

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

ANNEE 2009

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 le 15 Septembre 2009

par

**Elodie LY**

Née le 9 Juillet 1983 à Vitry-le-François (Marne)

**CARACTERISATION DES LESIONS CUTANEEES PAR MICROSPECTROSCOPIES  
OPTIQUES VIBRATIONNELLES : APPLICATIONS *EX VIVO* ET *IN VIVO***

**Jury**

Rapporteurs :	Pr. Arlette BAILLET-GUFFROY Dr. Bernard SCHOOT
Examineurs :	Pr. Philippe BERNARD Dr. Hugh BYRNE
Directeurs de thèse :	Pr. Michel MANFAIT Dr. Olivier PIOT



## REMERCIEMENTS

### **A Monsieur le Professeur Michel Manfait,**

Je vous remercie très sincèrement de m'avoir accueillie dans votre équipe et de m'avoir donné les moyens de réaliser ce travail. Je vous remercie également pour votre sympathie et surtout pour la confiance que vous m'avez accordée pendant mon doctorat. Vous m'avez également donné l'opportunité de présenter mes travaux dans des congrès internationaux à de multiples reprises, et je vous en suis reconnaissante.

### **A Madame le Professeur Arlette Baillet-Guffroy,**

Je vous remercie sincèrement pour l'honneur que vous me faites d'accepter d'être rapporteur de ce travail. Veuillez accepter mes remerciements et soyez assurée de mon respect et ma gratitude.

### **A Monsieur le Docteur Bernard Schoot,**

Je tiens à vous remercier pour l'honneur que vous me faites d'accepter d'être rapporteur de ce travail. Je vous remercie également pour votre sympathie à mon égard, ainsi que pour l'intérêt que vous avez toujours porté à mon travail.

### **A Monsieur le Professeur Philippe Bernard,**

Je vous adresse mes remerciements les plus respectueux pour avoir accepté d'être membre du jury. Je vous remercie pour l'intérêt que vous avez porté à mon travail, ainsi que pour notre travail de collaboration.

### **To Docteur Hugh J. Byrne,**

Many thanks for accepting reviewing my work. Your presence in the board of examiners is a great honour to me.

### **A Olivier Piot,**

Je te serai toujours reconnaissante pour ton investissement dans ce travail. Je te remercie sincèrement pour ta grande disponibilité, tes conseils, ta confiance en moi et surtout pour la grande liberté que tu m'as accordée. J'ai également apprécié ta bonne humeur et ta sympathie tout au long de mon doctorat. Toutes ces qualités font de toi un super encadrant. Je te dis encore merci, car sans toi, je n'aurais pas visité les chutes d'Iguaçu ni fait l'ascension de l'Etna !

Je tiens à remercier le personnel du laboratoire Pol Bouin du CHU de Reims, en particulier le Docteur Anne-Durlach, pour l'intérêt qu'elle a porté à mon travail.

Un grand merci au personnel du service de Dermatologie du CHU de Reims, en particulier les Docteurs Ziad Reguäi et Anne-Laure Goedel pour leur aide précieuse. Je n'oublie pas les infirmières et les secrétaires que j'ai souvent sollicitées.

Je remercie le Professeur Jean-Paul Ortonne et le Docteur Nathalie Cardot-Leccia pour leur intérêt pour mon travail. Nathalie, je te remercie sincèrement pour ton investissement. J'espère que le travail de collaboration se pérennisera.

Je remercie également l'équipe Galderma, en particulier Philippe Andres, André Jomard, Philippe Martel et Laurent Petit pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail, leur confiance et leur sympathie. Un grand merci au Docteur Paul Fogel pour ses conseils en statistiques et sa sympathie.

Aux "traiteurs du signal", Cyril, David et Vali, je vous remercie pour votre amitié et pour votre aide précieuse. A David, je te souhaite un bon courage pour la fin.

Merci également à Emilie et Julien pour leurs conseils en statistiques.

A Ganesh, Florence, Abdel, Adrien, Hadrian, Ali, Sana, Nathalie, Mme Pisani, Mr Jeannesson et à tous les étudiants, stagiaires, permanents et anciens membres du laboratoire, je vous remercie pour votre aide et votre bonne humeur. Merci également à Christine et à Valérie pour les pauses-déjeuner agréables.

Je remercie également ma famille et belle-famille pour leur soutien et leur confiance. Merci à mes parents pour m'avoir permis de faire de si longues études...

Mes derniers remerciements vont à Lukas, qui a toujours cru en moi, qui m'a soutenue et encouragée dans les moments difficiles. Je te remercie pour ton dévouement, ton avis critique et pour avoir sacrifié quelques week-ends pour venir au labo avec moi. Une partie de ce travail te revient également.

## RESUME

La peau est notre organe le plus important de par sa surface et son poids. Véritable barrière aux agressions extérieures, elle représente notre première ligne de défense naturelle. C'est un organe complexe qui présente une forte hétérogénéité, et qui peut être altéré par des désordres cutanés liés à des pathologies. Les techniques de spectroscopie vibrationnelle représentent un outil innovant pour l'analyse de la peau. Elles reposent sur l'interaction non-destructive lumière-matière ; ce qui permet d'extraire une "empreinte moléculaire" caractéristique de l'état physiopathologique de l'échantillon analysé. Nous avons évalué le potentiel de ces techniques pour la caractérisation des lésions cutanées. A partir de coupes de biopsies paraffinées, la micro-imagerie infrarouge, combinée à des méthodes puissantes de statistiques multivariées, a été appliquée avec succès pour le diagnostic différentiel des carcinomes cutanés (carcinomes basocellulaires et spinocellulaires) et pour la caractérisation du mélanome cutané. De plus, la microspectroscopie Raman polarisée a été mise en œuvre pour l'examen des lésions de type carcinome basocellulaire. Nous avons analysé plus précisément les foyers tumoraux et le tissu péri-tumoral. Les résultats montrent que le potentiel discriminant de la microspectroscopie Raman est renforcé par l'analyse de la polarisation du signal. Enfin, nous avons développé en milieu clinique la spectroscopie Raman *in vivo* pour l'analyse de pathologies cutanées chez les patients pris en charge au sein du service de Dermatologie du CHU de Reims.

## ABSTRACT

The skin, considering its surface and weight, is the most important organ of the human body. It acts as a genuine barrier to external aggression and is our first line of defense. It is a complex heterogeneous organ, which can be altered by cutaneous disorders related to skin pathologies. Vibrational spectroscopies are innovative tools for skin analysis. They are based on the non-destructive interaction between light and matter, and "molecular fingerprints" that are specific for the physiopathological state of the sample can be extracted. The potential of these techniques for the characterization of skin lesions has been assessed. Infrared micro-imaging, in combination with robust multivariate statistical analyses was successfully implemented for the differential diagnosis of skin carcinomas and for cutaneous melanoma characterization. These analyses were performed on paraffin-embedded skin biopsies. Polarized Raman microspectroscopy was then developed to investigate a tissue as complex as skin. It was able to strengthen the discriminative power of conventional Raman microspectroscopy for the study of tumoral and peritumoral tissues in basal cell carcinoma. Finally, Raman spectroscopy was applied *in vivo* for the analysis of cutaneous lesions on patients admitted to the Dermatology ward of CHU de Reims.

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

### Articles de revues

---

**LY E.**, PIOT O., WOTHUIS R., DURLACH A., BERNARD P., MANFAIT M.

Combination of FTIR spectral imaging and chemometrics for tumor detection from paraffin-embedded biopsies.

Analyst 2008 ; 133 : 197-205.

WOTHUIS R., TRAVO A., NICOLET C., NEUVILLE A., GAUB M-P., GUENOT D., **LY E.**, MANFAIT M., JEANNESSON P., PIOT O.

IR spectral imaging for histopathological characterization of xenografted human colon carcinomas.

Anal. Chem. 2008 ; 80 (22) : 8461-8469.

**LY E.**, PIOT O., DURLACH A., BERNARD P., MANFAIT M.

Polarized Raman microspectroscopy can reveal structural changes of peritumoral dermis in basal cell carcinoma.

Appl. Spectrosc. 2008 ; 62 (10) : 1088-1094.

**LY E.**, PIOT O., DURLACH A., BERNARD P., MANFAIT M.

Differential diagnosis of cutaneous carcinomas by infrared micro-imaging combined with pattern recognition.

Analyst 2009 ; 134 : 1208-1214.

**LY E.**, DURLACH A., ANTONICELLI F., BERNARD P., MANFAIT M., PIOT O.

Probing tumour and peritumoral tissues in superficial and nodular basal cell carcinoma using polarized Raman microspectroscopy

En attente de validation des corrections (Experimental Dermatology)

**LY E.**, CARDOT-LECCIA N., ORTONNE J-P., MAXIME BENCHETRIT, MICHIELS J-F., MANFAIT M., PIOT O.

Histopathological characterization of primary cutaneous melanoma using infrared micro-imaging: a proof-of-concept study

A soumettre à Histopathology

### Articles de congrès

---

SEBISKVERADZE D., GOBINET C., **LY E.**, MANFAIT M., JEANNESSON P., HERBIN M., PIOT O., VRABIE V.

Effects of digital dewaxing methods on K-means clusterized IR images collected on formalin-fixed paraffin embedded samples of skin carcinoma.

In proceedings of the 8<sup>th</sup> IEEE International Conference on BioInformatics and BioEngineering (BIBE 2008), Athens, Greece, 1-6

### Communications orales

---

**LY E.**, PIOT O., WOTHUIS R., MANFAIT M.

Diagnostic des lésions cancéreuses par imagerie infrarouge : importance du traitement statistique multivarié des données spectrales.

Séminaire Image : du traitement de l'image à la vidéo. The Mathwoks, Paris, France, 20 Sept. 2007.

**LY E.**, SOCKALINGUM G. D.

Applications de l'analyse en composantes principales en spectroscopie.

Ecole CNRS Chimométrie des Spectroscopies et Imageries Moléculaires (CSIM), Anglet, France, 22-26 Oct. 2007.

**LY E.**, PIOT O., DURLACH A., BERNARD P., MANFAIT M.

Diagnostic des lésions cutanées par imagerie infrarouge : rôle clé du traitement statistique multivarié dans l'exploitation des données spectrales.

Journées Jeunes Chercheurs de l'IFR 53, Reims, France, 19 Juin 2008.

**LY E.**, PIOT O., WOTHUIS R., MANFAIT M.

Matlab pour l'imagerie infrarouge.

Diagnostic des lésions cutanées par imagerie infrarouge : rôle clé du traitement statistique multivarié dans l'exploitation des données spectrales.

Webinar Matlab (séminaire en ligne), diffusé en ligne le 22 Sept. 2008 et disponible sur le site [www.mathworks.com](http://www.mathworks.com)

**LY E.**, PIOT O., DURLACH A., BERNARD P., MANFAIT M.

Differential diagnosis of cutaneous lesions by Infrared spectral imaging combined with a multivariate statistical data processing.

SPEC 2008, Shedding light on disease : optical diagnosis for the new millenium, São José Dos Campos, Brésil, 24-30 Oct 2008.

**LY E.**, PIOT O.

Méthodes spectroscopiques et biophysique.

Atelier de formation pour les Journées académiques des enseignants de Physique-Chimie, Section académique de Reims, Reims, France, 21 Janv. 2009.

**LY E.**, PIOT O., DURLACH A., BERNARD P., MANFAIT M.

Microspectroscopies Raman et infrarouge. Applications au diagnostic des cancers cutanés.

OPTDIAG 2009, Paris, France, 13-15 Mai 2009.

**LY. E.**, TRAVO A., JEANNESSON P., MANFAIT M., PIOT O.

Implémentation de l'imagerie spectrale infrarouge en oncologie.

Colloque Imagerie pour les Sciences du Vivant et la Médecine, IMVIE 2009, Mulhouse, France, 8-10 Juin 2009.

### **Communications par poster**

---

**LY E.**, PIOT O., WOTHUIS R., DURLACH A., BERNARD P., MANFAIT M.

Investigation of BCC and SCC skin cancers by vibrational micro-imaging: processing of infrared data collected on paraffin-embedded skin samples.

12<sup>th</sup> European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules (ECSBM 2007), Paris, France, 1-6 Sept. 2007.

PIOT O., TFAYLI A., **LY E.**, DURLACH A., BERNARD P., MANFAIT M.

Développement de l'analyse spectrale pour la caractérisation des systèmes biologiques : applications en dermatologie.

Forum Ingrédients : santé, beauté, bien-être, Vannes, France, 6-7 Déc. 2007

**PIOT O.**, JEANNESSON P., **LY E.**, TRAVO A., UNTEREINER V., WOTHUIS R., MANFAIT M.

Infrared imaging based-histology for molecular characterization of tumor tissue

99<sup>th</sup> American Association for Cancer Research Meeting (AACR 2008), San Diego (CA), USA, 12-16 Avril 2008.

**LY E.**, PIOT O., TFAYLI A., DURLACH A., BERNARD P., MANFAIT M.

Development of spectral analysis for applications in dermatology

International Investigative Dermatology 2008 (IID 2008), Kyoto, Japon, 14-17 Mai 2008.

J Invest Dermatol 2008 ; 128 (Suppl 1) : 354

**PIOT O.**, **LY E.**, DURLACH A., BERNARD P., MANFAIT M.

Polarized vs conventional Raman analysis of skin cancers: investigations on thin frozen sections of basal cell carcinoma

SPEC 2008, Shedding light on disease : optical diagnosis for the new millenium, São José Dos Campos, Brésil, 24-30 Oct 2008.

**SEBISKVERADZE D.**, GOBINET C., **LY E.**, PIOT O., MANFAIT M., JEANNESSON P., VRABIE V.

IR spectral micro-imaging of human skin carcinoma: a new way of revealing molecular information by fuzzy clustering.

Oncotrans 2009, Nancy, France, 19-20 Mars 2009.

**LY E.**, PIOT O., DURLACH A., BERNARD P., **MANFAIT M.**

Development of an infrared-imaging-based histology for the differential diagnosis of non-melanoma skin cancers.

100<sup>th</sup> American Association for Cancer Research Meeting (AACR 2009), Denver (CO), USA, 18-22 Avril 2009.

**LY E.**, DURLACH A., ANTONICELLI F., BERNARD P., MANFAIT M., PIOT O.

Probing tumour and peritumoral tissues in superficial and nodular basal cell carcinoma using polarized Raman microspectroscopy

Congrès Annuel de Recherche Dermatologique (CARD 2009), Reims, France, 3-5 Juin 2009

## LISTE DES ABREVIATIONS

**ACI** : analyse en composantes indépendantes  
**ACP** : analyse en composantes principales  
**ANN** : *artificial neural networks*  
**AUC** : *area under the curve*  
**BCC** : carcinome basocellulaire (*basal cell carcinoma*)  
**CaF<sub>2</sub>** : fluorure de calcium  
**CCD** : charge-coupled device  
**CSLM** : *confocal scanning laser microscopy*  
**EMSC** : *extended multiplicative signal correction*  
**FLIM** : *fluorescence lifetime imaging microscopy*  
**FTIR** : *Fourier-transform infrared*  
**HAS** : haute autorité de santé  
**INCa** : institut national du cancer  
**IR** : infrarouge  
**IRM** : imagerie par résonance magnétique  
**IRTF** : infrarouge à transformée de Fourier  
**LDA** : *linear discriminant analysis*  
**MALDI** : *matrix-assisted laser desorption ionization*  
**MDR** : *multi-drug resistant*  
**NIPALS** : *non linear iterative partial least squares*  
**NMSC** : *non melanoma skin cancers*  
**OCT** : optical coherence tomography  
**PC** : *principal component*  
**PCA** : *principal component analysis*  
**ROC** : *receiver operating characteristics*  
**SC** : stratum corneum  
**SSM** : *superficial spreading melanoma*  
**SVD** : *singular value decomposition*  
**SVM** : *support vector machines*  
**ZnSe** : séléniure de zinc

## LISTE DES FIGURES

<i>Figure I.01 : Structure de la peau</i>	19
<i>Figure I.02 : L'épiderme est un épithélium stratifié pavimenteux kératinisé</i>	21
<i>Figure I.03 : Répartition des cancers chez l'Homme</i>	23
<i>Figure I.04 : Formes cliniques du carcinome basocellulaire</i>	25
<i>Figure I.05 : Carcinome spinocellulaire</i>	25
<i>Figure I.06 : La règle ABCDE pour l'examen clinique du naevus</i>	26
<i>Figure I.07 : Histologie du CBC superficiel</i>	27
<i>Figure I.08 : Histologie du CBC nodulaire</i>	28
<i>Figure I.09 : Histologie du CBC nodulaire infiltrant</i>	28
<i>Figure I.10 : Histologie du CBC sclérodermique</i>	28
<i>Figure I.11 : Histologie du CSC</i>	29
<i>Figure I.12 : Histologie de la maladie de Bowen</i>	29
<i>Figure I.13 : Les indices de Clark et de Breslow</i>	30
<i>Figure I.14 : Histologie du mélanome SSM</i>	31
<i>Figure I.15 : Histologie du mélanome nodulaire</i>	31
<i>Figure I.16 : Histologie du mélanome lentigineux acral</i>	31
<i>Figure I.16 : Histologie du mélanome de Dubreuilh</i>	32
<i>Figure I.17 : Exemple des mouvements de vibration du groupe CH<sub>2</sub> d'une molécule</i>	36
<i>Figure I.18 : Phénomènes de diffusion entre un photon et la matière</i>	38
<i>Figure I.19 : Schéma descriptif de l'imageur infrarouge</i>	41
<i>Figure I.20 : Image spectrale-Image visible</i>	42
<i>Figure I.21 : Microspectromètre Raman Labram</i>	43
<i>Figure I.22 : Spectromètre Raman HE</i>	43
<i>Figure II.01 : Exemple d'un score plot</i>	49
<i>Figure II.02 : Effets du déparaffinage chimique sur un clustering K-means</i>	65
<i>Figure II.03 : Le déparaffinage chimique n'est pas complet</i>	65
<i>Figure II.04 : Comparaison d'une classification LDA (6 classes) et d'un clustering K-means</i>	77
<i>Figure II.05 : Mise en évidence des différences spectrales entre les trois types de lésion</i>	78
<i>Figure III.01 : Système d'axes utilisées pour des mesures en Raman polarisé sur des fibres uniques</i>	116
<i>Figure III.02 : Influence de la polarisation du laser sur les spectres Raman enregistrés sur une coupe de peau</i>	117
<i>Figure IV.01 : Sonde de mesure Raman InPhotonics</i>	143
<i>Figure IV.02 : Système Raman portable HE</i>	144
<i>Figure IV.03 : Exemple de lésions analysées</i>	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
<i>Figure IV.04 : Correction de la ligne de base</i>	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
<i>Figure IV.05 : Gamme spectrale discriminante entre les spectres enregistrés sur une peau saine et une peau lésée.</i>	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
<i>Figure IV.06 : Dendrogramme réalisé sur les spectres Raman in vivo enregistrés sur la lésion (rouge) et sur la peau saine (vert), à partir de 10 lésions distinctes.</i>	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>

