects signals from out-of-focus regions in the sample. A multichannel CCD detector (Coupled Charge Device) (1024 x 256 pixels) detects the Raman stokes signal

dispersed with a 4cm^{-1} spectral resolution by a holographic grating.

Spectral range for the acquired spectra was from 620 to 1810 cm^{-1} , acquisition time of each spectrum is 2 times 10 seconds and the confocal pinhole was adjusted at $150\text{ }\mu\text{m}$.

Spectral acquisition and pre-processing were performed using LabSpec software (Horiba Jobin Yvon, Lille, France).

To reduce the influence of the instrument response in the spectra, firstly, we corrected the collected signal by subtracting the black current signal (the signal collected on the CCD detector with the laser off). Secondly, the detector response was corrected by dividing spectra by the black body (white light) signal. Finally, the CaF_2 and/or the culture medium's signals were subtracted.

All spectra were smoothed using a 5 points average smoothing, then baseline corrected using an automatic polynomial function and vector normalised on the whole spectral range.

3 Results and Discussion

3.1 Spectral characterization of the Episkin[®] model:

Like any other biological sample, the reconstructed epidermis is a complex and heterogeneous system, containing a mixture of proteins, lipids, carbohydrates, nucleic acids and other organic components. Therefore, it is difficult to study the vibrational structure of each molecular constituent in the Episkin[®] model.

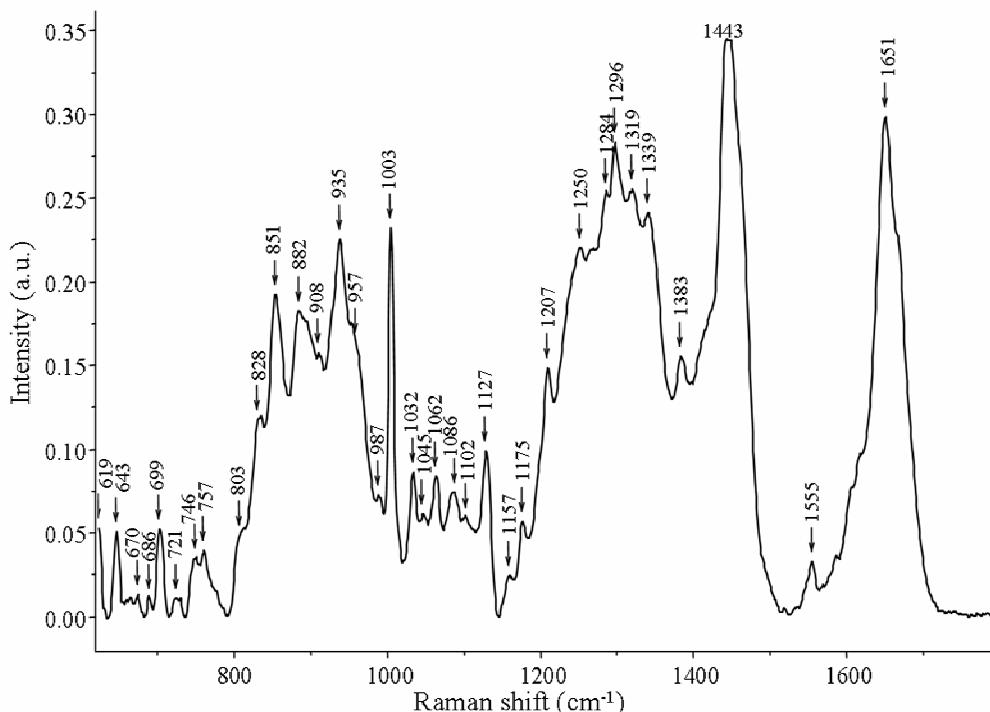


Figure 01: Raman spectrum of the reconstructed epidermis

Table 01: Raman bands assignment of the reconstructed skin in term of vibration bands or collective molecular vibration modes

Raman shift (cm^{-1})	Assignment
619	Phe ring
643	Tyr ring $\nu \text{ C-S}$
671	$\nu \text{ C-S } trans$ of Cysteine
699	$\nu \text{ C-S } gauche$ of Cysteine Cholesterol
722	Phospholipids $\nu \text{ C-S } trans$ of Cystine
746	aromatic ring puckering
758	Trp $\text{sym } \nu \text{ O-P-O}$ of Lipids
803	DNA
829	Tyr Fermi Doublet (ring)
851	Tyr Fermi Doublet (ring)
883	Trp Cholesterol
909	$\nu \text{ CH}_3$, $\gamma_w \text{ CH}_2$; $\rho \text{ CH}_2$ of Polypeptides
935	$\rho \text{ CH}_3$ terminal, $\nu \text{ CC } \alpha$ helix (secondary structure), Phospholipids
	$\nu \text{ P-O DNA}$
	$\nu \text{ C-C}$ (α helix and random coil (secondary structure))
957	carotenoids cholesterol $\delta \text{ CCH}$ olefinic
987	$\nu \text{ P-O-C}$ phospholipids
1003	$\text{sym. ring breathing}$ Phe Trp
1032	C-H Phe
1044	$\nu \text{ C-C}$ $\nu \text{ C-O}$ $\nu \text{ S-O}$
1062	Lipids : skeletal <i>trans</i> conformation Ceramides $\nu \text{ C-O DNA}$
1086	Lipids : hydrocarbon chain, <i>gauche</i> conformation Ceramides
1102	Lipids : hydrocarbon chain, <i>gauche</i> conformation Ceramides
1127	Lipids : hydrocarbon chain, <i>trans</i> conformation Ceramides
1157	$\nu \text{ C-C}$, $\rho \text{ CH}_3$, C-C skeletal vibration
1175	CH Tyr, Phe

		sym v C-O-C Lipids
1207		v C-C ₆ -H ₅ , Phe, Trp, Tyr
1250		Amide III random coil (secondary structure)
1284		Amide III α helix (secondary structure)
1296		Amide III CH ₂ phospholipids
		C=C
1319		Guanine δ CH proteins
		v CC, CH bend
1339		Phe, Trp Adenine Guanine
1382		CH ₃ bend, δ CH ₃
1443		δ CH proteins and lipids
1555		Trp
1651		Amide I

v : stretch ; γ_w : wagging ; δ : deformation ; ρ : rocking , Phe : phenylalanine, Tyr : tyrosine, Trp : tryptophan.

Proteins of the Episkin® model: From the spectrum in the fig.01 and the band assignment in table 01, it is possible to obtain some information about the amino acids composition and the secondary structure of proteins in the Episkin®. The presence of some amino acids like phenylalanine, tyrosine, and tryptophane can be clearly revealed.

For the phenylalanine (Phe), we can identify essentially 3 bands, 620 cm⁻¹ (ring breathing), 1003 cm⁻¹ (ring breathing) and 1030 cm⁻¹ (C-H). The phenylalanine also contributes to the 1175 cm⁻¹ and 1339 cm⁻¹ vibrations ^{19,25,38-44}.

The presence of tyrosine (Tyr) is highlighted by the 643 cm⁻¹ band (ring breathing) and the Raman doublet at 829 and 851 cm⁻¹, this doublet is due to Fermi resonance between the ring breathing vibration, and the overtone of the nonplanar ring vibration at 413 cm⁻¹. The intensity ratio I₈₂₉/I₈₅₁ is related to the state of the phenolic hydroxyl group ⁴⁰. In this study, for the Episkin®, the 851 cm⁻¹ vibration is more intense which indicates that the phenolic OH group is an acceptor of hydrogen bonds; and that the tyrosil residues are exposed and not "buried" within the protein. Such a configuration tends to form intermolecular bonds rather than intramolecular bonds.

The intensity ratio of the bands at 620 cm⁻¹ (Phe) and 643 cm⁻¹ (Tyr) is usually used to estimate the ratio of the density of both amino acids. Here, it's difficult to have such information because the contribution of cysteines, major amino acids of the epidermis, presenting a band at 642 cm⁻¹ assigned to the C-S stretching and hiding the tyrosine vibration ^{8,38-42}.

The tryptophane (Trp) vibrational bands are present at 758 cm^{-1} , 1340 cm^{-1} and 1550 cm^{-1} . The 883 cm^{-1} peak could also be assigned to the tryptophane; this peak is shifted in frequency (from 873 cm^{-1} to 883 cm^{-1}) when the residue is in aqueous liquid. The lack of the vibration peak at 1363 cm^{-1} shows that the tryptophane ring is exposed and therefore accessible to molecules of water^{8,25,38,40,41}.

At 1602 cm^{-1} , a low-intensity vibration highlights the glutamine and glutamic acid presence. The Cysteine, major amino acid of keratin fibers^{45,46}, and its derived cystine are very important, because they are responsible for the disulfide bonds formation. Their characteristic Raman bands are located at 642 , 671 , 699 and 721 cm^{-1} (stretching C-S).

Concerning the secondary structure of the proteins, Raman spectroscopy can be used to determine *in-situ* the structure type (α helix, β sheet, β turn, random coil, etc) by studying the Amide I and Amide III bands. In these first observations, the maximum of the Amide I band is located at 1650 cm^{-1} which reveals the predominance of the α helix structure. The same conclusion can be given from the Amide III band analyze (the peak at 1283 cm^{-1} (α helix) is more intense than the one at 1250 cm^{-1} (random coil))^{25,41,42,47-50}. Furthermore, the intense vibration at 935 cm^{-1} confirms the predominance of the α helix conformation. These results agree with the previous studies about the evaluation of the secondary conformations of the epidermis^{25,29,47-51}.

Lipids of the Episkin® model: The lipids of the epidermis are mainly constituted of ceramides, cholesterol, fatty acids and of the membrane phospholipids of cells.

On the Episkin® spectrum, lipids were highlighted via various vibration bands, a more targeted study (in the spectral range of 2500 - 3000 cm^{-1}) could give more accurate information about the distribution and the conformation of all lipid compounds.

Concerning the phospholipids, three bands at 721 cm^{-1} (rocking CH_2), 757 cm^{-1} (symmetrical stretching O-P-O) and 987 (stretching P-O-C), are visible on the Raman spectrum of the figure 1.

The cholesterol contribution can be seen at 699 and 882 cm^{-1} , and as shoulders at 738 and 1670 cm^{-1} .

The lipids are present in different conformations corresponding to different levels of organization, for example the lipid fluidity increases with the decreasing number of the lateral bonds in the acyl chains, that is also associated with an increase of lipid disorganization^{29,31,33}. This fluidity and the intramolecular conformation can be studied by analyzing the peaks intensity in the 1000 - 1150 cm^{-1} region^{29,31,33,39,52}.

In the crystalline state, all the chains have a *trans* conformation, revealed by the presence of the 1062 cm^{-1} and the 1127 cm^{-1} peaks. The lipids disorganization corresponds to a transition towards a *gauche* conformation, which is proved by the disappearance of the 1062 cm^{-1} and the 1127 cm^{-1} peaks simultaneously with the appearance of the 1086 cm^{-1} and the 1102 cm^{-1} peaks^{25,29,31,33}.

In the Episkin® spectrum, the four peaks are all present, but with a clear predominance of 1062 cm^{-1} and 1127 cm^{-1} compared to 1086 cm^{-1} and 1102 cm^{-1} , which indicates a domination of organised conformations for the lipid components of the Episkin® model.

Other components of the Episkin® model: The vibrations assigned to nucleic acids have a low intensity and are usually masked by other vibrations. Nevertheless, we can identify some peaks at 722 cm^{-1} , 1319 cm^{-1} and 1339 cm^{-1} assigned to both DNA and RNA, at 803 cm^{-1} and 1062 cm^{-1} specific to DNA.

The presence of the polysaccharides is highlighted by the presence of a large band between 800 and 1150 cm^{-1} assigned to the C-O-C stretching vibration⁴⁰.

Water is an essential factor for the plasticity and the barrier functions of the epidermis⁵³. In the studied spectral range, the only water vibrations are the OH vibration peaks at 1450 cm^{-1} and 1645 cm^{-1} . The first one is masked by the CH vibration at 1450 cm^{-1} , the second one is buried in the Amide I band²⁹.

3.2 Comparison of the episkin signal and the normal skin signal:

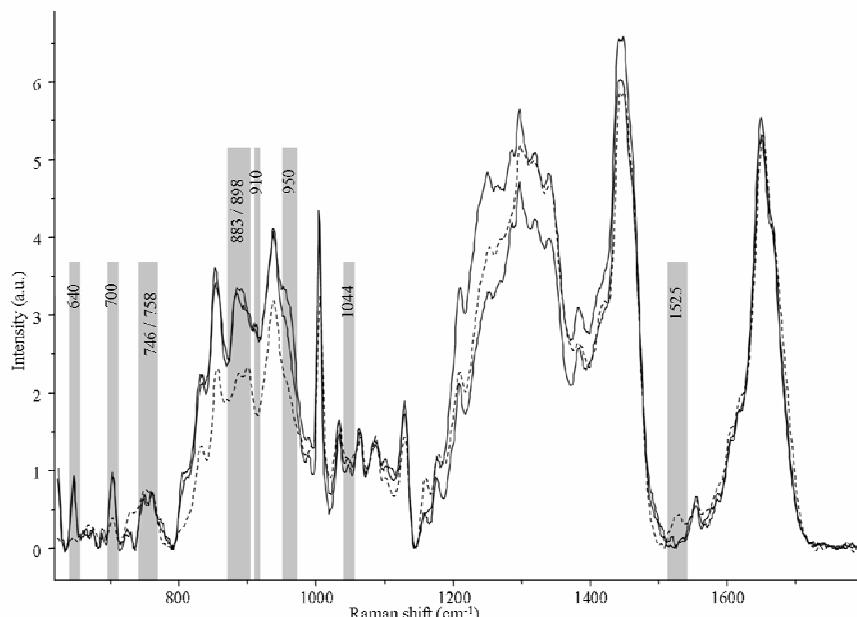


Figure 02: Comparison between a spectrum of normal skin (dashed line) and two spectra of the episkin (full line)

Table 02: The most significant spectral differences between Episkin and normal skin with an attempt of assignment of the differences

Raman shift (cm^{-1})	Episkin	Normal epidermis	Assignment
643	s	m	Tyrosine ring v C-S Cysteine
700	s	m	v C-S Cysteine Cholesterol
719	m	w	Phospholipids v C-S Cystine
746/758	746 758	<1	>1
			aromatic ring puckering v sym O-P-O phospholipids
773	sh w	-	Phospholipids
805	m	w	DNA
867	-	w	Proline, RNA
883/898	883 898	>1	<1
			Tryptophan Cholesterol
			DNA
910	m	-	Polypeptide : v CH_3 , $\gamma_w \text{CH}_2$, ρCH_2
950	sh	-	$\delta \text{ OH}$
974	-	sh w	CH=CH bending v C-O (perpendicular)
988-993	988 w -	-	intense v P-O-C of phospholipids CH out of plane bend v cycle
1044	m	-	v S-O
1159	w	s	-C=C- Carotenoids
1416	-	w	Ceramide 3
1525	-	m	-C=C- Carotenoids

v : stretch ; γ_t : twisting ; γ_w : wagging ; δ : deformation ; ρ : rocking ; sei: scissoring . v: very ; s: strong ; m: medium ; w: weak ; sh: shoulder ; br: broad.

The comparison of the reconstructed epidermis spectra with the normal human epidermis shows that both systems have quite similar spectral signatures, but still reveal several structural and conformational differences (fig.02, table 02).

At 640 cm^{-1} , the difference in the intensity can be due to the difference of quantity of tyrosine or cysteine residues (C-S bonds). But both tissues' spectra show the same intensities for all other peaks assigned to tyrosine at 1175 cm^{-1} and 1207 cm^{-1} . The intensity of the Fermi doublet of the tyrosine is linked to the entire intensity of the large band between 780 cm^{-1} and 980 cm^{-1} assigned to the C-O-C stretching of polysaccharides. Consequently, the difference in the intensity of the 640 cm^{-1} peak doesn't seem to be linked to tyrosine content, but rather to cysteine residues. This hypothesis can be confirmed by considering other vibrations of C-S

bond of cysteine especially at 700 cm^{-1} and 719 cm^{-1} , that show similar variation than the 640 cm^{-1} peak.

The increase of the vibrations of the C-S bonds could be related not only to an increase of the quantity of cysteine residues in the protein content, but also to a conformational change at the level of C-S bonds. Actually, the frequency of these vibrations changes with the conformation of these bonds, since the frequency is proportional to the energy of the bonds.

These modifications in the cysteine residues could reflect a structural strengthening of the keratin fibers in the reconstructed epidermis, because the cysteine residues can form disulfide bridges. Ponec et al. highlighted the presence of keratin 6 fibers in reconstructed epidermis models. This type of keratin is absent in the native skin and its expression is induced after acute challenges (wound, injury, etc)¹⁴. On the other hand, a lower expression of some other types of keratin was mentioned. Such variations may explain the difference in the C-S bonds vibrations between both tissues.

Analysis of the secondary structure: A first study of the secondary structure shows that the Amide I band on both tissues presents the same profile with a maximum at 1651 cm^{-1} ; which reveals a predomination of the α helix conformation. These results agree with previous studies on the secondary structure of the fibrillar proteins of the epidermis^{47,51}. On the Amide III peak, the intensity ratio of the 1250 cm^{-1} (random coil) and 1280 cm^{-1} (α helix) vibrations can lead to the same conclusion, i.e. $(I_{1250} / I_{1280}$ of the Episkin[®]) = $(I_{1250} / I_{1280}$ of the normal epidermis) = 0.7.

The similarity of the proteins secondary structure of the both tissues could be confirmed by the study of asymmetric CH₃ vibrations (1415 cm^{-1} , 1450 cm^{-1} and 2900 cm^{-1}), any frequency shift could reflect a folding or an unfolding of proteins and the exposition of their aliphatic chain to water molecules²⁹.

Furthermore, the study of the Fermi doublet can characterize the proteic conformation at the level of the tyrosil residues. 829 cm^{-1} to 851 cm^{-1} ratio is the same for both tissues, $I_{829} / I_{851} = 0,65$ (after the baseline correction between 790 cm^{-1} and 890 cm^{-1}) which indicates that the hydroxyl group in both tissues is acceptor of hydrogen bonds; consequently, the tyrosil residue is exposed and not buried within the protein.

The comparison of the spectra in the figure 2 shows that the overall phospholipids contents in the Episkin[®] model are close to those found in native epidermis. Meanwhile, some phospholipids peaks and bands have higher intensities in the Episkin[®] model compared to native skin. The vibrations at 758 cm^{-1} (O-P-O stretching) and at 987 cm^{-1} (P-O-C stretching)

are less intense for the skin. The peak at 773 cm^{-1} assigned to the phospholipids is even absent of the spectral signature of the normal human epidermis. These differences could be explained by the high contribution of the spectrum of the stratum corneum in the whole Raman spectrum. Contrarily to the normal epidermis, the stratum corneum of the Episkin® model was found to contain regularly lipid droplets¹⁴. Moreover, a small band at 1416 cm^{-1} assigned to the ceramide 3 (spectrum not shown) can be identified on the skin spectrum and is absent from the Episkin® signature.

The vibrational bands of lipids between 1000 and 1150 cm^{-1} are all simultaneously present in the spectra of both tissues. However, the relative intensity of the peak at 1127 cm^{-1} (*trans* conformation of the lipids) compared to the one at 1083 cm^{-1} (*gauche* conformation of the lipids), (I_{1127} / I_{1083}) is more important for Episkin® than for normal epidermis. These two vibrational bands are present on the spectra of ceramides 2, 3, 5 and 6 (data not shown) and with the same intensity ratio. Therefore, changes in the relative intensities and ratios of these two bands cannot be attributed to different amounts of the ceramides in the measured samples. On the other hand, these changes could be related to conformational differences in the lipid structures. These ratios could indicate a more crystalline structure for the lipids in the Episkin® model that could be due to the presence of lamellar bodies in the outermost layer of the Episkin®. In the native epidermis, the lamellar bodies are present in the stratum spinosum layers and the extrusion is complete at the stratum granulosum / stratum corneum interface¹⁴. For the reconstructed model, the extrusion being restarted, the presence of lamellar bodies is noticed in the uppermost stratum corneum layers^{14,54}.

The integrated intensity of the band between 780 cm^{-1} and 980 cm^{-1} assigned to polysaccharides C-O-C stretching vibration⁵⁵ seems to be more intense for Episkin®, which could originate from the culture medium polysaccharides.

Carotenoids are thought to play a significant part in the skin's anti-oxidant defense system, and may help prevent malignancy⁵⁶. Because the carotenoids are lipophilic molecules, they are well placed in the skin to act as chain-breaking anti-oxidants protecting polyunsaturated fatty acids from oxygen radical peroxidation⁵⁷. The main vibrations of cutaneous carotenoids are located at 1159 cm^{-1} and 1525 cm^{-1} ⁵⁶.

In figure 02, both peaks (1159 cm^{-1} and 1525 cm^{-1}) are easily identified on the normal epidermis spectrum. On the reconstructed epidermis spectrum (full line), Intensity of both peaks are much weaker. Such an observation could lead to the conclusion that carotenoids

content in the Episkin® is weaker compared to the normal skin. Therefore, molecules and cells of the Episkin® could be more exposed to peroxidation.

Furthermore, the reconstructed epidermis shows at 1044 cm^{-1} a weak peak that could be assigned to S-O vibration of the cystic acid resulting from the oxidation of disulfide S-S bonds⁴⁸⁻⁵⁰. This peak is absent in normal epidermis spectra, which reinforces the conclusion about the sensitivity of Episkin® towards oxidative mechanisms.

3.3 Comparison between the type I collagen signal, the deep layers of the skin (dermis) and the Episkin underlying matrix:

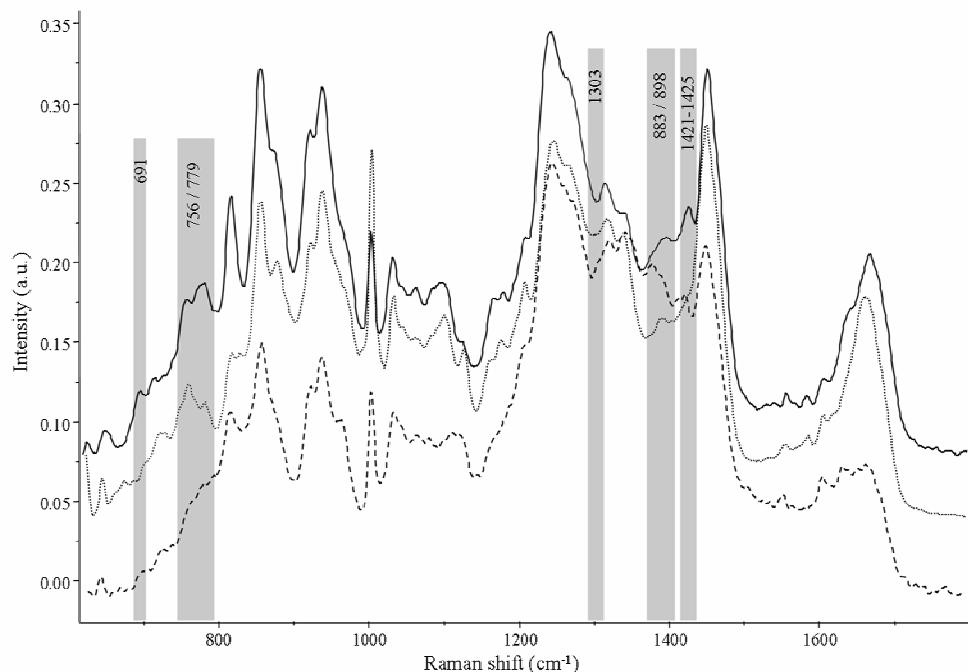


Figure 03: Comparison between spectra of type I collagen (full line), dermis (dotted line) and the episkin matrix (dashed line)

Table 03: Spectral differences between the underlying collagen matrix of the Episkin®, the type I collagen fibers and human dermis.

Raman shift (cm^{-1})	Episkin® matrix	Collagen	Dermis	Assignment
691	sh	m	-	
700	vw	-	w sh	v C-S N-H bend
730	w	sh	-	ρ CH ₂
Ratio	<u>756</u> <u>779</u>	<1	<1	v sym. O-P-O Trp ring breathing ρ CH ₂
792	sh vw	Absent	Absent	

	808-813	808 w	813 s	813 w	
	827	-	-	M	v asym.O-P-O DNA Tyr ring
	892	-	-	Sh	DNA ρ CH ₂
Ratio	954 961	=1	>1	>1	δ OH ρ CH ₃ v C-C (α helix & random coil)
	1140	W	-	-	v C-C ρ CH ₃
	1157	-	-	M	skeletal C-C vibration v C-N δ COH
	1163	M	m	-	v CH ₂ , ρ CH ₃ v C-O-C, v C-C leucine & valine skeletal (CH ₃)-C vibration
	1185	Sh	sh	Sh	Tyr v C-N, v CC
	1204				Hydroxyproline Tyr
	1204-1208		1208	1208	v C-C ₆ -H ₅ de Phe, Trp Tyr
	1258				Hydroxyproline
	1268	1258-1273	1263-1273	1268	Amide III C-H bend
1258- 1273					Amide III v P=O
	1273				Phospholipids N-O
					CH in plane bend
					Amide III, globular α helix
					δ NH, v CN
	1303	sh	-	-	γ _t CH ₂ (lip)
	1375	m	sh	-	Amide III (fibrillar α helix)
	1375				v asym CH ₃
	1375/1393	>1	<1	-	v asym CH ₃
	1393				v sym CO ₂
					CH ₃ bend asym
					δ sym CH ₃
	1410	w	-	-	

				v COO ⁻¹
Shift	1421	1421	1424	1425 sci C-H (CH ₂ adjacent to C=O) δ CH ₃
	1425			v COO ⁻¹ δ CH ₃
1538	-	vw	vw	C=C δ N-H
1547	w	-	w	Trp N-H bend
1566	w	-	w	
1650-1680	m	s	s	Amide I

v : stretch ; γ_t : twisting ; γ_w : wagging ; δ : deformation ; ρ : rocking ; sci: scissoring . v: very ; s: strong ; m: medium ; w: weak ; sh: shoulder ; br: broad

The figure 03 represents a comparison between type I collagen fibers signal, deep layers of the skin (dermis) signal, and the Episkin®'s underlying collagen matrix signal. The assignment of the bands in table 3 shows a strong similarity between the three spectral signatures. This is due to the high contribution of the collagen in the composition of the human dermis. Meanwhile, some differences are observed on the dermis signal compared to both collagen and the underlying matrix of Episkin®. For example, the changes in the 756/779 cm⁻¹ ratio are due to the contribution of the phospholipids in the dermis spectrum. This contribution induces also a shift in the position of the Amide III band. In addition to that, bands of DNA can be identified on the dermis signal at 827 and 892 cm⁻¹. On the other hand, the differences between the signal of collagen fibers and of the underlying matrix of Episkin® may be due to conformational differences related to the interaction between collagen fibers in the matrix.

The identification of spectral features of these layers may be of good use for the in-depth profile studies. Actually, when studying, with confocal Raman spectroscopy, deep layers under the skin surface, it is important to have a specific spectral signature for each layer.

3.4 Comparison between the Episkin® signal collected at the surface and the signal of the underlying collagen matrix:

The comparison of the spectral signature of the reconstructed epidermis surface and its underlying collagen matrix show several differences (figure 04, table 4), the main ones are listed below:

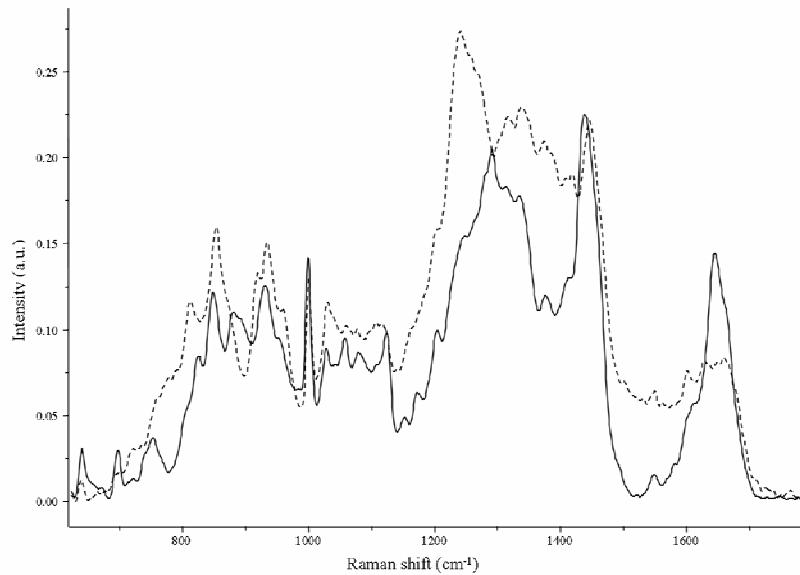


Figure 04: Spectrum of the Episkin® surface (full line) compared to the spectrum of the underlying collagen matrix (dashed line)

Table 04: Spectral differences between the spectra of the Episkin® surface and the underlying matrix

Raman shift (cm ⁻¹)	Surface of the Episkin®	Matrix of the Episkin®	Assignment
637	s	m	v C-S Tyr ring
651-662	Large band with a maximum at 657	3 discernable peaks at 651, 657, 662	polypeptides Amide IV bend
670	w	-	v C-S Cysteine
696	s	w	v C-S Cysteine N-H bend amide V
733	Buried in a bigger band	w	Amide V ρ CH ₂
751	s	Buried in a bigger band	Aromatic ring
775	-	m	ρ CH ₂
786	-	w	Trp ring breathing
804	sh	-	DNA
810	-	s	v C-C
825	m	-	v asym. O-P-O DNA Tyr ring
845-852	845 s	852 s	Tyr ring v C-C of Proline ring
Large Band centred on 885	880 s et 890 s	-	ρ CH ₂

917	-	w	v C-C, Proline ring
	929 s		Phospholipids
929-934			ρ CH₃ terminal
			v CC α helix
		934 s	v CC α helix
			ρ CH₃
1123	s	m	
1137	-	s	v C-C
1152	m	sh	
1171	m	sh	
1181	-	sh	Tyr v C-N v CC
Ratio	1244		Amide III anti-parallel β sheet
	1242/1257 >1	1246/1262 <1	v asym.PO₂⁻
	1260		Amide III α helix C-H bend
1298	s	-	Amide III fibrillar CH₂ phospholipids
1417	-	w	v COO⁻¹ Glu & Asp sci C-H (CH₂ adjacent to C=O) δ CH₃
1610	w	-	C=C Tyr & Phe
1650-1680	s	m	Amide I

v : stretch ; γ_t : twisting ; γ_w : wagging ; δ : deformation ; ρ : rocking ; sci: scissoring . v: very ; s: strong ; m: medium ; w: weak ; sh: shoulder ; br: broad

The C-S vibrations are much more intense for the epidermis, which can be related to the cysteins abundance in the keratin fibers.