## LISTE DES TABLEAUX

*Tableau 1 : Matrice de confusion pour un modèle à 6 classes* \_\_\_\_\_ 77

## SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION</b>	<b>15</b>
<b>CHAPITRE I : GENERALITES : LES CANCERS DE LA PEAU ET LES SPECTROSCOPIES VIBRATIONNELLES</b>	<b>18</b>
<b>I.1 Description histologique et moléculaire de la peau</b>	<b>19</b>
I.1.1 Epiderme	19
I.1.2 Derme	21
I.1.3 Hypoderme	22
<b>I.2 Cancers de la peau</b>	<b>23</b>
I.2.1 Présentation	23
I.2.2 Diagnostic clinique	25
I.2.3 Diagnostic histologique	27
I.2.4 Traitement des cancers cutanés	32
I.2.5 Méthodes biophysiques développées pour le diagnostic des carcinomes cutanés	33
<b>I.3 Spectroscopies vibrationnelles – Principe</b>	<b>36</b>
I.3.1 Spectroscopie Infrarouge (Dalibart and Servant, 2000)	37
I.3.2 Spectroscopie Raman (Barbillat et al., 1999)	37
I.3.3 Règles de sélection	39
<b>I.4 Spectroscopies vibrationnelles – Instrumentation</b>	<b>41</b>
I.4.1 Imageur Infrarouge	41
I.4.2 Microspectromètre Raman (Labram)	42
I.4.3 Spectromètre Raman miniaturisé	43
<b>I.5 Caractérisation des cancers cutanés par spectroscopie vibrationnelle</b>	<b>44</b>
<b>CHAPITRE II : CARACTERISATION DES CANCERS CUTANES PAR MICRO-IMAGERIE INFRAROUGE</b>	<b>45</b>
<b>II.1 Introduction</b>	<b>46</b>
<b>II.2 Chimiométrie et analyse statistique</b>	<b>47</b>
II.2.1 Analyse en composantes principales (ACP)	47
II.2.2 Analyse discriminante linéaire	50
II.2.3 Analyse hiérarchique ascendante	52
II.2.4 Analyse par K-means clustering	52
<b>II.3 Article #1 : Combination of FTIR spectral imaging and chemometrics for tumor detection from paraffin-embedded biopsies</b>	<b>53</b>
<b>II.4 Article #2 : Differential diagnosis of cutaneous carcinomas by infrared micro-imaging combined with pattern recognition</b>	<b>66</b>
<b>II.5 Article #3 : Histopathological characterization of primary cutaneous melanoma using infrared micro-imaging: a proof-of-concept study</b>	<b>79</b>
<b>CHAPITRE III : DEVELOPPEMENT DE LA MICROSPECTROSCOPIE RAMAN POLARISEE POUR LA CARACTERISATION DES CARCINOMES BASOCELLULAIRES</b>	<b>105</b>
<b>III.1 Motivation</b>	<b>106</b>
<b>III.2 Article #4 : Polarized Raman microspectroscopy can reveal structural changes of peritumoral dermis in basal cell carcinoma</b>	<b>107</b>
<b>III.3 Article #5 : Probing tumour and peritumoral tissues in superficial and nodular basal cell carcinoma using polarized Raman microspectroscopy</b>	<b>118</b>
<b>III.4. Perspectives</b>	<b>141</b>

**CHAPITRE IV : EVALUATION DU POTENTIEL DE LA SPECTROSCOPIE RAMAN  
POUR L'AIDE AU DIAGNOSTIC DES LESIONS CUTANÉES. APPLICATION IN VIVO  
EN CLINIQUE** \_\_\_\_\_ **142**

**IV.1 Introduction** \_\_\_\_\_ **142**

**IV.2 Matériels et méthodes** \_\_\_\_\_ **143**

IV.2.1 Appareil utilisé \_\_\_\_\_ 143

IV.2.2 Protocole de mesure \_\_\_\_\_ 144

IV.2.3 Difficultés rencontrées – Améliorations du système de mesure \_\_\_\_\_ **Erreur ! Signet non défini.**

IV.2.4 Calibration des spectres \_\_\_\_\_ **Erreur ! Signet non défini.**

**IV.3 Résultats et discussion** \_\_\_\_\_ **Erreur ! Signet non défini.**

IV.3.1 Sélection de la gamme spectrale discriminante \_\_\_\_\_ **Erreur ! Signet non défini.**

IV.3.2 Analyse hiérarchique en clusters \_\_\_\_\_ **Erreur ! Signet non défini.**

IV.3.3 Analyse discriminante \_\_\_\_\_ **Erreur ! Signet non défini.**

**IV.4 Conclusion et perspectives** \_\_\_\_\_ **Erreur ! Signet non défini.**

**CONCLUSION GENERALE** \_\_\_\_\_ **146**

## INTRODUCTION

---

Le cancer de la peau est le cancer le plus fréquent au monde. Son diagnostic repose sur l'évaluation histologique d'une biopsie ou de l'exérèse de la lésion suspecte à l'aide de colorants spécifiques. Cette évaluation, principalement morphologique, dépend donc de l'expertise d'un dermatopathologiste.

Les microspectroscopies optiques infrarouge (IR) et Raman permettent d'accéder à la composition chimique d'un échantillon, par l'analyse de l'interaction non destructive lumière-matière. L'absorption IR ou la diffusion Raman du rayonnement se produit pour des longueurs d'ondes spécifiques des modes vibrationnels des groupements chimiques. La nature ou l'état physiopathologique d'un système biologique est intimement lié à sa composition chimique. Les spectroscopies Raman et infrarouge fournissent une "empreinte digitale" globale de la composition d'un échantillon biologique, et permettent de déterminer des signatures spectrales ou des marqueurs spectroscopiques caractéristiques de l'état physiopathologique du tissu. Dans les systèmes aussi complexes que la peau, l'information spectrale utile peut être masquée par la variabilité inhérente des échantillons. Il est donc nécessaire d'avoir recours à des méthodes chimiométriques (reconnaissance de forme, statistiques multivariées) afin d'en extraire l'information pertinente.

L'objectif de cette thèse consiste à développer et valider un outil original d'aide au diagnostic des cancers de la peau. Ce mémoire se présente comme suit :

**Le chapitre I** présente le contexte scientifique et technique (cancers de la peau, spectroscopie vibrationnelle).

**Le chapitre II** intitulé "Caractérisation des cancers cutanés par micro-imagerie infrarouge" porte sur le développement de la micro-imagerie spectrale infrarouge pour l'analyse de coupes de biopsies de peau paraffinées (**publications 1, 2 et 3**). Des méthodes chimiométriques ont été développées pour permettre une analyse automatique des coupes paraffinées **sans déparaffinage chimique préalable**. Une étude rétrospective a pu ainsi être menée et une banque de marqueurs spectroscopiques construite, permettant le développement d'un outil d'aide au diagnostic différentiel des carcinomes basocellulaires. Cette méthodologie est actuellement en cours de développement pour la caractérisation des différents types histologiques du mélanome cutané.

**Le chapitre III** porte sur le "Développement de la microspectroscopie Raman polarisée pour la caractérisation des carcinomes basocellulaires" (**publications 4 et 5**). Cette technique innovante a été appliquée pour la première fois sur un tissu aussi complexe que la peau. Nous avons pu mettre

en évidence que l'exploitation du signal Raman polarisé renforçait le pouvoir discriminant peau saine/zone tumorale et derme sain/derme péri-tumoral par rapport à la microspectroscopie Raman conventionnelle.

**Le chapitre IV** traite de "L'évaluation du potentiel de la spectroscopie Raman pour l'aide au diagnostic des lésions cutanées". Il est centré sur une étude menée en milieu clinique utilisant un prototype miniaturisé. Les spectres Raman sont enregistrés directement sur la peau du patient, à l'aide d'une sonde optique.

**CHAPITRE I**  
**GENERALITES : LES CANCERS DE LA PEAU ET LES**  
**SPECTROSCOPIES VIBRATIONNELLES**

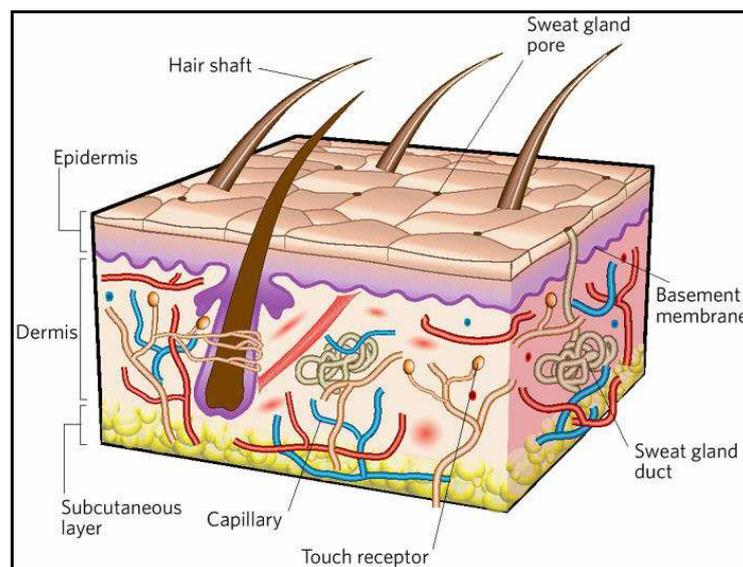
---

## I.1 Description histologique et moléculaire de la peau (Agache, 2000; Dubois, 2001; MacNeil, 2007; Powell, 2006; Tortora and Grabowski, 2002)

La peau est l'organe le plus important en poids (environ 3.5 kg) et en surface (1.80 m<sup>2</sup> chez un adulte de 75 kg). Il s'agit d'un organe assurant de multiples fonctions :

- protection (thermique, chimique, mécanique, contre les radiations)
- sécrétion (sueur, sébum)
- réception des informations de l'extérieur, expressions psychologiques, rôle social (apparence).

Les variations topographiques de la structure de la peau sont très importantes : cuir chevelu, peau du visage, de la paume ou de la plante, mais la structure générale de la peau reste identique. C'est un tissu qui se compose de trois couches principales (Figure I.01): l'épiderme en superficie (épithélium pavimenteux stratifié), le derme (tissu fibro-élastique) et enfin l'hypoderme (tissu sous-cutané ou adipeux).



**Figure I.01 : Structure de la peau** (MacNeil, 2007)

La peau est composée de trois couches : épiderme, derme et hypoderme.

### I.1.1 Epiderme

L'épiderme (environ 0.1 mm d'épaisseur) est la partie la plus superficielle de la peau, il est constitué en surface de cellules mortes (cornéocytes) composant la **couche cornée** (*stratum corneum*, SC) et plus en profondeur de cellules vivantes (Figure I.02).

On rencontre quatre types de cellules :

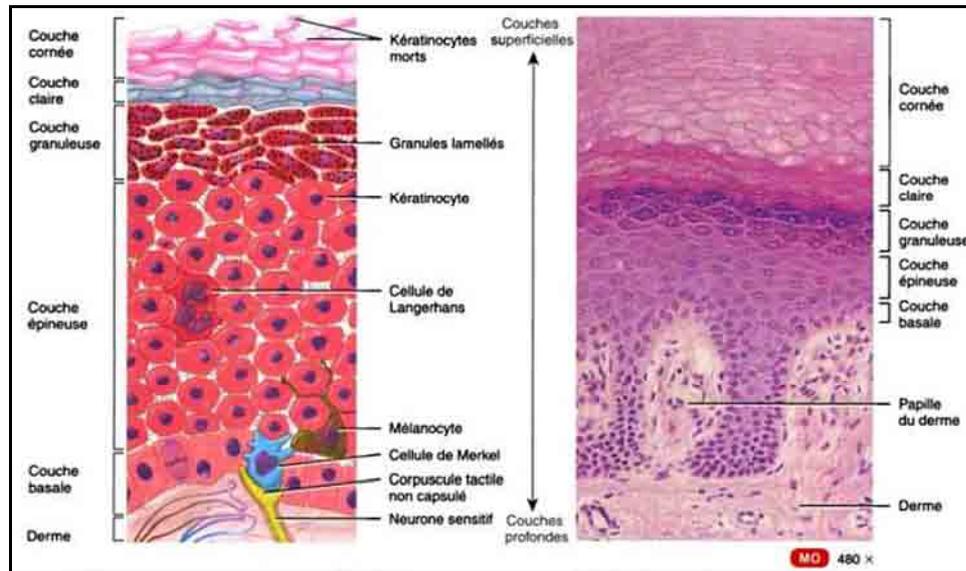
- les **kératinocytes** (du grec *keras* = corne) sont les plus nombreux (80%). Ils sont agencés dans l'épiderme en couches continues à partir de la **couche basale** ou germinative (*stratum basale* ou *stratum germinatum*). Cette couche est composée d'une rangée unique de cellules de forme cubique, certaines étant des cellules souches capables de se diviser pour produire de nouveaux kératinocytes. A fur et à mesure de leur maturation, les kératinocytes migrent vers la surface de la peau et s'aplatissent dans le *stratum spinosum* (ou **corps muqueux** de Malpighi ou couche épineuse), composé de 4 à 8 rangées de cellules. A ce stade, des tonofilaments (précurseurs de la kératine) se regroupent afin d'assurer cohésion et résistance aux cellules. A partir du *stratum granulosum* (**couche granuleuse**, 3 à 4 rangées de cellules), les kératinocytes se tassent et leur noyau commence à dégénérer, les organites cellulaires disparaissent. Le *stratum corneum* (25 à 30 rangées de cellules), dont l'épaisseur maximale se situe au niveau de la plante des pieds ou de la paume des mains (environ 2 mm), est composé de cellules très aplaties sans noyau (cornéocytes) dont le cytoplasme est rempli de kératine. Dans certains cas, on retrouve la couche claire ou *stratum lucidum* (bout des doigts, paume des mains, plante des pieds) qui est une bande claire située à la base du SC. L'association du film lipidique à la surface de la peau et des cornéocytes remplis de kératine donne au SC le rôle vital de barrière à la diffusion de l'eau. Par exemple, la perte du SC sur plus de 50% peut se révéler être fatale (cas des grands brûlés). Dans la partie supérieure du SC, les cornéocytes vont se desquamer, assurant ainsi le renouvellement de la peau et la protection contre les corps étrangers. Le processus de maturation des kératinocytes ou kératinisation, à partir de la couche basale jusqu'à la surface du SC, dure environ de 21 à 28 jours; lors de désordres cutanés tels que le psoriasis, il peut être réduit à 7 jours.

- les **mélanocytes** (du grec *melas* = noir) sont sécrétors de **mélanine**, protéine qui est responsable de la couleur de la peau. Les grains de mélanine sont assemblés dans le cytoplasme sous forme de mélanosomes. Les mélanocytes sont situés au niveau de la couche basale (sauf chez les populations noires, où l'on retrouve des mélanocytes dans toutes les couches de l'épiderme), on compte en général 1 mélanocyte pour 8 kératinocytes. Ces cellules dendritiques s'insinuent entre les kératinocytes, ce qui permet le transfert par phagocytose des mélanosomes vers les kératinocytes. Que ce soit chez les peaux claires ou mates, le nombre de mélanocytes est sensiblement le même, les différences de pigmentation résident surtout au niveau du type de mélanine sécrétée (eumélanine/phéomélanine).

- les **cellules de Langerhans** représentent environ 4% des cellules de l'épiderme, ce sont les cellules du système immunitaire. On les retrouve à l'état de base (forme non activée) au niveau de la couche épineuse et elles constituent la première ligne de défense immunitaire.

- les **cellules de Merkel** sont des cellules impliquées au niveau des sensations tactiles, ces récepteurs sensoriels sont associés à une terminaison nerveuse et se situent au niveau de la partie

profonde de l'épiderme. Ces cellules sont très nombreuses au niveau des lèvres, de la pulpe des doigts, de la paume des mains ainsi que de la plante des pieds.



**Figure I.02 : L'épiderme est un épithélium stratifié pavimenteux kératinisé** (Tortora and Grabowski, 2002)

Les cellules nouvellement formées de la couche basale subissent un processus de kératinisation. Alors qu'elles remontent à la surface, elles accumulent de la kératine et entrent en apoptose (mort cellulaire) et perdent leur noyau. Finalement, ces cellules kératinisées se détachent lors de la desquamation et sont remplacées par les cellules sous-jacentes. Le cycle complet dure environ 4 semaines.

### I.1.2 Derme

Le derme (1 à 4 mm d'épaisseur) est un **tissu conjonctif** qui assure résistance et élasticité à la peau. Il est relié à l'épiderme au niveau de la lame basale, par la jonction dermo-épidermique. Cette jonction joue un rôle fondamental pour le maintien de l'épiderme sur le derme et pour assurer le transport de produits métaboliques. Elle est principalement composée de fibres d'ancrage (collagène VII) et de collagène IV qui assure stabilité et cohésion par le biais d'interactions spécifiques. On retrouve relativement peu de cellules dans le derme, principalement des fibroblastes qui sécrètent le **collagène et l'élastine**, des lymphocytes et des macrophages. Les fibres de collagène (il existe 13 variétés de collagène) sont organisées sous forme de faisceaux, assurant **solidité** à l'édifice. Les fibres d'élastine sont moins nombreuses, plus fines et sont organisées en un maillage souple, conférant **élasticité** à la peau. La production de ces fibres évolue en fonction de l'âge de la personne et diminue au cours du vieillissement. A la différence de l'épiderme, le derme est composé de nombreux vaisseaux sanguins et lymphatiques assurant sa nutrition. On note également la présence

de cellules musculaires lisses (muscles arcteurs des poils) et de fibres musculaires striées. Le derme est traversé par différentes structures appelées **annexes cutanées**. On recense :

- les glandes sudoripares eccrines productrices et sécrétrices de sueur
- les glandes sudoripares apocrines, plus profondes et plus grosses que les précédentes, débouchent dans le follicule pileux et non directement à la surface de la peau. Elles se situent principalement au niveau des aisselles et dans les régions ano-génitales.
- les follicules pilo-sébacés comprennent le follicule pileux, la tige du poil, le muscle arcteur du poil et les glandes sébacées. Ce sont des invaginations tubulaires de l'épiderme dans le derme dont le contour est délimité par la membrane basale qui supporte les cellules matricielles.

Le derme est subdivisé en deux couches :

- le **derme papillaire** est la couche superficielle en contact avec l'épiderme (environ 0.1 mm). C'est un tissu conjonctif lâche composé principalement de collagène I et d'élastine. Des petites projections appelées papilles du derme accroissent considérablement sa surface. Ces structures en forme de mamelon donnent à l'interface de l'épiderme un relief accidenté. Quelques papilles du derme renferment des récepteurs du toucher (corpuscules de Messner) qui sont des terminaisons nerveuses sensibles au contact.

- le derme **réticulaire** (1.1 mm) est composé d'un réseau beaucoup plus dense de fibres de collagène et d'élastine. Il renferme les annexes pilo-sébacées ainsi que la partie pelotonnée des glandes sudorales et leur canal excréteur. La fonction du derme réticulaire est principalement d'ordre mécanique. Il forme une structure solide à la fois distensible et compressible.

### I.1.3 Hypoderme

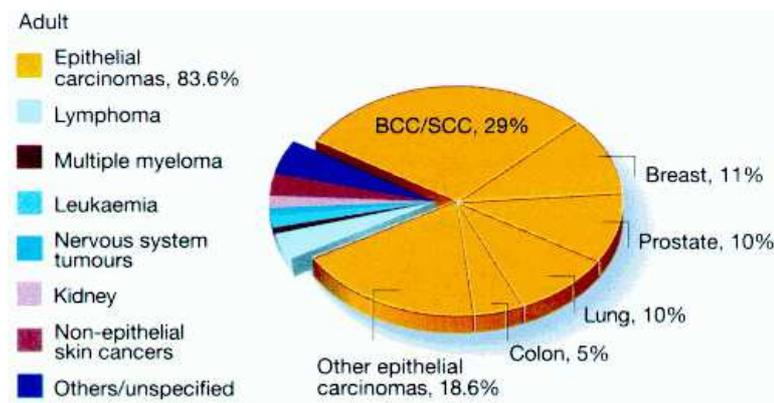
L'**hypoderme** est un tissu sous-cutané pouvant mesurer de 1 mm à 1 cm. Il est constitué d'un tissu conjonctif lâche très souvent associé en sa partie profonde au **tissu adipeux**. Il est principalement composé d'adipocytes, cellules pouvant accumuler et stocker les graisses qui peuvent être libérées selon les besoins.

## I.2 Cancers de la peau

Les cancers de la peau sont les plus fréquents, on estime qu'un Américain sur 6 développera un cancer de la peau durant sa vie (Diepgen and Mahler, 2002). Parmi les tumeurs malignes cutanées, on distingue les carcinomes, les mélanomes, les carcinomes neuroendocrines, les sarcomes et les angiosarcomes. Nous allons nous intéresser ici aux deux premiers types, les plus fréquents.

### I.2.1 Présentation

Les **carcinomes cutanés** sont les cancers les plus fréquents chez l'Homme (Figure I.03). Il existe deux types de carcinomes cutanés, les carcinomes basocellulaires ou basal cell carcinoma (BCC) et les carcinomes spinocellulaires ou squamous cell carcinoma (SCC). A l'inverse du mélanome qui se développe à partir des mélanocytes, les carcinomes se développent à partir des kératinocytes et sont donc communément appelés *non-melanoma skin cancers* (NMSCs).



**Figure I.03 : Répartition des cancers chez l'Homme** (DePinho, 2000)  
Les carcinomes cutanés sont les cancers les plus fréquents chez l'Homme (29%).

- les **carcinomes basocellulaires**, découverts en 1827 par Jacob (Jacob, 1827), sont les cancers de la peau les plus fréquents ; ils représentent environ 80% des NMSCs. Ils se développent principalement au niveau de la tête et du cou (80% des cas) (Rubin et al., 2005). Il est assez difficile d'avoir des données chiffrées car les carcinomes cutanés sont souvent exclus des données statistiques. Toutefois, on estime qu'il y a environ près de 250 000 consultations qui débouchent sur un diagnostic de BCC en France par an (Bernard et al., 2008). En région Champagne-Ardenne, on dénombre 157 nouveaux cas de BCC pour 100 000 habitants par an (Bernard et al., 2001). Ils se développent chez les personnes de peau claire de plus de 40 ans, principalement sur les zones photo-exposées mais il peut également se développer sur les zones

protégées du soleil. De même, le BCC est le cancer avec la plus grande incidence en Australie (Rubin et al., 2005). L'exposition aux rayons du soleil semble être le facteur de risque le plus important, mais les mécanismes entrant en jeu ne sont pas encore totalement élucidés. Il semblerait toutefois que les fortes expositions intermittentes soient les plus dangereuses. Le BCC ne produit pas de métastases (sauf dans de très rares cas), le taux de mortalité est donc faible ; mais il peut infiltrer profondément le derme et détruire le tissu environnant local. Ainsi, une exérèse totale de la lésion suffit pour traiter le patient. Cependant, de part le grand nombre de cas recensés, le BCC est un problème de santé majeur, par exemple le coût du traitement du NMSC (à 80% de type BCC) est au 5<sup>ème</sup> rang des dépenses engagées par Medicare (programme national américain d'assurance maladie pour les personnes âgées de plus de 65 ans) (Epstein, 2008).

- les **carcinomes spinocellulaires** se développent à partir des kératinocytes de la couche épineuse de l'épiderme. Le SCC (20% des NMSCs) est plus rare que le BCC, on reporte environ 20 nouveaux cas pour 100 000 habitants par an en France mais **ils sont potentiellement agressifs**. En effet, dans certains cas, des métastases peuvent se développer au niveau des ganglions lymphatiques (2% des cas) (Anonyme, 2005a). Tout comme le BCC, le SCC se développe sur le sujet âgé, principalement sur les zones photo-exposées. Le SCC peut apparaître *de novo* (sans lésion préexistante) mais il existe cependant des lésions précurseurs de SCC (lésions précancéreuses) telles que les kératoses actiniques (lésions cutanées dues à une forte exposition solaire). Dans la forme intra-épithéliale (lésion qui reste uniquement dans l'épiderme et qui n'a pas franchi la lame basale), le SCC est appelé **maladie de Bowen** (carcinome *in situ*).

Le **mélanome** est le cancer de la peau le plus connu, ceci est sans doute dû aux campagnes de sensibilisation lancées par l'Etat contre les méfaits de l'**exposition solaire**. En effet, le soleil est le seul facteur environnemental impliqué dans l'épidémiologie du mélanome. Les facteurs de risques physiques sont la peau claire, les cheveux roux ou blonds et le nombre élevé de naevi (grains de beauté). Les prédispositions génétiques sont au moins aussi importantes que le soleil. Environ 10% des mélanomes surviennent dans un contexte de "mélanome familial", c'est-à-dire quand au moins deux personnes de la même famille ont été atteintes de mélanome. Le mélanome se développe à partir des cellules pigmentées de la peau, les mélanocytes. Ils représentent seulement moins de 5% des cancers de la peau mais sont les plus agressifs. En 2008, l'*American Cancer Society* a estimé à 62480 le nombre de nouveaux cas au Etats-Unis, parmi ces derniers, 8420 seraient mortels. Contrairement aux autres cancers cutanés c'est un cancer qui touche tous les âges, c'est d'ailleurs le cancer le plus répandu chez les adolescents et les jeunes adultes (ACS, 2007). L'incidence du mélanome est croissante, ceci est dû, d'une part à la meilleure information des patients qui sont

mieux sensibilisés, mais aussi paradoxalement à l'attitude des personnes qui s'exposent aux U.V naturels ou artificiels pour avoir une peau bronzée.

### I.2.2 Diagnostic clinique

Selon les rapports de la Haute Autorité de Santé (HAS), le **carcinome basocellulaire** existe sous 3 sous-types cliniques (Figure I.04):

- **CBC nodulaire** : c'est une tumeur ferme, bien délimitée et d'aspect perlé. La taille de la lésion augmente progressivement et peut atteindre une taille variable.

- **CBC superficiel** : il se présente sous la forme d'une plaque rouge, plane, bien délimitée à extension très lentement centrifuge. La lésion est parfois recouverte de petites squames ou de croûtes, elle peut être multiple d'emblée.

- **CBC sclérodermiforme** : c'est une plaque dure, brillante et mal délimitée. Ce type est souvent difficile à diagnostiquer lorsqu'il n'est pas ulcéré car il a l'apparence d'une cicatrice blanche. Les limites d'exérèse sont très difficiles à déterminer.

Il existe également d'autres formes particulières, le carcinome basocellulaire métatypique et le BCC mixte ou composite (ANAES, 2004).

Les formes superficielles et nodulaires sont les plus fréquentes (50.7% et 38.4% des cas, respectivement (Bernard et al., 2008)).



**Figure I.04 : Formes cliniques du carcinome basocellulaire**

Le carcinome basocellulaire existe sous trois formes cliniques : superficiel (gauche (Henry and Thompson, 2004)), nodulaire (milieu (Crowson, 2006)) et sclérodermiforme (droite (Anonyme, 2005a)).

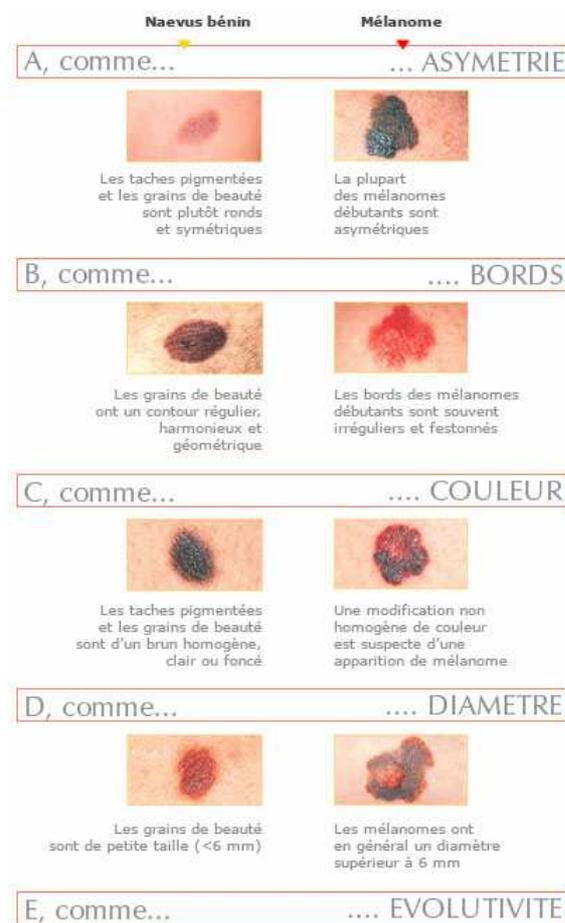


**Figure I.05 : Carcinome spinocellulaire** (avec la permission du Pr P. Bernard, Reims)

Le **carcinome spinocellulaire** se présente sous la forme d'une lésion croûteuse, jaunâtre avec une ulcération centrale ou un aspect bourgeonnant (Figure I.05). Quelque soit son aspect clinique, cette lésion doit faire l'objet d'une biopsie pour confirmer le diagnostic.

Le diagnostic clinique du **mélanome** repose principalement sur l'évaluation morphologique du grain de beauté (naevus) selon le système ABCDE (Figure I.06) :

- Asymétrie
- Bords irréguliers
- Couleur inhomogène
- Diamètre supérieur 6 mm
- Evolution de la taille ou de la couleur



**Figure I.06 : La règle ABCDE pour l'examen clinique du naevus**

Des campagnes de sensibilisation sont menées par l'Etat chaque année pour alerter le grand public sur les méfaits du soleil.

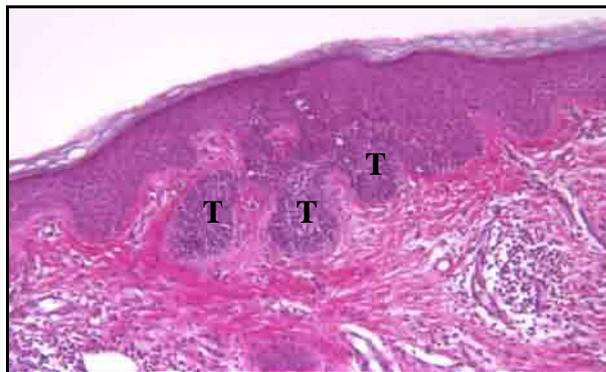
Le mélanome peut soit se développer à partir d'une peau saine (70 à 80% des cas) soit résulter de la transformation maligne d'un naevus. Le diagnostic clinique du mélanome repose sur l'examen anatomopathologique sur une pièce d'exérèse complète et non sur une biopsie (HAS, 2008).

### I.2.3 Diagnostic histologique

Pour tout prélèvement (biopsie ou exérèse complète), l'échantillon est conservé soit sous forme congelée, soit inclus en paraffine. Des coupes fines (de l'ordre de quelques microns) sont alors réalisées à l'aide d'un microtome (ou cryotome pour les coupes congelées), déposées sur une lame de verre et colorées pour être ensuite observées au microscope optique. **Le diagnostic histologique repose donc sur des critères morphologiques et demeure la méthode de référence pour confirmer les suspicions du dermatologue.**

- On recense 4 sous-types histologiques pour le carcinome basocellulaire :

- **superficiel** : on observe un nid tumoral attaché à l'épiderme et/ou les follicules pileux. Les cellules sont basaloïdes et leurs noyaux sont arrangés en palissade en périphérie. Des artéfacts de rétractation séparent souvent les cellules tumorales du stroma environnant (tissu de soutien). Les foyers tumoraux sont multiples et sont séparés par des intervalles de peau normale (Figure I.07).

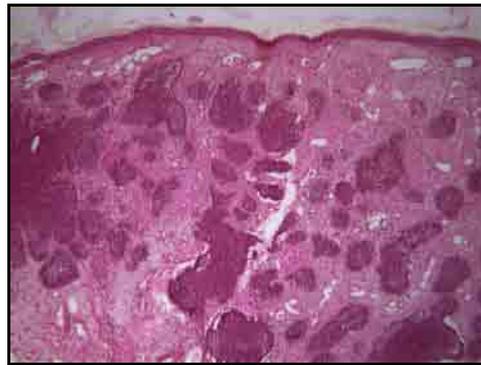


**Figure I.07 : Histologie du BCC superficiel** (avec la permission du Dr A. Durlach, Reims)

Les foyers tumoraux (T) sont rattachés à l'épiderme. On observe des cellules basaloïdes arrangées en palissade à la périphérie des lobes tumoraux.

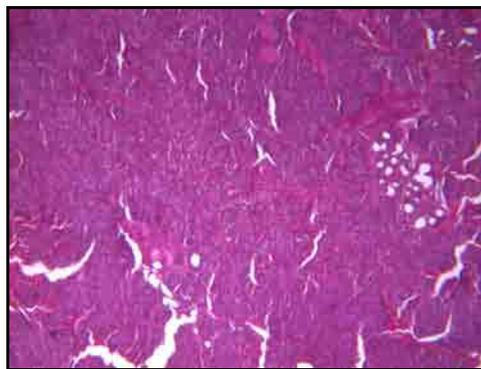
- **nodulaire** : il est caractérisé par la présence d'un ou plusieurs massifs ou lobules larges et bien circonscrits dans le derme. Les foyers tumoraux sont composés de cellules basaloïdes dont les noyaux sont arrangés en palissade en périphérie. Des artéfacts de rétractation sont souvent présents (Figure I.08).

- **infiltrant** : dans sa forme trabéculaire (agencement en travées), les foyers tumoraux sont de petite taille, mal limités, et situés dans le derme ou même la jonction dermo-hypodermique. Dans sa forme micronodulaire, il est composé des multiples foyers tumoraux formant des lobules bien limités (Figure I.09).



**Figure I.08 : Histologie du CBC nodulaire** (avec la permission du Dr A. Durlach, Reims)

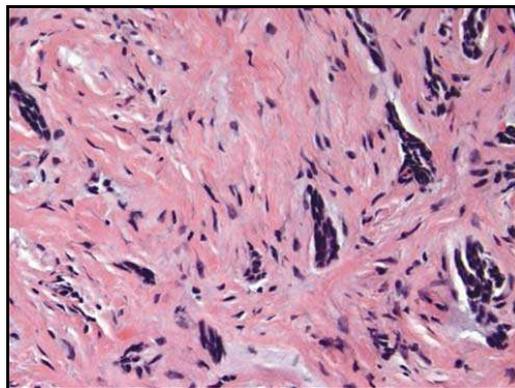
On observe de nombreux lobes tumoraux assez larges (colorés en rouge foncé) qui envahissent le derme. Les contours sont bien limités.



**Figure I.09 : Histologie du CBC nodulaire infiltrant** (avec la permission du Dr A. Durlach, Reims)

On observe de nombreux foyers tumoraux qui envahissent le derme. Les contours sont bien limités.

- **sclérodermiforme** : les foyers tumoraux sont des cordons effilés. La tumeur infiltre le stroma et peut occuper parfois toute la hauteur du derme (Figure I.10).