The phospholipids and the nucleic acids vibrations are also more intense for the epidermis (table 4).

In the Amide III band, the random coil structure of the proteins is more important for the collagen matrix. On the other hand, the α helix conformation is predominant in the epidermis signal. This conformational difference is highlighted by an intense peak centred at 1250 cm⁻¹ for the collagen matrix spectra, and a peak centered at 1298 cm⁻¹ for epidermis spectra.

For the analysis of penetration in depth profiles, and the follow up of drugs into the skin, the intensity ratio I₁₂₅₀ / I₁₂₉₀ could be used to, *i/* localize the dermis / epidermis interface and *ii/* evaluate the optical distortions inducing errors in Z analysis in a multilayer systems.

Actually, in spectral Z profiles analysis, spectra show a progressive decrease of the epidermis peaks with an increase of those of the collagen matrix.

3.5 Comparison between the spectra of Episkin® surface treated with Metronidazole, untreated Episkin® surface and the spectra of Metronidazole dissolved in Transcutol:

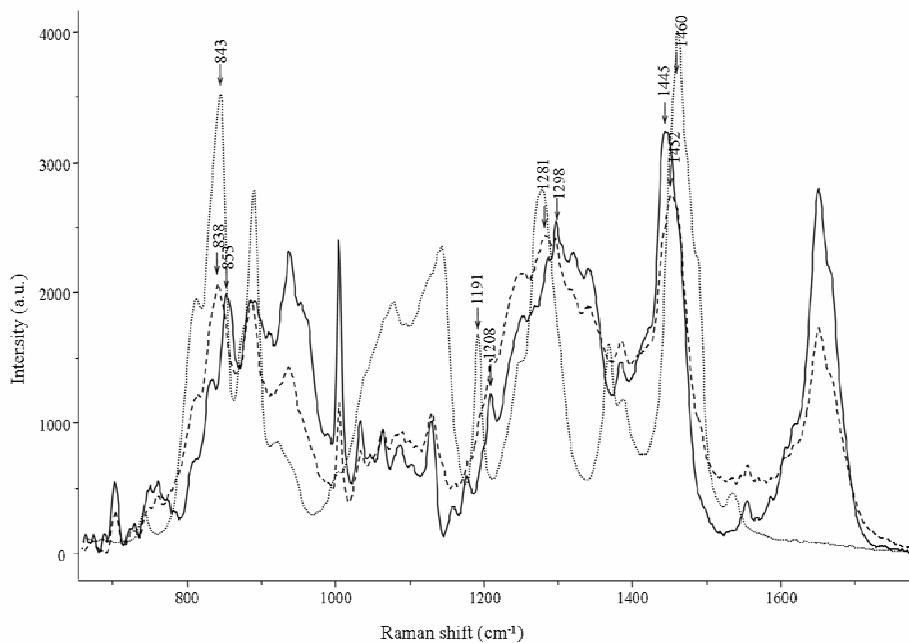


Figure 05: Comparison between the spectra from the untreated Episkin surface (full line), the surface treated by Metronidazole (dashed line) and Metronidazole solution (dotted line)

Table 05: Assignment of the spectral differences between untreated Episkin surface, treated surface and Metronidazole solution

Raman shift (cm ⁻¹)	Untreated Episkin surface	Treated Episkin surface	Metronidazole solution	Assignment
838	-	m	s	Metronidazole ring breathing
853	s	sh	-	Tyr ring breathing v C-C of Prolines ring
1191	-	sh	s	v C-N Metronidazole
1208	sh s	sh s	-	v C-C ₆ -H ₅ de Phe, Trp, Tyr, Hydroxyproline
1281	-	Shifted to 1281 cm ⁻¹ m	s	N-O Metronidazole
1298	m	sh	-	Amide III
1445-1460 shift	1445 s			δ CH protein and lipids CH ₂ bend, δ asym CH ₃ sc CH Alanine
	1452 s		1460 s	δ asym CH ₃ CD0036

v : stretch ; γ_t : twisting ; γ_w : wagging ; δ : deformation ; ρ : rocking ; sci: scissoring . v: very ; s: strong ; m: medium ; w: weak ; sh: shoulder ; br: broad

The spectra of the Metronidazole in solution and of the Episkin® surface treated with Metronidazole present a peak at 838 cm^{-1} near to the peak at 853 cm^{-1} assigned to Episkin® (figure 05, table 5).

At 1191 cm^{-1} , the Metronidazole spectrum presents a distinct peak that appears as a shoulder in the treated surface spectrum.

The peak at 1270 cm^{-1} , assigned to Metronidazole, is shifted when interacting with the reconstructed skin and can be identified at 1281cm^{-1} on the treated surface.

The C-N stretch vibration of Metronidazole is identified at 1369 cm^{-1} , while no signal appears on the untreated epidermis spectrum.

The presence of the very intense vibration peak of Metronidazole at 1460 cm^{-1} induces a frequency shift of the phospholipids and proteins peak from 1445 cm^{-1} on the non treated surface to 1452 cm^{-1} for the treated surface.

The comparison between the spectrum of Metronidazole in solid state, spectrum of Transcutol, and spectrum of the Metronidazole dissolved in the Transcutol (data not shown), shows that the bands at 1191 cm^{-1} , 1281 cm^{-1} and 1369 cm^{-1} are due only to the Metronidazole, the Transcutol does not have any Raman activity at these wavenumbers. Therefore, these bands (1191 cm^{-1} , 1281 cm^{-1} and 1369 cm^{-1}) were used for the Metronidazole detection in skin or Episkin® models. Only the results corresponding to the 1281 cm^{-1} vibration were presented. Similar results were obtained with the two other bands.

3.6 Comparison between the spectra extracted from Z profiles collected at different diffusion times of the Metronidazole:

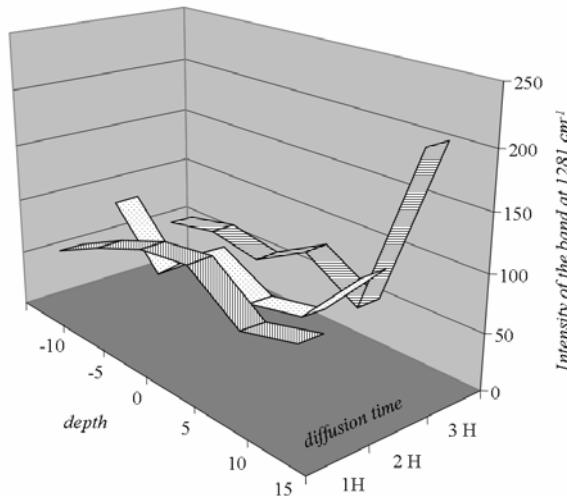


Figure 06: Graphic representation of the variation of the integrated intensity of the peak at 1281 cm^{-1} of the Metronidazole depending on the diffusion time (1 h, 2 h and 3 h) and the depth.

Penetration profiles were measured at 1h 2h and 3h after the deposition of the Metronidazole solution on the Episkin® surface. Before the recording of each profile, the surface is cleaned with a cotton swab to avoid parasite signal of the residual Metronidazole amount on the surface, which has not diffused in the Episkin.

On each profile, the spectra corresponding to different depths (from -10 µm to +30 µm with a step of 5 µm) were extracted.

Beyond 20 µm depth, the signal/noise ratio of the spectra is too low and the precise identification of the vibration peaks becomes impossible. For this first study, we restricted the collection of spectroscopic data to a maximal depth of 15 µm.

In order to evaluate the intensity variation of the Metronidazole peaks depending on the time and depth, all spectra were normalized on the integrated intensity of the phenylalanine vibration peak at 1003 cm⁻¹, that presents the advantage to be isolated and not influenced by the structural changes of the protein content.

Due to instrumental restrictions the experiments realised on Episkin® were limited on superficial layers of the epidermis, no deeper than 15 µm.

Spectral profiles allowed us to identify the Metronidazole presence deeply under skin.

Table 6 and the graphic in the figure 6 shows the in-depth evolution of the Metronidazole into the Episkin® model. After 1 hour of diffusion, the highest concentration is noted at 5 µm under the surface. 2 hours after the deposition of the drug solution, we can see its evolution and migration, at this stage the highest concentration is measured at 15 µm. 1 hour later (3 hours of diffusion), the concentration at 15 µm under the surface was still rising. To follow the penetration evolution deeper in the skin, further experiments need to be performed using specific optical objective.

In Conclusion, in this research work, we were able to establish non-destructively a detailed spectral characterization despite the complexity of the studied model. This characterization enables us to access to molecular and structural information, and to create a spectral database that could be used as reference for any Raman study on the Episkin® model. The study of the protein content reveals a predominance of the α helix conformation in the Episkin®, It appears also that the tyrosil residues are exposed, likely to create hydrogen bonds on their hydroxyl groups. Moreover, the position of tryptophane bands shows that the indole group of this amino-acid is exposed to water molecules.

The predominance of the peaks at 1062 and 1127 cm⁻¹ compared to those at 1088 and 1102 cm⁻¹ reveals a clear domination of organized conformations in the lipids Episkin® surface.

On the other hand, the comparison between the signatures of the Episkin® and the normal epidermis enabled us to put in evidence several spectral differences, which normally are related to structural and conformational characteristics specific of each sample.

These differences may influence the interaction between the drug and the biological tissue, and affect the diffusion kinetics speed. For example; this comparison highlighted a difference in the cystein content between the Episkin® and normal epidermis. This could be related to a difference in the conformation of keratin fibers.

The difference in the intensities of the bands at 1159 and 1525 cm⁻¹, assigned to the carotenoids, reveals their default in the Episkin®. With a smaller number of carotenoids, the anti-oxidation mechanisms can be seriously affected; this is visible by the apparition of S-O bands due to the oxidation of disulfide bands. As the carotenoids content in the Episkin® is not representative of the normal skin content, Episkin models should not be used for photoaging studies, and for any other study that implicates an oxidation mechanism.

The comparison between the underlying collagen matrix and the Episkin surface enabled us to determine some spectral markers for each structure. These markers can be used *i/* to localize the dermis/epidermis junction, and *ii/* to evaluate the optical effects related to the analysis through multilayer systems. The differences of the refractive index (at the air – skin interface and between the different skin layers) induce a deviation of the light beam; which gives a misestimated depth value.

The possibility of tracking exogenous molecules in the skin has been demonstrated by previous works^{36,37}. For their studies Xiao et al. used deuterated phospholipids. Labelling molecules with deuterium permits to facilitate their detection, since C-D bonds arise between 2000 and 2250 cm⁻¹, a spectral domain free of vibrations from biological constituents. The deuteration consists nevertheless in a chemical modification that is likely to modify some interaction mechanisms between the skin and the molecule. Therefore, in our study, we preferred to work directly with a non-modified drug, solubilized in Transcutol, a common organic solvent employed by the pharmaceutical industry for drug formulation.

Since the drug and the solvent, both, present vibrations in the 600-1800 cm⁻¹ region, it was very important to determine the pertinent spectral features that could be used as signature for the Metronidazole solution. Meanwhile, this work remains a feasibility study of tracing the in-depth repartition of Metronidazole into a reconstructed skin model. Further works are

currently carried out to compare the speed and the depth of penetration of the drug through both native and reconstructed skin samples.

4 References

1. Schreiber, S.; Mahmoud, A.; Vuia, A.; Rubbelke, M. K.; Schmidt, E.; Schaller, M.; Kandarova, H.; Haberland, A.; Schafer, U. F.; Bock, U.; Korting, H. C.; Liebsch, M.; Schafer-Korting, M. *Toxicol In Vitro* 2005, 19, 813-822.
2. SCCNFP. Adopted at 25th plenary meeting October 2003, 2003.
3. Françoise, B. *Journal de la société de Biologie* 2005, 199, 313-320.
4. EC. Brussel, Belgium, 2003, p 26-35.
5. Portes, P.; Grandidier, M. H.; Cohen, C.; Roguet, R. *Toxicol In Vitro* 2002, 16, 765-770.
6. OECD. Paris, France, 2004a.
7. OECD. 2003.
8. Bell, E.; Sher, S.; Hull, B.; Merrill, C.; Rosen, S.; Chamson, A.; Asselineau, D.; Dubertret, L.; Coulomb, B.; Lapierre, C.; Nusgens, B.; Neveux, Y. *J Invest Dermatol* 1983, 81, 2s-10s.
9. Prunieras, M.; Regnier, M.; Woodley, D. *J Invest Dermatol* 1983, 81, 28s-33s.
10. OECD. Paris, France, 2004c.
11. Martinhao Souto, R. L.; Rehder, J.; Vassallo, J.; Cintra, M. L.; Strangler Kraemer, M. H.; Puzzi, M. B. *Sao Paolo Medical Journal* 2006, 124, 71-76.
12. Rehder, J.; Martinhao Souto, R. L.; Magro Issa, C. M. B.; Puzzi, M. B. *Sao Paolo Medical Journal* 2004, 122, 22-25.
13. Lotte, C.; Patouillet, C.; Zanini, M.; Messager, A.; Roguet, R. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2002, 15 Suppl 1, 18-30.
14. Ponec, M.; Boelsma, E.; Gibbs, S.; Mommaas, M. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2002, 15 Suppl 1, 4-17.
15. koningsten, J. A. introduction of the theory of the Raman effect; D. Reidel publiching, 1971.
16. Gniadecka, M.; Philipsen, P. A.; Sigurdsson, S.; Wessel, S.; Nielsen, O. F.; Christensen, D. H.; Hercogova, J.; Rossen, K.; Thomsen, H. K.; Gniadecki, R.; Hansen, L. K.; Wulf, H. C. *J Invest Dermatol* 2004, 122, 443-449.
17. Mordechai, S.; Sahu, R. K.; Hammody, Z.; Mark, S.; Kantarovich, K.; Guterman, H.; Podshyvalov, A.; Goldstein, J.; Argov, S. *J Microsc* 2004, 215, 86-91.
18. Shim, M. G.; Wilson, B. C. *journal of Raman spectroscopy* 1997, 28, 131-142.
19. Stone, N.; Kendall, C.; Smith, J.; Crow, P.; Barr, H. *Faraday Discuss* 2004, 126, 141-157; discussion 169-183.
20. Tfayli, A.; Piot, O.; Derancourt, S.; Bernard, P.; Manfait, M. The international society of optical engineering, 2006.
21. Tfayli, A.; Piot, O.; Durlach, A.; Bernard, P.; Manfait, M. *Biochim Biophys Acta* 2005, 1724, 262-269.
22. Eikje, N. S.; Aizawa, K.; Ozaki, Y. *Biotechnol Annu Rev* 2005, 11, 191-225.
23. Huang, Z.; Zeng, H.; Hamzavi, I.; McLean, D. I.; Lui, H. *Optics Letters* 1992, 26, 1782-1784.
24. Short, M. A.; Lui, H.; McLean, D.; Zeng, H.; Alajlan, A.; Chen, X. K. *J Biomed Opt* 2006, 11, 34004.
25. Barry, B. W.; Edwards, H. G. M.; Williams, A. C. *Raman Spectroscopy* 1992, 23, 641-645.

26. Huang, Z.; Lui, H.; Chen, X. K.; Alajlan, A.; McLean, D. I.; Zeng, H. J Biomed Opt 2004, 9, 1198-1205.
27. Caspers, P. J.; Lucassen, G. W.; Carter, E. A.; Bruining, H. A.; Puppels, G. J. J Invest Dermatol 2001, 116, 434-442.
28. Caspers, P. J.; Lucassen, G. W.; Puppels, G. J. Biophys J 2003, 85, 572-580.
29. Gniadecka, M.; Faurskov Nielsen, O.; Christensen, D. H.; Wulf, H. C. J Invest Dermatol 1998, 110, 393-398.
30. Kalasinsky, K. S.; Kalasinsky, V. F. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc 2005, 61, 1707-1713.
31. Neubert, R.; Rettig, W.; Wartewig, S.; Wegener, M.; Wienhold, A. Chem Phys Lipids 1997, 89, 3-14.
32. Sieg, A.; Crowther, J.; Blenkiron, P.; Marcott, C.; Matts, P. J. The international society of optical engineering, 2006.
33. Wegener, M.; Neubert, R.; Rettig, W.; Wartewig, S. Chem Phys Lipids 1997, 88, 73-82.
34. Chrit, L.; Hadjur, C.; Morel, S.; Sockalingum, G.; Lebourdon, G.; Leroy, F.; Manfait, M. J Biomed Opt 2005, 10, 44007.
35. Tfayli, A.; Piot, O.; Pitre, F.; Manfait, M. Eur Biophys J 2007.
36. Xiao, C.; Moore, D. J.; Flach, C. R.; Mendelsohn, R. Vibrational Spectroscopy 2005, 38, 151-158.
37. Xiao, C.; Moore, D. J.; Rerek, M. E.; Flach, C. R.; Mendelsohn, R. J Invest Dermatol 2005, 124, 622-632.
38. ; VPL Molecular Spectroscopic Database.
39. Akhtar, W.; Edwards, H. G. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc 1997, 53A, 81-90.
40. Parker, F. Applications of Infrared, Raman and Raman Resonance spectroscopy in biochemistry: New York, 1983.
41. Piot, O. In Pharmacy; University of Reims Champagne - Ardenne: Reims, 2000.
42. Piot, O.; Autran, J. C.; Manfait, M. Journal of Cereal Science 2000, 32, 57-71.
43. Sett, P.; Chattopadhyay, S.; Mallick, P. K. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc 2000, 56, 855-875.
44. Tsuboi, M.; Ezaki, Y.; Aida, M.; Suzuki, M.; Yimit, A.; Ushizawa, K.; Ueda, T. Biospectroscopy 1998, 4, 61-71.
45. Baden, H. P.; Bonar, L. J Invest Dermatol 1968, 51, 478-483.
46. Baden, H. P.; Bonar, L.; Katz, E. J Invest Dermatol 1968, 50, 301-307.
47. Baden, H. P.; Goldsmith, L. A.; Bonar, L. J Invest Dermatol 1973, 60, 215-218.
48. Kuzuhara, A. Biopolymers 2005, 77, 335-344.
49. Kuzuhara, A. Biopolymers 2005, 79, 173-184.
50. Kuzuhara, A.; Hori, T. Biopolymers 2005, 79, 324-334.
51. Yu, P. Br J Nutr 2005, 94, 655-665.
52. Lippert, J. L.; Petricolas, W. L. Proc Natl Acad Sci U S A 1971, 68, 1572-1576.
53. Blank, I. H. J Invest Dermatol 1952, 18, 433-440.
54. Ponec, M.; Boelsma, E.; Weerheim, A.; Mulder, A.; Bouwstra, J.; Mommaas, M. Int J Pharm 2000, 203, 211-225.
55. Zhu, F.; Isaacs, N. W.; Hecht, L.; Tranter, G. E.; Barron, L. D. Chirality 2006, 18, 103-115.
56. Hata, T. R.; Scholz, T. A.; Ermakov, I. V.; McClane, R. W.; Khachik, F.; Gellermann, W.; Pershing, L. K. J Invest Dermatol 2000, 115, 441-448.
57. Krinsky, N. I.; Deneke, S. M. J Natl Cancer Inst 1982, 69, 205-210.

Ch.III.5 – Correction de l'estimation de la profondeur par microscopie confocale

Raman

Article 5. Confocal Raman microspectroscopy on excised human skin: uncertainties in depth profiling and mathematical correction applied to dermatological drug permeation

Contexte

La microspectroscopie Raman présente l'avantage de donner des informations d'ordre moléculaire et structural sans détruire les échantillons. Des travaux récents ont montré le potentiel de cette technique pour étudier l'hydratation, la répartition des molécules endogènes et exogènes en couplant le système à un microscope confocal. Cependant, sur un système présentant une interface avec un saut d'indice de réfraction, la réfraction de la lumière induit une perte en résolution axiale et une estimation fausse de la profondeur de l'analyse.

Le but de cette étude est d'évaluer l'erreur induite par les effets de réfraction, et les corriger au moyen de calculs mathématiques.

Matériels et Méthodes

Pour cette étude, des coupes de peau et des films de polyéthylène de différentes épaisseurs ont été utilisés. Pour évaluer la résolution axiale, les coupes de peau et les films de polyéthylène sont déposés sur des supports de silicium. Pour l'évaluation de la profondeur, ils ont été déposés sur des fenêtres de CaF₂.

Résultats

Les résultats de cet article sont présentés selon deux approches :

- Approche théorique et modélisation :
 - a- Estimation de la résolution axiale
 - b- Estimation de la profondeur de pénétration
- Approche expérimentale :
 - c- Profondeur d'analyse
 - d- Evaluation de la résolution axiale
 - e- Suivi de la diffusion du Métronidazole dans la peau, et correction des profils Raman au moyen de modèles mathématiques.

Conclusion

Ce travail montre l'effet du changement de l'indice de réfraction sur la résolution axiale et la profondeur de l'analyse. Il montre aussi la possibilité de corriger les valeurs expérimentales en appliquant des modèles théoriques basés sur les principes optiques de la réfraction de la lumière.

Confocal Raman microspectroscopy on excised human skin: uncertainties in depth profiling and mathematical correction applied to dermatological drug permeation

A. Tfayli, O. Piot* and M. Manfait

MeDIAN Unit, CNRS UMR 6142, Faculty of Pharmacy, University of Reims Champagne – Ardenne, 51 rue Cognacq Jay, UFR Pharmacie, 51096 Reims Cedex, France

Received: 8 August 2007, Revised: 19 September 2007, Accepted: 21 September 2007
Published online: 5 November 2007

Key words: confocal Raman microspectroscopy, human skin, depth correction, mathematical modeling, drug tracking

PACS: 33.20.Fb

Abstract

Confocal Raman microspectroscopy represents the advantage of giving structural and conformational information on samples without any destructive treatment. Recently, several works were achieved to study the skin hydration, endogenous and exogenous molecules repartition in the skin using the confocal feature of this technique. Meanwhile, when working through a material boundary with a different refractive index, the main limitation remains the spatial precision, especially the distortion in the depth and the depth resolution. Recently, several authors described mathematical models to correct the depth and the resolution values. In this study, we combined theoretical approaches, proposed by different authors with experimental measurements to try to find out the most appropriate approach for correction. We applied then the corrections on in-depth profiles tracking the penetration of Metronidazole, a drug produced by Galderma for rosacea treatment, through excised human skin.

Introduction

Raman microspectroscopy is a non-destructive technique which allows probing chemical and structural properties of a sample at the micrometric scale. At the level of biological samples, Raman spectra contain detailed information about the structures and interactions of molecular classes that can be of interest for certain biomedical applications, e.g. lipid chain conformational order, nucleic acid structure, protein secondary structure, etc. In recent years, the highly efficient optical filtering and detection, combined with spectrometers that are matched to a microscope, made the Raman a widely used technique. Such instruments were adapted to integrate confocal properties by placing a confocal aperture at the back-focal image plane in order to select the light scattered from the a limited laser focal volume (microvolume).

Several works related the use of confocal Raman spectroscopy to study the skin and skin hydration by assessing water concentrations and the effects of moisturizing factors [1-4]. Temporal and spatial variations of the penetration-enhancer DMSO in the stratum corneum were also studied [5]. Xiao et al. used the same technique for tracking phospholipids permeation into the skin [6-8]. More recently, Tfayli et al. used confocal Raman to follow up permeation of a drug, developed for the rosacea treatment, through the skin [9], and Wascotte et al. assessed the "skin reservoir" of urea [10]. In the above mentioned studies, considerable efforts have been expended on developing data analysis techniques to extract molecular and structural information, but very little work has been reported on extracting "accurate" spatial information along the Z axis dimension from data collected with confocal instruments.

Theoretically, one expects with confocal Raman microspectroscopy to improve the axial resolution of the volumetric data. Unfortunately, when a "dry" metallurgical objective (the most common configuration for Raman spectrometers) is used, the air / sample interface perturbs the confocal properties due to the light refraction . In fact, when the laser spot is focused over a sample surface, it is simple to correlate the physical position of the spot on the surface. However, when focusing below the sample surface (with a refractive index $n > 1$), the convergent laser beam will be refracted at the sample surface and the laser spot is shifted deeper into the sample. Therefore, it becomes more difficult to define the Z – coordinate and the focus volume (depth resolution) of the region under investigation [11-14].

To reduce the laser beam distortions, some authors used immersion objectives to avoid the problems induced by the air/sample interface (variation in the refractive index) [15], however,

for some studies, the use of metallurgical objectives is inevitable to avoid artefacts induced by the immersion oils or aqueous solutions.

To assess the refraction effect, Xiao et al. used multilayered systems constituted of several polymer films with refractive indexes close to those of the human skin. They estimated that the distortion effects lead to an underestimation of the depth value of 15-20 % [6]. In previous works, we used these values to correct the depth [9].

Everall [11,12], was the first author to point the misinterpretation of the data if the laser refraction is ignored, Everall modelled the distortion and the changes in the axial resolution (depth of focus) and in the axial position (Z- coordinate).

Batchelder and co-workers [16] extended the study of Everall by including the role of the confocal aperture (neglected in the Everall models).

A more complete study was performed by Sourisseau and co-workers [17,18] by taking into consideration, in addition of the diffraction effects, the off-axis laser intensity distribution in (x,y) directions, these authors made use of the rigorous vectorial electromagnetic framework developed by Török et al. [19-21]. They proposed a two-parameter relation for the modelling of the refraction and diffraction effects in order to calculate the in-depth Raman intensity variation, and a three-parameter relation to calculate the depth resolution (depth of collection).

In the present study, 12 and 30 μm thick poly (ethylene terephthalate) (PET) films, refraction index $n=1.575$ [22], and of the 5, 10, 16, 20, 40 and 50 μm thick microtomed skin slices, refraction index of stratum corneum $n=1.51$ [23]. Skin and PET were used to assess the differences between real and measured thicknesses.

PET films and skin slices were then deposited on silicon substrates to measure the variations in the axial resolution induced by various thicknesses of PET and skin.

We compared then the results obtained from experimental analysis and the theoretical estimations obtained from Everall, Batchelder and Sourisseau models.

In the last part of this work, we realised a confocal line map (depth profile), on excised human skin samples, to follow-up the penetration of Metronidazole, a drug produced by Galderma for Rosacea treatment[24].

We finally applied the Sourisseau theoretical model to correct the depth values (Z-coordinates) in this profile and to give more accurate estimation of the depth of diffusion of the Metronidazole in the skin.

Materials and methods

Skin sections and PET films:

Transversal skin sections were cut by cryo-microtome from cryo-fixed excised human skin. For the study of the in-depth resolution, slices of 5, 10, 16, 20, 40, 50 µm thick were deposited on silicon substrates. For the thickness assessment (depth), slices of 16 and 20 µm thicknesses were deposited on CaF₂ slides. These slides are optimized for Raman spectroscopy, they do not present any signal in the considered spectral range (620 –1810cm⁻¹). The refractive indexes of the skin have been determined at 1.34 for epidermis, 1.41 for dermis and 1.51 for stratum corneum [23]. The analysis were led at the stratum corneum (SC) level, being given that the SC is the outermost layer of the skin and is the first concerned for *in-vivo* or *ex-vivo* confocal Raman studies as well for drug tracking as for lesions detection. The phenylalanine band (1003 cm⁻¹) and the Amide I band (1656 cm⁻¹) were used as a spectral markers of the skin. For the 12 and 30 µm PET films, the refractive index is 1.575 [22], and the Raman vibration at 700 cm⁻¹ was used as spectral marker of PET.

Excised human skin:

Full thickness human skin (Biopredic International, Rennes, France), obtained from plastic surgery around the abdomen, was used. The skin was stored at -80°C until the date of the study.

For confocal Raman analysis, a 1.5x1.5 cm² square of skin were cut. The underside of the skin was plunged in a PBS medium (Invitrogen, UK) to maintain the hydration of the skin, and the stratum corneum was exposed to the air. Each spectral recording was 10 minutes long. Details about spectral acquisition are presented in the instrumentation paragraph.

Metronidazole solution:

The Metronidazole is a drug developed by Galderma (Sophia Antipolis, France) for Rosacea treatment. It mainly acts against pathogenic cutaneous anaerobic bacteria suspected to be the cause of the disease. For our analysis, 18 µg of Metronidazole were dissolved in 1 ml of Transcutol (Diethylen Glycol Monoethyl) (Gattefossé, France), a solvent employed in galenic formulation of the drug.

To study the penetration of the solution through the excised human skin, 20 µl of the solution were deposited on the surface of a 1.5 x 1.5 cm² square of skin; the time of diffusion was 1 hour for the first sample and 2 hours for the second. Analyses were repeated four times, an untreated skin sample as a blank test was also analyzed. After the diffusion period, the

skin surface was cleaned with a dry cotton swab. After that, Raman axial Z profiles were recorded. The Z profiles consist of an in-depth scanning through the skin, by collecting Raman spectra from -10 μm (above the skin surface) to 40 μm (under the skin surface) with 4 μm step increments. To follow the Metronidazole penetration we used the band at 1191 cm^{-1} of the drug solution.

Confocal Raman microspectroscopy

Raman spectral acquisitions were performed with a Labram microspectrometer (Horiba Jobin Yvon, Lille France). The excitation source was a titanium sapphire laser (Spectra Physics) generating single mode laser at 785 nm. Such a near infrared wavelength allows a good penetration of the light deeply in the skin, minimizes parasite fluorescence and does not cause any photochemical or thermal degradation. The power of the laser beam focalized on the sample was measured and maintained at 50 mW, which has been proved to be non-destructive for biological samples.

The microspectrometer is equipped with an Olympus microscope and measurements were recorded using a 100X PL FLUOTAR L objective (Leica Germany) ($\text{NA}= 0.75$, focal distance $f= 4.7 \text{ mm}$), and a 100X MPlan objective (Olympus, Japan) ($\text{NA}= 0.9$, $f= 0.21 \text{ mm}$). To realize Z profiles, objectives were mounted on a high precision piezoelectric focusing drive which allows vertical movements with a minimal step of 50 nm.