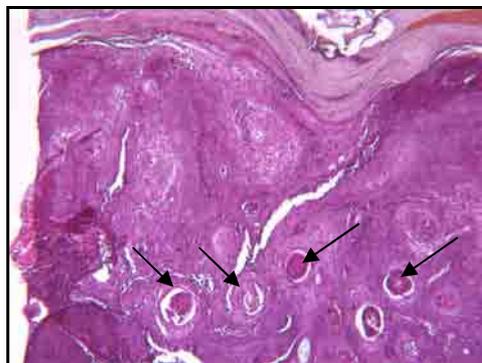


**Figure I.10 : Histologie du CBC sclérodermiforme** (Crowson, 2006)

La tumeur est ici composée de cordons effilés et non de lobes tumoraux bien définis.

- Le carcinome spinocellulaire se traduit histologiquement par la présence de cellules tumorales organisées en travées ou en lobules. On observe la présence de globes de kératine, produits de la

maturation des cellules cancéreuses (Figure I.11). La tumeur peut envahir plus ou moins le derme. Il existe différents états de différenciation et d'invasion. Lorsque la lame basale n'est pas franchie, on parle de Maladie de Bowen (Figure I.12).



**Figure I.11 : Histologie du SCC** (avec la permission du Dr A. Durlach, Reims)

Les cellules tumorales envahissent totalement le derme et des globes de kératine (flèches) se forment.



**Figure I.12 : Histologie de la maladie de Bowen** (avec la permission du Dr A. Durlach, Reims)

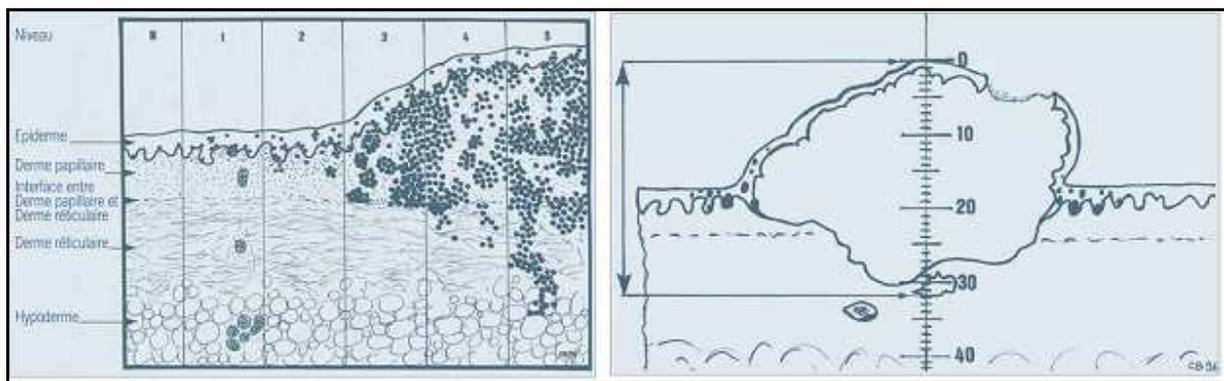
La maladie de Bowen est un carcinome *in situ*, les cellules tumorales (T) n'ont pas franchi la lame basale. On note la présence d'une forte réaction inflammatoire au niveau de la jonction tumeur-derme (flèches).

- Le diagnostic anatomopathologique du mélanome repose sur des critères cytologiques (variabilité de la forme des noyaux, mitoses, nécrose cellulaire) et architecturaux (mélanocytes isolés intra-épidermiques et/ou dermiques). Le développement d'un mélanome s'effectue en deux étapes :

- **une extension "horizontale"** intra-épidermique, au dessus de la membrane basale. Cette composante est constituée de mélanocytes regroupés en nappe (mélanomes de type lentigineux) ou en **thèques** (amas de mélanocytes plus ou moins globulaires). Ils sont disposés le long de la lame basale de façon irrégulière, les couches superficielles de l'épiderme sont envahies par des cellules tumorales migrant de façon isolée et anarchique.

- **une extension "verticale"** avec envahissement du derme superficiel (phase micro-invasive), puis du derme profond et de l'hypoderme (phase invasive). Elle peut être accompagnée d'une réaction inflammatoire.

L'examen histologique permet d'associer des critères pronostiques à la lésion (Figure I.13) : **l'indice de Clark** traduit le niveau d'infiltration en profondeur de la lésion et **l'indice de Breslow** traduit l'épaisseur en millimètres de la lésion depuis la partie haute de la couche granuleuse jusqu'à la partie la plus profonde de la tumeur. C'est l'indice pronostique le plus important qui guidera le traitement et le suivi.



**Figure I.13 : Les indices de Clark et de Breslow** (Marot and Weynand, 2007)  
Les indices de Clark (gauche) et de Breslow (droite) permettent de mesurer l'invasion et l'épaisseur de la tumeur mélanocytaire.

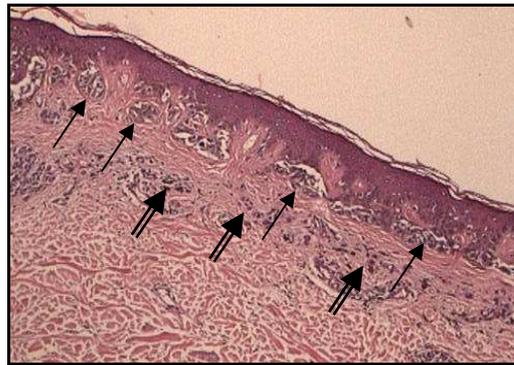
Il existe 4 formes histologiques du mélanome (Anonyme, 2005b; HAS, 2006; Marot and Weynand, 2007)

- le **superficiel spreading melanoma (SSM)** est la forme anatomoclinique la plus fréquente (60 à 70% des cas). Il se caractérise par une prolifération de mélanocytes isolés ou groupés en thèques dispersés sur toute la hauteur de l'épiderme (Figure I.14).

- le **mélanome nodulaire** (4 à 18% des cas) n'a pas d'extension latérale, l'évolution est verticale et il devient rapidement invasif (Figure I.15). Il n'y a pas de composante intra-épidermique adjacente de part et d'autre du mélanome nodulaire.

- le **mélanome acral lentigineux** (2 à 10% des cas) se développe sur les zones acrales, c'est-à-dire au niveau de la paume des mains et de la plante des pieds (Figure I.16).

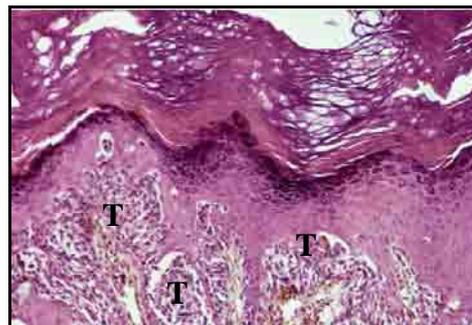
- le **mélanome de Dubreuilh** (10% des cas) se développe sur les zones photo-exposées, principalement chez les sujets de plus de 60 ans. Il a une évolution lente. Il se caractérise par la présence de mélanocytes atypiques au niveau des assises inférieures de l'épiderme (Figure I.17).



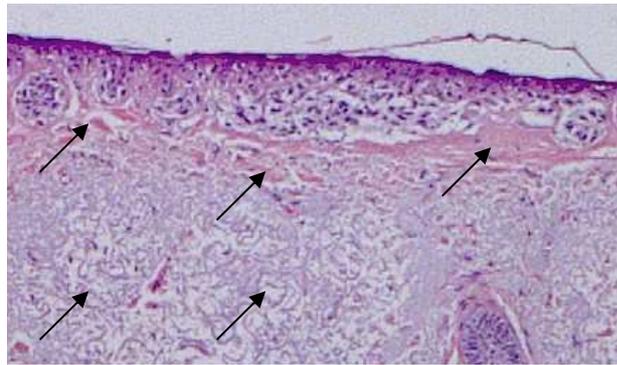
**Figure I.14 : Histologie du mélanome SSM** (avec la permission du Dr N. Cardot-Leccia, Nice)  
Ce mélanome SSM a un indice de Clark égal à 2 et un indice de Breslow de 0.35 mm. On observe des thèques de cellules tumorales dans les crêtes épidermiques (flèches) mais également une composante invasive (double-flèches).



**Figure I.15 : Histologie du mélanome nodulaire** (avec la permission du Dr N. Cardot-Leccia, Nice)  
Ce mélanome nodulaire a un indice de Clark égal à 4 et un indice de Breslow de 2 mm. On observe à droite le foyer tumoral (T) qui envahit le derme et à gauche, la partie saine de l'épiderme (E).



**Figure I.16 : Histologie du mélanome lentigineux acral** (Marot and Weynand, 2007)  
On observe une couche de kératine épaisse à la surface de la coupe, caractéristique des zones acrales. Les mélanocytes atypiques prolifèrent au niveau des crêtes épidermiques (T).



**Figure I.16 : Histologie du mélanome de Dubreuilh** (avec la permission du Dr N. Cardot-Leccia, Nice)

On observe de nombreuses thèques de cellules tumorales. Le derme superficiel est le siège d'une élastose solaire (flèches) due à la dégradation des fibres du derme par le soleil.

#### I.2.4 Traitement des cancers cutanés

Que ce soit pour les mélanomes ou les carcinomes, la Haute Autorité de Santé recommande la **chirurgie comme traitement curatif**. Elle est, pour le mélanome, le seul geste thérapeutique reconnu. Pour les carcinomes spinocellulaires, la radiothérapie peut être utilisée à titre exceptionnel, dans le cas de patients inopérables ou pour certaines localisations. Dans certains cas, la chimiothérapie peut être utilisée pour réduire les tumeurs de grande taille avant chirurgie.

Pour les carcinomes basocellulaires, l'efficacité du traitement se mesure par le taux de récurrence après 5 ans :

- 1% pour la **chirurgie de Mohs** (voir plus bas) ou la **chirurgie classique** suivie d'un examen extemporané (analyse histologique d'une ou plusieurs coupe(s) durant une intervention afin d'orienter le geste chirurgical)

- 5 à 10% pour la chirurgie classique, la radiothérapie ou la cryochirurgie

- 7 à 13% pour le curettage ou l'électrocoagulation

Ces données correspondent aux taux de récurrences pour les BCC primaires. La chirurgie est un traitement de choix car elle permet un examen histologique de la pièce d'exérèse et permet de contrôler le **caractère complet de l'exérèse**. Les recommandations de la HAS pour les marges d'exérèse sont les suivantes (chirurgie classique) :

- BCC de bon pronostic : 3 à 4 mm

- BCC de pronostic intermédiaire : 4 mm minimum

- BCC de mauvais pronostic : 5 à 10 mm

- mélanome *in situ* : 0.5 cm

- mélanome de 0 à 1 mm (indice de Breslow) : 1 cm

- mélanome de 1.01 à 2 mm : 1 à 2 cm

- mélanome de 2.01 à 4 mm : 2 cm

- mélanome supérieur à 4 mm : 2 à 3 cm

Pour les mélanomes de Dubreuil dont les limites sont très mal définies, on préconise une marge de 1 cm. Les marges pour les SCC sont d'emblées plus importantes pour que le BCC de part leur potentiel métastatique et sont généralement de l'ordre du centimètre (ANAES, 2004; Anonyme, 2005a, b; HAS, 2008; Motley et al., 2002).

**La chirurgie de Mohs** repose sur un contrôle histologique extemporané des limites d'exérèse : chaque tranche de section est congelée en vue d'un examen immédiat, l'exérèse étant poursuivie jusqu'à ce que les limites soient saines dans tous les plans. Elle nécessite une équipe spécialisée et une bonne coordination permettant la réalisation conjointe du geste chirurgical, de la préparation des lames et de leur lecture. Grâce à cette méthode, les limites d'exérèse sont mieux contrôlées et seul le tissu tumoral est enlevé et le tissu sain est épargné. Seuls quelques centres en France sont équipés, mais bien que ce soit une procédure minutieuse, fastidieuse et coûteuse, elle est de pratique courante aux Etats-Unis.

### I.2.5 Méthodes biophysiques développées pour le diagnostic des carcinomes cutanés

L'objet de ce manuscrit est d'évaluer le potentiel des spectroscopies vibrationnelles pour l'aide au diagnostic des cancers cutanés. Durant les dernières décennies, de nombreuses autres techniques biophysiques ont émergé, certaines sont maintenant utilisées en routine dans les cabinets de dermatologues (Mette Mogensen, 2007; Rallan and Harland, 2004).

- la **profilométrie** permet d'évaluer la topographie de la peau et donc d'étudier les effets du vieillissement cutané (Lagarde et al., 2001; Rallan and Harland, 2004). Une étude a suggéré la possibilité de discriminer les naevi bénins des mélanomes par profilométrie (Connemann et al., 1995).

- la **dermoscopie** ou microscopie de surface est une méthode microscopique non invasive et **la méthode de référence pour le diagnostic différentiel des lésions pigmentaires**, ainsi que le diagnostic précoce du mélanome. La lumière est réfléchiée à la surface de la peau et seulement très peu de lumière pénètre dans la peau. Si l'on utilise un liquide d'immersion (alcool, huile, eau) entre la surface cutanée et le dermoscope, la couche cornée devient "translucide". Ceci permet à la lumière de pénétrer plus en profondeur de la peau et d'illuminer les couches profondes. A l'aide de ce système optique, les structures jusqu'au derme réticulaire peuvent être visualisées. Couplés à des logiciels de reconnaissance de forme et de couleur, les dermoscopes peuvent produire un diagnostic de façon automatique (Braun et al., 2005; Rallan and Harland, 2004; Zaballos et al., 2005).

- la **spectroscopie par réflectance diffuse** utilise des sondes optiques pour transmettre la lumière vers la surface du tissu. La lumière est soit absorbée, réfléchi ou transmise. Seule une partie des photons dispersés revient à la surface du tissu et émerge pour être détectée. En mesurant les changements d'intensité de la lumière réfléchi, les changements relatifs de structures spécifiques peuvent être déterminés. Cette méthode a été utilisée pour la détection du mélanome (Guitera et al., 2009; Zonios et al., 2008).

- la **spectroscopie de fluorescence** sonde les différents chromophores de la peau, une connaissance *a priori* est donc nécessaire pour choisir la gamme d'excitation. Elle permet de mesurer l'autofluorescence de la peau (tryptophane, collagène) et avoir des informations sur la prolifération cellulaire ou sur la dégradation du collagène (Brancaleon et al., 2001; Panjehpour et al., 2002; Paoli et al., 2008). Cette technique a permis d'évaluer les marges de BCC à l'aide de fluorophores endogènes (NADH) et exogènes (Protoporphyrine IX)(Na et al., 2001).

- la **tomographie par cohérence optique** (Optical Coherence Tomography, OCT) est une technique basée sur la propagation d'ondes lumineuses et sur la détection des ondes partiellement réfléchies par les interfaces séparant deux milieux d'indice de réfraction différents. A la manière du Doppler (onde sonore), l'OCT permet de mesurer la distance entre deux interfaces. Les images d'OCT obtenues sont alors grossièrement comparables à une coupe histologique non colorée. Des études ont montré qu'il était possible de mettre en évidence les changements morphologiques provoqués par un carcinome basocellulaire mais que les différents sous-types de BCC n'étaient pas distinguables (Gambichler et al., 2007; Godavarty et al., 2004; Strasswimmer et al., 2004; Welzel, 2001).

- la **microscopie confocale à balayage laser** (Confocal Scanning Laser Microscopy, CSLM) permet de sonder la peau avec une très haute résolution (de l'ordre du micromètre). La partie superficielle de la peau est analysée *in vivo* à différentes profondeurs, permettant ainsi de discriminer les cellules des différentes couches de l'épiderme. Différentes architectures peuvent être alors déterminées (vaisseaux sanguins, morphologie des cellules ...) sans faire de biopsie. De récentes études ont montré le fort potentiel de cette méthode pour le diagnostic des cancers cutanés (Busam et al., 2002; Gerger et al., 2006).

- l'**imagerie par résonance magnétique** (IRM) permet de mesurer et de caractériser l'épaisseur des couches de la peau par les mesures des temps de relaxation T1 et T2, et d'avoir ainsi accès à l'hydratation de la peau à différents états physiopathologiques (Gufler et al., 2007; Lee et al., 1988; Mette Mogensen, 2007).

- la **spectroscopie térahertz** est très sensible au contenu en eau et pourraient aider à la définition des marges d'exérèse pour le BCC (Wallace et al., 2006; Woodward et al., 2003).

- les spectroscopies non linéaires telles que la **microscopie de fluorescence à deux photons**, la **spectroscopie de génération de seconde harmonique** ou la **microscopie par durée de vie de fluorescence** (Fluorescence Life-time Imaging Microscopy, FLIM) sont également des technologies actuellement développées pour l'aide au diagnostic des carcinomes cutanés (Cicchi et al., 2007; Cicchi et al., 2008; Strupler et al., 2007).

Parmi toutes ces techniques biophysiques, seule la dermoscopie est actuellement utilisée en milieu clinique. Elle repose malgré tout sur la "simple" analyse morphologique d'une image et ne donne aucune information sur la composition moléculaire de la lésion. L'examen anatomopathologique demeure la technique de référence pour l'examen des tumeurs cutanées.