Light scattered by the tissue is collected through the same objective. Rayleigh elastic scattering is intercepted by a Notch filter which reduces its intensity by a 10^6 factor. A confocal pinhole rejects signals from out-of-focus regions in the sample. A multichannel CCD detector (Coupled Charge Device) (1024 x 256 pixels) detects the Raman Stokes signal dispersed with a 4 cm^{-1} spectral resolution by a holographic grating (950 grooves/mm). The spectral range was selected from 620 to 1810 cm^{-1} , the acquisition time of each spectrum was 2 accumulations of 10 seconds each, and two different diameters of the confocal aperture were used: 100 and 150 μm .

Spectral acquisition and data pre-processing were performed using Labspec software (Horiba Jobin Yvon SAS, Lille, France).

Data treatment:

The Raman data were analyzed with software, developed in house, that operates in the Matlab environment (The Matworks, Inc., Natick, Massachusetts). The software is based on

mathematical modeling of light paths (laser excitation and Raman scattering) in a material of refractive index n and through a confocal device.

Notations:

To clarify certain terms used in this paper, we think valuable to precise the following definitions. The axial resolution was designated by the term “depth of focus” when talking about the spread of the illumination along the z axis, and by the term “collection resolution” when talking about the volume from which the Raman signal is collected. The term “centre of gravity of illumination” was used to indicate the position of the mean value of the laser intensity distribution along the Z axis. The term “confocal line map” is used to designate the confocal Raman profiles. The term “nominal depth” designates the displacement of the objective which corresponds also to the same for the measured depth.

Results:

Theoretical approach and modeling:

Incident ray tracing:

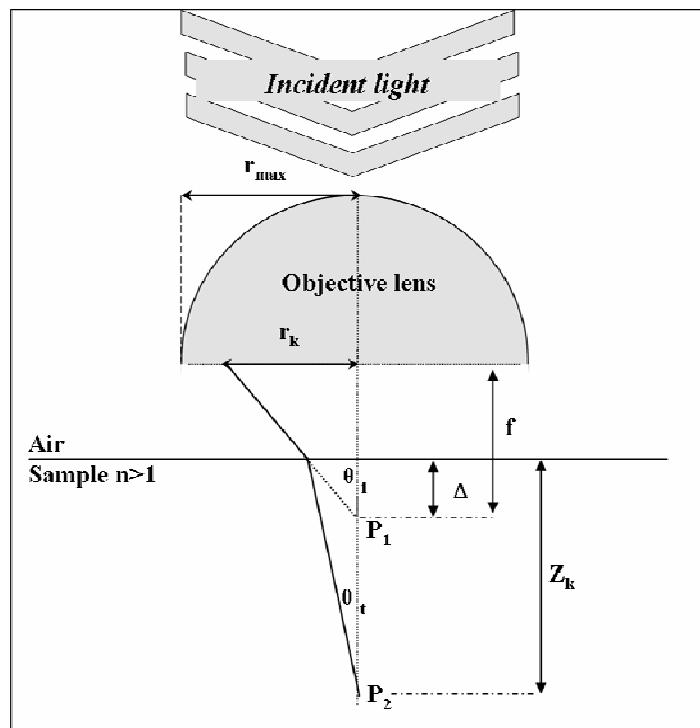


Figure 1: Ray tracing schematic representation. In case of no refraction, the light is focused at P_1 , with the refraction it is deviated to P_2

As shown in figure 1, when a ray originating from a radius r_k from the optical axis of the objective, is confronted to a material boundary it is deviated to focus point P_2 . If the refractive index of the material $n=1$, the ray will be directly focussed at point P_1 , Δ is defined as the distance between P_1 and the material surface. Δ is the nominal depth and corresponds to the objective displacement from the focalisation at the surface until the aimed depth.

If the refractive index $n \neq 1$ ($n>1$), the ray will be deviated deeper in the sample to point P_2 , we define Z_k as the distance between P_2 and the material surface. Z_k is the real depth.

In his analysis Everall [11] has determined Z_k using the followed expression:

$$z_k = \frac{\Delta}{f} \left[n^2 (r_k^2 + f^2) - r_k^2 \right]^{1/2} \quad (\text{Eq. 01})$$

f is the focal distance of the objective.

And with $0 \leq r_k \leq r_{\max}$; This relation can be expressed by using the normalised radius $m=r_k/r_{\max}$. m is defined as the pupil factor: $0 \leq m \leq 1$

The real depth will then be expressed as function of m :

$$z_m = \Delta \left[m^2 \cdot \frac{NA^2(n^2 - 1)}{(1 - NA^2)} - n^2 \right]^{1/2} \quad (\text{Eq. 02})$$

With NA , the numerical aperture of the objective.

This expression can be reduced to:

$$z_m = n \cdot \Delta \cdot M \quad (\text{Eq. 03})$$

With:

$$M = \sqrt{1 + \frac{m^2 \cdot NA^2(n^2 - 1)}{(1 - NA^2)n^2}} \quad (\text{Eq. 04})$$

Depth of focus (spread of the illumination along the z axis):

At a given nominal depth Δ , rays originating from the whole diameter of the objective are focused between $Z_{m=0}$ and $Z_{m=1}$. The depth of focus (d.o.f.) can be determined as:

$$d.o.f. = z_{m=1} - z_{m=0} = \Delta \left[\left[\frac{NA^2(n^2 - 1)}{(1 - NA^2)} - n^2 \right]^{1/2} - n \right] \quad (\text{Eq. 05})$$

This value will be used in the next part as the axial resolution for the Everall model, and will be noted: "**depth resolution (Ev)**".

Centre of gravity of the illumination (c.o.g.):

In his work, Everall showed that the laser intensity distribution along the axis follows the expression:

$$I(m) = I_0 \cdot e^{-2m^2 / \phi^2} \quad (\text{Eq. 06})$$

I_0 is the intensity for the axial irradiation ($I_0=1$), Φ is the filling factor: if $\Phi = 1$, laser diameter is equal to the objective diameter and we have optimum filling. If $\Phi > 1$, the objective is overfilled and the distribution is truncated at higher intensity values (less energy transmitted), while the converse holds $\Phi < 1$.

The laser intensity distribution described as function of m can be used to assess the "centre of gravity" (c.o.g.) of the illumination:

$$c.o.g. = \frac{\int m.z_m \cdot I(m) dm}{\int m.I(m) dm} \quad (\text{Eq. 07})$$

The position of the centre of gravity will be used as the corrected depth in the Everall model as "**depth (Ev)**".

Raman response:

In his model, Everall doesn't take into consideration the effect of the confocal aperture, and consider only the collection limitation due to the NA of the objective. He determined the NA "effective" which determines the region (volume) within the sample from which emitted photons can be captured by the objective. The following expression determines the weighting factor which corresponds to the square of the NA effective.

$$(NA_{eff})^2 = \frac{1}{n^2} \left[\frac{m^2 \cdot NA^2}{1 - NA^2 + m^2 \cdot NA^2} \right] \quad (\text{Eq. 08})$$

The Raman spatial response R_{Zm} (Ev) was then determined by simply multiplying the laser intensity distribution $m.I(m)$ by the weighting factor.

$$R_{Zm} = m.I(m).(\text{NA}_{eff}^2) \quad (\text{Eq. 09})$$

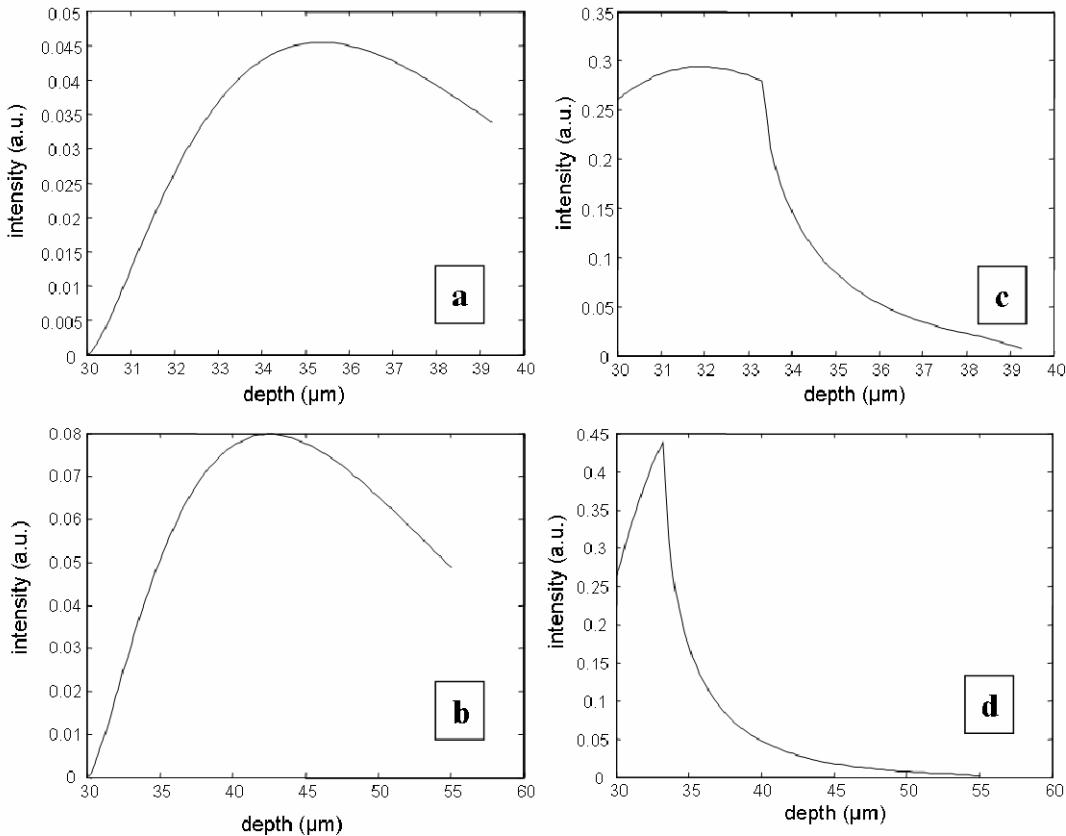


Figure 2: Distribution of Raman intensity along the z axis according to the value of m, at a nominal depth Δ of 20 μm . Comparison of the spatial Raman response repartition between the Everall model: **a**: with a 100X objective NA 0.75, **b**: 100X objective NA 0.9, and the Batchleder model: **c**: 100X objective. NA 0.75 and **d**: 100X objective NA 0.9

At a particular nominal depth Δ , the collected Raman intensity corresponds to the integration of the Raman spatial response (R_{Zm}) for m going from 0 to 1. Figures 2a and 2b show the R_{Zm} (**Ev**) distribution for a nominal depth of 20 μm using 100X objectives with NA 0.9 and 0.75 respectively.

Effect of the confocal aperture in the Raman collection:

Batchelder and co-workers showed that the Raman collection efficiency depends on the diameter of the "virtual" back-image ($2 \rho_0$) of the confocal aperture (h: confocal diameter) (figure 3).

$$h = 2\rho_0 \cdot MP \cdot G \quad (\text{Eq. 10})$$

MP is the magnification power of the objective (100X) and G is the enlargement of the lens located just in front of the confocal hole, G = 1.4 for the Labram instrument.

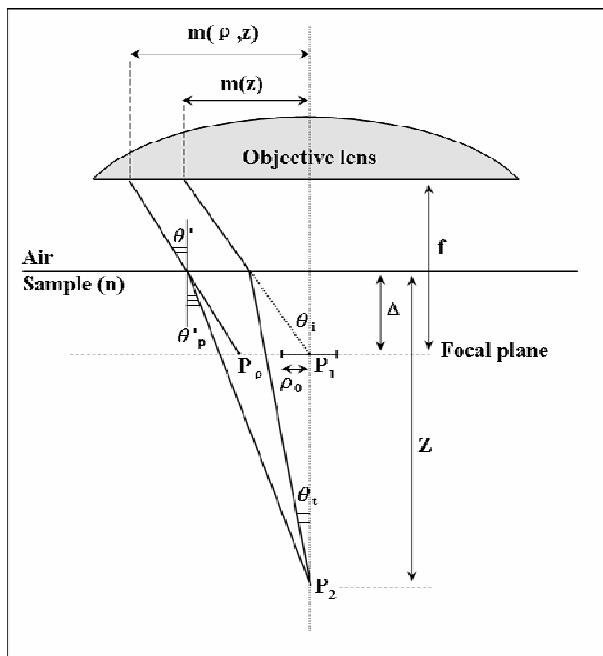


Figure 3: Schematic diagram representing the deviation of an incident ray to point P_2 and the back ray path of the diffused Raman light from P_2 . Note ρ_0 , the radius of the back-image of the confocal aperture

In figure 3, a ray originating from a given pupil factor m position is focused at P_2 . If we assume that the Raman scattering from point P_2 is spatially homogeneous, then the collection efficiency calculation requires to determine the fraction of the solid angle from point P_2 that is passed through the confocal aperture. The path of a ray scattered from P_2 with an angle θ'_p through the interface and towards the lens of the objective is traced in the scheme.

We can then determine the virtual image point P_p corresponding to the intersection of the virtual beam with the confocal aperture image plane. P_p is at a distant ρ from P_1 . From this geometrical representation we can write down the expression for ρ .

$$\rho = z_m \cdot \tan \theta' - \Delta \cdot \tan \theta'_p \quad (\text{Eq. 11})$$

This leads to the expression:

$$\rho = n\Delta \left[M(m) \cdot \tan \theta' - \frac{1}{\sqrt{\frac{1}{\tan^2 \theta'} - (n^2 - 1)}} \right] \quad (\text{Eq. 12})$$

If $-\rho_0 < \rho < \rho_0$, the ray passes through the confocal aperture and can reach the detector. Limiting angles θ_P , θ_Q and θ_R were determined by Batchelder and co-workers [16]. These

angles determine the forbidden zone; i.e., the ray will pass through the confocal aperture only if $0 < \theta' < \theta_P$ or $\theta_Q < \theta' < \theta_R$.

Numerical methods were proposed to determine these angles for each m value, so that the total collection solid angle is then expressed as:

$$\Omega = 2\pi(1 - \cos \theta_P + \cos \theta_Q - \cos \theta_R) \quad (\text{Eq. 13})$$

Collection resolution (depth resolution according to Batchelder model):

To calculate the mean focal depth (Z_{moy}) and the collection resolution (c.r.), we need only to introduce the solid angle Ω in the expression of the mean focal depth of illumination from equation 07 [16]:

$$z_{moy} = \frac{\int m.I(m)z_m \Omega \cdot \frac{dz}{dm} dm}{\int m.I(m) \frac{dz}{dm} dm} \quad (\text{Eq. 14})$$

Where dz/dm can be calculated using the expression:

$$\frac{dz}{dm} = \frac{\Delta.m.NA^2(n^2 - 1)}{(1 - NA^2)n.M} \quad (\text{Eq. 15})$$

Z_{moy} will be used as the corrected depth according to the Batchelder model "**depth (Bat)**".

The collection resolution can be defined as the distance in which the light intensity falls to 50% of its maximal value. This can be determined by the following expression [16]:

$$c.r.(Bat) = \left\{ \frac{\int_0^1 m.I(m)z_m^2 \Omega^2 \cdot \frac{dz}{dm} dm}{\int_0^1 m.I(m) \frac{dz}{dm} dm} - z_{moy}^2 \right\}^{1/2} \quad (\text{Eq. 16})$$

This value will be considered as the corrected depth resolution according to the Batchelder model "**depth resolution (Bat)**".

Spatial distribution of the collected Raman intensity (Batchelder model):

To determine the z profile of the collected Raman intensity, Batchelder multiplied the illumination intensity by Ω , the fraction of the solid angle passed through the confocal aperture (figure 2c and 2d). In our study, we determined the position of the maximal collection intensity of each nominal depth value "**depth (pos.max)**", and we compared it to the corrected depths proposed by Everall and Batchelder.

The Raman response intensity for each value of the nominal depth can be determined by integrating the collected Raman intensity profile.

Sourisseau model for intensity and depth of focus estimation:

Sourisseau and co-workers extended the study of Batchelder and by adding supplementary term in order to take into account the diffraction effects and the off-axis diffusion.

Without solving the problem, they assumed that the experimental Raman intensities can be described by the following relation:

$$I_{\text{exp.Raman}} = I(\Delta) = A.(\text{theor.calc.}) \left(1 + \frac{2\Delta}{B} \right) \quad (\text{Eq. 17})$$

A and B are two normalisation factors that can be determined from the first two values from the experimental profile and the Batchelder model intensity.

To determine the depth resolution "**depth resolution (Sour)**", they used a three-parameter relation:

$$\text{depth..resolution} = a.(1 + e^{(-b.\Delta)}) + c \quad (\text{Eq. 18})$$

a, b and c can be determined from the first three experimental measurements values and the Batchelder model resolution. This analytical expression leads to a plateau limit of the resolution.

In the next part, we will compare the depths and the depth resolutions determined by the experimental Raman profiles with the theoretical values of the different models.

Experimental approach:

Depth:

As shown in the previous chapter, the nominal depth Δ , determined by the displacement of the objective along the Z axis, does not correspond to the real value of the depth of the region under investigations (figure 1).

From a confocal Raman line-map through a sample with a determined thickness (Z), it is possible to measure the difference between the real thicknesses (Z) and the nominal thicknesses (Δ) in an experimental manner. For this, we simply need to determine a starting point or zero position (end of the first regime (air) and the start of the second regime (sample)) and an end point position (end of the second regime (sample)) (figure 4).

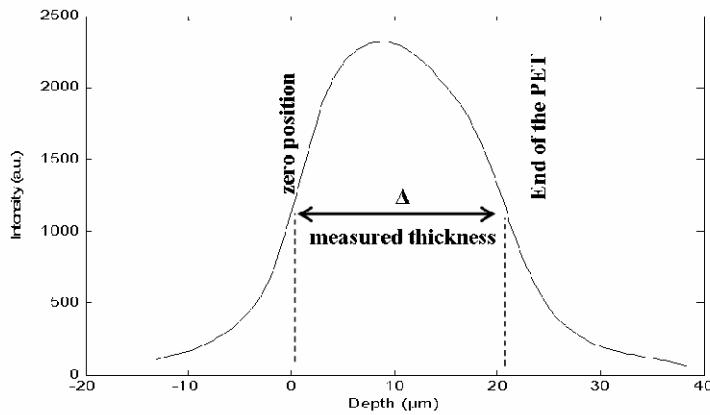


Figure 4: Example of confocal line-map through a $30\text{ }\mu\text{m}$ PET film ($n=1.575$) using a NA 0.9 objective, with a confocal aperture of $150\text{ }\mu\text{m}$. The measured thickness (Δ) is $20\text{ }\mu\text{m}$, while the real thickness (Z) is $30\text{ }\mu\text{m}$. Note the zero position and the end point position

It is generally admitted to locate the starting point or the zero position at half of the intensity maximum reached at the end of the first regime (air). This is justified by the fact that when focusing on the sample surface, the centre of gravity of illumination is located at the sample boundary; which means that only the half of the laser spot is inside the sample.

The end point position can be determined in the same manner, by considering the end of the second regime (sample) when the half of the laser spot of focus is outside the sample.

When scanning through the sample, from zero position to the end point, the laser spot of focus moves from the first air/sample interface (end of the first regime), to the second interface (end of the second regime), scanning the whole thickness of the sample (Z). To determine the nominal depth or nominal thickness Δ , we need simply to subtract the zero point position from the end point position (figure 4). Once the nominal depth determined, we can proceed to calculate the modelised thicknesses.

To compare nominal, real and modelised depths (thicknesses), we made use of PET films ($n=1.575$) of 12 and $30\text{ }\mu\text{m}$ thickness, and thin skin sections ($n=1.51$ for the stratum corneum) of 16 and $20\text{ }\mu\text{m}$.

PET films: To follow the PET signal intensity variation and to trace the confocal line-map of PET, we use the Raman band at 700 cm^{-1} of the PET.

In tables 1 and 2 we compare the values of real, nominal and modelised depths for 100 and $150\text{ }\mu\text{m}$ confocal aperture diameter, and for two different objectives (NA 0.75 and 0.9).

Table 1: Comparison between real, nominal and modelised depths for a NA 0.75, 100X objective, using PET films.

objective	100X, NA 0.75							
Confocal aperture	100 µm				150 µm			
Real depth	Nominal depth	Depth (Ev)	Depth (Bat)	Depth (pos. max)	Nominal depth	Depth (Ev)	Depth (Bat)	Depth (pos. max)
12 µm	11 µm	19.4 µm	20 µm	18.6 µm	10.4 µm	18.6 µm	18.9 µm	17.1 µm
30 µm	19.6 µm	34.6 µm	35.6 µm	33.6 µm	19.6 µm	34.6 µm	35.6 µm	33.7 µm

Table 2: Comparison between real, nominal and modelised depths for a NA 0.9, 100X objective, using PET films.

objective	100X, NA 0.9							
Confocal aperture	100 µm				150 µm			
Real depth	Nominal depth	Depth (Ev)	Depth (Bat)	Depth (pos. max)	Nominal depth	Depth (Ev)	Depth (Bat)	Depth (pos. max)
12 µm	8.2 µm	17.4 µm	18.3 µm	14.9 µm	8.4 µm	17.8 µm	18.7 µm	15.9 µm
30 µm	18 µm	38.2 µm	40.1 µm	30.9 µm	18 µm	38.2 µm	40.1 µm	31.8 µm

The tables 1 and 2 show that, for low depth values, the nominal depth is relatively close to the real depth values, especially with the NA 0.75 objective, and the models give estimations much higher than the real depth. For higher depth values, the nominal depth is around 19.6 µm with NA 0.75 objective, and 18 µm with the NA 0.9 objective. At this depth, all models give reasonable depth estimations for the NA 0.75, but with an over estimation of about 4 µm. On the other hand, when using the NA 0.9 objective, the Everall and the Batchelder models give highly over estimated values, with an error around 12 µm. Only the "**depth (pos.max)**" gives a good corrected depth value with an estimation of 31.8 µm and 30.9 µm (confocal aperture diameter of 150 µm and 100 µm respectively) for a 30 µm PET film.

Skin sections: To trace the confocal line-map of the skin we used the Amide I band (1650-1670 cm⁻¹) intensity variation along with depth (Z).

When working on the skin, the intensity of Raman signal falls dramatically when we pass from 150 µm to 100 µm confocal aperture diameter (data not shown). Therefore, we present here the only depths obtained from the 150 µm confocal aperture.

Table 3: Comparison between real, nominal and modelised depths in the skin. Using two different 100X objectives, NA 0.75 and 0.9 respectively.

objective	100X, NA 0.75				100X, NA 0.9			
Confocal aperture	150 μm				150 μm			
Real depth	Nominal depth	Depth (Ev)	Depth (Bat)	Depth (pos. max)	Nominal depth	Depth (Ev)	Depth (Bat)	Depth (pos. max)
Skin 16 μm	10.4 μm	17.4 μm	17.8 μm	16.1 μm	7.6 μm	15.3 μm	15.9 μm	13.9 μm
Skin 20 μm	14.4 μm	24 μm	24.7 μm	22.9 μm	11.2 μm	22.2 μm	23.4 μm	18.8 μm

The table 3 shows that the estimation values for the 16 μm skin sections are relatively acceptable for all theoretical models. Otherwise for the 20 μm skin sections, the Everall and Batchelder models give over estimated values. The "depth (pos.max)" gives the most reasonable estimation for the real depth values.

Depth resolution:

The depth of focus can be measured by focusing the laser beam just above a silicon wafer, and measuring the 521 cm^{-1} band intensity as the objective moves down. The full width at half-maximum of the silicon signal gives an indication of the depth of the laser focus. However, the silicon profile appears to be slightly asymmetric. This is due to a very small penetration depth of the incident light into silicon [17]. Therefore, the axial depth of focus is estimated by taking twice the value of the left half-width at half-maximum (figure 5).

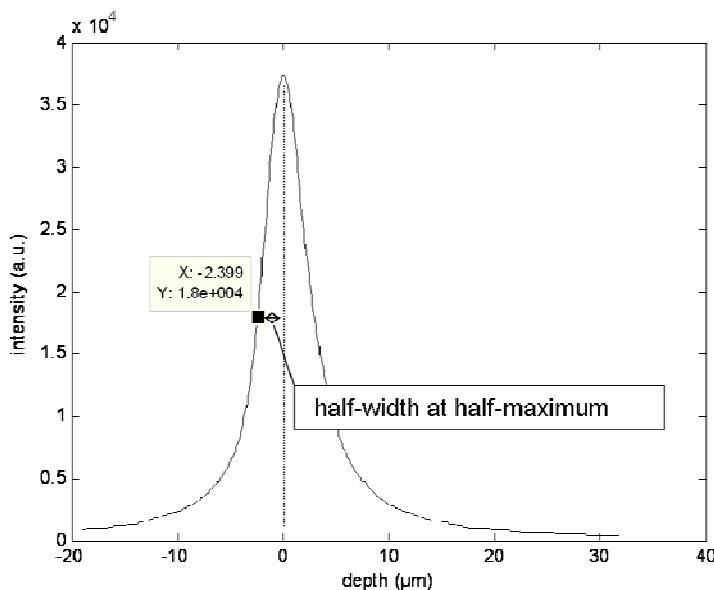


Figure 5: Confocal line map constructed on the 521 cm^{-1} band intensity of silicon, the depth resolution measurement corresponds to twice the half-width at half-maximum

To measure the depth resolution through the skin, 5, 10, 16, 20, 40 and 50 μm skin sections were deposited on silicon wafers, and we then proceeded as described above.

In table 4, we compare the depth of focus between NA 0.75 and NA 0.9 100X objectives, at different depths under the skin.

Table 4: Comparison between depth resolutions measured with NA 0.75 and NA 0.9 objectives, for a 150 μm confocal aperture diameter

objective	100X, NA 0.75	100X, NA 0.9
	Real depth resolution	Real depth resolution
Si	7.7 μm	4.8 μm
5 μm of skin	8 μm	5.2 μm
10 μm of skin	8.2 μm	5.3 μm
16 μm of skin	9.3 μm	6 μm
20 μm of skin	8.8 μm	8 μm
40 μm of skin	11 μm	12.3 μm
50 μm of skin	9.3 μm	14.8 μm

The axial resolution of the NA 0.9 objective, at low depth values, is higher than the resolution with the NA 0.75. While the laser spot of focus position moves down through the skin, its resolution decreases progressively. This decrease is much more important with the NA 0.9 objective. These experimental measurements are in agreement with the analytical analysis of Batchelder, Everall and Sourisseau [11-14,16-18].

Nominal depth determination: To calculate the theoretical depth resolution following Everall, Batchelder, and Sourisseau models, we need to determine the value of the nominal depth Δ . With the experimental measurements, we dispose only of the real thickness of the samples (Z). For example, when measuring the depth of focus under 20 μm of skin surface, the laser spot of focus moves 20 μm down from the surface, but the objective displacement must be determined from the confocal line map.

The table 5 presents nominal depths Δ estimated from Z values using theoretical models (Everall model) for the skin sections ($n=1.51$).

Table 5: Estimation of the nominal depth (objective displacement) for different real depth values, with two different objectives

	Real depth (μm)	5	10	16	20	40	50
100X, NA 0.75	Nominal depth (μm)	3	6	9.6	12	24	30
100X, NA 0.9	Nominal depth (μm)	2.5	5	8	10	20	25

The nominal depth values are then used to determine theoretical values of depth of focus.

In table 6, we compare the real depth resolution measured experimentally with a NA 0.9 100X objective, for 100 and 150 μm confocal aperture diameter respectively. The measured values were compared with the estimated resolution values calculated by using the models of Everall, Batchelder and Sourisseau.

Table 6: Comparison between real depth resolutions and estimated resolution values

objective pinhole	100X, NA 0.9				100X, NA 0.9			
	100 μm				150 μm			
	Real resolution	depth resolution (Ev)	depth resolution (Bat)	depth resolution (Sour)	Real resolution	depth resolution (Ev)	depth resolution (Bat)	depth resolution (Sour)
Si	4.68				4.74			
5 μm of skin	4.64	3.15	3.51		5.16	3.15	3.63	
10 μm of skin	4.84	6.29	5.38		5.29	6.29	6.47	
16 μm of skin	6.04	10.07	6.48		6.00	10.07	8.32	
20 μm of skin	5.68	12.58	6.92	6.55	7.96	12.58	9.06	7.67
40 μm of skin	10.16	25.16	7.99	9.09	12.28	25.16	11.06	11.01
50 μm of skin	10.68	31.46	8.28	10.36	14.78	31.46	11.64	12.68

As we can see in Table 6, the Everall model gives the same values for both 100 μm and 150 μm confocal apertures. This model induces a dramatically decrease in the resolution value that is, under 50 μm thick section of skin, 3 times the real depth resolution.

Batchelder and Sourisseau models give a relatively acceptable estimation of the depth resolution. The first three values of the Sourisseau models were used to find out the values of a, b and c in the Eq. 18, they correspond exactly to the real depth values.

The resolution values in Table 6 are plotted in figure 6.

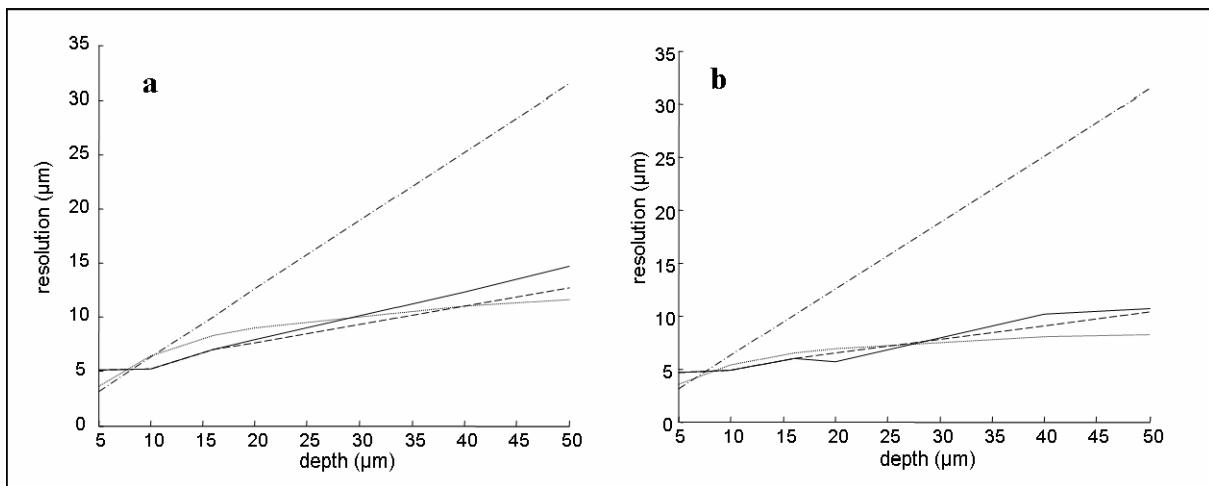


Figure 6: Comparison of resolution variation with depth with a confocal aperture of $150\mu\text{m}$ (a), and $100\mu\text{m}$ (b). Real resolutions are plotted with a solid line, Sourisseau resolution estimation with dashed line, Batchelder estimation with dotted line, Overall estimation with a dotted-dashed line

Follow-up permeation of Metronidazole through excised human skin and correction of the confocal line-maps:

In this part we tried, first, to follow-up the permeation of the Metronidazole solution in the skin after 1h and 2h of diffusion. Raman confocal line-maps were then recorded in order to trace the variation of the intensity of the drug signal through the skin.