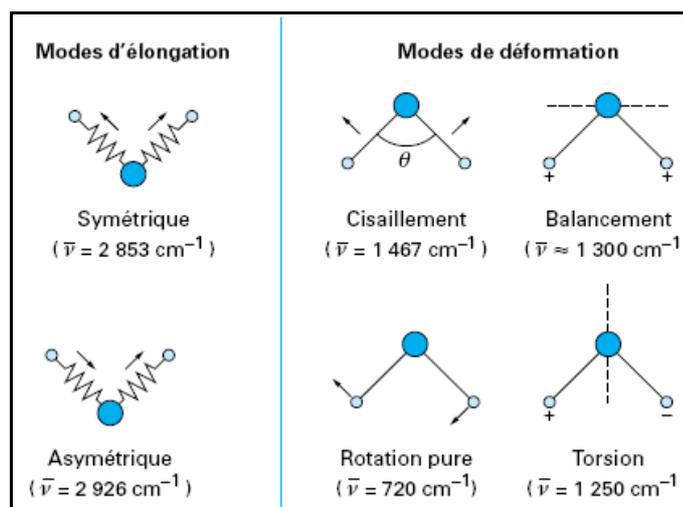
### I.3 Spectroscopies vibrationnelles – Principe

Les spectroscopies vibrationnelles d'absorption infrarouge et de diffusion Raman reposent sur l'interaction entre un rayonnement électromagnétique et la matière. D'après la mécanique quantique, l'énergie ( $E$ ) d'une molécule est quantifiée, et on peut l'approximer comme la somme des énergies de rotation ( $E_{\text{rot}}$ ), vibration ( $E_{\text{vib}}$ ) et d'état électronique ( $E_{\text{el}}$ ) :

$$E = E_{\text{rot}} + E_{\text{vib}} + E_{\text{el}} \quad \text{Eq. 1}$$

$$\text{avec } E_{\text{rot}} \ll E_{\text{vib}} \ll E_{\text{el}}$$

On s'intéressera ici aux énergies de vibration des molécules. Dans le cas de molécules polyatomiques non linéaires de  $N$  atomes, on dénombre  $3N-6$  degrés de liberté pour les modes de vibration des liaisons atomiques. Ces modes de vibration correspondent à des élongations, à des déformations d'angles ou à des déformations hors du plan. Ces modes de vibration sont schématisés sur la Figure I.17. On associe à chacun de ces modes un nombre d'onde de vibration  $\nu$  qui correspond à une transition entre deux niveaux d'énergie vibrationnelle de l'état électronique fondamental. La spectroscopie vibrationnelle consiste à déterminer les fréquences de vibrations des molécules de l'échantillon analysé, ces fréquences dépendent de 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.



**Figure I.17 : Exemple des mouvements de vibration du groupe CH<sub>2</sub> d'une molécule (Dalibert and Servant, 2000)**

On distingue les vibrations de valence (ou d'élongation) symétriques ou antisymétriques qui font intervenir une variation de longueur de la liaison et les modes de déformation pour lesquels les angles des liaisons varient.

### I.3.1 Spectroscopie Infrarouge (Dalibart and Servant, 2000)

La spectroscopie infrarouge (IR) est une spectroscopie d'**absorption**. Lorsque le faisceau lumineux qui traverse l'échantillon a une énergie correspondant à l'énergie entre deux niveaux de vibration (typiquement de nombre d'onde entre 400 et 4000  $\text{cm}^{-1}$  soit de 2.5 à 25  $\mu\text{m}$  en longueur d'onde), une absorption des photons de la fréquence correspondante pourra avoir lieu et l'échantillon sera alors porté à un état excité. Pour que l'absorption ait effectivement lieu, les niveaux d'énergie concernés et la polarisation du rayonnement incident doivent vérifier certaines règles, appelées règles de sélection.

Un spectre infrarouge représente l'**absorbance** A (ou la transmittance T) en fonction du nombre d'onde  $\sigma$  correspondant à l'inverse de la longueur d'onde  $\lambda$  (le nombre d'onde étant proportionnel à l'énergie du rayonnement). Celle-ci est définie par la loi de Bouguer-Beer-Lambert par :

$$A(\sigma \text{ ou } \lambda) = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \varepsilon(\sigma \text{ ou } \lambda)cd \quad \text{Eq. 2}$$

avec  $I_0$  intensité du rayonnement incident  
 $I$  intensité du rayonnement transmis  
 $\varepsilon$  coefficient d'extinction molaire  
 $c$  concentration de la substance absorbante  
 $d$  épaisseur de l'échantillon

L'absorbance étant proportionnelle à la concentration, il est donc possible d'utiliser la spectroscopie d'absorption comme méthode d'analyse **quantitative**. Cependant cette linéarité n'est vérifiée que dans un domaine limité d'absorbance, situé en général entre 0.3 et 2.

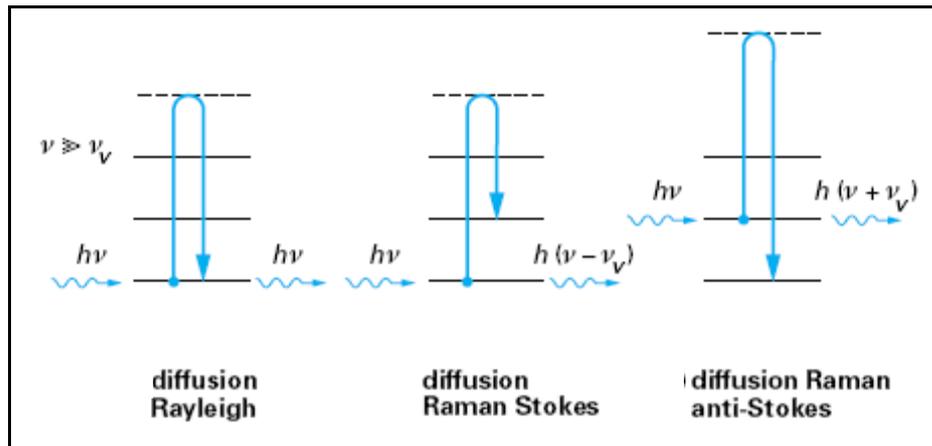
### I.3.2 Spectroscopie Raman (Barbillat et al., 1999)

L'effet Raman fut découvert en 1928 par Sir Venkata Raman, ce qui lui valut le prix Nobel de Physique en 1930. L'effet Raman résulte de l'interaction inélastique entre un **faisceau laser** et les molécules composant l'échantillon. Ce phénomène de diffusion Raman est lié à la polarisabilité  $\underline{\alpha}$  des liaisons moléculaires, c'est-à-dire à la faculté du nuage électronique d'une liaison de se déformer et donc d'acquérir un moment dipolaire induit sous l'effet du champ électrique E de l'onde incidente. Si le champ électrique incident oscille à la fréquence  $\nu$  et si la liaison moléculaire vibre à la fréquence  $\nu_v$  (correspondant à une énergie de vibration  $h \nu_v$  où h est la constante de Planck), et que

cette vibration induise une variation de la polarisabilité, l'onde électromagnétique diffusée possède plusieurs composantes de différentes fréquences (Figure I.18) :

- une onde diffusée à la même fréquence  $\nu$  que l'onde électromagnétique incidente, c'est la **diffusion Rayleigh** (diffusion élastique). Ce phénomène est le plus fréquent.

- deux ondes diffusées inélastiquement aux fréquences  $\nu + \nu_v$  (**diffusion Raman anti-Stokes**) et  $\nu - \nu_v$  (**diffusion Raman Stokes**). Ce phénomène est beaucoup plus rare (1 photon Raman Stokes sur  $10^4$  photons Rayleigh).



**Figure I.18 : Phénomènes de diffusion entre un photon et la matière** (Barbillat et al., 1999)

Une expérience Raman fait dont apparaître deux raies de vibration Raman (si cette vibration respecte la règle de sélection concernant la variation de polarisabilité) de part et d'autre d'un pic de diffusion élastique. L'écart entre les raies Raman et la raie Rayleigh est égal à la fréquence de vibration de la molécule. Le phénomène Stokes étant le plus probable à température ambiante, on enregistre en pratique préférentiellement cette diffusion Raman Stokes. L'intensité de la lumière diffusée pour une transition Stokes entre les états moléculaires  $m$  et  $n$  est donnée par la formule suivante :

$$I_{Stokes} = K(\nu - \nu_v)^4 I_0 \sum_{i,j} |a_{i,j}^{mn}|^2 \quad \text{Eq. 3}$$

avec  $a_{i,j}$  la dérivée du tenseur de polarisabilité selon les coordonnées  $x$  et  $y$

$K$  une constante

$\nu$  la fréquence de l'onde excitatrice

$\nu_v$  la fréquence du mode vibrationnel excité

$I_0$  l'intensité de la radiation incidente

A une température donnée, la répartition en niveaux d'énergie d'une molécule obéit à la loi de Maxwell-Boltzmann. On en déduit le rapport d'intensité des raies anti-Stokes et Stokes :

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

avec  $\nu$  la fréquence de l'onde excitatrice

$\nu_v$  la fréquence du mode vibrationnel excité

$h$  la constante de Planck ( $6.62 \times 10^{-34}$  J.s)

$k$  la constante de Boltzmann ( $1.38 \times 10^{-23}$  J.K<sup>-1</sup>)

$T$  la température

Ce rapport d'intensité peut donc être utilisé pour déterminer la température d'un échantillon sans aucun contact matériel. On retiendra par ailleurs, que l'intensité de la diffusion Raman augmente avec la fréquence de l'onde à la puissance 4. En pratique, on est limité par une fréquence d'excitation maximale qui induit des phénomènes d'émission de fluorescence parasites qui masquent l'effet Raman.

### I.3.3 Règles de sélection

Une approche classique nous permet de voir l'importance des règles de sélection. Si on considère une onde électromagnétique dont le champ électrique peut être écrit sous la forme :

$$E = E_0 \cos(\nu t) \quad \text{Eq. 5}$$

Une molécule soumise à une telle onde électromagnétique possède alors un moment dipolaire  $\mu$  qui s'écrit :

$$\mu = \mu_{permanent} + \underline{\underline{\alpha}} E_0 \cos(\nu t) \quad \text{Eq. 6}$$

avec  $\underline{\underline{\alpha}}$  le tenseur de polarisabilité

Le moment dipolaire permanent et le tenseur de polarisabilité peuvent s'écrire au premier ordre autour de la position d'équilibre 0 :

$$\mu_{permanent} = \mu_{permanent}(0) + \sum_{n=1}^{3N-6} \left( \frac{\partial \mu_{permanent}}{\partial Q_n} \right) Q_n \quad \text{Eq. 7}$$

$$\underline{\underline{\alpha}} = \underline{\underline{\alpha}}(0) + \sum_{n=1}^{3N-6} \left( \frac{\partial \underline{\underline{\alpha}}}{\partial Q_n} \right) Q_n \quad \text{Eq. 8}$$

avec  $Q_n$  la coordonnée normale du mode de vibration  $n$  ( $n=1 \dots 3N-6$ ).

Dans l'approximation harmonique, pour une fréquence  $\nu_n$  et une amplitude  $Q_n$  on a :

$$Q_n = Q_0 \cos(\nu_n t) \quad \text{Eq. 9}$$

En combinant les équations 5 à 8, on obtient l'expression du moment dipolaire suivante :

$$\mu = \mu_{\text{permanent}}(0) + \sum_{n=1}^{3N-6} \left( \frac{\partial \mu_{\text{permanent}}}{\partial Q_n} \right) Q_0 \cos(\nu_n t) + \alpha(0) E_0 \cos(\nu t) + \frac{1}{2} E_0 \sum_{n=1}^{3N-6} \left( \frac{\partial \alpha}{\partial Q_n} \right) Q_0 \{ \cos[(\nu - \nu_n)t] + \cos[(\nu + \nu_n)t] \}$$

Eq. 10

Cette équation nous permet de déduire les résultats suivants :

- le terme  $\sum_{n=1}^{3N-6} \left( \frac{\partial \mu_{\text{permanent}}}{\partial Q_n} \right) Q_0 \cos(\nu_n t)$  correspond à l'absorption infrarouge d'un dipôle

vibrant à  $\nu_n$ . Pour que ce terme soit non nul, l'interaction doit induire une **variation du moment dipolaire**. Ainsi, pour une molécule possédant un centre symétrique, les vibrations symétriques par rapport à ce centre seront inactives en infrarouge.

- le terme  $\alpha(0) E_0 \cos(\nu t)$  est à l'origine de la diffusion Rayleigh (interaction élastique).

- le terme  $\frac{1}{2} E_0 \sum_{n=1}^{3N-6} \left( \frac{\partial \alpha}{\partial Q_n} \right) Q_0 \{ \cos[(\nu - \nu_n)t] + \cos[(\nu + \nu_n)t] \}$  correspond au phénomène de

diffusion Raman. On retrouve les vibrations à l'origine des phénomènes Stokes et anti-Stokes. Pour que ce terme soit non nul, l'interaction doit induire une **variation de la polarisabilité** de la molécule. Ainsi, pour une molécule possédant un centre symétrique, les vibrations symétriques par rapport à ce centre seront actives en Raman, par contre les vibrations antisymétriques seront inactives.

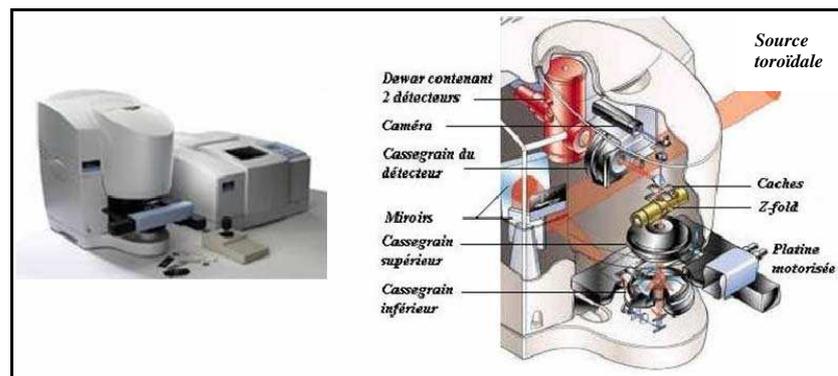
Les vibrations totalement symétriques sont toujours actives en Raman. Les raies correspondantes sont **polarisées** et souvent très intenses. Par exemple, on peut repérer très facilement la respiration symétrique du cycle benzène à  $922 \text{ cm}^{-1}$ . Durant cette vibration, tous les atomes de carbone et d'hydrogène s'approchent ou s'éloignent du cycle en phase. Ce phénomène de polarisation sera plus détaillé dans le chapitre III de ce manuscrit.

Si ces règles sont relativement simples à déterminer pour des molécules diatomiques, il devient très difficile de prédire l'existence ou non d'un raie Raman (ou d'une bande infrarouge) pour les molécules polyatomiques. On fait alors appel à la théorie des groupes. De plus, les règles énoncées précédemment ont été établies dans l'approximation harmonique. Sur des spectres réels, on peut donc observer des raies correspondant à des harmoniques de fréquence  $n.\nu$  ou de la forme  $\nu_\nu + \nu'_\nu$ .

## I.4 Spectroscopies vibrationnelles – Instrumentation

### I.4.1 Imageur Infrarouge

L'enregistrement des spectres et des images spectrales infrarouges est effectué à l'aide de l'**imageur Spotlight 300** couplé à un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier Spectrum One (Perkin Elmer, Courtaboeuf, France). Le schéma descriptif du système d'imagerie est représenté sur la Figure I.19.



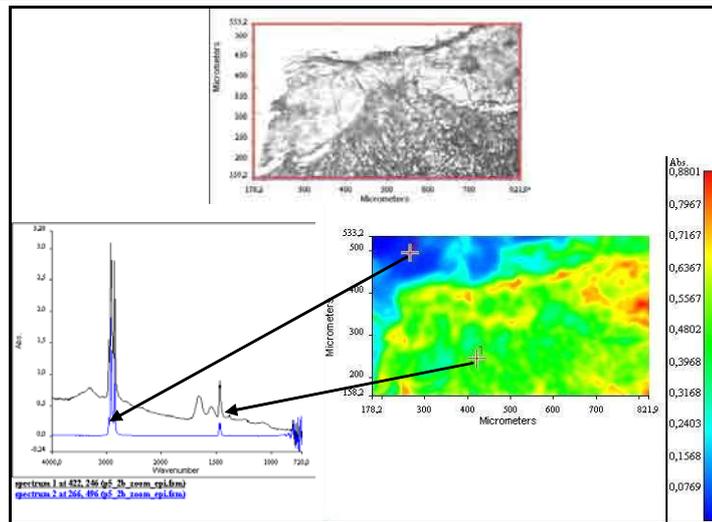
**Figure I.19 : Schéma descriptif de l'imageur infrarouge**

Le système d'imagerie permet d'enregistrer des images spectrales automatiquement avec une taille de pixel de  $6.25 \times 6.25 \mu\text{m}^2$  ou  $25 \times 25 \mu\text{m}^2$ .

Une source de lumière polychromatique (dans le **moyen infrarouge**) est focalisée à l'aide d'objectifs Cassegrain sur l'échantillon (mode transmission). Un système Z-fold permet de changer de **résolution,  $6.25 \mu\text{m}$  ou  $25 \mu\text{m}$** . A noter que la résolution spatiale est limitée par les **phénomènes de diffraction**, elle est donc de l'ordre de  $10 \mu\text{m}$  pour la résolution de  $6.25 \mu\text{m}$  donnée par le constructeur. Deux détecteurs de type MCT (Mercure Cadmium Telluride) refroidis à l'azote liquide sont utilisés, l'un composé de 16 éléments de  $6.25 \times 6.25 \mu\text{m}^2$  pour l'imagerie spectrale et l'autre de  $100 \times 100 \mu\text{m}^2$  pour l'acquisition de spectres points.

La mesure des intensités des différentes nombres d'onde transmis (ou absorbés) est réalisée avec un **interféromètre de Michelson**, le spectre résulte du calcul de la transformée de Fourier de l'interférogramme; d'où le nom de **spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier** (IRTF ou FTIR en anglais).

Le logiciel utilisé pour l'acquisition et la reconstruction d'image spectrale est le logiciel Spotlight (Figure I.20).



**Figure I.20 : Image spectrale-Image visible**

Une image de l'échantillon (haut) est enregistrée en lumière blanche (image visible) et une zone d'intérêt sélectionnée en rouge. L'image spectrale correspondante est très riche en information (l'échelle de couleurs correspond à l'absorbance moyenne) et en chaque pixel de cette image le spectre d'absorption infrarouge associé peut être extrait (bas).