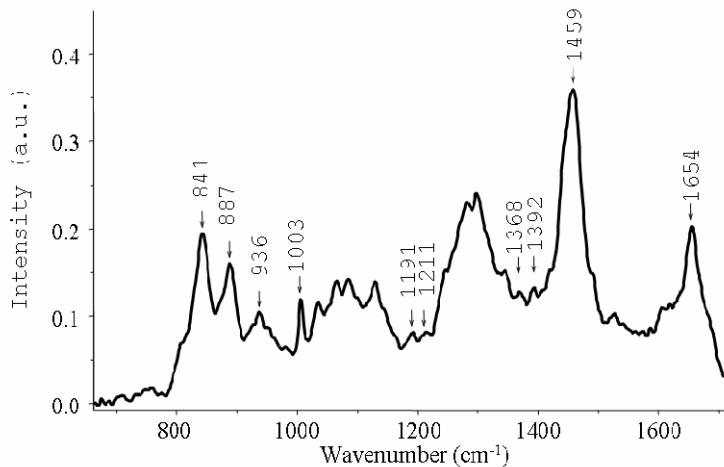


Figure 7: Spectrum of the Metronidazole solution in the skin

In these confocal line-maps, we used the phenylalanine band at 1003 cm^{-1} as a marker for the skin. Given that the quantity of drug on and/or in the skin was very small, and that it was highly diluted in the Transcutol; it was crucial to find some vibrations of the Metronidazole in spectral regions where the skin and the Transcutol do not present any Raman signal. The

comparison (data not shown) of spectra of Transcutol, of Metronidazole in its solid state, of Metronidazole diluted in Transcutol, and of the skin enabled us to select the band at 1191cm^{-1} as a marker for the Metronidazole for the diffusion experiments (figure 7).

Figure 7 shows a spectrum measured below the skin surface ($30\mu\text{m}$). It contains features of both skin and Metronidazole. Indeed, Raman bands of the skin such as the phenylalanine band at 1003 cm^{-1} , the Amide I and the Amide III bands (secondary structure of the proteins), or the CH deformation band at 1460 cm^{-1} can be found. For the Metronidazole solution, we can identify two intense bands at 841 and 887 cm^{-1} , and other vibrations at 1191 , 1368 and 1392 cm^{-1} .

Even though the intensity of the bands at 841 and 887cm^{-1} is higher than that of the 1191cm^{-1} vibration, they are superimposed with skin Raman contribution. In the opposite, at 1191 cm^{-1} the skin does not present any Raman signal.

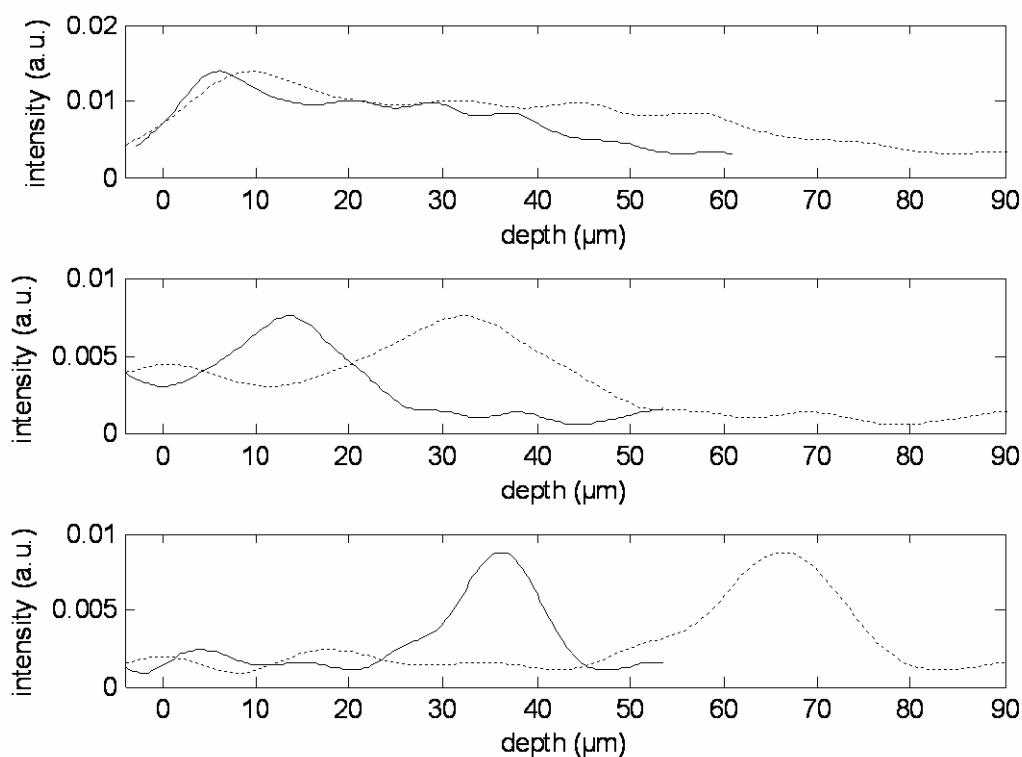


Figure 8: Raman confocal line-maps representing: a: the variation of the intensity of the skin signal, b: the variation of the intensity of the Metronidazole 1h after its deposition on the skin surface, and c: the variation of the intensity of the Metronidazole 2h after its deposition on the skin surface. In full lines: measured confocal line-maps, dotted line: corrected line-maps. (confocal aperture: $150\text{ }\mu\text{m}$, objective 100X , NA 0.9).

To evaluate the Metronidazole penetration, we needed to determine first the position of the surface of the skin (zero position), by using the method described in the first part of the experimental results. For this, we traced confocal line-maps following the phenylalanine band intensity, and determined the zero position (skin surface). To facilitate the comparison of the data, the abscise axes were shifted in a manner that the surface position corresponds to zero (figure 8a).

We compared then, the skin depth profile (figure 8a) with confocal line-maps of the Metronidazole permeation, 1 hour (figure 8b) and 2 hours (figure 8c) after the topical application of the solution on the skin.

After 1 hour diffusion, the Metronidazole is detected between 6 and 20 μm (nominal depths) under the skin surface. 1 hour later, the Metronidazole is mainly detected between 34 and 42 μm (nominal depth) under the surface.

In a second time, we tried to trace confocal line-maps representing the corrected depth values. Giving a more precise idea of the real depths of diffusion of the Metronidazole (figure 8b, 8c (dotted lines)).

For the corrections, the position of the maximum of collection, "depth (pos.max)", was used. This correction model gave more accurate results than the models developed by Everall and Batchelder.

After correction, the Metronidazole diffusion, 1 hour after drug application, goes from 20 μm down to 42 μm . 2 hours after the drug application, the Metronidazole can be detected from 60 μm down to 75 μm .

Discussion

As it was already shown by previous works [11-14,16-18], the nominal depth Δ cannot be considered as the real depth value. To determine the real depth Z , some authors used a correction factor of 20% of the nominal depth [6,9]. Meanwhile, as we showed with the experimental and the theoretical approaches, the relation between Z and Δ depends on optical elements (the magnification and the NA of the objective, the confocal aperture diameter) and on material to be analyzed (the refractive index of the sample). Therefore, a constant value cannot be fixed as a correction factor; each depth and each analysis must be treated as a separate case according to its corresponding parameters (n , NA and h).

Depth determination experiments showed that, at low depth values, the difference between the nominal depth and the real depth is small. But, deeper we focus under the skin, higher is the error of measurement. The estimated depth values, according to Batchelder and Everall models, gave an overestimation of the real depth. A more valuable estimation was found by using the position of the maximum of the spatial Raman response, "depth (pos.max)". Meanwhile, all these estimations tend to give an approximate idea about the real depth value, but remain far to represent an accurate estimation.

It is worthy to note, that working on the skin, like all other biological tissues, is much more complex than with simple polymer films models. The heterogeneity of the skin and the fluctuations on the section surface, add artefacts and make the real estimation harder to modelise. Moreover, the difference in the refractive index between the different layers of the skin (1.51 for the stratum corneum, 1.41 for the dermis and 1.34 for the epidermis) make the analysis more complex. Therefore, in our study, we limited the analysed zone at the stratum corneum to avoid additional refractions.

In the second part of the experimental results, we showed, using home-made Matlab calculation software, that the Everall model gives an overestimation of about three times the real value. Meanwhile, Batchelder and Sourisseau models give very acceptable depth resolution estimations.

The advantage of the confocal Raman line-maps is that they offer structural, chemical and physical information from deep layers of the skin and they can reveal its interaction with exogenous agents and drugs without any destructive treatment. The main limitation of this analysis is the error on the depth of the region from which we have this information. In this study, we tried to correct this misestimation by applying correction models based on physical laws of geometrical optics. The corrected confocal depth profiles show a much more accuracy on the real analysed depths. The models allow also to access the real axial resolution of these measurements. The real and corrected values of Metronidazole diffusion indicated in this work are given to assess the extent of the correction. A more robust study on the diffusion properties of this drug will be led by including a statistical approach of the data collection and by taking into account the skin heterogeneity.

Conclusion

This study shows the dramatic effect of beam light distortion in the precision of confocal Raman microanalysis. It presents also the possibility to correct the experimental data in order to access to more accurate values. At the level of the skin, this work could be of interest in the tracking of dermatological drugs as we have shown with the Metronidazole, and could be also easily extended to cosmetic problematics.

References

1. Caspers PJ, Lucassen GW, Carter EA, Bruining HA, Puppels GJ: In vivo confocal Raman microspectroscopy of the skin: noninvasive determination of molecular concentration profiles. *J Invest Dermatol* 2001;116:434-442.
2. Caspers PJ, Lucassen GW, Puppels GJ: Combined in vivo confocal Raman spectroscopy and confocal microscopy of human skin. *Biophys J* 2003;85:572-580.
3. Chrit L, Hadjur C, Morel S, Sockalingum G, Lebourdon G, Leroy F, Manfait M: In vivo chemical investigation of human skin using a confocal Raman fiber optic microprobe. *J Biomed Opt* 2005;10:44007.
4. Sieg A, Crowther J, Blenkiron P, Marcott C, Matts PJ: Confocal Raman microspectroscopy - Measuring the effects of topical moisturisers on stratum corneum water gradients in vivo. In The international society of optical engineering (ed): SPIE. 2006.
5. Caspers PJ, Williams AC, Carter EA, Edwards HG, Barry BW, Bruining HA, Puppels GJ: Monitoring the penetration enhancer dimethyl sulfoxide in human stratum corneum in vivo by confocal Raman spectroscopy. *Pharm Res* 2002;19:1577-1580.
6. Xiao C, Flach CR, Marcott C, Mendelsohn R: Uncertainties in depth determination and comparison of multivariate with univariate analysis in confocal Raman studies of a laminated polymer and skin. *Appl Spectrosc* 2004;58:382-389.
7. Xiao C, Moore DJ, Flach CR, Mendelsohn R: Permeation of dimyristoylphosphatidylcholine into skin - structural and spatial information from IR and Raman microscopic imaging. *Vib Spectrosc* 2005;38:151-158.
8. Xiao C, Moore DJ, Rerek ME, Flach CR, Mendelsohn R: Feasibility of tracking phospholipid permeation into skin using infrared and Raman microscopic imaging. *J Invest Dermatol* 2005;124:622-632.
9. Tfayli A, Piot O, Pitre F, Manfait M: Follow-up of drug permeation through excised human skin with confocal Raman microspectroscopy. *Eur Biophys J* 2007;under press.
10. Wascotte V, Caspers P, de Sterke J, Jadoul M, Guy RH, Preat V: Assessment of the "Skin Reservoir" of Urea by Confocal Raman Microspectroscopy and Reverse Iontophoresis in vivo. *Pharm Res* 2007;24:1897-1901.
11. Everall NJ: Confocal Raman Microscopy: why the depth resolution and spatial accuracy can be much worse than you think. *Appl Spectrosc* 2000;54:1515-1520.
12. Everall NJ: Modeling and measuring the effect of refraction on the depth resolution of Confocal Raman Microscopy. *Appl Spectrosc* 2000;54:773-782.
13. Everall NJ: www.spectroscopyonline.com. Depth profiling with confocal Raman Microscopy, Part II, Spectroscopy DOI: www.spectroscopyonline.com.
14. Everall NJ: www.spectroscopyonline.com. Depth profiling with confocal Raman Microscopy, Part I, Spectroscopy DOI: www.spectroscopyonline.com.

15. Vyorykka J, Paaso J, Tenhunen M, Tenhunen J, Iitti H, Vuorinen T, Stenius P: Analysis of depth profiling data obtained by confocal Raman microspectroscopy. *Appl Spectrosc* 2003;57:1123-1128.
16. Baldwin KJ, Batchelder DN: Confocal Raman Microspectroscopy through a Planar Interface. *Appl Spectrosc* 2001;55:517-524(518).
17. Bruneel JL, Lassègues JC, Sourisseau C: In-depth analyses by confocal Raman microspectrometry: experimental features and modeling of the refraction effects. *J Raman Spectrosc* 2002;33:815-828.
18. Bruneel JL, Lassègues JC, Sourisseau C: Aspects expérimentaux concernant les analyses en profondeur en microspectrométrie Raman Confocale. . In *Journée Spectroscopie 2001*.
19. Torok P, Varga P, Booker GR: Electromagnetic diffraction of light focused through a planar interface between materials of mismatched refractive indices: structure of the electromagnetic field. I. *J. Opt. Soc. Am. A* 1995;12:2136-2144.
20. Torok P, Varga P, Konkol A, Booker GR: Electromagnetic diffraction of light focused through a planar interface between materials of mismatched refractive indices: structure of the electromagnetic field. II. *J. Opt. Soc. Am. A* 1996;13:2332-2338.
21. Torok P, Varga P, Laczik Z, Booker GR: Electromagnetic diffraction of light focused through a planar interface between materials of mismatched refractive indices: an integral representation. *J. Opt. Soc. Am. A* 1995;12:325-332.
22. Parker-TexLoc: http://www.texloc.com/closet/cl_refractiveindex.html. In, Parker-TexLoc.
23. Knuttel A, Boehlau-Godau M: Spatially confined and temporally resolved refractive index and scattering evaluation in human skin performed with optical coherence tomography. *J Biomed Opt* 2000;5:83-92.
24. Galderma: <http://www.galderma.com/>. In, Galderma laboratories.

Ch.III.6 – Perspectives

Outre le "screening" de molécules, les travaux de recherche à venir pourraient porter sur :

- Un réglage optimal de l'instrumentation en jouant sur l'ouverture du trou confocal et sur les paramètres optiques des objectifs ;
- Le développement de modèles mathématiques prenant en compte les sauts d'indice de réfraction entre la couche cornée, l'épiderme et le derme ;
- coupler l'analyse en Raman à d'autres techniques de détection comme l'OCT par exemple ;
- analyser autres types de peau reconstruite et réaliser des études comparatives de diffusion avec la peau normale ;

A retenir :

- **L'utilisation de la microspectroscopie Raman confocale permet de suivre la diffusion de molécules exogènes, sans aucun marquage, à travers les couches cutanées.**
- **Elle permet aussi de mettre en évidence des changements moléculaires et / ou structuraux au niveau des constituants cutanés résultant d'interactions entre les molécules exogènes et la peau.**
- **La comparaison des spectres de l'Episkin et de la peau excisée révèle des différences spectrales, traduisant des différences structurales qui pourraient affecter les interactions principe actif / modèle biologique utilisé ; et par conséquent influencer la vitesse de diffusion des principes actifs.**
- **Les marqueurs spectroscopiques spécifiques des différentes structures de l'Episkin (surface et matrice sous-jacente) peuvent être utilisés i- pour contrôler la profondeur d'analyse et, ii- pour contrôler la qualité du modèle étudié.**
- **Sur un système présentant une interface avec un saut d'indice de réfraction (air / peau), la réfraction de la lumière induit une perte en résolution axiale et une estimation fausse de la profondeur de l'analyse.**
- **Des modèles mathématiques, permettent de corriger ces effets de réfraction au niveau du laser incident et de la diffusion Raman.**

CHAPITRE IV
APPLICATION DE LA SPECTROSCOPIE RAMAN IN VIVO EN MILIEU
CLINIQUE : DISCRIMINATION DES LESIONS CUTANEES



Ch.IV.1 : Introduction

Les études présentées précédemment ont montré le potentiel de la spectroscopie Raman d'une part pour suivre la diffusion d'un principe actif sur un bloc de peau excisée, et d'autre part pour caractériser des lésions tumorales au niveau de coupes fines de biopsies. Ces études, *in-vitro* et *ex-vivo*, ne sont réalisables qu'au sein de laboratoires de recherche et ne tiennent pas compte de l'intégrité et des propriétés du tissu vivant (vascularisation cutanée...).

Dans le but de développer l'approche Raman vers des applications cliniques, nous avons testé une nouvelle instrumentation. Ce nouvel appareil est constitué d'un spectromètre de géométrie axiale, couplé à une fibre optique (SEDI Fibre Optics, France). Ce système permet des analyses *in-vivo* directement sur les patients. L'appareil utilisé est un prototype, et les tests réalisés au sein de l'unité MéDIAN permettent d'améliorer les performances de l'instrument dans le cadre d'une collaboration entre l'unité MéDIAN et Horiba Jobin Yvon.

Ch.IV.2 : Description du spectromètre axial (Figure Ch.IV.1)

Outre sa compacité, la principale caractéristique du spectromètre est sa géométrie axiale ; avec la présence d'un "grism" (prisme + grating) comme élément de dispersion. Ainsi les axes d'entrée et de sortie du spectromètre sont confondues. Le "grism", double système dispersif constitué d'un prisme et d'un réseau gravé sur la face de sortie du prisme, permet une très bonne résolution spectrale ($\approx 2 \text{ cm}^{-1}$). Ce système associé à la géométrie tubulaire axiale diminue fortement les aberrations (Coma chromatique, astigmatisme, ...) et les distorsions des rayons lumineux.

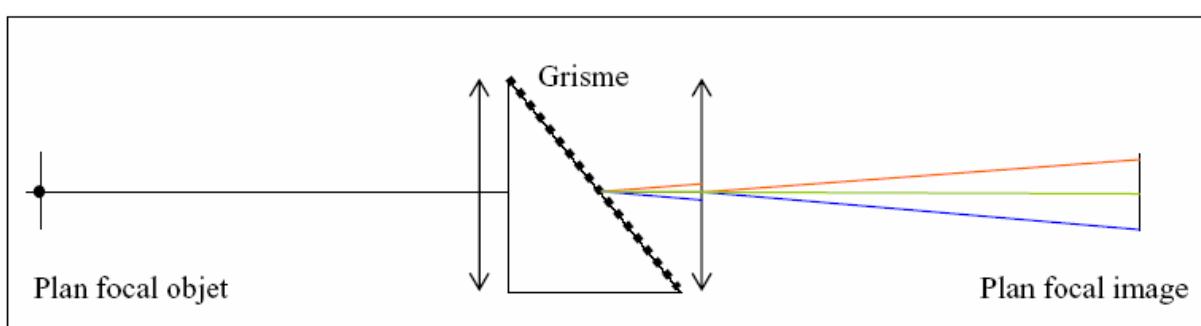


Figure Ch.IV.1 : Schéma de principe d'un spectromètre axial

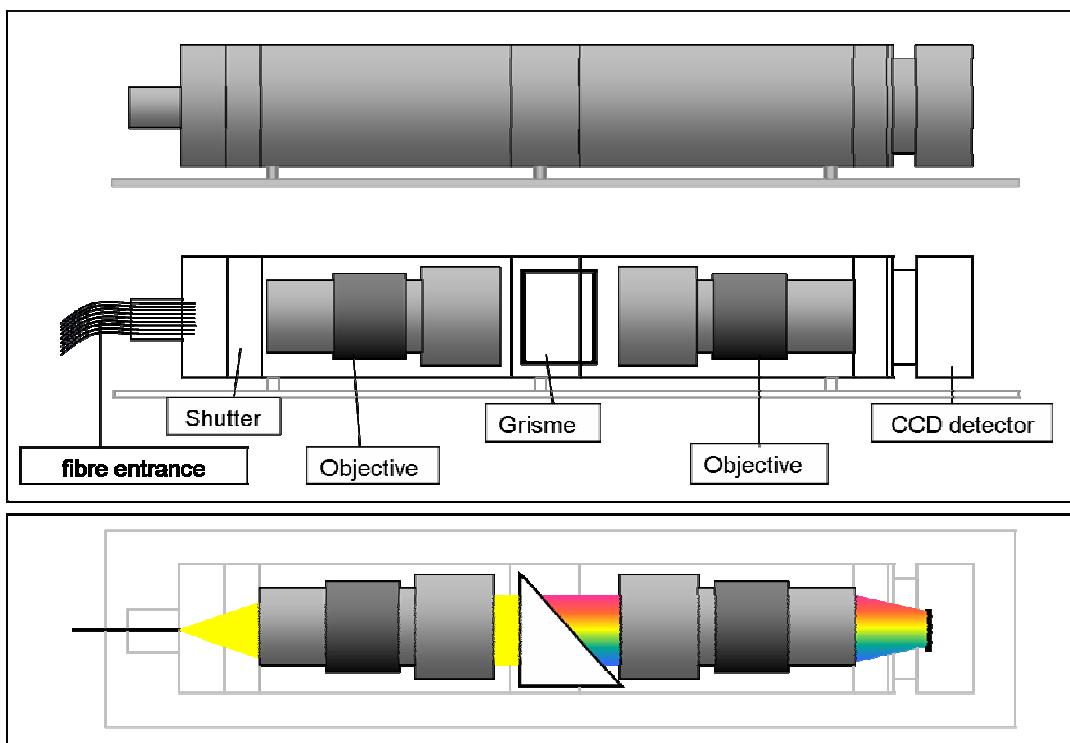


Figure Ch.IV.2 : Dessin d'un spectromètre axial Jobin Yvon

Pour collecter le signal, le spectromètre est couplé à une sonde de mesure telle que par exemple un "bundle" de fibres optiques. Le laser d'excitation est acheminé par une fibre centrale de 400 µm de diamètre ; Le signal Raman est collecté par neuf fibres périphériques de 200 µm de diamètre. Au niveau de la connexion avec le spectromètre, ces fibres collectrices sont alignées selon la fente d'entrée du spectromètre ; perpendiculairement à la direction de la dispersion.

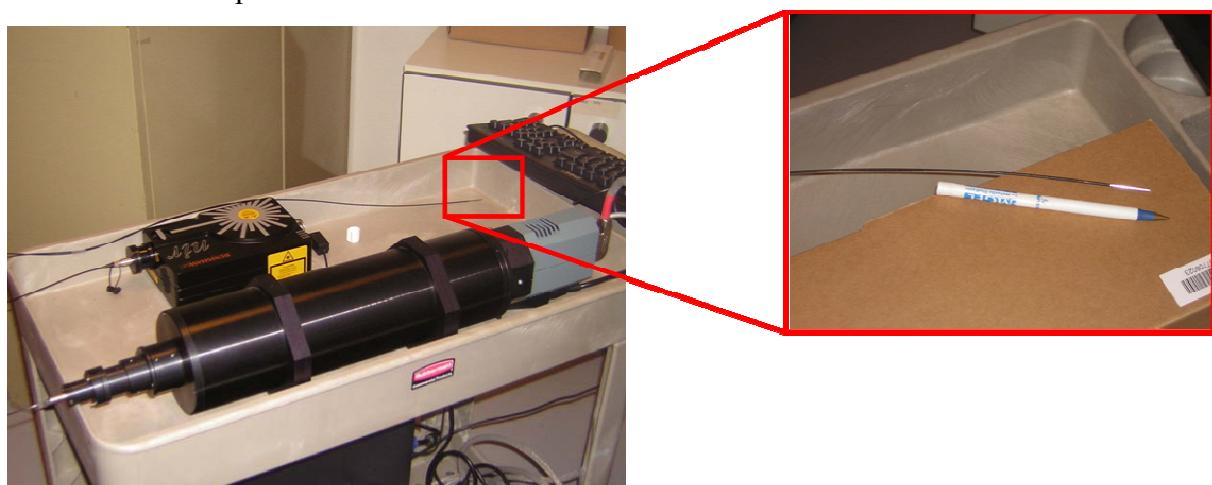


Figure Ch.IV.3 : Couplage du spectromètre à une fibre optique

Ch.IV.3 : Proceeding of SPIE : In vivo analysis of tissue by Raman microprobe: examination of human skin lesions and esophagus Barrett's mucosa on an animal model

Contexte

La détection précoce des cancers cutanés est primordiale pour un traitement efficace. Les spectroscopies vibrationnelles, absorption Infrarouge et diffusion Raman, sont de plus en plus utilisées pour la détection, la classification et la caractérisation de la peau et de ses lésions. Le but de ce travail est de tester l'efficacité d'un nouveau système de mesure Raman, dédié aux analyses *in-vivo*. Pour ceci des tests sur des produits de références ont été réalisés, ensuite des mesures *ex-vivo* et *in-vivo* ont été menées.

Méthodes

Les produits de références correspondant à des produits purs sous forme de poudre. Ces produits, dont les raies de vibration sont bien identifiées, sont utilisées pour la calibration des spectromètres. Les spectres des acides aminés, phénylalanine et tyrosine, ont également été enregistrés. Les mesures *ex-vivo* ont été réalisés sur des œsophages de rats, dans le cadre d'une étude portant sur la muqueuse de Barrett. L'approche *in-vivo*, quant à elle, a été menée sur des patients consentant, hospitalisés dans le service de Dermatologie du CHU de Reims.

Résultats

Les mesures réalisées sur les produits de référence et les acides aminés donnent des signatures spectrales de très bonne qualité avec des temps d'acquisitions de quelques secondes. Pour les mesures *ex-vivo* et *in-vivo*, le signal est fortement bruité et présente une forte contribution des fibres optiques. Il est néanmoins possible de corriger ce signal parasite de façon à obtenir des signatures spectrales spécifiques des tissus, permettant une identification des organes de l'appareil digestif du rat (*ex-vivo*) et des lésions cutanées de type carcinome basocellulaire chez l'homme (*in-vivo*).

Conclusion

Les résultats ne présentent pas véritablement d'intérêt clinique mais ont permis d'évaluer l'efficacité et les limitations de ce premier prototype instrumental. Au regard de ces résultats, des améliorations techniques ont pu être apportées (filtrage optique des sondes, longueur d'onde d'excitation...).

In vivo analysis of tissue by Raman microprobe: examination of human skin lesions and esophagus Barrett's mucosa on an animal model

Ali Tfayli *^a, Olivier Piot ^a, Sylvie Derancourt ^b, Guillaume Cadiot ^c, Marie Danielle Diebold
^c, Philippe Bernard ^b and Michel Manfait ^a

^a Unité MéDIAN UMR CNRS 6142, UFR Pharmacie, 51 rue Cognacq Jay, 51096 Reims Cedex; France.

^b Service de Dermatologie, CHU Robert Debré, Avenue du Général Koenig, 51092 Reims Cedex ; France.

^c Service d' Hepato-gastro-enterologie, CHU Robert Debré, Avenue du Général Koenig, 51092 Reims Cedex; France

ABSTRACT

In the last few years, Raman spectroscopy has been increasingly used for the characterization of normal and pathological tissues. A new Raman system, constituted of optic fibers bundle coupled to an axial Raman spectrometer (Horiba Jobin Yvon SAS), was developed for *in vivo* investigations. Here, we present *in vivo* analysis on two tissues: human skin and esophagus mucosa on a rat model.

The skin is a directly accessible organ, representing a high diversity of lesions and cancers. Including malignant melanoma, basal cell carcinoma and the squamous cell carcinoma, skin cancer is the cancer with the highest incidence worldwide. Several Raman investigations were performed to discriminate and classify different types of skin lesions, on thin sections of biopsies. Here, we try to characterize *in vivo* the different types of skin cancers in order to be able to detect them in their early stages of development and to define precisely the exeresis limits.

Barrett's mucosa was also studied by *ex vivo* examination of rat's esophagus. Barrett's mucosa, induced by gastro-esophageal reflux, is a premalignant state that has to be carefully monitored due to its high risk of evolution in adenocarcinoma. A better knowledge of the histological transformation of esophagus epithelium in a Barrett's type will lead to a more efficient detection of the pathology for its early diagnosis. To study these changes, an animal model (rats developing Barrett's mucosa after duodenum – esophagus anastomosis) was used. Potential of vibrational spectroscopy for Barrett's mucosa identification is assessed on this model.

Keywords: portable Raman spectrometer, *in vivo* Raman spectroscopy, skin lesions, basal cell carcinoma, Barrett's esophagus.

Biomedical Vibrational Spectroscopy III: Advances in Research and Industry,
edited by Anita Mahadevan-Jansen, Wolfgang H. Petrich,
Proc. Of SPIE Vol. 6093, 609312, (2006) 1605-7422/06/\$15 . doi: 10.1117/12.645874

1. INTRODUCTION

Vibrational spectroscopies are increasingly used techniques for the characterization of biological tissues. The spectral analysis reveals hidden information at microstructural and molecular levels. Moreover the *in vitro* and *ex vivo* applications have established the potential of these techniques for detecting and diagnosing different types of lesions. Several works were successfully realized to differentiate cancerous from benign tissues on thin sections of biopsies on colon [1, 2, 3], cervix [4, 5], stomach [6-7], breast [8], skin [5, 9, 10, 11], Barrett's epithelium [12] and oral carcinoma [13].