#### I.4.2 Microspectromètre Raman (Labram)

Les acquisitions Raman ont été réalisées à l'aide du microspectromètre Labram (Jobin Yvon Horiba, Villeneuve-d'Ascq, France). Les différents éléments qui constituent ce système d'analyse sont les suivants (Figure I.21):

- une source laser excitatrice (785 nm, proche infrarouge, dans notre cas). Le choix de la longueur d'onde d'excitation résulte d'un compromis. Plus l'onde excitatrice est de longueur d'onde faible, plus le phénomène de diffusion Raman est intense mais plus la fluorescence parasite est importante. On augmente également les risques de dégrader l'échantillon.

- un filtre interférentiel permet de s'affranchir des longueurs d'ondes parasites, il est suivi par une série de filtres atténuateurs qui permettent de réduire, si besoin, l'intensité du rayonnement incident

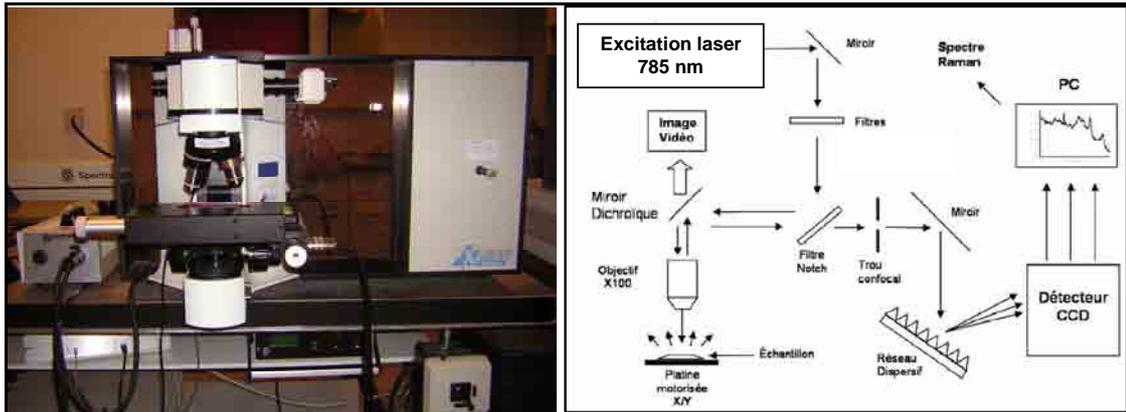
- un filtre notch (ou de type edge) permet d'éliminer une réflexion parasite du laser ainsi que la diffusion Rayleigh

- le rayon laser est alors focalisé sur l'échantillon à l'aide d'un objectif. Le 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. Ce même objectif est utilisé pour récolter le signal de diffusion Raman émis par l'échantillon.

- un trou confocal permet de sélectionner le signal émis par un point particulier de l'échantillon. Dans le cas d'un échantillon multicouche, le trou permet réaliser du "tranchage optique" en sélectionnant une couche précise de cet échantillon. Le signal est ensuite focalisé sur la

fente d'entrée du spectromètre. La largeur de la fente définit la résolution spectrale de l'appareil, mais lorsqu'on réduit l'ouverture de la fente, l'intensité du signal à analyser est aussi réduite.

- le système dispersif est constitué d'un réseau de 950 traits/mm
- un détecteur de type CCD (charge-coupled device) de 2 x 256 pixels permet l'enregistrement numérique des spectres Raman.
- une platine motorisée permet l'enregistrement de cartographies Raman (mode point par point). Le pas de déplacement minimal est de 0.1  $\mu\text{m}$ .



**Figure I.21 : Microspectromètre Raman Labram**

Le microspectromètre Labram résulte d'un couplage entre un spectromètre Raman et d'un microscope. Une platine motorisée permet l'enregistrement d'images spectrales.

#### I.4.3 Spectromètre Raman miniaturisé

L'un des objectifs de ce doctorat est de montrer le potentiel de la spectrométrie Raman pour des applications *in vivo* en milieu clinique. Nous possédons pour cela un système miniaturisé composé d'éléments totalement fixes (Labram HE, Jobin Yvon Horiba, Villeneuve-d'Ascq) auquel nous avons couplé une sonde de mesure (cf. Chapitre IV de ce manuscrit). Le détecteur est refroidi par effet Peltier. Le système est composé d'une diode laser comme source excitatrice (785 nm). L'ensemble est d'encombrement relativement réduit (Figure I.22).



**Figure I.22 : Spectromètre Raman HE**

Le spectromètre Raman HE est miniaturisé, il est commandé par un ordinateur portable via une connexion de type USB.

## I.5 Caractérisation des cancers cutanés par spectroscopie vibrationnelle

De par son accessibilité et la grande diversité des lésions cutanées, la peau représente un domaine particulièrement intéressant pour les études spectroscopiques (Eikje et al., 2005). De nombreuses études principalement à visée **diagnostique**, ont été menées sur des tumeurs de type carcinome basocellulaire (le type de tumeur cutanée le plus souvent rencontré).

Les premiers résultats comparent essentiellement les spectres enregistrés sur un épiderme sain à des spectres enregistrés sur une zone tumorale, à partir de coupes de biopsies (Choi et al., 2005; Fendel and Schrader, 1998; Gniadecka et al., 1997; Mordechai et al., 2004; Wong et al., 1993). Ces études ont permis de mettre en évidence des marqueurs spectroscopiques de la tumeur. Les **différences spectrales** proviennent principalement de modifications structurales et/ou de modifications en contenu de protéines, lipides, polysaccharides et acides nucléiques. Plus récemment, Short et al. se sont intéressés à des modifications spectrales **très localisées** en analysant les spectres Raman du derme proche et à distance de la tumeur, mettant ainsi en évidence une dégradation du collagène par des enzymes sécrétées par les cellules tumorales (Short et al., 2006).

Le développement technologique des appareils de mesure permet d'enregistrer des images spectrales et donnant ainsi accès à des informations à haut débit. Pour donner un sens à ces données, des **techniques chimiométriques** (traitement des spectres à partir d'algorithmes mathématiques) ou de **statistiques multivariées** ont été développées avec intérêt. Ceci a permis de renforcer le potentiel de la spectroscopie vibrationnelle et de pouvoir appréhender l'utilisation en milieu clinique de ces méthodes (Hammody et al., 2008; Lieber et al., 2008a; McIntosh et al., 1999a; McIntosh et al., 1999b; Nordling et al., 2005; Sigurdsson et al., 2004).

Cependant, le réel besoin clinique en matière de diagnostic des cancers cutanés est de pouvoir éviter la biopsie. En effet, l'examen histologique est la méthode de référence pour le diagnostic de ce type de cancer. Ainsi, plusieurs équipes de recherche ont testé l'applicabilité des spectroscopies vibrationnelles pour des **mesures *in vivo***. Des systèmes munis de **fibres optiques** ont été développés (Huang et al., 2005; Huang et al., 2001; Lieber et al., 2008b; McIntosh et al., 2001) mais le signal parasite des sondes de mesure est très intense masque en grande partie le signal Raman du tissu (cf Chapitre IV de ce manuscrit). Afin de s'affranchir de ces limitations, Nijssen et al. ont proposé d'exploiter le signal Raman dans les hautes fréquences ( $2800-3125\text{ cm}^{-1}$ ) où la contribution de la sonde optique est fortement réduite (Nijssen et al., 2007).

**CHAPITRE II**  
**CARACTERISATION DES CANCERS CUTANES PAR MICRO-**  
**IMAGERIE INFRAROUGE**

---

## II.1 Introduction

Le couplage d'un spectromètre d'absorption IR et d'une platine motorisée, permet d'effectuer une cartographie chimique d'un échantillon. Cette technique permet de caractériser un tissu complexe en apportant des informations moléculaires, non accessible par des analyses histopathologiques conventionnelles (coloration hématoxyline-éosine, immuno-marquage), et ceci **sans marquage ni préparation** particulière des coupes tissulaires. Compte tenu du nombre de spectres collectés, des méthodes puissantes de traitement de données sont utilisées afin d'extraire des marqueurs spectroscopiques associés à la malignité.

Les tissus inclus en paraffine, disponibles au sein des tumorothèques, représentent une source considérable d'information, ce qui offre l'opportunité de mener des études rétrospectives. Cependant, la paraffine possède un signal IR qui masque en partie le signal du tissu, augmentant ainsi la complexité de l'analyse. Habituellement, les études spectroscopiques sont menées sur des tissus frais, congelés ou déparaffinés chimiquement. Or, le déparaffinage chimique nécessite l'utilisation de solvants très agressifs (xylène) et il a été montré qu'il n'est jamais totalement efficace (O Faolain et al., 2005a; O Faolain et al., 2005b). Notre laboratoire a été pionnier dans l'analyse des coupes de tissus paraffinés par spectroscopie IR et Raman. Tfayli et al. ont montré la possibilité de discriminer les spectres IR de naevi et de mélanome en travaillant sur des zones spectrales où le signal de la paraffine est nul (Tfayli et al., 2005). Cependant, cette étude a été réalisée à partir de spectres points, sur une gamme spectrale réduite, sans exploiter pleinement l'ensemble des vibrations moléculaires du tissu.

Dans ce chapitre, nous avons développé des méthodes chimiométriques permettant de "**déparaffiner numériquement**" une image spectrale IR. Ces méthodes ont été testées sur différents types de tissus, de supports optiques et de paraffines. Le couplage avec des techniques de classification par statistiques multivariées permet de mettre au point une histologie spectrale très informative, directement sur des coupes provenant de blocs paraffinés, de façon non supervisée. (cf **Article #1**).

Compte tenu du potentiel de la méthodologie employée, une étude rétrospective a été menée sur des coupes de carcinomes cutanés (BCC, SCC et maladies de Bowen) afin de construire une banque de spectres caractéristiques des différentes structures tissulaires (normal, tumoral, péri-tumoral, inflammatoire...). Cette étape cruciale repose sur la confrontation des images spectrales avec les coupes histologiques, et nécessite un travail collaboratif avec un partenaire anatomo-pathologiste. A partir de cette banque de spectres, il a été possible de construire un outil de diagnostic totalement

informatisé. Cet algorithme est capable de détecter les zones tumorales au sein d'une coupe de peau paraffinée et de diagnostiquer le type de lésion (cf **Article #2**).

Nous utilisons actuellement la même méthodologie sur des échantillons de mélanome présentant des degrés d'agressivité différents. La banque de spectres de référence est en cours de construction, en collaboration avec le service d'anatomopathologie (hôpital Pasteur) et le service de Dermatologie (Hôpital de l'Archet 2) du CHU de Nice. Nous nous sommes particulièrement intéressés à exploiter l'hétérogénéité tumorale mise en évidence par analyse statistique multivariée des spectres IR (cf **Article #3**).

## II.2 Chimométrie et analyse statistique

### II.2.1 Analyse en composantes principales (ACP)

Pour le traitement de données, les spectres sont numérisés et sont assimilés à des vecteurs, la longueur du vecteur,  $N_\lambda$ , dépend de la gamme spectrale et de la résolution spectrale. Un ensemble de  $N_s$  spectres constitue donc une matrice de données de dimensions  $N_\lambda \times N_s$ . Les différentes variables (ici les nombres d'onde) contiennent des informations redondantes, il est donc possible de **réduire la dimension des données** tout en conservant l'information liée à la variabilité (Scharf, 1991). L'ACP (ou PCA pour Principal Component Analysis) est un outil de compression, elle permet de remplacer les variables redondantes par des **composantes principales** (PC pour Principal Component) qui sont en fait des combinaisons linéaires des variables initiales (Comon, 1994; Hyvärinen, 1999; Hyvärinen et al., 2001). L'ACP est une méthode de traitement couramment utilisée en spectroscopie (Deinum et al., 1999; Haka et al., 2002). Voici le formalisme matriciel associé :

Si on considère une matrice de spectres  $\mathbf{X} \in \mathfrak{R}^{N_\lambda \times N_s}$ , où  $N_\lambda$  est le nombre de longueurs d'ondes et  $N_s$  le nombre de spectres, alors il existe deux matrices orthonormales  $\mathbf{U} \in \mathfrak{R}^{N_\lambda \times N_\lambda}$  et  $\mathbf{V} \in \mathfrak{R}^{N_s \times N_s}$  ainsi qu'une matrice pseudo-diagonale  $\mathbf{D} \in \mathfrak{R}^{N_\lambda \times N_s}$  telle que

$$\mathbf{X} = \mathbf{U}\mathbf{D}\mathbf{V}^t \tag{Eq. 11}$$

où  $\mathbf{V}^t$  est la transposée de  $\mathbf{V}$

Cette équation représente la **décomposition en valeurs singulières** (SVD, Singular Value Decomposition) de la matrice  $\mathbf{X}$ . Les éléments diagonaux de  $\mathbf{D}$  sont appelés les **valeurs singulières**. Les matrices  $\mathbf{U}$  et  $\mathbf{V}$  sont appelées respectivement matrices de vecteurs singuliers gauches et de

vecteurs singuliers droits (Scharf, 1991). Puisque les matrices  $\mathbf{U}$  et  $\mathbf{V}$  sont orthonormales, on a les relations suivantes :

$$\begin{aligned}\mathbf{U}\mathbf{U}^t &= \mathbf{U}^t\mathbf{U} = \mathbf{I}_{N_\lambda} \\ \mathbf{V}\mathbf{V}^t &= \mathbf{V}^t\mathbf{V} = \mathbf{I}_{N_s}\end{aligned}\tag{Eq. 12}$$

où  $\mathbf{I}_n$  est la matrice identité de taille  $n \times n$

La matrice de covariance  $\mathbf{Z} \in \mathfrak{R}^{N_\lambda \times N_\lambda}$  de la matrice de spectres  $\mathbf{X} \in \mathfrak{R}^{N_\lambda \times N_s}$ , peut être calculée de la manière suivante :

$$\mathbf{Z} = \mathbf{X}\mathbf{X}^t = \mathbf{U}\mathbf{D}\mathbf{V}^t(\mathbf{U}\mathbf{D}\mathbf{V}^t)^t = \mathbf{U}\mathbf{D}\mathbf{V}^t\mathbf{V}\mathbf{D}^t\mathbf{U}^t = \mathbf{U}\mathbf{D}\mathbf{D}^t\mathbf{U}^t = \mathbf{U}\mathbf{D}^2\mathbf{U}^t\tag{Eq. 13}$$

En multipliant à droite cette relation par la matrice  $\mathbf{U}$  on obtient la relation suivante :

$$\mathbf{Z}\mathbf{U} = \mathbf{U}\mathbf{D}^2\tag{Eq. 14}$$

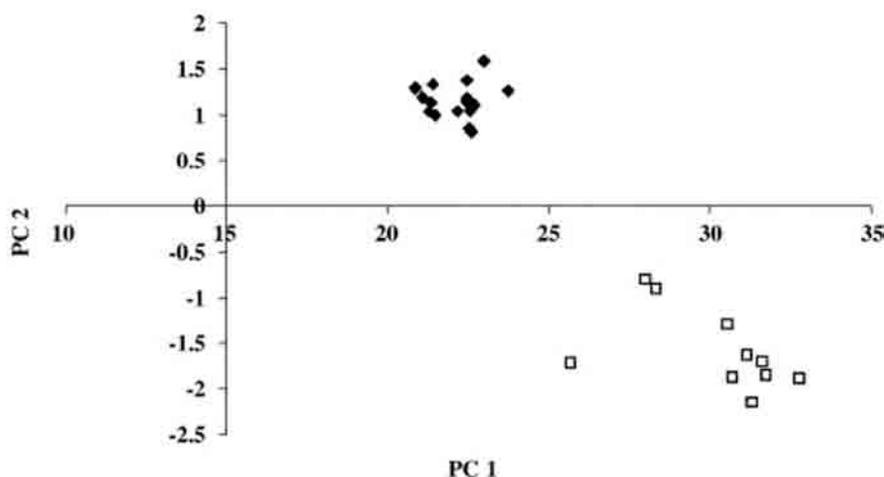
La matrice  $\mathbf{D}^2$  est une matrice diagonale, ces éléments diagonaux sont les carrés des valeurs singulières de la matrice  $\mathbf{X}$ . Cette relation montre que la matrice  $\mathbf{U}$  est en fait une **matrice de vecteurs propres** de la matrice de covariance  $\mathbf{Z}$ . Les valeurs propres associées aux vecteurs propres sont les éléments diagonaux de la matrice  $\mathbf{D}^2$ . Les matrices  $\mathbf{U}$  et  $\mathbf{D}^2$  peuvent être déterminées à l'aide d'autres algorithmes que la décomposition en valeurs singulières tels que les **NIPALS** (Nonlinear Iterative Partial Least Squares) (Wold, 1966); par convention, ils sont réarrangés par ordre décroissant de valeur propre. Plus la valeur propre est élevée, plus le vecteur propre associé décrit la variance de la matrice  $\mathbf{X}$ . La matrice  $\mathbf{X}$  peut alors être écrite dans la base des vecteurs propres de  $\mathbf{Z}$ . Selon la théorie de l'ACP, les vecteurs propres  $\mathbf{U} \in \mathfrak{R}^{N_\lambda \times N_\lambda}$  (deux à deux orthogonaux) sont les composantes principales (ou **loads**) et les coordonnées de chaque vecteur (donc de chaque spectre) dans cette nouvelle base correspondent aux **scores**. La matrice de scores, notée  $\mathbf{S} \in \mathfrak{R}^{N_\lambda \times N_s}$ , est donnée par la relation :

$$\mathbf{S} = \mathbf{U}^t\mathbf{X}, \text{ donc } \mathbf{X} = \mathbf{U}\mathbf{S}\tag{Eq. 15}$$

En utilisant le formalisme de la SVD (Eq. 11), on peut démontrer que la matrice des scores  $\mathbf{S}$  peut être calculée avec la formule suivante :

$$\mathbf{S} = \mathbf{D}\mathbf{V}^t \quad \text{Eq. 16}$$

Dans le cadre de l'ACP, on cherche à travailler dans **un sous-espace** de dimension  $k$  (avec  $k < N_\lambda$ ). On choisira alors le sous-espace engendré par les  $k$  premiers vecteurs propres, qui ont été arrangés par poids décroissant. Un des points faibles de l'ACP est que l'utilisateur doit déterminer manuellement le nombre de composantes principales. Dans notre cas, les premières composantes principales (1<sup>ère</sup> à 10-15<sup>ème</sup> PC) contiennent la majeure partie de l'information spectrale, les composantes suivantes n'en contiennent qu'une quantité décroissante tandis que les dernières (à partir de la 30<sup>ème</sup>) ne sont formées que de bruit. L'ACP peut par ailleurs être utilisée pour débruiter les signaux (Comon, 1994; Hyvärinen, 1999; Hyvärinen et al., 2001). De manière générale, une dizaine de composantes principales suffisent pour décrire plus de 99% de la variance des données. Utilisée de façon descriptive, l'ACP permet de mettre en évidence des groupements entre spectres (portant par exemple la même information spectrale) par le biais de *score plots* (Krishna et al., 2005; Murali Krishna et al., 2005). Ces représentations graphiques comparent les valeurs des scores de chaque spectre selon deux ou trois composantes principales, définies par l'utilisateur (Figure II.01).