For *in vivo* diagnosis, Raman spectroscopy is one of many optical methods investigated in the recent years, it presents the advantage of permitting a non destructive analysis, not expensive, not hindered by the aqueous nature of tissues. Moreover, it does not require a previous sample preparation and it is a rapid technique enabling a real-time spectral acquisition. In 1997 M.G. Shim *et al.* [14] described a fibered Raman system and presented *in vivo* spectra from buccal cheek epithelium, human skin, finger nail and tooth. Since that, several *in vivo* works were realized on atherosclerotic plaque [15], skin [16], colon [17] and esophagus [17].

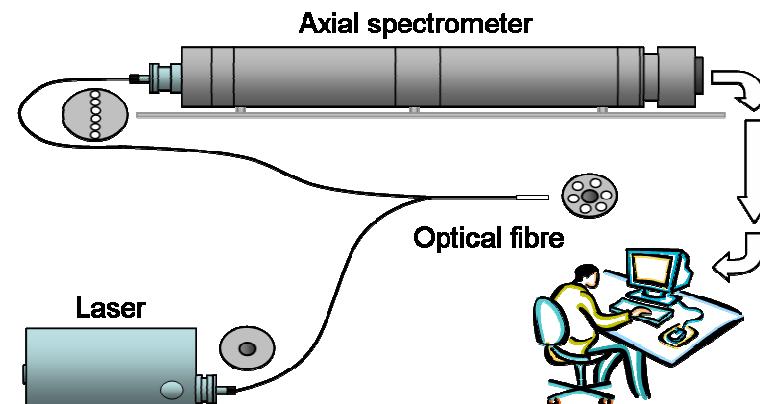
For this work a new miniaturized spectrometer (Horiba Jobin Yvon, France) was used, the main particularity of this spectrometer is its size (60 cm length) which makes it easy to transport into operation rooms for *in situ* clinical direct application on patients. The first step of our study was the validation of the efficiency of the spectrometer; spectra were collected first from pure products generally used for spectrometers calibration, and then spectra of some amino acids and standard proteins were collected.

The second step consisted of *ex vivo* and *in vivo* applications. For the *ex vivo* study, a rat model having undergone an esophagus duodenum anastomosis was used. The *in vivo* study was realized on consenting patients who present skin cancer directly before the chirurgical intervention. The quality of the Raman spectra collected from the tissues was reduced mainly by the fluorescence of the fused-silica fiber core and by the fluorescence of the tissue itself. The spectral analysis enabled however a good separation between cancerous and normal skin. This work was principally realized to validate the efficiency of the new portable Raman system. The main limitation of the quality of spectra was the signal induced by the fiber optic probe, to resolve this problem new fiber probes especially dedicated for Raman scattering in near infrared region will be used in the future.

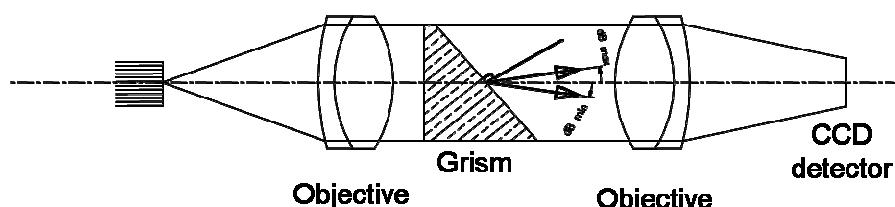
2. EXPERIMENTAL ASPECT

2.1 Portable Raman system

A description of the set up, a portable Raman system coupled to a bundle of optical fibres is presented in Figure 1. The axial spectrometer has been developed by Horiba Jobin Yvon (France) with the aim to be a portable, high throughput Raman system. The spectrometer has an axial geometry 60 cm long without any movable component. The dispersion of the signal is done by a GRISM, conjugation of a prism and a grating that is deposited on the output face of the prism. The spectrometer is equipped with a charge-coupled device, CCD (Andor Technology) as detector and Peltier-cooled at -65°C. With this new dispersive component, the spectral resolution reaches remarkably 2 cm^{-1} .



A: Global view of the setup



B: Details of the optical components of the axial spectrometer

Figure 1: Global schematic view of the setup (A), and detailed view of the axial spectrometer (B).

Excitation and scattered (elastic and Raman) light are transported through a bifurcated fibre-optic bundle (SEDI Fibres Optics, France). The 830 nm wavelength excitation, delivered by a diode laser (Renishaw, United Kingdom), has been chosen for i/ the significant decrease of tissue fluorescence compared to a more energetic excitation and ii/ providing a good penetration of the light in the tissue. This is particularly important for early diagnosis of skin

cancers, in which malignancy takes birth in the basal cells layer located at the dermis / epidermis interface, roughly 100 – 150 µm below the skin surface.

At the distal end, 9 collection fibres of 200 µm-diameter core surround the delivery fibre of 400 µm-diameter core, whereas at the proximal end, the collection fibres are aligned along the entrance slit of the spectrograph. Their numerical aperture is 0.22. With this geometry, the area from which the scattered light is gathered from the tissue is maximized and full advantage is taken of the binning capabilities in the vertical direction of the CCD detector without compromising spectral resolution. To ensure a good transmission of the near infrared signal, low OH silica fibres, constituted of pure silica core and doped silica cladding, were chosen. The size of the bundle has been limited to 1.6 mm-diameter in order to be incorporable into an endoscope. The materials are medically sterilizable.

The output power at the central delivery fibre was 110 mW, which does not present any danger for *in vivo* application. Collection time for each spectrum was 30s. Furthermore, the set-up was EC-certified.

2.2 Validation tests

Before the *in vivo* application of the portable Raman system, some tests were realized to check the efficacy, the accuracy, the resolution and the required acquisition time. Firstly, spectra of pure products like benzene and naphthalene were measured. Secondly, spectra were collected from amino acids such as phenylalanine and tyrosine, and from elastin.

Reference products spectra

Benzene and naphthalene are commonly used in Raman spectroscopy as reference products due to their high quality spectra with intense and well identified narrow bands. The figures 2 and 3 present a comparison between spectra realized with the portable Raman system and a classic Labram spectrometer (Horiba Jobin Yvon SAS, France). For the acquisition with the Labram we used a 50X objective with 2 seconds of accumulation time, this time was reduced to 0.2 seconds with the portable spectrometer. Spectra were collected from powder of both naphthalene and benzene.

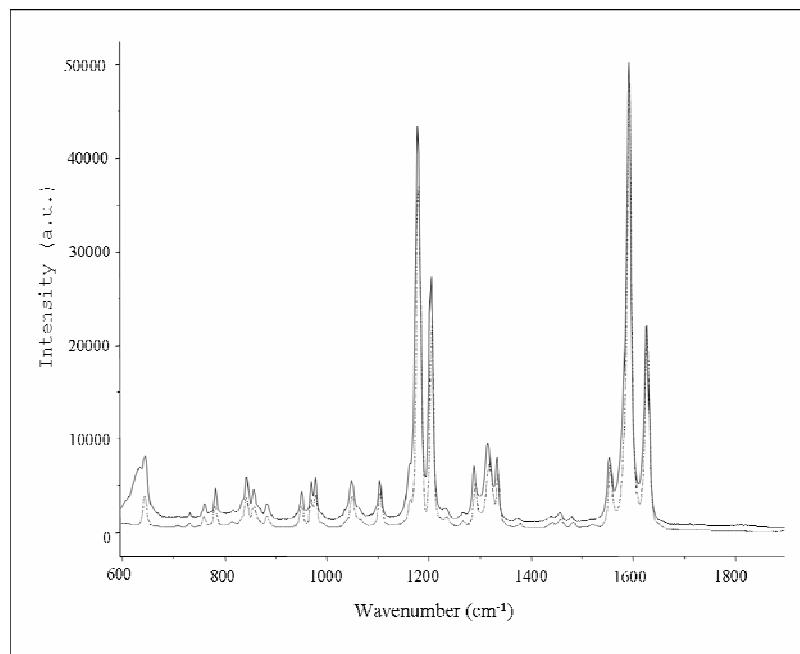


Figure 2: Spectra of benzene recorded with the Labram (dotted line) and the portable spectrometer (connected line).

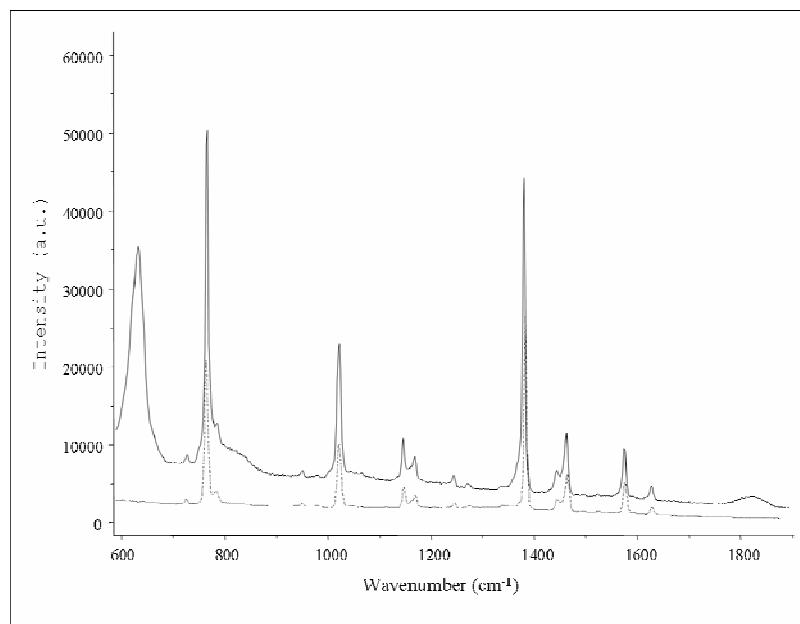


Figure 3: Spectra of naphthalene recorded with the Labram (dotted line) and the portable spectrometer (connected line).

On the benzene spectrum, the fiber contribution can be visualized by a narrow band at 630 cm⁻¹. On the naphthalene spectrum the fiber signal presents a fluorescence baseline and two bands at 1825cm⁻¹ and 630cm⁻¹. For these two products the Raman spectra were minimally affected by fiber contribution showing the efficiency of the new spectrometer with a very short acquisition time.

Phenylalanine, Tyrosine and elastin spectra

Phenylalanine and tyrosine are amino acids present in the majority of proteins. They present high quality Raman spectra with intense bands, some of these bands can be used to quantify proteins in tissues (1004 cm^{-1} for the phenylalanine), others can give information about the structural conformation (Fermi doublet of the tyrosine at 830 and 850 cm^{-1}).

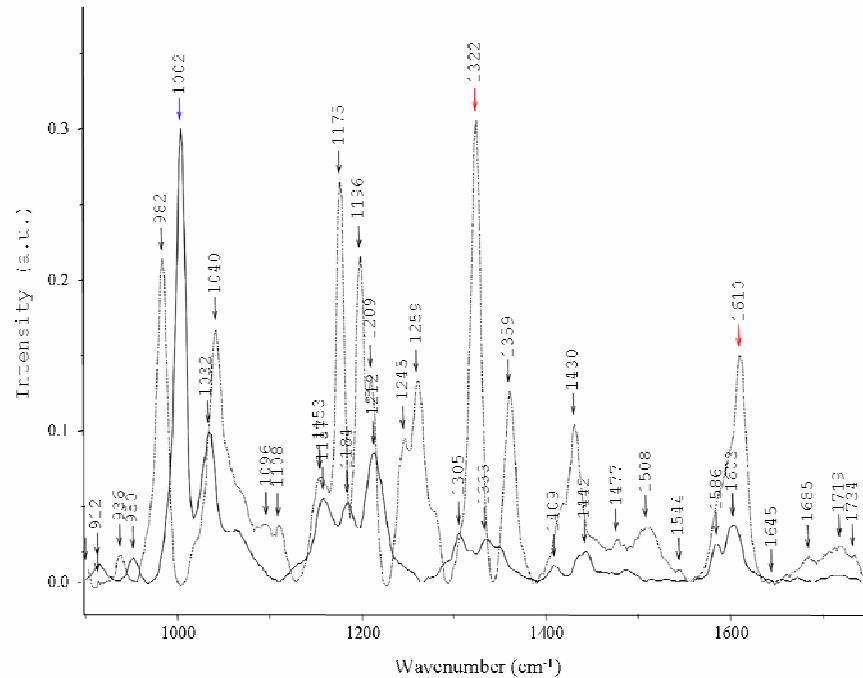


Figure 4: Spectra of phenylalanine and tyrosine in the $900\text{-}1750\text{cm}^{-1}$ region, recorded with the axial spectrometer.

The spectra of phenylalanine and tyrosine collected with the axial spectrometer (Fig. 4) present all the vibration bands of both amino acids, none of the bands is masked by the fiber signal and the fluorescence baseline is very low. The simple structure of these products and their high Raman response enables to obtain good quality spectra, even with an acquisition time of 0.2 second.

To test the quality of spectra from more complicated structures, we measured the Raman spectrum of elastin fibers.

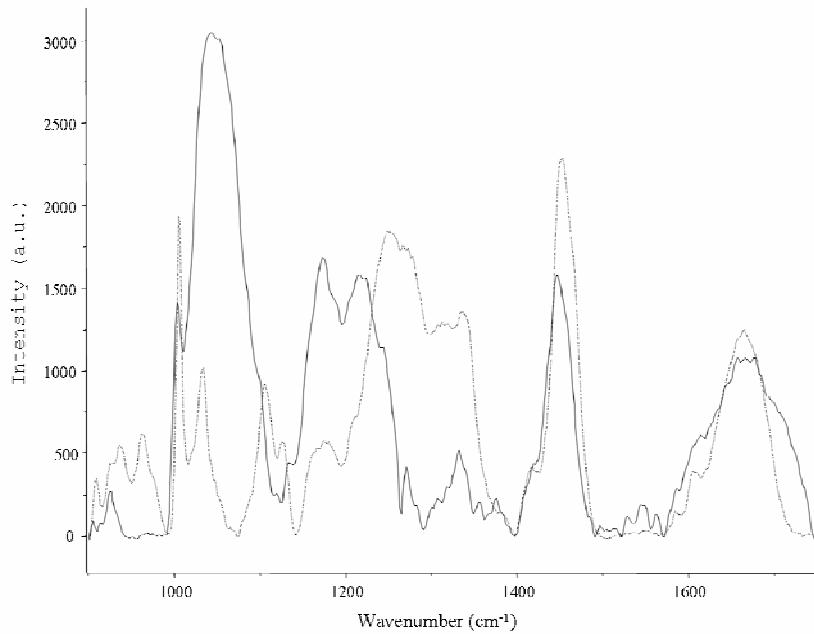


Figure 5: Comparison between elastin spectra recorded with a classic Labram system (dotted line) and the portable Raman system (connected line).

When working on more sophisticated molecular system, the signal to noise ratio decreases significantly if we compare the fibered system results with classic spectrometer spectra. This is due to the reflectivity properties on the surface of the elastin, its high fluorescence and its weak Raman signal. In spite of the contribution of the fiber optic probe especially between 1020 and 1290 cm⁻¹, we can identify the Amide I band, the CH deformation band at 1410cm⁻¹ and the phenylalanine peak at 1004 cm⁻¹. The spectra collected from such structures need to be corrected, and the fiber fluorescence and signal must be eliminated before any classification test or structural analysis test.

2.3 *Ex vivo* and *in vivo* analysis

On biological tissues, the spectra collected *in vivo* present a very intense fluorescence baseline which masks the tissues signal and spectra need to be corrected before any classification.

Spectral data pre-processing

The spectra recorded on tissue, skin or esophagus, present an intense signal below 1100 cm⁻¹ due to the silica signal (Figure 6). A typical spectrum of biological tissue collected on a thin section with Labram microspectrometer (Horiba Jobin Yvon) is also presented. In order to avoid taking into account this contribution in treatment of tissue spectra, the spectral window

was reduced from 1000 to 1800 cm^{-1} (upper spectral limit with the axial dispersive system). On this reduced region, silica fibre contribution can be mathematically corrected by a polynomial baseline correction, available on the LabSpec software (Horiba Jobin Yvon SAS). All tissue spectra were corrected on the 1000 - 1800 cm^{-1} region by the same baseline function. A more accurate correction should consider the detector response as a function of the frequency and the silica fibre signals collected on different types of tissue. This last signal, being generated by back reflected laser and scattered Rayleigh beam of the tissue, whose optical properties (optical index, reflectivity) are specific, is consequently dependent of the analysed tissue. For example, it should be checked if keratinisation of the tissue induces a reflectivity change.

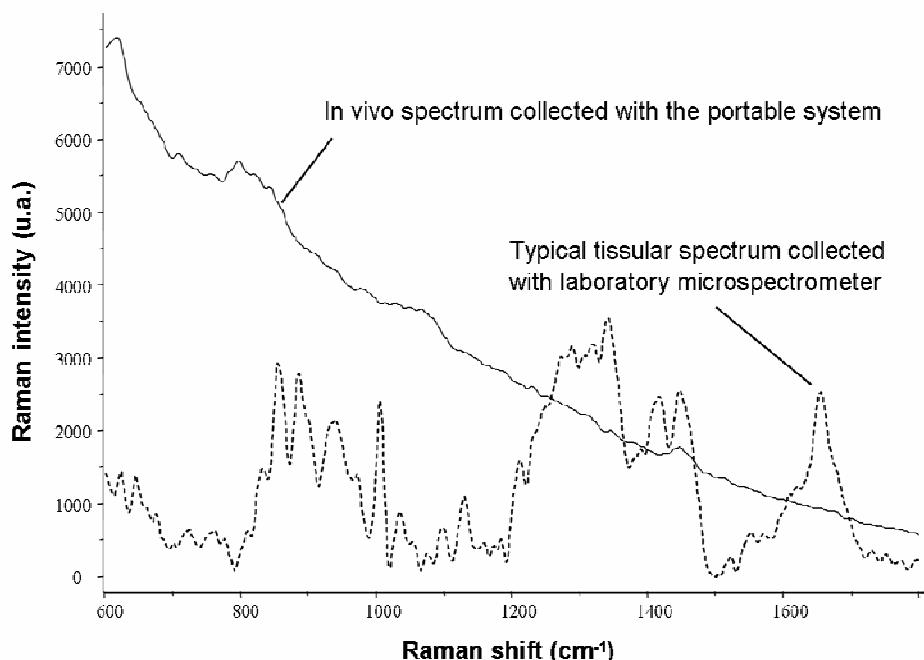


Figure 6: Overall view of an in vivo spectrum and of a typical spectrum of epithelial tissue.

Multivariate analysis

Hierarchical cluster analysis (HCA) was performed using the OPUS software (Bruker Optik GmbH, Germany) to classify the spectral data. A thorough description of this statistical analysis can be found in Tfayli, *et al.* (2005). The result is visualised in a tree-like diagram (dendrogram), presenting the regrouping of the spectra in clusters according to a heterogeneity scale.

Ex vivo analysis of Barrett's mucosa

Although the oesophagus cancer represents only 4% of death by cancer, it is nowadays markedly increasing due to alimentary habits. Adenocarcinoma, one of the two types of oesophageal tumour, is very dangerous because of its high metastasis risk, what leads to a very pessimistic prognosis with a survival rate at 5 years of 5 to 10%. This esophageal adenocarcinoma develops from a Barrett's mucosa that corresponds therefore to a pre-cancer status. The risks of evolution of a pathological mucosa in adenocarcinoma are directly related with a late diagnosis of a Barrett's metaplasia. There are three different types of Barrett's metaplasia: cardial (or junctional), fundic (or gastric) and specialized (or intestinal). Simultaneous presence of different types can be found in composite mucosa. Only the specialized type is likely to evolve in adenocarcinoma, and requires a particular medical following. If the diagnosis of Barrett's epithelium is not established in early stages, the therapeutic solution, when possible, consists in a total esophagectomy, a delicate surgical intervention that alters the quality of life for the patient.

Moreover, the clinical detection of Barrett's epithelium in the early stages is difficult by endoscopic technique because the diseased mucosa is often confused with a banal infection such as esophagitis. This diagnosis consists of performing multiple biopsies, at regular intervals, on all the suspicious part of the esophagus. More than twenty biopsies can be done on the same patient. A histological analysis is afterwards necessary to precise the type of pathology, and also to define the type of metaplasia in case of Barrett mucosa. In vitro studies of Barrett's mucosa, led by us and other [12,18] by infrared or Raman microspectroscopy on thin tissue sections, cut from snap frozen biopsies, showed that vibration spectra of normal and Barrett's epithelium can be clearly discriminated. Moreover, we have recently showed (data not shown) that vibrational microspectroscopy can also discriminate different types of metaplasia particularly cardial and specialized types of Barrett's mucosa.

The objective here is to develop an optical tool, suitable for in vivo analysis, which will permit to target biopsies by diagnosing the specialized (intestinal) areas of the epithelium during endoscopic examination of the pathological esophagus. In order to show the feasibility of Raman spectroscopy for in vivo detection and classification of Barrett's epitheliums, a rat model having undergone an esophagus - duodenum anastomosis was used. Barrett's mucosa is likely to take place in esophagus epithelium by acidification of the esophagus by gastric liquid (Figure 7).

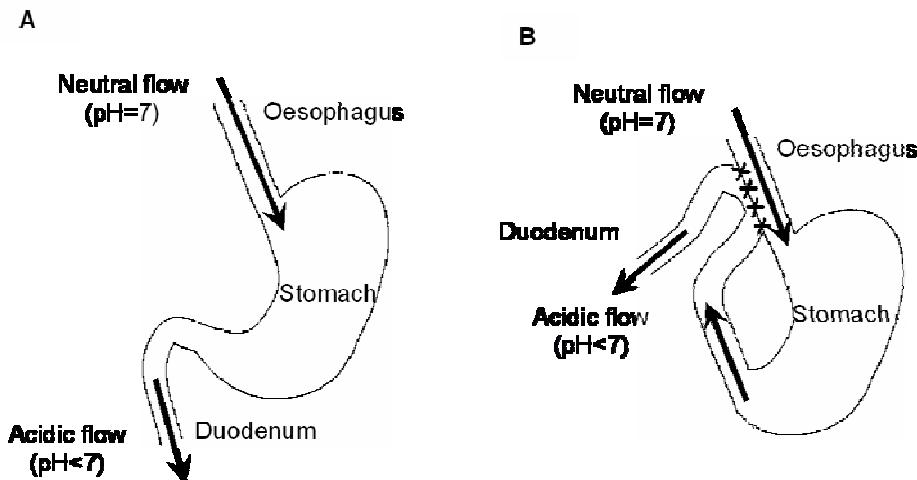


Figure 7: A/ Schematic view of a normal digestive tract. B/ Acidification of the oesophagus by oesophagus – duodenum anastomosis.

The primary objective of this rat model was a clinical and biochemical approach to study the development of Barrett's mucosa induced by gastro-esophageal reflux. Six months after the surgical anastomosis, the rats were sacrificed and digestive apparatus was taken for analysis of the pathological esophagus. Opportunity of recording spectra was given. A first set of spectra was collected on the outer tissue of the organs (esophagus, stomach, rumen and duodenum). And a second set of spectra was corresponding to the inner tissue of the organs after their dissection. Unfortunately, despite of a protocol referenced in the scientific literature, the anastomosis and the induced reflux were not sufficient for the development of a Barrett's metaplasia on the esophagus mucosa. Consequently, recording of in vivo Raman spectra of Barrett's mucosa and discrimination from normal tissue and between the different types was not possible in this first study. Only spectra of normal tissue were collected on the different organs, attempts of classification of the spectra were then performed in the aim to regroup spectra of the same organ.

As for spectra of the skin, an intense signal of the fused-silica fiber is superimposed with the tissue signal. And a similar pre-processing (elimination of the spectral region where the fiber gives a very intense signal, baseline correction on the retained spectral region, smoothing...) was performed on the set of spectra. For data clustering by Hierarchical Classification Analysis (HCA), the spectral windows $1040 - 1110$ and $1250 - 1330 \text{ cm}^{-1}$ were selected. The results for spectra, collected on the inner tissue of stomach, duodenum and esophagus after dissection, are presented by the dendograms of the Figures 8 and 9. On the esophagus,

distinction was done between spectra collected on the anastomosis zone and spectra collected at points distant from the anastomosis.

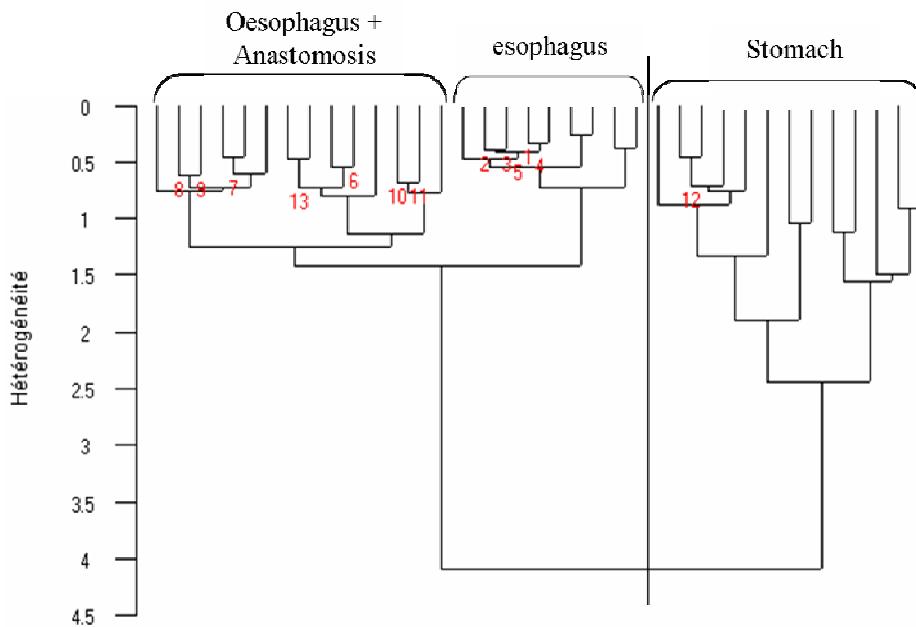


Figure 8: Dendrogram showing the separation between ex vivo Raman spectra of oesophagus and stomach.

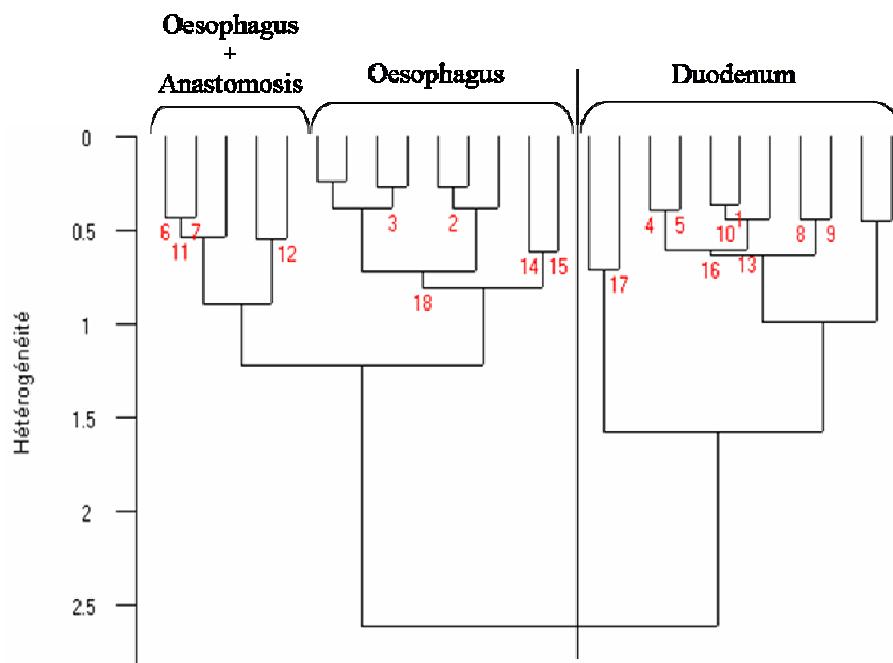


Figure 9: Dendrogram showing the separation between ex vivo Raman spectra of oesophagus and duodenum.

In the first dendrogram (Figure 8), the statistical treatment bears on spectra collected ex vivo on stomach and oesophagus, after dissection. A clear separation between the two organs is

visible. In the cluster regrouping spectra of the oesophagus, two sub-clusters can be distinguished: one corresponding to spectra of oesophageal tissue and the other to a mix of spectra collected on the intact oesophagus and on the anastomosis zone (altered tissue). No distinction between spectra of the non altered oesophagus and spectra of the anastomosis was obtained with HCA. A very comparable result was obtained with spectra collected ex vivo on duodenum and oesophagus, after dissection (Figure 9).

Moreover, similar classification tests were performed with spectra collected in vivo on the outer tissue of the organs. The separations between the different organs are not as clear as in case of the inner tissue, what is certainly due to the difficulty to record spectra directly in rat digestive tract rather than after dissection and positioning of the organ on a cork plaque.

These examples show the potential of this Raman approach to distinguish the different tissues of the digestive tract, on a rat model. Further investigations will have to include Barrett's mucosa, always on this rat model but also in the future on patients for validation of the methodology for the clinical arena.

In vivo analysis: Skin cancer

Skin can present different types of lesions, benign such as nevi or malignant such as malignant melanomas or basal cell carcinomas (BBC). Today, skin cancer is the cancer with the highest incidence worldwide [19]. But the prognosis is related to early detection which is difficult in numerous cases, due to the difficulty to identify the various lesions that present a clinical aspect very similar even for expert dermatologists. For the study, 10 patients treated for BBC consented to participate to the study.

The comparison of mean spectra of normal skin and basocellular carcinomas is shown in Figure 10. For spectra of normal skin, the measurements were done in similar regions as those of the lesion sites, i.e. at the periphery of the lesions. The spectra are presented after baseline correction. Slight changes appear: a frequency shift in the C-H deformation mode (around 1450 cm^{-1}) when normal and pathological skins are compared, a weakly intense shoulder at 1685 cm^{-1} in the protein amide I band of carcinoma spectra, differences in the $1200 - 1250\text{ cm}^{-1}$ region relative to amide III band and phospholipids content are also observed.

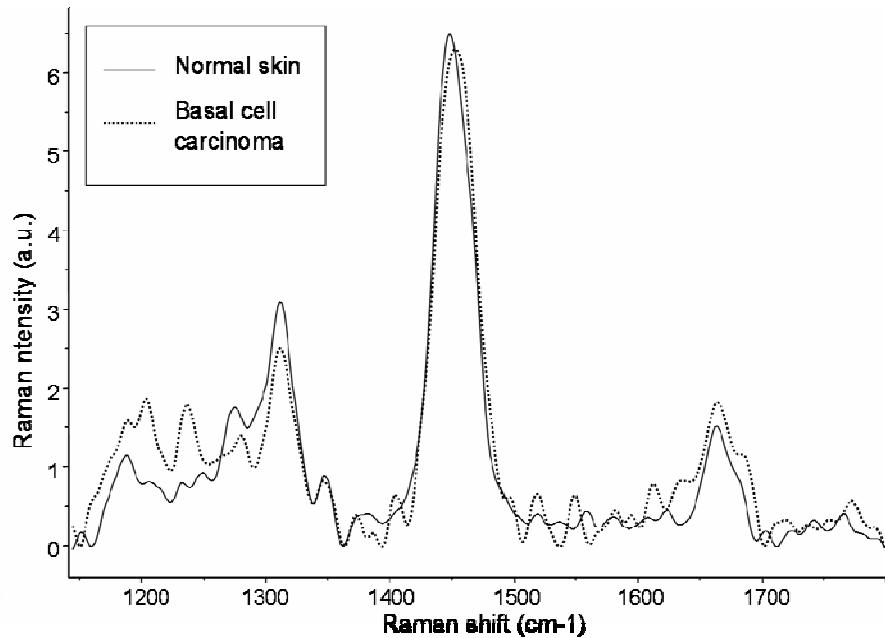


Figure 10: Comparison between mean spectrum of normal skin and the basal cell carcinoma mean spectrum.

HCA was performed on the set of skin spectra, collected directly on patients before surgical intervention. The result is presented in the dendrogram shown in Figure 11. The cluster analysis was performed on the Amide III band and the CH deformation band at 1410cm^{-1} .

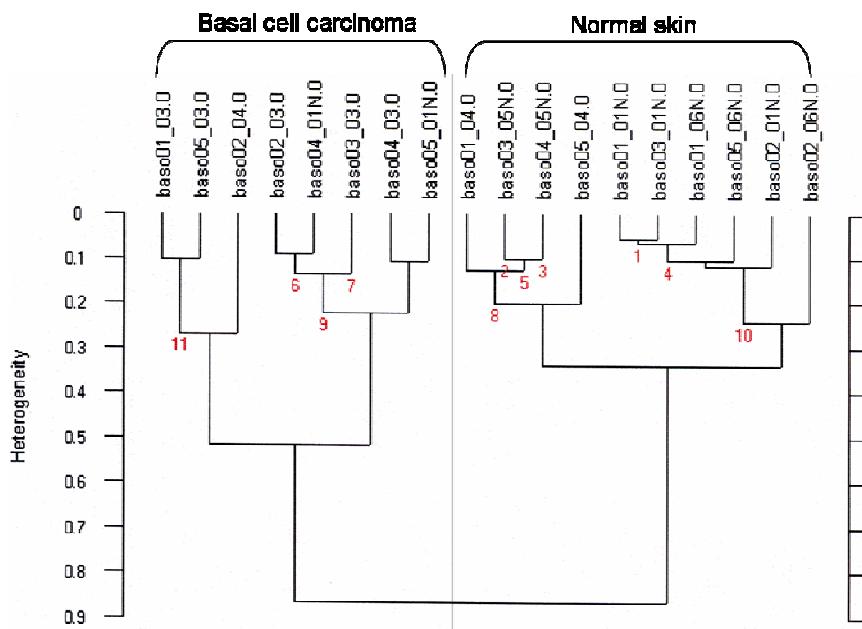


Figure 11: Dendrogram separating spectra of normal and cancerous skin.

Such a result, even if does not present a one hundred percent separation is very promising, in spite of the poor quality of tissue Raman signal due to the high contribution of the fibre silica,

the combination of spectral data and HCA enables a relatively good separation. The same study was realized on patients with nevi and a good separation between the lesion and normal skin was obtained.

Further works are going on to produce a more reliable optical fibre for Raman studies , and further experiments will concern a larger number of patients with respect of inter-lesions variability. Sex, age, location of the skin lesion on the body will also be taken into account.

3. CONCLUSION AND PERSPECTIVES

The examples presented here show that portable Raman system could in the future potentially be used as diagnostic tool in medical care centres. Improvements in optical instrumentation are foreseen and expected by setting up appropriate filters at the tip of the bundle, by changing fibre geometry and by testing another excitation wavelength (better detector sensibility). Also, more advanced data analysis method such as Independent Component Analysis should permit to modelise silica fibre signal in order to be able to subtract it correctly from the collected signal and thus to improve signal quality.

REFERENCES

1. N. Stone, C. Kendall, J. Smith, P. Crow and H. Barr, *Raman spectroscopy for identification of epithelial cancers*, Faraday Discuss, **126**, 141-157; 169-183, 2004.
2. P. Lasch, W. Haensch, D. Naumann and M. Diem, *Imaging of colorectal adenocarcinoma using FT-IR microspectroscopy and cluster analysis*, Biochim Biophys Acta , **1688**, 176-186, 2004.
3. Q. B. Li, Z. Xu, N. W. Zhang, L. Zhang, F. Wang, L. M. Yang, J. S. Wang, S. Zhou, Y. F. Zhang, X. S. Zhou, J. S. Shi and J. G. Wu, *In vivo and in situ detection of colorectal cancer using Fourier transform infrared spectroscopy*, World J Gastroenterol, **11**, 327-330, 2005.
4. B. R. Wood, L. Chiriboga, H. Yee, M. A. Quinn, D. McNaughton and M. Diem, *Fourier transform infrared (FTIR) spectral mapping of the cervical transformation zone, and dysplastic squamous epithelium*, Gynecol Oncol, **93**, 59-68, 2004.

5. S. Mordechai, R. K. Sahu, Z. Hammody, S. Mark, K. Kantarovich, H. Guterman, A. Podshyvalov, J. Goldstein and S. Argov, *Possible common biomarkers from FTIR microspectroscopy of cervical cancer and melanoma*, J Microsc, **215**, 86-91,2004.
6. X. Ling, Y. Xu, S. Weng, W. Li, Z. Xu, R. Hammaker, W. Fateley, F. Wang, X. Zhou, R. Soloway, J. Ferraro and J. Wu, *Investigation of normal and malignant tissue samples from the human stomach using Fourier Transform Raman spectroscopy*, Applied Spectroscopy, **53**, 2002.
7. N. Fujioka, Y. Morimoto, T. Arai and M. Kikuchi, *Discrimination between normal and malignant human gastric tissues by Fourier transform infrared spectroscopy*, Cancer Detect Prev, **28**, 32-36, 2004.
8. H. Fabian, P. Lasch, M. Boese, and W. Haensch, *Mid-IR microspectroscopic imaging of breast tumor tissue sections*, Biopolymers, **67**, 354-357, 2002.
9. R. Mendelsohn, H.C. Chen, M.E. Rerek and D.J. Moore, *Infrared microspectroscopic imaging maps the spatial distribution of exogenous molecules in the skin*, J Biomed Opt., **8**, 185-90, 2003.
10. M. Gniadecka, P. A. Philipsen, S. Sigurdsson, S. Wessel, O. F. Nielsen, D. H. Christensen, J. Hercogova, K. Rossen, H. K. Thomsen, R. Gniadecki, L. K. Hansen and H. C. Wulf, *Melanoma diagnosis by Raman spectroscopy and neural networks: structure alterations in proteins and lipids in intact cancer tissue*, J Invest Dermatol, **122**, 443-449, 2004.
11. A. Tfayli, O. Piot, A. Durlach, P. Bernard and M. Manfait, *Discriminating nevus and melanoma on paraffin-embedded skin biopsies using FTIR microspectroscopy*, Biochimica et Biophysica Acta, **1724**, 262-269, 2005.
12. I. A. Boere., T. C. B. Schut, J. V. D. Boogert, R. W. F. De Bruin and G. J. Puppels, *Use of fiber optic probes for detection of Barrett's epithelium in the rat oesophagus by Raman spectroscopy*, vibrational spectroscopy, **32**, 47-55, 2003.
13. C. Murali Krishna, G.D. Sockalingum, J. Kurien, L. Rao, L. Venteo, M. Pluot, M. Manfait and V.B. Kartha, *Micro-Raman Spectroscopy for Optical Pathology of Oral Squamous Cell Carcinoma*, Appl Spectrosc, **58**, 1128-35, 2004.
14. M.G. Shim and B.C. Wilson, *Development of an in vivo Raman spectroscopic system for diagnostic applications*, journal of Raman spectroscopy, **28**, 131-142,1997.
15. J.T. Motz, M. Hunter, L.H. Galindo, J. A. Gardecki, J. R. Kramer, R.R. Dasari and M. S. Feld, *Optical fiber probe for biomedical spectroscopy*, applied optics, **43**, 3, 2004.

16. L. Chrit, C. Hadjur, S. Morel, G. Sockalingham, G. Lebourdon, F. Leroy, M. Manfait, *In vivo chemical investigation of human using a confocal Raman fiber optic microprobe*, journal of biomedical optics, **10**, 4, 044007, 2005.
17. M.G. Shim, L.M. Wong Kee Song, N. E. Marcon and B.C. Wilson, *In vivo near-infrared Raman spectroscopy: demonstration of feasibility during clinical gastrointestinal endoscopy*, photochemistry and photobiology, **72**, 1, 146-150, 2000.
18. L.M. Wong Kee Song, *Optical Spectroscopy for the Detection of Dysplasia in Barrett's Esophagus*, Clinical Gastroenterology and Hepatology, **3**, 7, S2-S7, 2005.
19. R. Greinert, B. Volkmer, A. Wende, S. Voss and E. W. Breitbart, *Prevention of skin cancer: Necessity, implementation and success*, Hautarzt, **54**, 1152-1163, 2003.

Ch.IV.4 : Améliorations techniques et perspectives

Des améliorations techniques ont été apportées sur le système. Des filtres notch ont été ajoutés à l'entrée du spectromètre de façon à améliorer la qualité du signal Raman.

Pour s'affranchir i/ du signal des fibres optiques de la sonde. Et ii/ de l'autofluorescence due à la pigmentation de la peau, nous envisageons de travailler dans la région des hautes fréquences ($2800\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$).

Au niveau de l'instrumentation, les développements portent sur l'adaptation d'une sonde de micro-imagerie, au moyen d'un bundle de fibres optiques indexées, en entrée du spectromètre, sur les lignes de pixels du détecteur CCD. Ce montage permettra d'enregistrer *in-vivo* et en temps réel des images spectrales Raman de lésions tissulaires avec une résolution de l'ordre de $10\text{ }\mu\text{m}$ (diamètre des cœurs de fibres).

A retenir :

- **Les mesures réalisées au moyen de la sonde fibrée sur les produits de référence et les acides aminés donnent des signatures spectrales de très bonne qualité avec des temps d'acquisitions de quelques secondes.**
- **Pour les mesures tissulaires *ex-vivo* et *in-vivo*, le signal est fortement bruité et présente une forte contribution des fibres optiques.**
- **Il est possible de corriger ce signal parasite des fibres de façon à obtenir des signatures spectrales spécifiques des tissus, permettant l'identification des organes de l'appareil digestif chez le rat (*ex-vivo*) et la détection des lésions cutanées de type carcinome basocellulaire chez l'homme (*in-vivo*).**

CHAPITRE V

ANALYSE SERS A L'ECHELLE CELLULAIRE : DETECTION D'UN PRINCIPE ACTIF DEPIGMENTANT AU NIVEAU DES CELLULES CUTANEES DE TYPE MELANOCYTES



Ch. V.1 : Introduction

Dans les parties précédentes, les spectroscopies vibrationnelles ont été appliquées pour la caractérisation d'échantillons biologiques *in-vitro* (coupes fines de tissus), *ex-vivo* (bloc de peau excisée) et *in-vivo* (patients pris en charge en Dermatologie) à l'échelle tissulaire ou même sur les patients directement.

L'objectif de cette partie est de mener des analyses à l'échelle cellulaire en tentant de détecter un principe actif au niveau de la cellule vivante isolée. Les investigations ont été menées en deux étapes :

- La première étape a consisté à déterminer les limites de détection, en Raman et en SERS, du principe actif au cours de dilutions successives.
- La seconde étape a porté sur la détection du principe actif au niveau de mélanocytes.

Ch. V.2 : Généralités

Pigmentation cutanée: (Lin et al. 2007; Agache)

La pigmentation de la peau humaine est principalement due à la présence de la mélanine. Située en majeure partie dans l'épiderme, la mélanine donne une coloration qui varie du jaune pâle au noir en passant par tous les tons de brun.

La mélanine

Dans la peau humaine, la mélanine se présente sous la forme de particules solides sphériques de 20 à 40 nm de diamètre qui forment les mélanosomes, mais aussi sous une forme soluble dans les vésicules de prémélanosomes. Le terme de mélanine correspond à un groupe hétérogène de pigments qui peuvent être regroupés en deux familles suivant leur structure chimique et leur couleur :

- Les phaéomélanines, riches en soufre, associées à la couleur jaune ou rouge prédominant chez les sujets roux.
- Les eumélanines, pigments noirs ou marrons, insolubles et pauvres en soufre présents chez les sujets bruns ou noirs.

Ces deux familles proviennent du métabolisme, selon deux voies différentes, d'un même composé, la dopaquinone.

La composition précise de la mélanine dépend de facteurs génétiques et environnementaux. Dans la peau noire, l'excellente photoprotection serait due à la mélanine qui est présente non

seulement en grande quantité, avec prédominance des eumélanines, mais également à sa répartition particulière qui protège les noyaux cellulaires et leurs acides nucléiques. Chez les sujets roux, l'apparition d'éphélides, ou taches de rousseur, après exposition, correspondait à une fabrication d'eumélanines par des mélanocytes qui synthétisaient initialement des phaéomélanines. Les propriétés photoprotectrices sont nettement plus élevées pour les eumélanines que pour les phaéomélanines. De plus, les phaéomélanines ont des propriétés carcinogènes car elles se décomposent après irradiation lumineuse en produisant des produits fortement agressifs pour la cellule (Lin et al. 2007; Agache).

Unité épidermique de mélanisation

La mélanine est synthétisée par les mélanocytes situés dans la couche basale de l'épiderme. Les mélanocytes s'intercalent entre les kératinocytes de l'assise basale. Ils émettent des prolongements cellulaires, les dendrites, qui entrent en contact avec les kératinocytes des assises basales. La mélanine est transportée dans ces dendrites sous la forme de grains, les mélanosomes, puis transférée aux kératinocytes avoisinants. Cette fonction unissant kératinocytes et mélanocytes a permis d'établir le concept d'unité épidermique de mélanisation dont le fonctionnement dépend du programme génétique de l'individu, mais peut être influencé par l'environnement.

Pour assurer une bonne photoprotection, il faut que la mélanine non seulement absorbe le rayonnement mais aussi se localise au-dessus de l'ADN, principale cible des UV. Effectivement dans les kératinocytes, les mélanosomes se regroupent souvent au-dessus du noyau, formant une sorte d'ombrelle protégeant le matériel nucléaire. A mesure que les kératinocytes meurent pour former la couche cornée, les mélanosomes sont détruits et la mélanine se disperse dans le cytoplasme, perdant ainsi son efficacité photoprotectrice.

Le rôle photoprotecteur de la mélanine

Les preuves du rôle photoprotecteur de la mélanine sont bien établies : exposée aux radiations solaires, la peau a tendance à se pigmenter et se montre alors moins sensible aux expositions suivantes. Les individus à peau mate sont moins sensibles à la lumière du soleil que ceux à peau claire. L'incidence des cancers de la peau au niveau des zones exposées est nettement plus faible chez les individus dont la peau est pigmentée que chez les individus à peau claire. Le rôle photoprotecteur de la mélanine repose surtout sur sa capacité d'absorption. Elle a été étudiée *in vitro* chez la seiche (Agache). *In vivo*, on peut accéder aux caractéristiques d'absorption de la pigmentation mélanique de l'épiderme en comparant les spectres de

réflexion de peaux pigmentées avec ceux de peaux non pigmentées (par exemple, sujets atteints de vitiligo ou d'albinisme). Le maximum d'absorption se situe à 335 nm comme pour la mélanine de la seiche. Ce spectre d'absorption montre que la mélanine procure une protection plus efficace vis-à-vis des UVA que des UVB (Agache).

Désordres hyperpigmentaires

Les désordres hyperpigmentaires (Mélasma, Lentigo senilis, Hyperpigmentations post inflammatoires ...) se manifestent par une augmentation de la couleur naturelle de la peau.

Nous allons rappeler les principales caractéristiques de ces pathologies :

1. Le mélasma

- Macules brunes symétriques sur le visage.
- Plus fréquent chez les femmes, et chez les phototypes foncés.
- Exacerbé par l'exposition solaire, les contraceptifs oraux, la grossesse (masque de grossesse), l'utilisation de cosmétiques.
- Augmentation de l'activité mélanocytaire responsable de l'accumulation de mélanine—pathologie mal caractérisée.

2. Le lentigo senilis

- Synonymes : lentigo solaire, lentigo actinique, tache de vieillesse...
- Lésions pigmentées diffuses apparaissant avec l'âge sur les zones photoexposées
- Taille et couleur variable, plus fréquent chez les sujets à peau claire
- Caractérisé par une augmentation de l'activité mélanocytaire et du nombre de mélanocytes qui se répartissent le long d'élongations épidermiques dans le derme.

3. Les hyperpigmentations post-inflammatoires

- Hyperpigmentation consécutive à une inflammation ou un traumatisme cutané.
- Apparition de macules hyperpigmentées sur le site d'anciennes lésions cutanées inflammatoires (acné, eczéma...) ou après un acte traumatique pour la peau (peeling chimique, cryochirurgie, laser, traitement irritant...).
- Plus fréquent chez les phototypes foncés.
- Deux phénomènes impliqués :
 - a- Augmentation de la **synthèse** de mélanine
 - b- Anomalie de **distribution** du pigment : incontinence pigmentaire caractérisée par la présence de mélanophages dans le derme

Diffusion Raman exaltée de surface (SERS) :

La diffusion Raman d'une particule adsorbée sur une surface métallique présente une très grande augmentation en intensité. Ce phénomène est dû à un changement des propriétés de la molécule au voisinage d'une surface métallique et à l'augmentation du champ électrique. C'est la diffusion Raman exaltée de surface (DRES), ou son anglicisme surface-enhanced Raman scattering (SERS). L'augmentation de l'intensité du signal Raman dépend de la nature chimique de la molécule adsorbée, du type de la surface métallique et de sa morphologie. L'exaltation la plus importante se produit avec l'argent, l'or et le cuivre. La surface métallique doit être « rugueuse » et avoir des propriétés spécifiques d'adsorption. L'effet SERS peut s'observer dans trois types de systèmes métalliques :

- Electrodes : la surface devient active après un cycle d'oxydoréduction
- Système de particules métalliques en suspension et colloïdes, qui sont de petites tailles comparées à la longueur d'onde de la lumière incidente. Pour nos tests, des colloïdes d'argent ont été utilisés.
- Films actifs en SERS qui présentent l'avantage d'une homogénéité et d'une régularité contrôlables, ces films sont préparées par micro lithographie.

L'effet SERS possède des propriétés qui le distingue de la diffusion Raman conventionnelle :

- L'intensité de la diffusion Raman pour les molécules adsorbées est plus grande d'un facteur 10^2 à 10^6 par rapport aux molécules non adsorbées.
- L'exaltation dépend de la fréquence d'excitation, mais aussi du degré de rugosité du substrat.
- Parfois le spectre SERS diffère remarquablement du spectre des molécules en Raman conventionnel. Ceci se manifeste par une exaltation sélective de certaines bandes ainsi que par l'apparition de nouvelles bandes dans le spectre SERS (Creighton 1982; Lee et al. 1982; Siiman et al. 1983).

Les colloïdes :

Un système fréquemment utilisé est l'hydrosol métallique. La réduction chimique des sels d'argent, de cuivre et d'or a été utilisée pour produire un état colloïdal en pré-aggrégat. Différents agents réducteurs peuvent être utilisés tels que le citrate, les ions oxalates ou le borohydrure de sodium. Ce système est facile à préparer. Le principal avantage des colloïdes par rapport aux électrodes et aux films actifs est la simplicité de préparation de l'hydrosol

ainsi que la possibilité de contrôler la taille et la forme des particules, en faisant varier les concentrations relatives du sel métallique et de l'agent réducteur (Creighton 1982; Siiman et al. 1983).

L'hydrosol d'argent est préparé par réduction de l' AgNO_3 par le citrate de sodium (Lee et al. 1982). Il est très stable pendant quelques semaines et fournit une exaltation importante de la diffusion Raman des biomolécules pour des excitations visibles proche infrarouge.

Ch. V.3 : Matériels et Méthodes

Principe Actif utilisé

Le CD5829, est un médicament produit par Galderma (Sophia Antipolis, France) comme agent dépigmentant agissant au niveau des mélanosomes. Pour nos analyses, le principe actif est dissous dans le DMSO à 0,5 M. 10 solutions à concentrations différentes sont ensuite préparées en réalisant des dilutions successives au 1/3 à partir de la solution mère de 0,5 M. Pour les tests SERS chacune des solutions est diluée au millième en PBS ce qui permet de travailler dans la gamme spectrale de l'IC50 des cellules (de l'ordre du μM).

Système biologique :

Lignée cellulaire

La souche MnT-1 est issue d'un mélanome humain. Elle a été établie à partir d'une tumeur par une équipe italienne (Piantelli et al. 1995) et a été fournie par Galderma R&D (Sophia Antipolis, France) dans le cadre de notre collaboration.

Conditions de culture

Les cellules sont cultivées *in vitro* dans du milieu de culture liquide DMEM 4,5 g/l glucose L-Glutamax (Invitrogen). Ce milieu nutritif est supplémenté avec 20 % de sérum de veau foetal (SVF) (Gibco, UK) préalablement décomplémenté 30 min à 56°C, et 1 % d'un mélange d'antibiotiques/antimycotiques (100 U/mL de pénicilline, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycine et 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de fungizone) (Gibco, UK). Ce milieu constitue un milieu complet.

Les cellules sont cultivées en monocouche dans une étuve à 37°C, sous atmosphère humide contenant 5 % CO_2 . Elles sont repiquées pendant la phase exponentielle de leur croissance (3-4 jours) dans du milieu complet et dans des conditions stériles sous une hotte à flux laminaire vertical (ESI Flufrance, France). Après le retrait du milieu de culture usagé, les cellules sont lavées dans un volume d'une solution tampon phosphate (Phosphate Buffer Solution ou PBS ;

Gibco, UK) puis 500 µL de trypsine (Gibco, UK) sont ajoutés. Cette enzyme digère l'extrémité des protéines d'adhésion et permet le décollement du tapis cellulaire. Les cellules sont incubées dans l'étuve pendant 5 min afin de favoriser le décollement, puis elles sont diluées dans 3 mL de milieu complet. Les cellules sont ensemencées à la densité de $5 \cdot 10^4$ cellules / mL sur des lames de CaF₂ posées au fond de boîtes de Pétri. Pour les mesures en Raman, les cellules sont lavées dans du PBS, puis dans du NaCl 0,9% (0,16M).

La microspectroscopie SERS :

Préparation du colloïde

L'hydrosol d'argent, ou colloïde, est préparé selon la méthode de Lee et Meisel (Lee et al. 1982). 90 mg de nitrate d'argent (AgNO₃) (ALFA, MM = 169,87) sont dissous dans 500 mL d'eau distillée (sur colonne à quartz et sous pression d'azote gazeux). La solution est chauffée à 100°C. 10 mL d'une solution de citrate de sodium 1 % (Sigma, USA, MM = 258,1) sont ajoutés sous agitation vigoureuse à la solution de AgNO₃. Le mélange est maintenu à 100°C pendant 60 à 90 min, puis conservé à 4°C après préparation.

Instrumentation

L'instrumentation utilisée pour enregistrer les spectres SERS est la même que pour la spectroscopie Raman conventionnelle (chapitre I), à savoir, un microspectromètre LabRam (Horiba Jobin Yvon), couplé à un laser Titane/Saphir (Spectra Physics Inc., USA) à 785 nm. Le microspectromètre est équipé d'un microscope optique (Olympus, Japon) et les mesures sont enregistrées au moyen d'un objectif 100X (N.A. = 1) spécifique aux analyses dans le proche infrarouge. Dans ces conditions, la puissance du laser sur l'échantillon est de 10 mW, et le diamètre de l'impact du laser est proche du micromètre. La gamme spectrale utilisée est de 300-3400 cm⁻¹ pour les produits purs et de 580-1750 cm⁻¹ pour les analyses sur les cellules avec un temps d'acquisition de 2 secondes pour les analyses en SERS et 10 secondes pour les analyses en Raman conventionnel.

Acquisition des spectres Raman et SERS

Une première série de tests a permis de déterminer les concentrations limites pour la détection d'un signal Raman et d'un signal SERS du CD5829 en solution.

Préalablement aux manipulations sur les cellules, les cultures cellulaires sont incubées avec 50 µM de CD5829 pendant 24 heures et avec 500 µL de colloïdes d'argent pendant 1 heure à

37°C sous atmosphère humide enrichie avec 5 % CO₂, puis lavées deux fois avec une solution de PBS.

Ch. V.3 : Résultats et discussion

Vérification de la limite de sensibilité de détection en spectroscopie Raman conventionnelle :

5 mg du CD5829 sont dissous dans 52 µl de DMSO donnant une solution mère à 0,5 M. 10 dilutions successives au 1/3 partant de la solution mère jusqu'à 5 µM environ ont été réalisées. Pour ces concentrations, le signal Raman a été enregistré pour vérifier la limite de détection du principe actif dans une solution de DMSO.

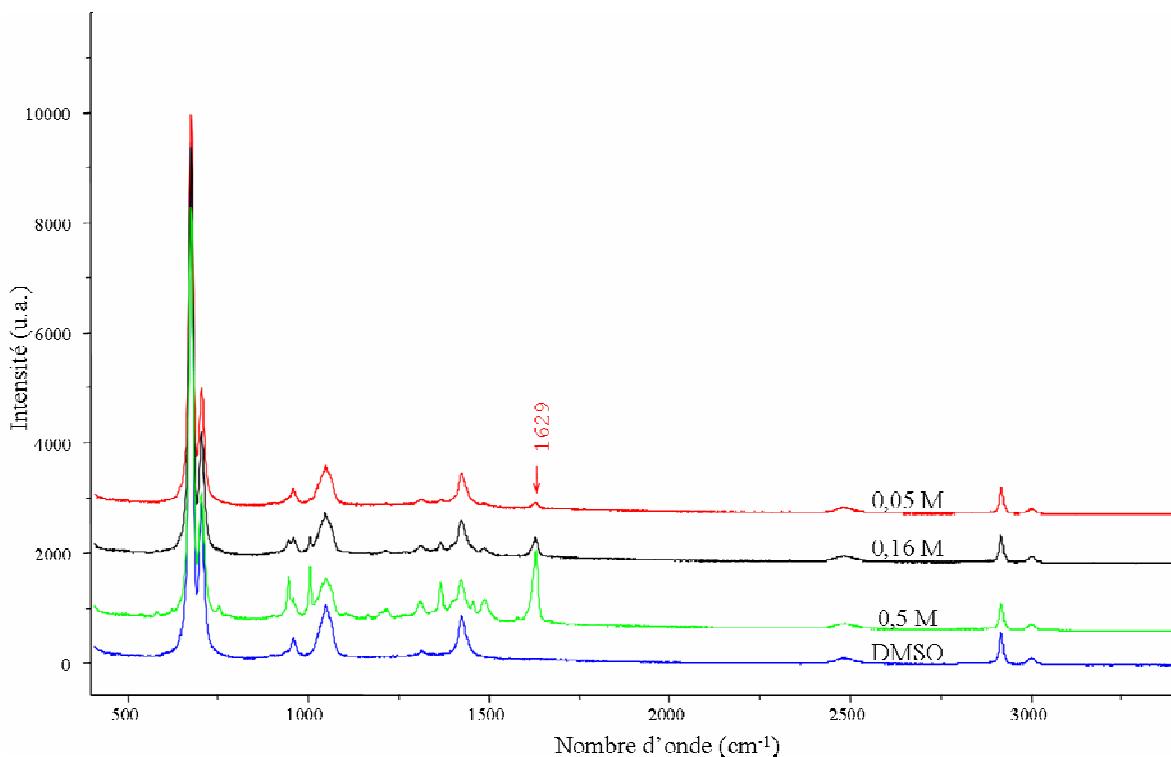


Figure Ch.V.01 : Comparaison des spectres Raman de la solution du CD5829 à différentes concentrations après dilution dans le DMSO

Parmi les vibrations du CD5829, la raie à 1629 cm⁻¹ est la plus intense en Raman conventionnel. La limite de détection du CD5829 dans le DMSO est évaluée à 0,05M, concentration à laquelle la raie à 1629 cm⁻¹ est encore détectable (Figure Ch.V.01).

Vérification de la limite de sensibilité de détection en SERS :

Les solutions préparées pour la série de mesures précédentes sont diluées d'un facteur 1000 dans du PBS, de façon à conserver les conditions de viablitité cellulaire (le DMSO étant cytotoxique à fortes concentrations).

Pour chaque analyse un mélange est préparé dans les proportions suivantes : 80% de la solution de colloïdes d'argent, 10 % de NaCl et 10% de la solution de CD5829. De cette façon les concentrations initiales de CD5829 des solutions sont divisées par 10.

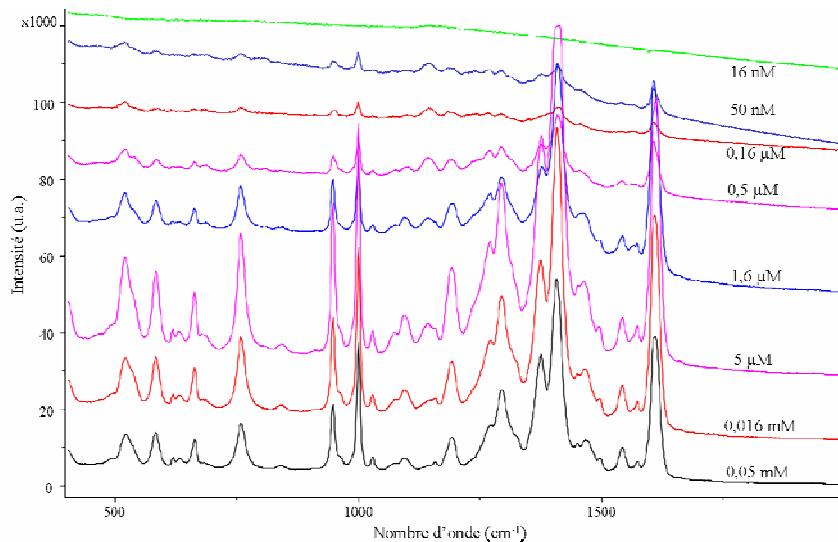


Figure Ch.V.02 : Comparaison des spectres SERS de la solution du CD5829 à différentes concentrations

Les spectres des différentes concentrations du CD5829 montrent que la limite de détection en SERS est de l'ordre de 50nM (Figure Ch.V.02).