**Figure II.01 : Exemple d'un score plot** (Murali Krishna et al., 2005)

La comparaison des scores pour les composantes principales PC 1 et 2 permet de discriminer des spectres IR enregistrés sur (♦) des cellules de sarcome utérin (MES-SA) et (◻) des cellules dérivées MDR (multi-drug resistance).

Si les similitudes ou les différences entre les données ne sont pas visibles dans un espace à  $N_\lambda$  dimensions (de manière générale,  $N_\lambda$  vaut plus de 500), elles peuvent l'être plus distinctement dans l'espace des composantes principales. Au niveau des données spectroscopique, l'analyse des loads

permet également de comprendre quelles variables (ici les nombres d'ondes) ont contribué le plus au regroupement ou à la discrimination entre les données. Par exemple, la première composante principale représentant le spectre le plus corrélé sur les  $N_s$  spectres acquis, les variables qui ont contribué le plus à cette composante auront des valeurs plus grandes que les variables n'ayant pas contribué. Cependant, les scores et les loads peuvent prendre des valeurs négatives (à cause de la contrainte d'orthogonalité), rendant difficile la corrélation de l'analyse avec des phénomènes biologiques.

### II.2.2 Analyse discriminante linéaire

L'**analyse discriminante linéaire** (Linear Discriminant Analysis, LDA) est une méthode de classification dite **supervisée**. A partir d'un jeu de données  $X$  classées dans  $k$  différents **groupes ou classes**, on détermine l'appartenance d'un élément inconnu  $Y$  à l'une des  $k$  classes. L'utilisation de la LDA nécessite donc une connaissance *a priori* de l'attribution des classes (qui peuvent correspondre par exemple à différentes structures tissulaires) (Wang and Mizaikoff, 2008). Le concept de la LDA réside dans le fait que tous les spectres d'un même groupe ressemblent davantage au spectre moyen (qui peut être le centroïde ou le barycentre) de ce groupe qu'au spectre moyen d'un autre groupe. Cette ressemblance est basée sur un calcul de distance inter-spectrale. Dans un premier temps, on recherche alors un nouvel ensemble d'axes (ou **fonctions discriminantes**) qui résumeront au mieux la distance entre deux classes différentes. Si on se place dans le cas où le nombre d'individus est supérieur au nombre de variables, alors on pourra trouver  $k-1$  fonctions discriminantes. Dans ce nouveau repère, on cherchera à maximiser la distance entre les points (ou spectres) entre deux groupes différents (**variance inter-groupes**) et à minimiser la distance entre les points d'un même groupe (**variance intra-groupe**). Ensuite, pour prédire la classe d'appartenance d'une nouvelle observation, on calcule la distance (par exemple, euclidienne ou de Mahalanobis) entre cette observation et les centres de chaque classe. L'algorithme donne alors une probabilité *a posteriori* d'appartenance à chaque classe, et si la probabilité est supérieure à un certain seuil (0.50 par défaut), alors l'observation appartient à la classe correspondante.

Le design expérimental pour la création du modèle prédictif par LDA est le suivant :

- à chacun des  $N$  individus (spectres), est attribuée une classe, c'est la création de la banque de données
- les  $N$  individus sont séparés en deux jeux : le "**training set**" et le "**validation set**". De manière générale, on choisit une répartition de type 2/3-1/3 respectivement pour chaque jeu.
- le modèle LDA est construit à partir du training set (détermination des fonctions discriminantes)

- il est ensuite testé (**validation interne**) sur les données du validation set. A ce stade, il est possible d'optimiser certains paramètres (prétraitement des données, présélection des variables) pour améliorer le modèle.

- une fois le modèle final créé, on peut analyser des échantillons "en aveugle".

L'efficacité d'un modèle s'évalue de deux façons :

- en analysant la matrice de confusion. Cette matrice compare les appartenances de référence (en ligne) et les appartenances données par le modèle (en colonne). Les bonnes prédictions (en pourcentage) du modèle se situent donc sur la diagonale. La trace de la matrice de confusion (somme des éléments diagonaux) traduit le pourcentage de bonnes prédictions et doit donc être proche du nombre total de classes.

- en traçant des courbes "Receiver Operating Characteristics" (courbe ROC). Ces représentations sont très utilisées dans le milieu médical pour mesurer l'efficacité d'une méthode de diagnostic. Une courbe ROC montre la relation entre la sensibilité et la spécificité (plus précisément "1-la spécificité") obtenues par le modèle pour des seuils de probabilité d'appartenance allant de 0 à 1. Par définition on a :

$$\begin{aligned} \text{sensibilité} &= \frac{\text{nombre vrais positifs}}{\text{nombre vrais positifs} + \text{nombre faux négatifs}} \\ \text{spécificité} &= \frac{\text{nombre vrais négatifs}}{\text{nombre vrais négatifs} + \text{nombre faux positifs}} \end{aligned} \quad \text{Eq. 17}$$

Une courbe ROC est avant tout utilisée lors des problèmes à deux classes (par exemple discrimination tissu tumoral/non tumoral). On mesure l'aire sous la courbe (ou Area Under the Curve, AUC) afin d'obtenir un indicateur de la performance du modèle, l'AUC doit être la plus proche possible de 1.

Lorsque le nombre d'échantillons est insuffisant pour avoir une validation interne et une validation externe, on peut effectuer une **validation croisée**. La méthode du "leave-N-out" est généralement utilisée, elle consiste à enlever N échantillons de la banque, de créer un modèle sur les échantillons restants et de tester ce modèle sur les N échantillons mis de côtés, la performance du modèle est ensuite évaluée. Ce processus est répété plusieurs fois en permutant à chaque fois les N échantillons de façon aléatoire pour estimer la performance moyenne du modèle.

### II.2.3 Analyse hiérarchique ascendante

L'analyse hiérarchique ascendante (Hierarchical Cluster Analysis, HCA) est une méthode de classification **non supervisée** des données. Les objets (spectres) sont regroupés de façon séquentielle en classes ou clusters selon un **critère de ressemblance**. Ce critère est défini par la **distance inter-spectrale**, la distance peut être euclidienne ou de Mahalanobis par exemple. Les résultats obtenus sont présentés sous la forme d'un arbre hiérarchique appelé **dendrogramme**. De manière générale, on utilise l'algorithme de Ward pour effectuer le regroupement. L'algorithme est le suivant (Lasch et al., 2004):

- la matrice de distance entre spectres est calculée. C'est une matrice symétrique qui contient les distances entre les individus deux à deux.

- les deux individus les plus proches sont regroupés en un cluster. Ce cluster sera représenté par son centroïde. Une nouvelle matrice de distance est calculée entre tous les individus restants et le cluster nouvellement formé. Les deux objets les plus proches (individu/cluster ou individu/individu) sont regroupés en un même cluster.

- le processus s'arrête lorsqu'une seule classe regroupant tous les individus est formée.

Appliquée en spectroscopie, l'HCA a permis de montrer qu'il était possible de discriminer les spectres enregistrés sur des tissus tumoraux et non tumoraux, ou des spectres enregistrés sur des cellules de nature différente (Lasch et al., 2004; Tfayli et al., 2005; Wang and Mizaikoff, 2008; Wood et al., 2004). L'inconvénient majeur de cette technique réside dans le temps de calcul nécessaire. En effet, la matrice de distance doit être calculée à chaque itération et ceci peut aller au-delà des capacités de mémoire de l'ordinateur lors de l'analyse d'images spectrales (plusieurs dizaines de milliers de spectres).

### II.2.4 Analyse par K-means clustering

Le K-means clustering est également une méthode de **classification non supervisée**. Le regroupement spectral s'effectue sur un critère de distance minimale. Dans cet algorithme, les objets sont regroupés en K groupes (leur nombre K est déterminé par l'utilisateur). Outre ce paramètre, l'analyse est totalement non-subjective dans le sens où le regroupement s'effectue automatiquement. L'algorithme est le suivant (Steinley, 2006):

- K objets sont choisis totalement au hasard et seront les centres initiaux (ou centroïdes initiaux) des K clusters initiaux. Des variantes du K-means permettent de déterminer les K centres initiaux optimaux (Khan and Ahmad, 2004; Peña et al., 1999).

- la distance entre tous les objets et les K centroïdes est calculée. Les objets sont ensuite affectés au cluster dont ils sont le plus proche du centre. Les nouveaux centroïdes sont calculés.

- une nouvelle réaffectation est réalisée selon le critère de distance minimale.

- le processus s'arrête quand les objets ne changent plus de clusters. De façon pratique, l'utilisateur peut soit définir un nombre maximal d'itérations, soit un critère de convergence, i.e. quand moins de X% (à définir) d'objets changent de cluster.

Cet algorithme est facile à implémenter, et contrairement à la HCA, il est très rapide, c'est donc un choix idéal pour la classification des données issues d'images spectrales. Comme l'initialisation est effectuée aléatoirement, il convient de répéter l'algorithme plusieurs fois de suite afin de s'assurer qu'on obtient une solution stable. De plus, le nombre de clusters est un point sensible, des algorithmes sont actuellement mis au point pour donner automatiquement le nombre optimal (Kothari and Pitts, 1999).

### **II.3 Article #1 : Combination of FTIR spectral imaging and chemometrics for tumor detection from paraffin-embedded biopsies**

#### *Contexte*

La plupart des études spectroscopiques menées sur tissus sont réalisées à partir de prélèvements congelés. Cependant, ce mode de conservation n'est pas le plus répandu, la paraffine étant un mode de conservation plus simple et moins onéreux. Par exemple, les prélèvements de cancers cutanés sont systématiquement inclus en paraffine au laboratoire d'anatomo-pathologie Pol Bouin (CHU Maison Blanche, Reims). Dans ce cas, un déparaffinage chimique à l'aide de solvants nocifs (xylène) est nécessaire préalablement à l'analyse spectrale, mais ce déparaffinage peut altérer la composition biochimique des tissus. L'objectif de cette étude est de développer une méthode de traitement de données permettant de déparaffiner "numériquement" une image spectrale IR. Cette méthode automatique éviterait ainsi d'altérer le tissu par un déparaffinage chimique et permettrait l'analyse d'un grand nombre de tissus paraffinés conservés dans les tumorothèques. Ceci permettrait de mener des études rétrospectives afin d'identifier des marqueurs spectroscopiques à visée diagnostique et pronostique.

#### *Méthodes*

Deux types d'échantillons inclus en paraffine (colon et peau) provenant de deux laboratoires d'anatomo-pathologie différents (Laboratoire Pol Bouin Reims et Unité INSERM U682, Strasbourg) ont été analysés par micro-imagerie IR. Ces échantillons ont été déposés sur deux types de supports

différents communément utilisés en spectroscopie IR ( $\text{CaF}_2$ , fluorure de calcium et  $\text{ZnSe}$ , séléniure de zinc).

### *Résultats*

Un modèle mathématique adapté de l'EMSC (Extended Multiplicative Signal Correction) a été développé pour déparaffiner numériquement ces images spectrales. Le modèle repose sur une modélisation du signal IR par une combinaison linéaire de spectres de références, les coefficients sont déterminés par la méthode des moindres carrés. Cette méthode permet non pas d'éliminer le signal de la paraffine mais de neutraliser sa contribution. Des analyses par statistiques multivariées (K-means, HCA) ont ensuite permis de mettre en évidence, de façon totalement non supervisée, les zones tumorales au sein des coupes de tissus. Une routine sous Matlab est désormais disponible et utilisable par les membres du laboratoire.

### *Conclusion*

Le point clé de la correction réside, dans notre cas, en une modélisation adéquate de la paraffine. Il apparaît en effet que la paraffine n'est pas uniforme à l'échelle d'une coupe tissulaire et présente une variabilité qui pourrait être attribuée à une cristallisation "inhomogène" selon des micro-domaines lors de l'inclusion des tissus. Pour modéliser ce signal en tenant compte de sa variabilité, nous avons réalisé une ACP sur une coupe fine de paraffine brute. Il est nécessaire d'avoir un modèle spectral de la paraffine spécifique à chaque type d'échantillon. Ce modèle prend en compte non seulement les variations des bandes IR de la paraffine (variations des intensités relatives) mais également les interférences optiques induites par le système multicouches formé (support  $\text{CaF}_2$  ou  $\text{ZnSe}$  + section fine de paraffine). Pour être efficace, la correction doit inclure un nombre défini de composantes principales.

# Combination of FTIR spectral imaging and chemometrics for tumour detection from paraffin-embedded biopsies

Elodie Ly,<sup>a</sup> Olivier Piot,<sup>\*a</sup> Rolf Wolthuis,<sup>a</sup> Anne Durlach,<sup>b</sup> Philippe Bernard<sup>c</sup> and Michel Manfait<sup>a</sup>

Received 16th October 2007, Accepted 5th December 2007

First published as an Advance Article on the web 20th December 2007

DOI: 10.1039/b715924b

FTIR spectral imaging was applied on formalin-fixed paraffin-embedded biopsies from colon and skin cancerous lesions. These samples were deposited onto different substrates (zinc selenide and calcium fluoride respectively) and embedded using two types of paraffin. Formalin fixation followed by paraffin embedding is the gold standard in tissue storage. It can preserve molecular structures and it is compatible with immunohistochemistry. However, paraffin absorption bands are significant in the mid-infrared region and can mask some molecular vibrations of the tissue. Direct data processing was applied on spectral images without any chemical dewaxing of the tissues. Extended Multiplicative Signal Correction was used to correct the spectral contribution from paraffin. For this purpose, the signal of paraffin was modelled using Principal Component Analysis and paraffin spectra were removed from the raw images based on an outlier detection. Then, pseudo-colour images were computed by *K*-means clustering in order to highlight histological structures of interest. This robust chemometrics methodology was applied on the two samples. Tumour areas were successfully demarcated from the rest of the tissue in both colon and skin independently of the embedding material and of the substrate.

## Introduction

Cancer is the leading cause of death worldwide. Around 560 000 people are expected to die of cancer this year in the United States, which accounts for more than 1500 people a day. Statistics suggest that one man out of two will develop or die of cancer during his lifetime.<sup>1</sup> Improvements in treatment and early diagnosis are the only ways to increase life expectancy. Nowadays, relevant markers for early diagnosis or prognosis remain rare and very specific to a precise type of cancer. Therefore, lesion detection and characterization rely on the expertise and the know-how of clinicians and pathologists. In addition, misdiagnosis can lead to inaccurate treatment, or worse, bad prognosis. However, discrepancies in the interpretation often occur for it is subject to the specialist's experience and judgement.<sup>2</sup>

Innovative methods are increasingly assessed to address this problem. The potential of spectroscopy for the detection of cancerous lesions is now well established. Several studies on biological samples involve Nuclear Magnetic Resonance (NMR),<sup>3</sup> fluorescence emission spectra,<sup>4–6</sup> electrical impedance,<sup>7</sup> terahertz-pulse excitation,<sup>8</sup> Raman<sup>9–11</sup> and Fourier Transform Infrared (FTIR)<sup>12–21</sup> spectroscopies. More precisely, FTIR spectroscopy has been used to discriminate between tumours and healthy tissue from several anatomical

sites such as skin,<sup>13,17</sup> prostate,<sup>15,20,21</sup> brain,<sup>18,19</sup> colon,<sup>12</sup> cervix<sup>14</sup> and breast.<sup>16</sup> The vibrational energies at stake permit the highlighting of molecular information which is characteristic of the histopathological state of the tissue. When coupled to multivariate analysis such as *K*-means clustering, this analytical technique can lead to a rapid identification of tumour areas within a tissue by regrouping spectra according to their resemblance. Contrary to conventional biological methods such as hematoxylin–eosin (H&E) staining, spectral imaging and data analysis can be performed directly on paraffined tissue without any staining and are computer-processed, making the method less prone to human error and chemical alterations. The instruments for spectral imaging being now easy to use and accessible in terms of cost; the main challenge now is to develop reliable computer programs able to process and interpret multivariate data automatically.

Most spectroscopic studies involve analysis on frozen, fresh or chemically-dewaxed tissue. But in order to develop this innovative methodology at a clinical scale, an important step of validation has to be achieved by performing retrospective studies on numerous paraffin-embedded samples available in tumour banks. Indeed, formalin-fixed paraffin-embedded tissues represent a considerable source of information regarding molecular content and pathological state; furthermore, they allow having enough hindsight on patient outcome, thus permitting the identification of prediction markers.<sup>22</sup> In this context, chemical dewaxing, which is a time- and reagent-consuming procedure, would be limiting. Moreover, chemical deparaffinisation may not be complete<sup>22</sup> and might alter the chemical composition of the sample. However, paraffin has strong vibration bands, making spectral interpretation more difficult. In addition, it has been reported that the infrared absorption from a biological sample can be strongly dependent

<sup>a</sup>Unité MéDIAN CNRS UMR 6142, Faculty of Pharmacy, Reims Champagne-Ardenne University, 51 rue Cognacq-Jay, 51096 REIMS CEDEX, France. E-mail: olivier.piot@univ-reims.fr; Tel: +33 3 26918128 Fax+33 3 26913550

<sup>b</sup>Department of Pathology Pol Bouin, Maison Blanche University Hospital, 45 rue Cognacq-Jay, 51092 REIMS CEDEX, France

<sup>c</sup>Department of Dermatology, Robert Debré University Hospital, Avenue du Général Koenig, 51092 REIMS CEDEX, France

on the thickness of its substrate.<sup>23</sup> Consequently, this paraffin signal has to be modelled and subtracted from collected spectra in order to obtain 'purely tissular' spectra.