Bien que l'intensité du signal à 50nM soit beaucoup plus faible comparée aux autres concentrations, l'information spectrale reste exploitable.

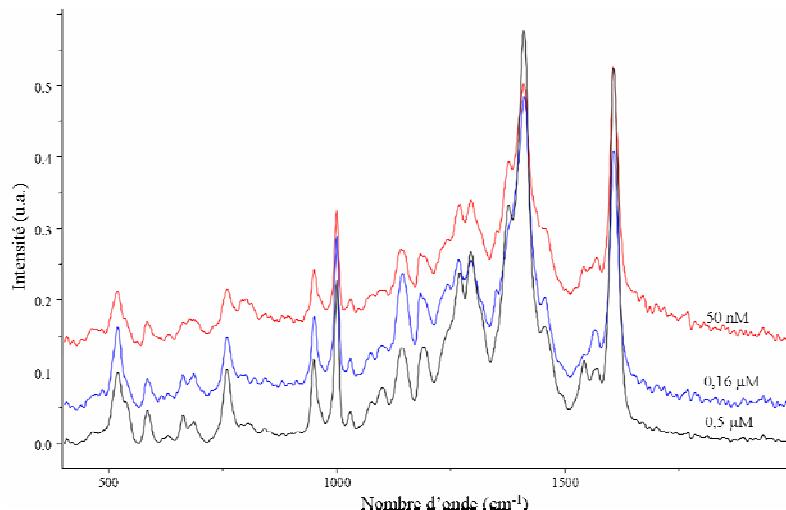
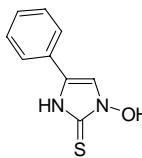


Figure Ch.V.03 : Comparaison des spectres SERS corrigés

Après prétraitement des spectres, élimination du courant noir (bruit statique), correction de la réponse du détecteur, lissage des spectres, correction de la ligne de base (ramenant les minima des spectres à zéro), et normalisation, il apparaît sur la figure Ch.V.03 que les spectres comportent la totalité de l'information vibrationnelle jusqu'à 50 nM.

Tableau Ch.V.1 : Principales bandes Raman et SERS du CD5829 en solution (dans le DMSO pour les mesures Raman et ensuite diluée au millième dans le PBS pour les mesures en SERS)

CD5829		
		
Raman	SERS	Attribution
	579	
	660	
	755	
	843	
939		Respiration du cycle
	946	
956		
998	998	ν cycle /// respiration du cycle /// ν C-C /// déformation CH
	1026	
1045	1092	
1100	1144	
1159	1189	
1214	1294	
1303		
1361		CH bend
1392	1377	
	1408	
1416		
1454		ν C-C
	1462	
1481		ν C=S (dans -N-C=S)
	1540	
	1571	
	1611	
1625		ν C=C /// 616 + 999

Les mesures présentées ci-dessus ont permis de déterminer les limites de détection du CD5839.

En Raman conventionnel :

En solution dans le DMSO, le CD5839 est détectable jusqu'à 50 mM

En Raman SERS :

Le CD5829 est détectable jusqu'à 50nM

Les limites de détection atteintes en SERS pour le CD5829 permettent d'envisager une étude de la distribution intracellulaire de ce principe actif dans des concentrations physiologiquement acceptables (employées en clinique humaine).

Détection du CD5829 au niveau des mélanocytes :

La limite de détection en spectroscopie Raman classique étant trop faible, les études cellulaires sur les mélanocytes ont donc été menées par analyses SERS. Pour ces analyses, la concentration de principe actif a été fixée à 50 μM .

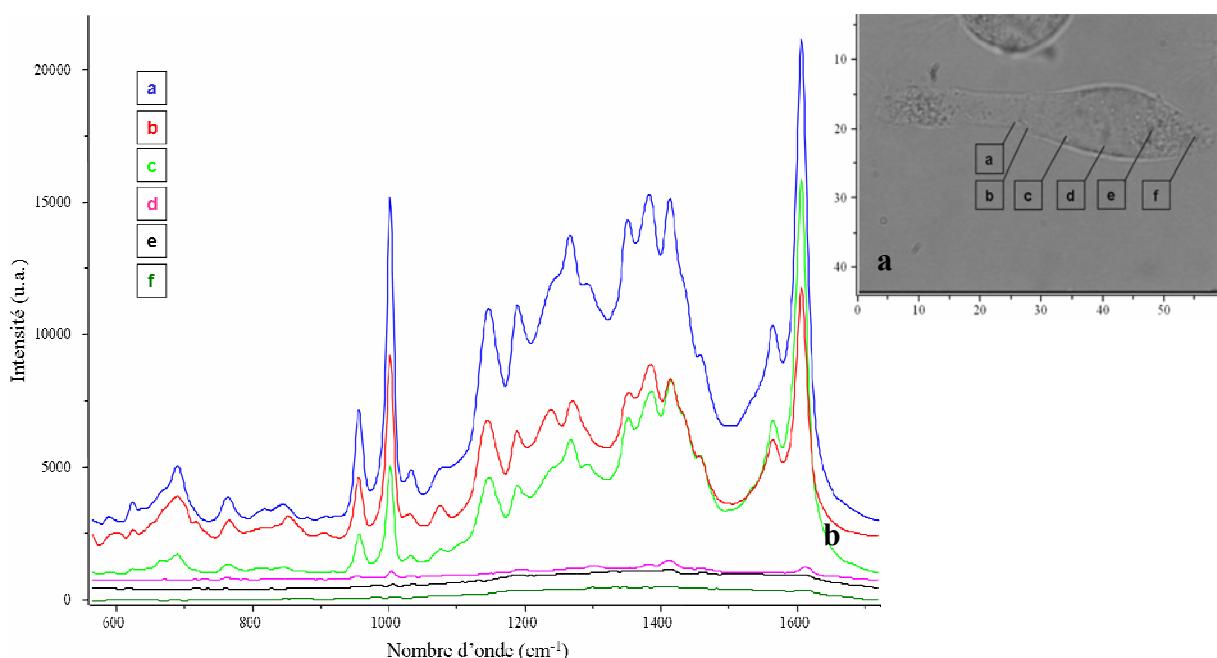
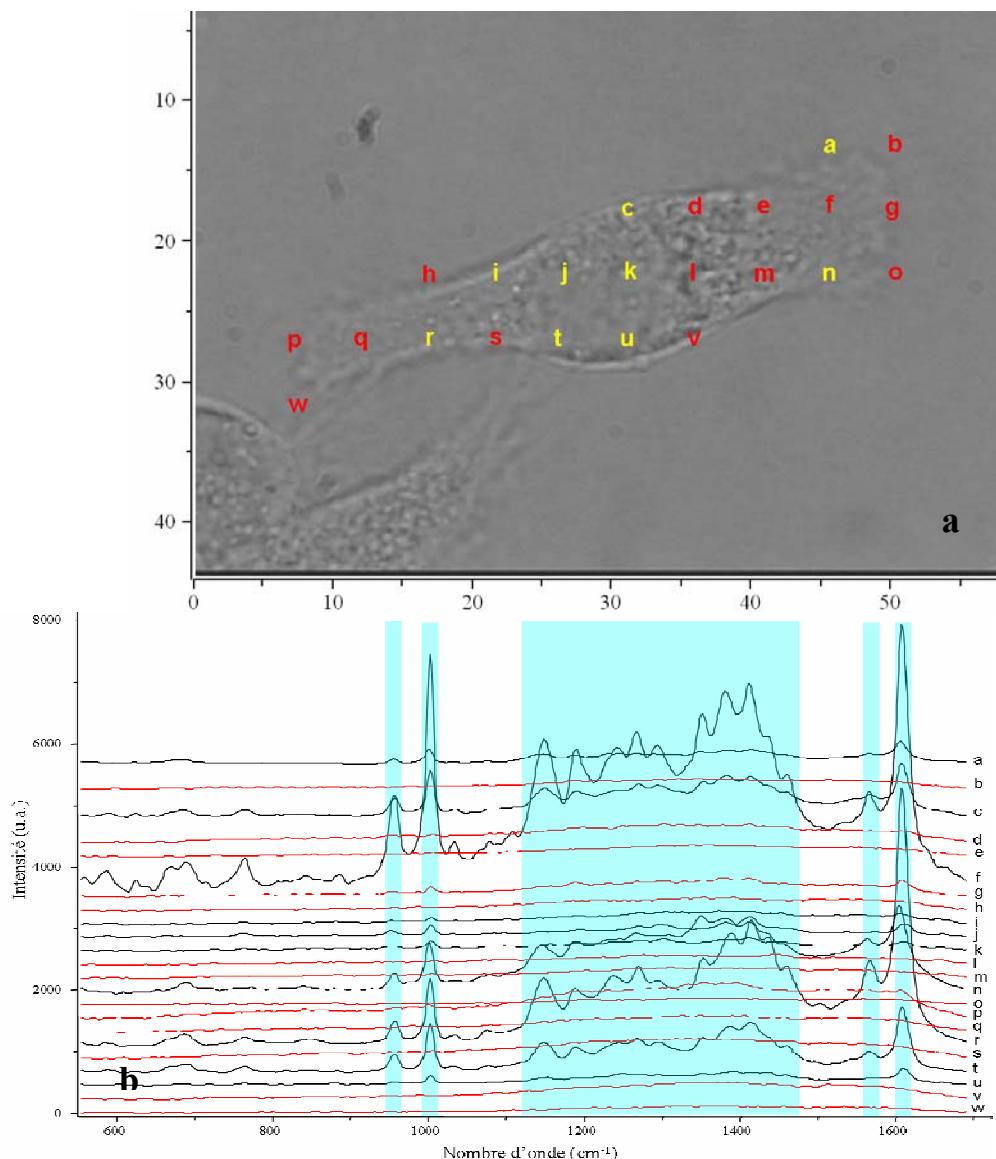


Figure Ch.V.05 : a : Photo d'une cellule MnT-1 traitée par le CD5829. b : spectres SERS mesurées en différents points de la cellule

Les cellules ont été incubées avec le principe actif pendant 24 heures, et avec les colloïdes pendant 1 heure. Pour les mesures SERS, les cellules sont incubées dans une solution de NaCL 0,9 %. Cette solution permet de maintenir les cellules en conditions de viabilité et joue en même temps le rôle de sel d'agrégation pour les colloïdes. La Figure Ch.V.05 montre le signal mesuré en différents points d'une cellule MnT-1. Il paraît donc des points (a, b, c) donnant un signal SERS (du CD5829) et d'autres (d, e, f) sans aucune exaltation de la diffusion Raman.

Imagerie spectrale

Pour compléter cette observation, des images spectrales couvrant la surface des cellules ont été réalisées (Figure Ch.V.06).



Des images spectrales ont été collectées sur des cellules isolées. Les spectres ont été enregistrés à des intervalles réguliers de $4\mu\text{m}$. La figure Ch.V.06 montre la répartition des points présentant un signal Raman exalté.

Les cellules sont incubées pendant 24 heures avec le principe actif, ce qui permet à ce dernier d'atteindre les mélanosomes.

Ch. V.4 : Conclusion

Les points présentant un signal SERS correspondent à des zones d'interaction entre les molécules de CD5829 et les colloïdes métalliques. Ces mesures sont effectuées après lavage de la culture cellulaire au PBS et son incubation dans du NaCl ; les colloïdes, ou une proportion de colloïdes sont donc soit retenus à l'intérieur de la cellule soit ancrés au niveau de la membrane.

La présence à la fois de zones présentant un signal SERS et de zones sans signal peut être expliquée selon deux hypothèses :

- 1- les zones présentant un signal SERS peuvent correspondre à la répartition du CD5829 dans la cellule.
- 2- Les zones présentant un signal SERS peuvent correspondre à la répartition des colloïdes. Cette dernière hypothèse devra être vérifiée par des analyses complémentaires par exemple en microscopie électronique.

Ces résultats montrent l'intérêt de l'analyse SERS pour étudier la distribution de molécules et des principes actifs au sein des cellules. Les points à éclaircir concernent principalement l'intégration des colloïdes par les cellules, une meilleure maîtrise de l'incorporation et de la distribution intracellulaire des colloïdes est indispensable pour valoriser les informations collectées.

Le développement de nouvelles surfaces SERS, avec une répartition contrôlée des nanostructures métalliques, pourrait également permettre d'appréhender des mécanismes moléculaires au niveau des membranes cellulaires.

CONCLUSION GENERALE



Un spectre vibrationnel est une véritable « empreinte digitale » caractéristique d'un échantillon biologique permettant d'accéder à des informations sur la constitution moléculaire, sur les interactions entre les composants ou encore sur le suivi de réactions biochimiques. De plus, le caractère non destructif de l'analyse vibrationnelle rend cet outil particulièrement bien adapté à l'étude des relations structure - fonction des échantillons biologiques et à la mise en évidence de changements moléculaires et structuraux consécutifs à un état lésionnel, ou induits par une molécule exogène (médicament, toxine...).

Au cours de ce travail de thèse, nous avons démontré le potentiel des spectroscopies vibrationnelles pour réaliser des études à différentes échelles, allant des études *in-vitro* sur la cellule unique jusqu'aux analyses tissulaires *in-vivo* directement sur des patients pris en charge en Dermatologie, et en passant par les mesures *ex-vivo* sur des blocs de peau excisée.

1- Malgré la complexité des structures cutanées, ce travail a permis en premier lieu de réaliser une caractérisation spectrale de la peau, de façon à établir une "référence spectrale" indispensable à toute analyse des tissus cutanés. Les informations collectées permettent d'accéder à la composition moléculaire en protéines, lipides, polysaccharides et autres composés organiques. De plus, la détermination des fréquences de vibration ou le calcul de rapports d'intensité permettent une caractérisation structurale, notamment au niveau de la conformation secondaire des protéines et de l'organisation des structures lipidiques.

Dans un second temps, les analyses ont porté sur des coupes de peau paraffinée, de façon à évaluer le potentiel des spectroscopies vibrationnelles pour le diagnostic différentiel des lésions malignes de type mélanome et bénignes de type nævus. A notre connaissance, cette étude menée sur des tissus paraffinés sans aucun déparaffinage préalable a été la première à être publiée dans une revue internationale.

En spectroscopie infrarouge, nous avons pu mettre en évidence, au sein d'une région spectrale sans contribution de la paraffine, des changements au niveau des vibrations associées aux acides nucléiques et la mélanine entre ces deux lésions. Ensuite, pour prendre en considération l'environnement tissulaire des zones tumorales ainsi que l'homogénéité de ces zones, des méthodes statistiques multivariées ont été appliquées aux images spectrales de façon à reconstruire des images pseudo-couleur très informatives comparativement aux coupes histologiques colorées.

En spectroscopie Raman, la contribution de la paraffine au niveau des spectres des tissus est plus importante comparée à la spectroscopie IRTF. Le signal de la paraffine présente, sur la totalité de la gamme spectrale, des bandes fines mais très intenses. Pour éliminer cette contribution parasite de la paraffine, des méthodes statistiques poussées (Analyse en composantes indépendante ICA et non-negativity constraint least square NCLS) ont été développées. Ces méthodes ont permis d'obtenir un signal tissulaire exploitable épuré des raies de la paraffine.

Ces développements permettent donc d'analyser directement les tissus paraffinés, disponibles en grand nombre dans les tumorothèques pour ce qui concerne les pathologies tumorales.

2- En utilisant des blocs de peau excisée, maintenue en condition de survie, la microspctroscopie Raman confocale a permis de suivre la pénétration du Métronidazole au niveau des couches cutanées. Des profils Raman (en Z) ont permis de suivre la diffusion du Métronidazole avec une résolution de quelques micromètres.

De plus, l'analyse des spectres a permis de mettre en évidence un effet du Métronidazole au niveau de la conformation des lipides de la peau.

Une caractérisation spectrale d'un modèle d'épiderme reconstruit, Episkin[®], a également été réalisée. Nous nous sommes intéressés aux différences spectrales entre la signature de l'Episkin[®] et celle de l'épiderme humain issu d'une peau excisée. Cette étude comparative permet de valider l'utilisation de l'épiderme reconstruit pour le suivi de principe actif par microscopie Raman confocal.

Dans cette partie du doctorat, nous nous sommes également intéressés aux incertitudes de mesure, résultant de saut d'indice de réfraction entre l'air et la peau (lois de Descartes). Ce qui induit non seulement une variation de la résolution axiale, mais également une estimation erronée de la profondeur de la mesure. Pour corriger ces erreurs au niveau des profils Raman, des modèles mathématiques, basés sur les principes optiques des lois de la réfraction, ont été utilisés.

3- Pour des futures applications cliniques, des analyses Raman intravitales ont été réalisées au moyen d'un spectromètre axial couplé à une sonde fibrée.

Malgré la forte contribution du signal des fibres optiques de la sonde, nous avons pu discriminer, sur la base de leur signature spectrale Raman, les zones lésionnelles (BCC) de la peau saine. Ces analyses constituent une première étape dans le développement d'un système de micro-imagerie Raman spécialement dédié aux analyses tissulaires *in-vivo* en milieu clinique.

Dans la dernière partie de la thèse, on a mené des analyses à l'échelle cellulaire pour détecter un principe actif au niveau de la cellule vivante isolée.

REFERENCES

- [1] Agache, P.
Physiologie de la peau et explorations fonctionnelles cutanées.
Paris : Tec et Doc ; 2000
- [2] Akhtar, W. and Edwards, H. G.
"Fourier-transform Raman spectroscopy of mammalian and avian keratotic biopolymers."
Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc (1997);**53A**(1): 81-90.
- [3] Amharref, N., Beljebbar, A., Dukic, S., Venteo, L., Schneider, L., Pluot, M., et al.
"Brain tissue characterisation by infrared imaging in a rat glioma model."
Biochim Biophys Acta (2006);**1758**(7): 892-899.
- [4] Andrus, P. G.
"Cancer monitoring by FTIR spectroscopy."
Technol Cancer Res Treat (2006);**5**(2): 157-167.
- [5] Baden, H. P. and Bonar, L.
"The alpha-fibrous proteins of epidermis."
J Invest Dermatol (1968);**51**(6): 478-483.
- [6] Barry, B. W., Edwards, H. G. M. and Williams, A. C.
"Fourier transform Raman and infrared vibrational study of human skin: assignment of spectral bands."
J Raman Spectrosc (1992);**23**: 641-645.
- [7] Bastuji-Garin, S. and Diepgen, T. L.
"Cutaneous malignant melanoma, sun exposure, and sunscreen use: epidemiological evidence."
Br J Dermatol (2002);**146 Suppl 61**: 24-30.
- [8] Bell, E., Sher, S., Hull, B., Merrill, C., Rosen, S., Chamson, A., et al.
"The reconstitution of living skin."
J Invest Dermatol (1983);**81**(1 Suppl): 2s-10s.
- [9] Benevides, J. M., Overman, S. A. and Thomas, G. J.
"Raman, polarized Raman and ultraviolet resonance Raman spectroscopy of nucleic acids and their complexes."
J Raman Spectrosc (2005);**36**(4): 279-299.
- [10] Benevides, J. M., Tsuboi, M., Bamford, J. K. and Thomas, G. J., Jr.
"Polarized Raman spectroscopy of double-stranded RNA from bacteriophage phi6: local Raman tensors of base and backbone vibrations."
Biophys J (1997);**72**(6): 2748-2762.

- [11] Bernard, G., Auger, M., Soucy, J. and Pouliot, R.
"Physical characterization of the stratum corneum of an in vitro psoriatic skin model by ATR-FTIR and Raman spectroscopies."
Biochim Biophys Acta (2007);**1770**(9): 1317-1323.
- [12] Bertrand, D. and Scotter, C. N. G.
"Application of Multivariate Analyses to NIR Spectra of Gelatinized Strach."
Appl Spectrosc (1992);**46**(9): 1420-1425.
- [13] Biswas, N., Waring, A. J., Walther, F. J. and Dluhy, R. A.
"Structure and conformation of the disulfide bond in dimeric lung surfactant peptides SP-B1-25 and SP-B8-25."
Biochim Biophys Acta (2007);**1768**(5): 1070-1082.
- [14] Bitar, R. A., Martinho Hda, S., Tierra-Criollo, C. J., Zambelli Ramalho, L. N., Netto, M. M. and Martin, A. A.
"Biochemical analysis of human breast tissues using Fourier-transform Raman spectroscopy."
J Biomed Opt (2006);**11**(5): 054001.
- [15] Bittoun, J., Querleux, B. and Darrasse, L.
"Advances in MR imaging of the skin."
NMR Biomed (2006);**19**(7): 723-730.
- [16] Bogomolny, E., Huleihel, M., Suproun, Y., Sahu, R. K. and Mordechai, S.
"Early spectral changes of cellular malignant transformation using Fourier transform infrared microspectroscopy."
J Biomed Opt (2007);**12**(2): 024003.
- [17] Braun-Falco, O., Plewig, G., Wolff, H. H. and Winkelmann, R. K.
Dermatology.
Berlin Heidelberg: 1991.
- [18] Brauner, J. W., Flach, C. R. and Mendelsohn, R.
"A quantitative reconstruction of the amide I contour in the IR spectra of globular proteins: from structure to spectrum."
J Am Chem Soc (2005);**127**(1): 100-109.
- [19] Bronchud, M. H., Foote, M. A., Giaccone, G., Olopade, O. and Workman, P.
Principles of Molecular Oncology. 2
Totowa, New Jersey : Humana Press ; 2004.
- [20] Burkitt, H. G., Young, B. and Heath, J. W.
Histologie fonctionnelle Wheater. 3
Paris : A Blackwell ; 1993.
- [21] Busam, K. J., Marghoob, A. A. and Halpern, A.
"Melanoma diagnosis by confocal microscopy: promise and pitfalls."
J Invest Dermatol (2005);**125**(3): vii.

- [22] Camacho, N. P., West, P., Torzilli, P. A. and Mendelsohn, R.
"FTIR microscopic imaging of collagen and proteoglycan in bovine cartilage."
Biopolymers (2001);**62**(1): 1-8.
- [23] Carli, P. and Salvini, C.
Familial melanoma, orphane 2004; [cité le 2007-12-06]. Disponible sur: URL:
<http://www.orpha.net/data/patho/GB/uk-Familial-melanoma.pdf>
- [24] Caspers, P. J., Lucassen, G. W., Carter, E. A., Bruining, H. A. and Puppels, G. J.
"In vivo confocal Raman microspectroscopy of the skin: noninvasive determination of molecular concentration profiles."
J Invest Dermatol (2001);**116**(3): 434-442.
- [25] Caspers, P. J., Lucassen, G. W. and Puppels, G. J.
"Combined in vivo confocal Raman spectroscopy and confocal microscopy of human skin."
Biophys J (2003);**85**(1): 572-580.
- [26] Chalus, P., Roggo, Y., Walter, S. and Ulmscheneider, M.
"Near-infrared determination of active substance content in intact low-dosage tablets."
Talanta (2002);**66**: 1294-1302.
- [27] Chen, S. C., Bravata, D. M., Weil, E. and Olkin, I.
"A comparison of dermatologists' and primary care physicians' accuracy in diagnosing melanoma: a systematic review "
Arch Dermatol (2001);**137**: 1627-1634.
- [28] Chen, Z. P., Morris, J. and Martin, E.
"Extracting chemical information from spectral data with multiplicative light scattering effects by optical path-length estimation and correction."
Anal Chem (2006);**78**(22): 7674-7681.
- [29] Choi, J., Choo, J., Chung, H., Gweon, D. G., Park, J., Kim, H. J., et al.
"Direct observation of spectral differences between normal and basal cell carcinoma (BCC) tissues using confocal Raman microscopy."
Biopolymers (2005);**77**(5): 264-272.
- [30] Chrit, L., Bastien, P., Biatty, B., Simonnet, J. T., Potter, A., Minondo, A. M., et al.
"In vitro and in vivo confocal Raman study of human skin hydration: assessment of a new moisturizing agent, pMPC."
Biopolymers (2007);**85**(4): 359-369.
- [31] Chrit, L., Bastien, P., Sockalingum, G. D., Batisse, D., Leroy, F., Manfait, M., et al.
"An in vivo randomized study of human skin moisturization by a new confocal Raman fiber-optic microprobe: assessment of a glycerol-based hydration cream."
Skin Pharmacol Physiol (2006);**19**(4): 207-215.
- [32] Chrit, L., Hadjur, C., Morel, S., Sockalingum, G., Lebourdon, G., Leroy, F., et al.
"In vivo chemical investigation of human skin using a confocal Raman fiber optic microprobe."
J Biomed Opt (2005);**10**(4): 44007.

- [33] Corbe, E., Laugel, C., Yagoubi, N. and Baillet, A.
"Role of ceramide structure and its microenvironment on the conformational order of model stratum corneum lipids mixtures: an approach by FTIR spectroscopy."
Chem Phys Lipids (2007);**146**(2): 67-75.
- [34] Corcuff, P., Chaussepied, C., Madry, G. and Hadjur, C.
"Skin optics revisited by in vivo confocal microscopy: melanin and sun exposure."
J Cosmet Sci (2001);**52**(2): 91-102.
- [35] Creighton, J. A.
Surface-enhanced Raman-scattering.
New York: Plenum; 1982.
- [36] Pouget, J. P.
Effet du rayonnement ionisant sur l'ADN cellulaire : mesure des bases puriques et pyrimidiques modifiées.
Thèse : Méd : Université Paris 11. 2000 ; 12
- [37] Dehring, K. A., Smukler, A. R., Roessler, B. J. and Morris, M. D.
"Correlating changes in collagen secondary structure with aging and defective type II collagen by Raman spectroscopy."
Appl Spectrosc (2006);**60**(4): 366-372.
- [38] Dill-Müller, D. and Maschke, J.
"Ultrasonography in dermatology."
JDDG (2007);**5** (8): 689–707.
- [39] Dubois, J.,
La peau, de la santé à la beauté: notions de dermatologie et de dermatologie.
Paris: Privat; 2001.
- [40] Dukor, R. K.
Vibrational Spectroscopy in the Detection of Cancer.
Illinois USA: Wiley; 2002.
- [41] Eikje, N. S., Aizawa, K. and Ozaki, Y.
"Vibrational spectroscopy for molecular characterisation and diagnosis of benign, premalignant and malignant skin tumours."
Biotechnol Annu Rev (2005a);**11**: 191-225.
- [42] Eikje, N. S., Ozaki, Y., Aizawa, K. and Arase, S.
"Fiber optic near-infrared Raman spectroscopy for clinical noninvasive determination of water content in diseased skin and assessment of cutaneous edema."
J Biomed Opt (2005b);**10**(1): 14013.
- [43] Enejder, A. M., Scecina, T. G., Oh, J., Hunter, M., Shih, W. C., Sasic, S., et al.
"Raman spectroscopy for noninvasive glucose measurements."
J Biomed Opt (2005);**10**(3): 031114.

- [44] Ermakov, I., Ermakova, M., Gellermann, W. and Bernstein, P. S.
 "Macular pigment Raman detector for clinical applications."
J Biomed Opt (2004a);**9**(1): 139-148.
- [45] Ermakov, I. V., Ermakova, M. R., Gellermann, W. and Lademann, J.
 "Noninvasive selective detection of lycopene and beta-carotene in human skin using Raman spectroscopy."
J Biomed Opt (2004b);**9**(2): 332-338.
- [46] Ermakov, I. V., Sharifzadeh, M., Ermakova, M. and Gellermann, W.
 "Resonance Raman detection of carotenoid antioxidants in living human tissue."
J Biomed Opt (2005);**10**(6): 064028.
- [47] Everall, N. J.
 "Confocal Raman Microscopy: why the depth resolution and spatial accuracy can be much worse than you think."
J Appl Spectrosc (2000a);**50**(10).
- [48] Everall, N. J.
 "Modeling and measuring the effect of refraction on the depth resolution of Confocal Raman Microscopy."
J Appl Spectrosc (2000b);**54**(6).
- [49] Everall, N. J.
 "Depth profiling with confocal Raman Microscopy, Part II".
Spectroscopy (2004) **19**, DOI:
- [50] Fabian, H., Lasch, P., Boese, M. and Haensch, W.
 "Mid-IR microspectroscopic imaging of breast tumor tissue sections."
Biopolymers (2002);**67**(4-5): 354-357.
- [51] Faolain, E. O., Hunter, M. B., Byrne, J. M., Kelehan, P., Lambkin, H. A., Byrne, H. J., et al.
 "Raman spectroscopic evaluation of efficacy of current paraffin wax section dewaxing agents."
J Histochem Cytochem (2005a);**53**(1): 121-129.
- [52] Faolain, E. O., Hunter, M. B., Byrne, J. M., Kelehan, P., McNamara, M., Byrne, H. J., et al.
 "A study examining the effect of tissue processing on human tissue sections using vibratinal spectroscopy."
Vib Spectrosc (2005b);**38**(1-2): 121-127.
- [53] Fendel, S. and B. Schrader.
 "Investigation of skin lesions by NIR-FT-Raman spectroscopy."
J Anal Chem (1998);**360** 609-613.
- [54] Fitzpatrick, T. B., Johnson, R. A., Polano, M. K., Suurmond, D. and Wolff, K.
 Dermatologie clinique: Atlas commenté en couleur.
 Paris : A Blackwell ; 1995.

- [55] Françoise, B.
"La peau reconstruite: modèle d'étude du kératinocyte, du fibroblaste et de leurs interaction. Effet des ultraviolets, dommages et réparation."
J Soc Biol (2005);**199**(4): 313-320.
- [56] Frushour, B. G. and Koenig, J. L.
"Raman scattering of collagen, gelatin, and elastin."
Biopolymers (1975);**14**(2): 379-391.
- [57] Gambichler, T., Boms, S., Stucker, M., Kreuter, A., Moussa, G., Sand, M., et al.
"Epidermal thickness assessed by optical coherence tomography and routine histology: preliminary results of method comparison."
J Eur Acad Dermatol Venereol (2006);**20**(7): 791-795.
- [58] Gambichler, T., Moussa, G., Sand, M., Sand, D., Altmeyer, P. and Hoffmann, K.
"Applications of optical coherence tomography in dermatology."
J Dermatol Sci (2005);**40**(2): 85-94.
- [59] Gniadecka, M., Faurskov Nielsen, O., Christensen, D. H. and Wulf, H. C.
"Structure of water, proteins, and lipids in intact human skin, hair, and nail."
J Invest Dermatol (1998a);**110**(4): 393-398.
- [60] Gniadecka, M., Nielsen, O. F., Wessel, S., Heidenheim, M., Christensen, D. H. and Wulf, H. C.
"Water and protein structure in photoaged and chronically aged skin."
J Invest Dermatol (1998b);**111**(6): 1129-1133.
- [61] Gniadecka, M., Philipsen, P. A., Sigurdsson, S., Wessel, S., Nielsen, O. F., Christensen, D. H., et al.
"Melanoma diagnosis by Raman spectroscopy and neural networks: structure alterations in proteins and lipids in intact cancer tissue."
J Invest Dermatol (2004);**122**(2): 443-449.
- [62] Gooris, G. S. and Bouwstra, J. A.
"Infrared spectroscopic study of stratum corneum model membranes prepared from human ceramides, cholesterol, and fatty acids."
Biophys J (2007);**92**(8): 2785-2795.
- [63] Gordon, S. H., Green, R. V., Wheeler, B. C. and James, C.
"Multivariate FTIR analysis of substrates for protein, polysaccharide, lipid and microbe content: potential for solid-state fermentations."
Biotechnol Adv (1993);**11**(3): 665-675.
- [64] Grams, Y. Y., Whitehead, L., Cornwell, P. and Bouwstra, J. A.
"On-line visualization of dye diffusion in fresh unfixed human skin."
Pharm Res (2004a);**21**(5): 851-859.

- [65] Grams, Y. Y., Whitehead, L., Cornwell, P. and Bouwstra, J. A.
 "Time and depth resolved visualisation of the diffusion of a lipophilic dye into the hair follicle of fresh unfixed human scalp skin."
J Control Release (2004b);**98**(3): 367-378.
- [66] Grob, J.-J., Saurat, J. H., Grasshans, E., J.M.Lachapelle, Lipsher, D., Thomas, L., et al.
Dermatologie et maladies sexuellement transmissibles.
 Paris : Masson ; 2004.
- [67] Hammond, B. R. and Wooten, B. R.
 "Resonance Raman spectroscopic measurement of carotenoids in the skin and retina."
J Biomed Opt (2005);**10**(5): 054002.
- [68] Hata, T. R., Scholz, T. A., Ermakov, I. V., McClane, R. W., Khachik, F., Gellermann, W., et al.
 "Non-invasive raman spectroscopic detection of carotenoids in human skin."
J Invest Dermatol (2000);**115**(3): 441-448.
- [69] Hofland, H. E., Bouwstra, J. A., Bodde, H. E., Spies, F. and Junginger, H. E.
 "Interactions between liposomes and human stratum corneum in vitro: freeze fracture electron microscopical visualization and small angle X-ray scattering studies."
Br J Dermatol (1995);**132**(6): 853-866.
- [70] Holtje, M., Forster, T., Brandt, B., Engels, T., von Rybinski, W. and Holtje, H. D.
 "Molecular dynamics simulations of stratum corneum lipid models: fatty acids and cholesterol."
Biochim Biophys Acta (2001);**1511**(1): 156-167.
- [71] Humbert, P. and Zahouani, H.
Actualités en ingénierie cutanée.
 Paris: ESKA; 2001.
- [72] Izutsu, K., Fujimaki, Y., Kuwabara, A., Hiyama, Y., Yomota, C. and Aoyagi, N.
 "Near-infrared analysis of protein secondary structure in aqueous solutions and freeze-dried solids."
J Pharm Sci (2006);**95**(4): 781-789.
- [73] Juang, C. B., Finzi, L. and Bustamante, C. J.
 "Design and application of a computer-controlled scanning differential polarization microscope."
Rev Sci Instrum (1988);**59** (11): 2399-2408
- [74] Kalasinsky, K. S. and Kalasinsky, V. F.
 "Infrared and Raman microspectroscopy of foreign materials in tissue specimens."
Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc (2005);**61**(7): 1707-1713.
- [75] Khan, G. M., Frum, Y., Sarheed, O., Eccleston, G. M. and Meidan, V. M.
 "Assessment of drug permeability distributions in two different model skins."
Int J Pharm (2005);**303**(1-2): 81-87.

- [76] Kirkpatrick, N. D., Hoying, J. B., Botting, S. K., Weiss, J. A. and Utzinger, U.
"In vitro model for endogenous optical signatures of collagen."
J Biomed Opt (2006);**11**(5): 054021.
- [77] Koenig, J. L. and Frushour, B.
"Raman studies of the helix-to-coil transition in poly-L-glutamic acid and poly-L-ornithine."
Biopolymers (1972);**11**(9): 1871-1892.
- [78] Kohler, A., Bertrand, D., Martens, H., Hannesson, K., Kirschner, C. and Ofstad, R.
"Multivariate image analysis of a set of FTIR microspectroscopy images of aged bovine muscle tissue combining image and design information."
Anal Bioanal Chem (2007).
- [79] Kohler, A., Kirschner, C., Oust, A. and Martens, H.
"Extended multiplicative signal correction as a tool for separation and characterization of physical and chemical information in Fourier transform infrared microscopy images of cryosections of beef loin."
Appl Spectrosc (2005);**59**(6): 707-716.
- [80] Koljenovic, S., Bakker Schut, T. C., van Meerbeeck, J. P., Maat, A. P., Burgers, S. A., Zondervan, P. E., et al.
"Raman microspectroscopic mapping studies of human bronchial tissue."
J Biomed Opt (2004);**9**(6): 1187-1197.
- [81] Koljenovic, S., Bakker Schut, T. C., Wolthuis, R., de Jong, B., Santos, L., Caspers, P. J., et al.
"Tissue characterization using high wave number Raman spectroscopy."
J Biomed Opt (2005);**10**(3): 031116.
- [82] Koljenovic, S., Choo-Smith, L. P., Bakker Schut, T. C., Kros, J. M., van den Berge, H. J. and Puppels, G. J.
"Discriminating vital tumor from necrotic tissue in human glioblastoma tissue samples by Raman spectroscopy."
Lab Invest (2002);**82**(10): 1265-1277.
- [83] Krafft, C., Neudert, L., Simat, T. and Salzer, R.
"Near infrared Raman spectra of human brain lipids."
Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc (2005);**61**(7): 1529-1535.
- [84] Krinsky, N. I. and Deneke, S. M.
"Interaction of oxygen and oxy-radicals with carotenoids."
J Natl Cancer Inst (1982);**69**(1): 205-210.
- [85] Kuzuhara, A.
"Analysis of structural change in keratin fibers resulting from chemical treatments using Raman spectroscopy."
Biopolymers (2005a);**77**(6): 335-344.

- [86] Kuzuhara, A.
"Protein structural changes in keratin fibers induced by chemical modification using 2-iminothiolane hydrochloride: a Raman spectroscopic investigation."
Biopolymers (2005b);**79**(4): 173-184.
- [87] Kuzuhara, A.
"Analysis of structural changes in bleached keratin fibers (black and white human hair) using Raman spectroscopy."
Biopolymers (2006);**81**(6): 506-514.
- [88] Kuzuhara, A. and Hori, T.
"Reduction mechanism of L-cysteine on keratin fibers using microspectrophotometry and Raman spectroscopy."
Biopolymers (2005);**79**(6): 324-334.
- [89] Lambert, J. L., Pelletier, C. C. and Borchert, M.
"Glucose determination in human aqueous humor with Raman spectroscopy."
J Biomed Opt (2005);**10**(3): 031110.
- [90] Lanka, B., Turner, M., Orton, C. and Carrington, B. M.
"Cross-sectional imaging in non-melanoma skin cancer of the head and neck."
Clin Radiol (2005);**60**(8): 869-877.
- [91] Lasch, P., Haensch, W., Naumann, D. and Diem, M.
"Imaging of colorectal adenocarcinoma using FT-IR microspectroscopy and cluster analysis."
Biochim Biophys Acta (2004);**1688**(2): 176-186.
- [92] Lasch, P. and Naumann, D.
"FT-IR microspectroscopic imaging of human carcinoma thin sections based on pattern recognition techniques."
Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) (1998);**44**(1): 189-202.
- [93] Lassau, N., Chami, L. and Peronneau, P.
"Imagerie des mélanomes : performances de l'échographie sans et avec injection de produit de contraste pour le diagnostic et l'évaluation des traitements."
Bull Cancer (2007);**94**(1): 93-98.
- [94] Lawson, E. E., Anigbogu, A. N., Williams, A. C., Barry, B. W. and Edwards, H. G.
"Thermally induced molecular disorder in human stratum corneum lipids compared with a model phospholipid system; FT-Raman spectroscopy."
Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc (1998);**54A**(3): 543-558.
- [95] Lee, P. C. and Meisel, D.
"Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols."
J Phys Chem (1982);**86**: 3391-3397.
- [96] Li, Y., Chen, R., Zeng, H., Huang, Z., Feng, S. and Xie, S.
"Raman spectroscopy on Chinese human skin in vivo."
Chinese Opt Lett (2007);**5**(2).

- [97] Lin, J. Y. and Fisher, D. E.
 "Melanocyte biology and skin pigmentation."
 Nature (2007);**445**(7130): 843-850.
- [98] Lin, S. J., Jee, S. H., Kuo, C. J., Wu, R. J., Lin, W. C., Chen, J. S., et al.
 "Discrimination of basal cell carcinoma from normal dermal stroma by quantitative multiphoton imaging."
 Opt Lett (2006);**31**(18): 2756-2758.
- [99] Lippert, J. L. and Peticolas, W. L.
 "Laser Raman investigation of the effect of cholesterol on conformational changes in dipalmitoyl lecithin multilayers."
 Proc Natl Acad Sci U S A (1971);**68**(7): 1572-1576.
- [100] Lipsker, D. M. and Cribier, B.
 Mélanome: épidémiologie, diagnostic, critères cliniques et histopathologiques du pronostic, évolution et dépistage, Faculté de médecine de Strasbourg. 2004 ; [cité le 2007-12-06]. Disponible sur: URL:
http://www.ulpmmed.ustrasbg.fr/medecine/cours_en_ligne/e_cours/cancero/module10_item149_B.pdf
- [101] Lotte, C., Patouillet, C., Zanini, M., Messager, A. and Roguet, R.
 "Permeation and skin absorption: reproducibility of various industrial reconstructed human skin models."
 Skin Pharmacol Appl Skin Physiol (2002);**15 Suppl 1**: 18-30.
- [102] Luo, J., Ying, K., He, P. and Bai, J.
 "Properties of Savitzky-Golay digital differentiators."
 Digit Signal Process (2005);**15**: 122-136.
- [103] MacKie, R. M.
 "An aid to the preoperative assessment of pigmented lesions of the skin."
 Br J Dermatol (1971);**85**(3): 232-238.
- [104] Martinhao Souto, R. L., Rehder, J., Vassallo, J., Cintra, M. L., Strangler Kraemer, M. H. and Puzzi, M. B.
 "Model for human skin reconstructed in vitro composed of associated dermis epidermis."
 Sao Paolo Med J (2006);**124**(2): 71-76.
- [105] Skin transport mechanisms; Perspective in Percutaneous Penetration (10 : 2006 : La grande motte, France)
 Marty, J. P.
 La grande motte, France, 2006
- [106] Masters, B. R., So, P. T. and Gratton, E.
 "Multiphoton excitation microscopy of in vivo human skin. Functional and morphological optical biopsy based on three-dimensional imaging, lifetime measurements and fluorescence spectroscopy."
 Ann N Y Acad Sci (1998);**838**: 58-67.

- [107] Mathlouthi, M., Seuvre, A. M. and Koenig, J. L.
"F.t.-i.r. and laser-Raman spectra of cytosine and cytidine."
Carbohydr Res (1986a);**146**(1): 1-13.
- [108] Mathlouthi, M., Seuvre, A. M. and Koenig, J. L.
"F.t.-i.r. and laser-Raman spectra of guanine and guanosine."
Carbohydr Res (1986b);**146**(1): 15-27.
- [109] Matousek, P. and Stone, N.
"Prospects for the diagnosis of breast cancer by noninvasive probing of calcifications using transmission Raman spectroscopy."
J Biomed Opt (2007);**12**(2): 024008.
- [110] McIntosh, L. M., Jackson, M., Mantsch, H. H., Stranc, M. F., Pilavdzic, D. and Crowson, A. N.
"Infrared spectra of basal cell carcinomas are distinct from non-tumor-bearing skin components."
J Invest Dermatol (1999);**112**(6): 951-956.
- [111] Mendelsohn, R., Chen, H. C., Rerek, M. E. and Moore, D. J.
"Infrared microspectroscopic imaging maps the spatial distribution of exogenous molecules in skin."
J Biomed Opt (2003);**8**(2): 185-190.
- [112] Mendelsohn, R., Flach, C. R. and Moore, D. J.
"Determination of molecular conformation and permeation in skin via IR spectroscopy, microscopy, and imaging."
Biochim Biophys Acta (2006);**1758**(7): 923-933.
- [113] Mil'Shtein, S.
"Infrared scanning for biomedical applications."
Scanning (2006);**28**(5): 274-277.
- [114] Mirrashed, F. and Sharp, J. C.
"In vivo morphological characterisation of skin by MRI micro-imaging methods."
Skin Res Technol (2004);**10**(3): 149-160.
- [115] Mordechai, S., Sahu, R. K., Hammody, Z., Mark, S., Kantarovich, K., Guterman, H., et al.
"Possible common biomarkers from FTIR microspectroscopy of cervical cancer and melanoma."
J Microsc (2004);**215**(Pt 1): 86-91.
- [116] Motz, J. T., Gandhi, S. J., Scepanovic, O. R., Haka, A. S., Kramer, J. R., Dasari, R. R., et al.
"Real-time Raman system for in vivo disease diagnosis."
J Biomed Opt (2005);**10**(3): 031113.

- [117] Mourant, J., Kunapareddy, P., Carpenter, S. and Freyer, J. P.
 "Vibrational spectroscopy for identification of biochemical changes accompanying carcinogenesis and the formation of necrosis."
Gynecol Oncol (2005);**99**(3 Suppl 1): S58-60.
- [118] Neubert, R., Rettig, W., Wartewig, S., Wegener, M. and Wienhold, A.
 "Structure of stratum corneum lipids characterized by FT-Raman spectroscopy and DSC. II. Mixtures of ceramides and saturated fatty acids."
Chem Phys Lipids (1997);**89**(1): 3-14.
- [119] Nijssen, A., Bakker Schut, T. C., Heule, F., Caspers, P. J., Hayes, D. P., Neumann, M. H., et al.
 "Discriminating basal cell carcinoma from its surrounding tissue by Raman spectroscopy."
J Invest Dermatol (2002);**119**(1): 64-69.
- [120] Nijssen, A., Maquelin, K., Santos, L. F., Caspers, P. J., Bakker Schut, T. C., den Hollander, J. C., et al.
 "Discriminating basal cell carcinoma from perilesional skin using high wave-number Raman spectroscopy."
J Biomed Opt (2007);**12**(3): 034004.
- [121] Nogueira, G. V., Silveira, L., Martin, A. A., Zangaro, R. A., Pacheco, M. T., Chavantes, M. C., et al.
 "Raman spectroscopy study of atherosclerosis in human carotid artery."
J Biomed Opt (2005);**10**(3): 031117.
- [122] Norlen, L., Gil, I. P., Simonsen, A. and Descouts, P.
 "Human stratum corneum lipid organization as observed by atomic force microscopy on Langmuir-Blodgett films."
J Struct Biol (2007);**158**(3): 386-400.
- [123] OECD.
 Guidance Document No 28 for the conduct of skin absorption studies. 2003; [cité le 2007-12-06]. Disponible sur: URL :
http://www.oecd.org/LongAbstract/0,3425,fr_2649_34365_34605161_1_1_1,1,00.html
- [124] OECD.
 Test Guideline 431: In vitro skin corrosion: Human skin model test, Paris, France. 2004; [cité le 2007-12-06]. Disponible sur: URL :
http://www.oecd.org/document/40/0,3343,fr_2649_34365_33906280_1_1_1,1,00.html
- [125] ORS.
 Le cancer dans les régions de France, Mortalité, Incidence, Affections de longue durée, Hospitalisations, Fédération nationale des observatoires régionaux de la santé. 2003; [cité le 2007-12-06]. Disponible sur: URL :
<http://www.fnors.org/fnors/ors/travaux/synthesekcer.pdf>
- [126] Parker, F.
 Applications of Infrared, Raman and Raman Resonance spectroscopy in biochemistry
 New York : Plenum Press ; 1983.

- [127] Percot, A. and Lafleur, M.
"Direct observation of domains in model stratum corneum lipid mixtures by Raman microspectroscopy."
Biophys J (2001);**81**(4): 2144-2153.
- [128] Petibois, C. and Deleris, G.
"Chemical mapping of tumor progression by FT-IR imaging: towards molecular histopathology."
Trends Biotechnol (2006);**24**(10): 455-462.
- [129] Piantelli, M., Maggiano, N., Ricci, R., Larocca, L. M., Capelli, A., Scambia, G., et al.
"Tamoxifen and quercetin interact with type II estrogen binding sites and inhibit the growth of human melanoma cells."
J Invest Dermatol (1995);**105**(2): 248-253.
- [130] Pilgram, G. S., Van Pelt, A. M., Spies, F., Bouwstra, J. A. and Koerten, H. K.
"Cryo-electron diffraction as a tool to study local variations in the lipid organization of human stratum corneum."
J Microsc (1998);**189**(Pt 1): 71-78.
- [131] Pircher, M., Goetzinger, E., Leitgeb, R. and Hitzenberger, C. K.
"Three dimensional polarization sensitive OCT of human skin in vivo."
Optics express (2000);**12**(14).
- [132] Pirola, R., Bareggi, S. R. and De Benedittis, G.
"Determination of acetylsalicylic acid and salicylic acid in skin and plasma by high-performance liquid chromatography."
J Chromatogr B Biomed Sci Appl (1998);**705**(2): 309-315.
- [133] Podoleanu, A. G., Rogers, J. A. and Jackson, D. A.
"Three dimensional OCT images from retina and skin."
Optics express (2000);**7**(9).
- [134] Ponec, M., Boelsma, E., Gibbs, S. and Mommaas, M.
"Characterization of reconstructed skin models."
Skin Pharmacol Appl Skin Physiol (2002);**15 Suppl 1**: 4-17.
- [135] Portes, P., Grandidier, M. H., Cohen, C. and Roguet, R.
"Refinement of the Episkin protocol for the assessment of acute skin irritation of chemicals: follow-up to the ECVAM prevalidation study."
Toxicol In Vitro (2002);**16**(6): 765-770.
- [136] Potts, R. O., Guzek, D. B., Harris, R. R. and McKie, J. E.
"A noninvasive, in vivo technique to quantitatively measure water concentration of the stratum corneum using attenuated total-reflectance infrared spectroscopy."
Arch Dermatol Res (1985);**277**(6): 489-495.
- [137] Prunieras, M., Regnier, M. and Woodley, D.
"Methods for cultivation of keratinocytes with an air-liquid interface."
J Invest Dermatol (1983);**81**(1 Suppl): 28s-33s.

- [138] Rehder, J., Martinhao Souto, R. L., Magro Issa, C. M. B. and Puzzi, M. B.
 "Model of human epidermis reconstructed in vitro with keratinocytes and melanocytes on dead de-epidermized human dermis."
Sao Paolo Med J (2004);**122**(1): 22-25.
- [139] Remontet, L., Buemi, A., Velten, M., Jouglia, E. and Estève, J.
 Evolution de l'incidence et de la mortalité par cancer en France de 1978 à 2000 Institut de Veille Sanitaire, Département maladies chroniques et traumatismes. 2003; [cité le 2007-12-06]. Disponible sur: URL :
http://www.invs.sante.fr/publications/2003/rapport_cancer_2003/
- [140] Rodríguez-Cabello, J. C., Alonso, M., Caballero, M. I. and Herguedas, M. M.
 "Experimental study of the assignment of non-amide Raman bands of the polypentapeptide of elastin, poly(VPGVG)."
J Raman Spectrosc (2000);**31** (6): 523 - 527.
- [141] Saiag, P., Grob, J. J. and Grosshans, E.
 "Epithelial and melanotic skin tumors. Melanomas."
Ann Dermatol Venereol (2002);**129**(10 Suppl): S143-148.
- [142] Savitzky, A. and GOLAY, M. J. E.
 "Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures."
Anal Chem (1964);**36**(8): 1627-1639.
- [143] SCCNFP (2003).
 The SCCNFP's Notes of Guidance for the testing of cosmetic ingredients and their safety evaluation. 2003 ; [cité le 2007-12-06]. Disponible sur: URL :
http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/sccp/documents/out242_en.pdf
- [144] Schenke-Layland, K., Riemann, I., Damour, O., Stock, U. A. and Konig, K.
 "Two-photon microscopes and in vivo multiphoton tomographs--powerful diagnostic tools for tissue engineering and drug delivery."
Adv Drug Deliv Rev (2006);**58**(7): 878-896.
- [145] Scheuplein, R. J. and Blank, I. H.
 "Permeability of the skin."
Physiol Rev (1971);**51**(4): 702-747.
- [146] Schmitt, D.
 Biologie de la peau humaine.
 Paris : Inserm ; 1997.
- [147] Schreiber, S., Mahmoud, A., Vuia, A., Rubbelke, M. K., Schmidt, E., Schaller, M., et al.
 "Reconstructed epidermis versus human and animal skin in skin absorption studies."
Toxicol In Vitro (2005);**19**(6): 813-822.

- [148] Serruys, C.
 "Classification automatique des tumeurs noires de la peau par des techniques numériques d'analyses d'images fondées sur des méthodes d'apprentissage par l'exemple: aide au dépistage des mélanomes."
 Thèse : Paris V René Descartes; 2002
- [149] Sett, P., Chattopadhyay, S. and Mallick, P. K.
 "Raman excitation profiles and excited state molecular configurations of three isomeric phenyl pyridines."
Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc (2000);**56**(5): 855-875.
- [150] Shim, M. G., Song, L. M., Marcon, N. E. and Wilson, B. C.
 "In vivo near-infrared Raman spectroscopy: demonstration of feasibility during clinical gastrointestinal endoscopy."
Photochem Photobiol (2000);**72**(1): 146-150.
- [151] Shim, M. G. and Wilson, B. C.
 "Development of an in vivo Raman spectroscopic system for diagnostic applications."
J Raman Spectrosc (1997);**28**: 131-142.
- [152] Shim, M. G., Wilson, B. C., Marple, E. and Wach, M.
 "Study of fiber-optic probes for in vivo medical Raman."
Appl Spectrosc (1999);**53**(6).
- [153] Confocal Raman microspectroscopy - Measuring the effects of topical moisturisers on stratum corneum water gradients in vivo; The international society of optical engineering (6093 : 2006 : San Jose, California, USA)
 Sieg, A., Crowther, J., Blenkiron, P., Marcott, C. and Matts, P. J.
 San Jose, California, USA, 2006
- [154] Sigurdsson, S., Philipsen, P. A., Hansen, L. K., Larsen, J., Gniadecka, M. and Wulf, H. C.
 "Detection of skin cancer by classification of Raman spectra."
IEEE Trans Biomed Eng (2004);**51**(10): 1784-1793.
- [155] Siiman, O., Bumm, L. A., Caalaghan, R., Blatchford, C. G. and Kerker, M.
 "Surface enhanced Raman scattering by citrate on colloidal silver."
J Phys Chem (1983);**87**: 1014-1021.
- [156] So, P. T. C. and Kim, H.
 "Two-photon deep tissue ex vivo imaging of mouse dermal and subcutaneous structures."
Optics express (1998);**3**(9).
- [157] Stone, N., Kendall, C., Smith, J., Crow, P. and Barr, H.
 "Raman spectroscopy for identification of epithelial cancers."
Faraday Discuss (2004);**126**: 141-157; discussion 169-183.
- [158] Strasswimmer, J., Pierce, M. C., Park, B. H., Neel, V. and de Boer, J. F.
 "Polarization-sensitive optical coherence tomography of invasive basal cell carcinoma."
J Biomed Opt (2004);**9**(2): 292-298.

- [159] Szayna, M. and Kuhn, W.
"In vivo and in vitro investigations of hydration effects of beauty care products by high-field MRI and NMR microscopy."
J Eur Acad Dermatol Venereol (1998);**11**(2): 122-128.
- [160] Tfayli, A., Piot, O., Pitre, F. and Manfait, M.
"Follow-up of drug permeation through excised human skin with confocal Raman microspectroscopy."
Eur Biophys J (2007).
- [161] Thennadil, S. N., Martens, H. and Kohler, A.
"Physics-based multiplicative scatter correction approaches for improving the performance of calibration models."
Appl Spectrosc (2006);**60**(3): 315-321.
- [162] Thivolet, J. and Faure, M.
Biologie de la peau.
Paris: Inserm ; 1989.
- [163] Tortora, G. J. and Reynolds-Grabowski, S., Eds.
Principes d'anatomie et de physiologie.
Bruxelle : DeBoeck Université; 1988.
- [164] Tsen, K. T., Tsen, S. W. and Kiang, J. G.
"Lycopene is more potent than beta carotene in the neutralization of singlet oxygen: role of energy transfer probed by ultrafast Raman spectroscopy."
J Biomed Opt (2006);**11**(6): 064025.
- [165] Tsuboi, M., Ezaki, Y., Aida, M., Suzuki, M., Yimit, A., Ushizawa, K., et al.
"Raman scattering tensors of tyrosine."
Biospectroscopy (1998);**4**(1): 61-71.
- [166] Uzunbajakava, N., Lenferink, A., Kraan, Y., Volokhina, E., Vrensen, G., Greve, J., et al.
"Nonresonant confocal Raman imaging of DNA and protein distribution in apoptotic cells."
Biophys J (2003);**84**(6): 3968-3981.
- [167] van de Sandt, J. J. M., van Burgsteden, J. A., Cage, S., Carmichael, P. L., Dick, I., Kenyon, S., et al.
"In vitro predictions of skin absorption of caffeine, testosterone, and benzoic acid: a multi-centre comparison study."
Regul Toxicol Pharmacol (2004);**39**(3): 271-281.
- [168] Veiro, J. A. and Cummins, P. G.
"Imaging of skin epidermis from various origins using confocal laser scanning microscopy."
Clin Lab Invest (1994);**189**(1): 16–22.

- [169] Wagner, H., Kostka, K.-H., Lehr, C.-M. and Schaefer, U. F.
"Interrelation of permeation and penetration parameters obtained from in vitro experiments with human skin and skin equivalents."
J Control Release (2001);**75**(3): 283-295.
- [170] Methods and models for examining percutaneous absorption; Perspective in Percutaneous Penetration (10 : 2006 : La grande motte, France)
Walters, K. A.
La grande motte, France, 2006
- [171] Wegener, M., Neubert, R., Rettig, W. and Wartewig, S.
"Structure of stratum corneum lipids characterized by FT-Raman spectroscopy and DSC. III. Mixtures of ceramides and cholesterol."
Chem Phys Lipids (1997);**88**(1): 73-82.
- [172] Weigmann, H.-J., Jacobi, U., Antoniou, C., Tsikrikas, G. N., Wendel, V., Rapp, C., et al.
"Determination of penetration profiles of topically applied substances by means of tape stripping and optical spectroscopy: UV filter substance in sunscreens."
J Biomed Opt (2005);**10**(1): 014009-014007.
- [173] Weigmann, H., Lademann, J., Meffert, H., Schaefer, H. and Sterry, W.
"Determination of the horny layer profile by tape stripping in combination with optical spectroscopy in the visible range as a prerequisite to quantify percutaneous absorption."
Skin Pharmacol Appl Skin Physiol (1999);**12**(1-2): 34-45.
- [174] Weissman, M. M., Gross, R., Fyer, A., Heiman, G. A., Gamerooff, M. J., Hodge, S. E., et al.
"Interstitial cystitis and panic disorder: a potential genetic syndrome."
Arch Gen Psychiatry (2004);**61**(3): 273-279.
- [175] West, P. A., Torzilli, P. A., Chen, C., Lin, P. and Camacho, N. P.
"Fourier transform infrared imaging spectroscopy analysis of collagenase-induced cartilage degradation."
J Biomed Opt (2005);**10**(1): 14015.
- [176] Wood, B. R., Chiriboga, L., Yee, H., Quinn, M. A., McNaughton, D. and Diem, M.
"Fourier transform infrared (FTIR) spectral mapping of the cervical transformation zone, and dysplastic squamous epithelium."
Gynecol Oncol (2004);**93**(1): 59-68.
- [177] Xiao, C., Flach, C. R., Marcott, C. and Mendelsohn, R.
"Uncertainties in depth determination and comparison of multivariate with univariate analysis in confocal Raman studies of a laminated polymer and skin."
Appl Spectrosc (2004);**58**(4): 382-389.
- [178] Xiao, C., Moore, D. J., Flach, C. R. and Mendelsohn, R.
"Permeation of dimyristoylphosphatidylcholine into skin - structural and spatial information from IR and Raman microscopic imaging."
Vib Spectrosc (2005a);**38**: 151-158.

- [179] Xiao, C., Moore, D. J., Rerek, M. E., Flach, C. R. and Mendelsohn, R.
"Feasibility of tracking phospholipid permeation into skin using infrared and Raman
microscopic imaging."
J Invest Dermatol (2005b);**124**(3): 622-632.
- [180] Yeung, K. Y. and Ruzzo, W. L.
"Principal component analysis for clustering gene expression data."
Bioinformatics (2001);**17**(9): 763-774.
- [181] Yu, B., Kim, K. H., So, P. T., Blankschtein, D. and Langer, R.
"Visualization of oleic acid-induced transdermal diffusion pathways using two-photon
fluorescence microscopy."
J Invest Dermatol (2003);**120**(3): 448-455.
- [182] Zhu, F., Isaacs, N. W., Hecht, L., Tranter, G. E. and Barron, L. D.
"Raman optical activity of proteins, carbohydrates and glycoproteins."
Chirality (2006);**18**(2): 103-115.