In this study, we discuss the accuracy and sensitivity of computer-based processing methods for the identification of tumour lesions from IR spectral images of tissue sections. Data acquisition is performed directly on the paraffin-embedded samples, without any chemical pre-treatment. Two types of formalin-fixed paraffin-embedded cancerous tissues were considered in this first study: skin and colon. Paraffin spectra were modelled using Principal Component Analysis (PCA) preceded by a quality test. Extended Multiplicative Signal Correction (EMSC) was applied in order to eliminate paraffin contribution in all spectra and *K*-means clustering was performed to highlight tumour tissue within non-cancerous tissue. Hierarchical Clustering Analysis (HCA) was performed on cluster centres to evaluate the discriminating power of the method.

## Experimental

### Sample preparation

Samples of formalin-fixed paraffin-embedded superficial Basal Cell Carcinoma (BCC) and xenografted colon carcinoma were obtained from the Pathology Department of the Maison-Blanche University Hospital (Reims) and the INSERM U682 (Strasbourg) respectively. Ten (skin) or 7–8 (colon) micron-thick sections were cut and mounted either on a calcium fluoride (CaF<sub>2</sub>) (Crystran Ltd., Dorset, UK) or a zinc selenide (ZnSe) (Crystal GmbH, Germany) window for spectral acquisition. Two different substrates were employed to demonstrate that differing substrate contributions can be accounted for. A paraffin section from each laboratory (referred as paraffin block A and paraffin block B) was also cut to study the possible variability between the two paraffin blocks. Sections were fixed with a drop of distilled water and the window was subsequently placed onto a slide warmer until complete water evaporation for paraffin to melt and adhere to the window. Adjacent sections from the same blocks were H&E stained for histological diagnosis. Sections contained both tumour and normal or necrotic tissue.

### FTIR data collection

Infrared transmission spectra were collected with the Spectrum Spotlight 300 FTIR Imaging System coupled to a Spectrum One FTIR spectrometer (both from Perkin Elmer Life Sciences, France) using the image mode. The device is equipped with a nitrogen-cooled mercury cadmium telluride 16-pixel-line detector for imaging. Prior to acquisition, a visible image of the sample was recorded and the area of interest was selected by comparison to the H&E stained section. Spectral images were collected at either 16 accumulations (BCC sample) or two accumulations (colon sample) with a 4 cm<sup>-1</sup> spectral resolution. Prior to each data acquisition, a spectrum from the window was recorded at a 4 cm<sup>-1</sup> spectral resolution with 240 accumulations. This reference spectrum was subsequently subtracted from the dataset automatically. A 6.25 μm spatial resolution was chosen in order to record more detailed structures.

### Data processing

Spectral images were corrected from the contribution of atmospheric water vapour and CO<sub>2</sub> absorption bands by a built-in function from the Perkin Elmer Spotlight software. All data processing was carried out directly on spectral images – containing up to 10 000 spectra – using programs written in Matlab 7.2 (Mathworks, Natick, MA) supplied with the PLS toolbox 2.0 (Eigenvector Research Inc., Manson, WA).

### Pre-processing

Because CaF<sub>2</sub> absorbs infrared light significantly from 900 cm<sup>-1</sup> downwards, spectra were cut in this region. For this analysis, data were reduced to the 900–1800 cm<sup>-1</sup> fingerprint region, which actually corresponds to the most informative region. Spectra of BCC and colon images were then vector-normalized (*i.e.* zero-centred and variance-reduced to 1) before EMSC was run. The rationale for EMSC is the correction of sample-to-sample variability caused by physical but not chemical differences.<sup>24</sup> EMSC was first introduced by Martens and Stark to remove interference spectra and light-scattering effects from near-infrared collected data.<sup>25</sup> In this article, we adapt the EMSC model for correcting mid-infrared spectra from the contribution of the paraffin signal. Briefly, any spectra  $s_i$  of the dataset can be described as

$$s_i = a_i \hat{s} + b_i I + c_i P + e_i \quad (1)$$

where  $\hat{s}$  is the estimation of the dataset (usually the average data),  $I$  the interference spectrum (in our case, paraffin) and  $P$  a polynomial which accounts for light-scattering effects. These vectors are fitted with the coefficients  $a_i$ ,  $b_i$  and  $c_i$  respectively. The residue  $e_i$  gives an estimation of the accuracy of the fitting model. The EMSC corrected spectrum  $s_{i\text{corr}}$  is then processed as follows

$$s_{i\text{corr}} = \hat{s} + e_i/a_i \quad (2)$$

In this study, the estimation of the dataset for each image was chosen as the average spectrum within the image. Light-scattering effects were modelled with a four-degree polynomial function.

### Paraffin model

Paraffin is not homogeneous so choosing one spectrum or even an average spectrum would not model the paraffin contribution properly. Consequently, PCA on a set of paraffin spectra was run to keep the maximum variance in the paraffin dataset while reducing the amount of data. Spectra were averaged on a 2-pixel-size square to reduce noise and further vector-normalized. A defined number of loads from PCA was then introduced in the EMSC model (vector  $I$ ).

We also assessed the need for a quality test prior to PCA. Paraffin spectra which do not comply with defined criteria were excluded from the dataset; spectra with low background (average absorbance in the 1800–1900 cm<sup>-1</sup> region comprised between -1 and 0.35) and sufficient intensity (average absorbance in the 1460–1470 cm<sup>-1</sup> region comprised between 0.3 and 1) were kept. Then the ratios  $A_{940-980}/A_{1420-1480}$  and

$A_{1600-1700}/A_{1420-1480}$  were computed (where  $A_{940-980}$  and  $A_{1600-1700}$  correspond to absorbance due to biological molecules and  $A_{1420-1480}$  corresponds to deformation vibrations of CH bonds, which are paraffin and tissue constituents). Spectra whose ratio values were within  $[-1.6 -0.9]$  and  $[-1.3 -0.82]$  respectively passed the test for they accounted for a low background in the first case and a low protein content from possible contaminants in the second. The Savitsky–Golay first derivative on a 31-point window and a third order polynomial was applied. Again, spectra whose first derivative ratios  $A_{930-1000}/A_{1430-1500}$  and  $A_{1180-1250}/A_{1430-1500}$  were included in the intervals  $[-0.04 0.1]$  and  $[-0.06 0.1]$  respectively were not excluded. Following these quality tests, a minimum of 3700 spectra were used for PCA.

### Cluster images

*K*-means clustering was used to regroup spectra that show similar spectral characteristics. This method has already proved its potential for IR-analyzed cancerous tissues.<sup>12,26</sup> Spectra within a same cluster should describe similar biological properties. *K*-means clustering is a non-hierarchical clustering method that relies on the minimization of the squared distances between the data and their cluster centre.<sup>27</sup> For the first iteration, *k* spectra (*k* corresponding to the number of clusters selected by the user) are chosen randomly and the program computes the distances between those *k* spectra (initial cluster centres) and the remaining dataset. Spectra closest to a particular cluster centre are grouped into the same cluster. Then, new cluster centres are computed (average spectrum for each cluster) and a new reassignment is processed. The program stops when a certain convergence criterion is reached. In this study, *K*-means maps were calculated several times to make sure a stable solution was reached; the percentage of convergence was set to 99.9% in all cases. The retained number of clusters was set to 11, which appears to match the histology of the epithelial tissues analyzed.

### Hierarchical clustering analysis

HCA was used on cluster centres in order to quantify the discriminating power of our processing methods. HCA regroups spectra into clusters on a minimal distance criterion. The result of such a clustering is displayed in a tree-like diagram called a dendrogram. Neighbouring spectra are grouped into a same cluster. The distance between each cluster gives an estimation of the spectral differences. Euclidian distances and clustering using Ward's algorithm were calculated using built-in Matlab functions from the Statistical toolbox.

## Results and discussion

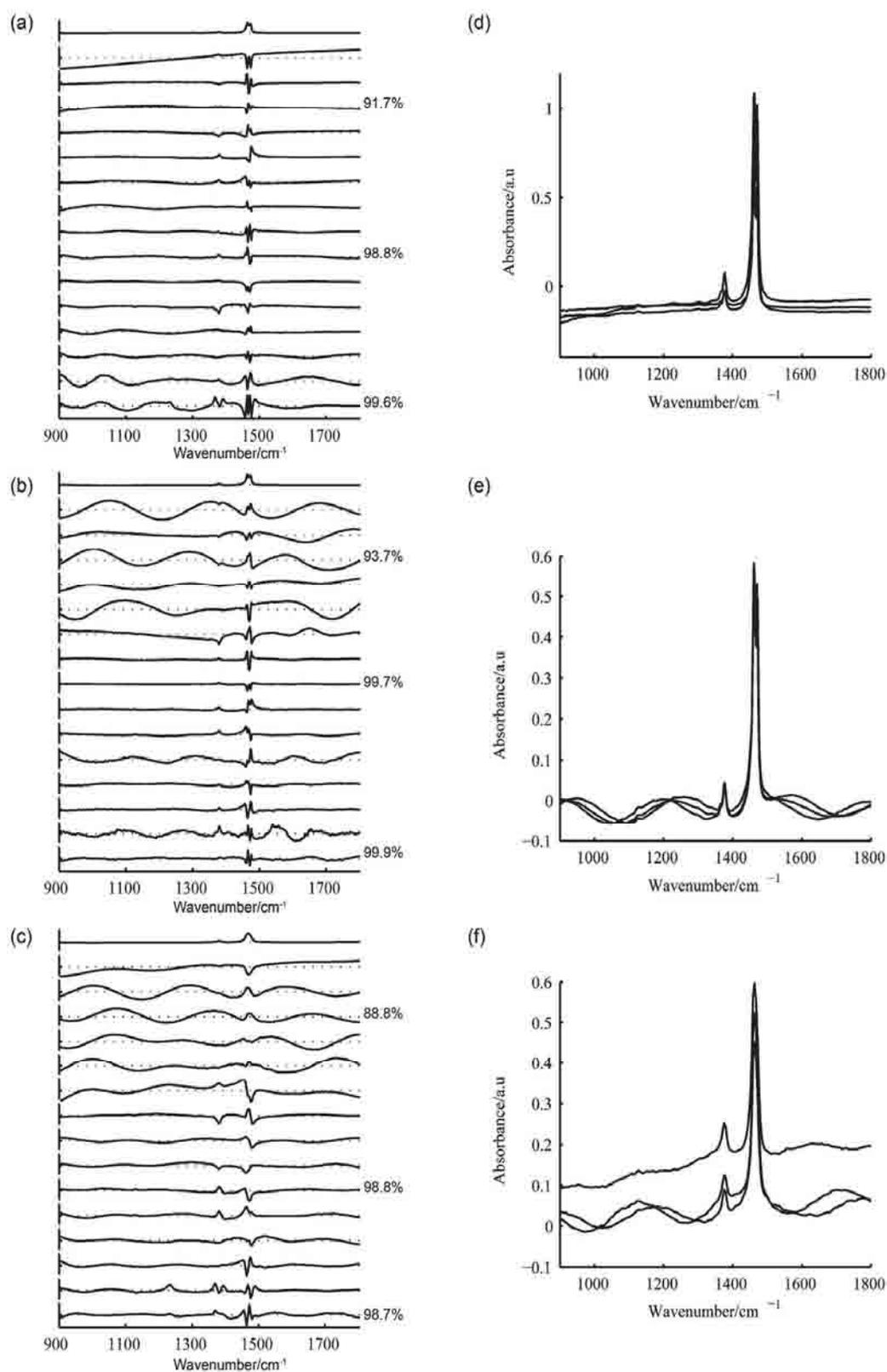
### Paraffin variability and modelling

The paraffin contribution must be eliminated from the dataset because it interferes with the tissue signal so it must be modelled as precisely as possible. The quality test on paraffin spectra prior to EMSC was necessary and aimed at removing spectra with a significant contribution in the spectral regions devoid of paraffin vibrations caused by possible

contamination. Indeed, those spectra could bias the signal correction and lead to a misinterpretation. Fig. 1 shows the first 15 principal components of the two paraffin datasets (block A and block B). For each type of paraffin, principal components describe dissimilar characteristics. Because we are only interested in the shape of the principal components (PCs), only the relative intensity to the baseline (dotted line) is relevant. In Fig. 1(a),(b), only the type of substrate changes (CaF<sub>2</sub> and ZnSe, respectively). The apparition of sinusoid-like curves in Fig. 1(b) is very specific of the contribution of the ZnSe window. Indeed, ZnSe has a higher refractive index than CaF<sub>2</sub> (*ca.* 2.4 *versus ca.* 1.4 in the mid-infrared region) which could lead to strong interferences between refracted light beams. This phenomenon is quite significant with a ZnSe substrate for it is present right from the second PC. CaF<sub>2</sub> also produces interferences between refractive beams but those interferences are quite negligible for they are present only from the 12th PC on. In Fig. 1(b),(c), similar ZnSe windows were used for the two paraffin blocks. Again, interferences between refracted beams are present in Fig. 1(c). The frequency of these oscillation was estimated in both cases: paraffin block A produced oscillations with a frequency of 1210 cm<sup>-1</sup> *versus* 1050 cm<sup>-1</sup> for the other block. This difference could be explained by the difference of thickness between the two sections (10 μm for block A and 8 μm for block B). Consequently, the use of CaF<sub>2</sub> substrates leads to less interferences to correct.

Paraffin spectra should be removed from the dataset prior to *K*-means clustering. The importance of this correction on results of *K*-means clustering of the spectra is illustrated in Fig. 2. This figure shows the H&E stained photograph (a) with two tumour sites (outlined) and *K*-means results (b) on the BCC sample without elimination of the interference spectra. Up to nine clusters were chosen, but no discrimination between different skin constituents can be detected. This result shows that paraffin variability is higher than sample variability and needs removing. The method employed to subtract the paraffin signal in IR maps was an outlier detection based on the fitting coefficient from the EMSC model. The fit coefficient  $a_i$  and the residue  $e_i$  are plotted for all spectra from the IR image in Fig. 3. Spectra with a low fitting coefficient, here below 7, correspond to paraffin spectra. Thus, if spectra with fitting coefficients below 7 (threshold) are removed from the IR map, most paraffin will be eliminated artificially. Further outlier detection can be undertaken with the residue  $e_i$ , for which we chose a threshold value of 0.2. Optimization of threshold values can be performed so as to remove as many outliers as possible. Cluster maps in Fig. 2 panels (c)–(f) were obtained using the outlier elimination. The latter proves as useful as most paraffin spectra are removed from the image, permitting the identification of histological structures of the skin sample.

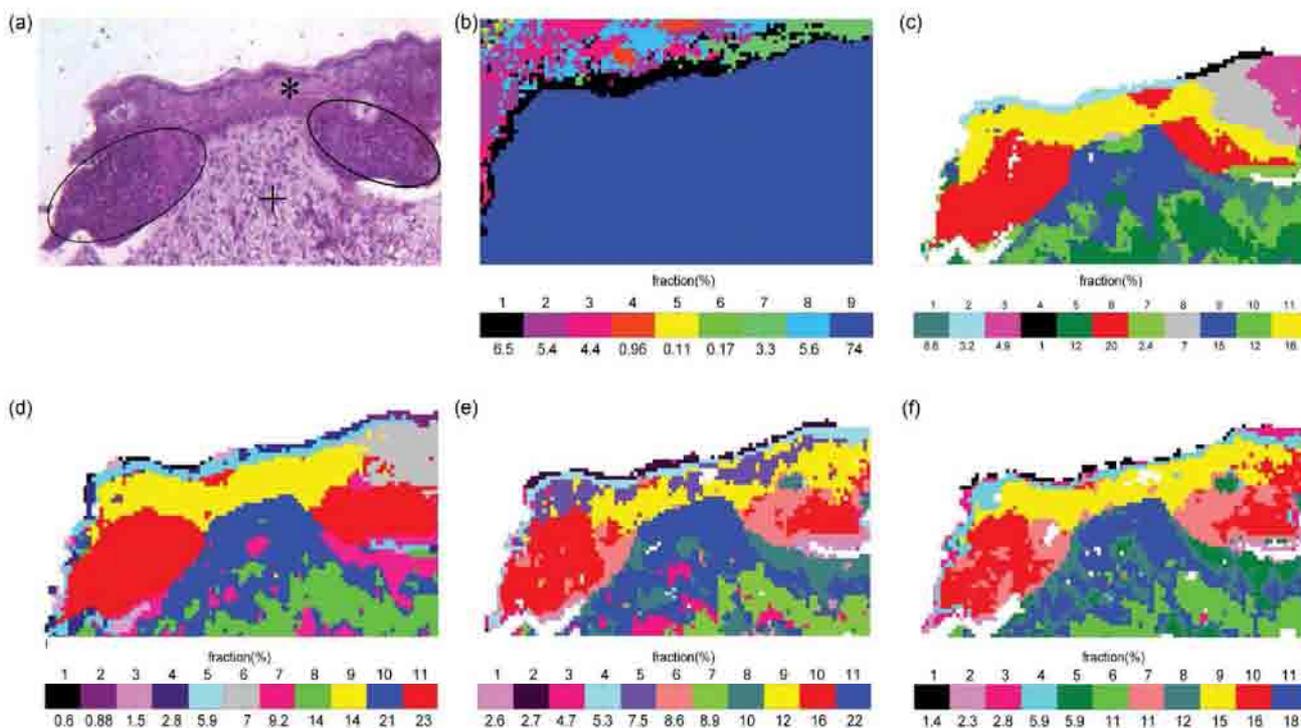
In light of the differences among paraffin blocks, paraffin signal corrections have to be adapted in order to reproduce the paraffin features as precisely as possible. Because paraffin is not homogeneous within a tissue section, choosing the average spectrum is not the optimal choice. Indeed, Fig. 2(c) shows a *K*-means map obtained from spectra corrected using the average spectrum of paraffin in the EMSC model. This model



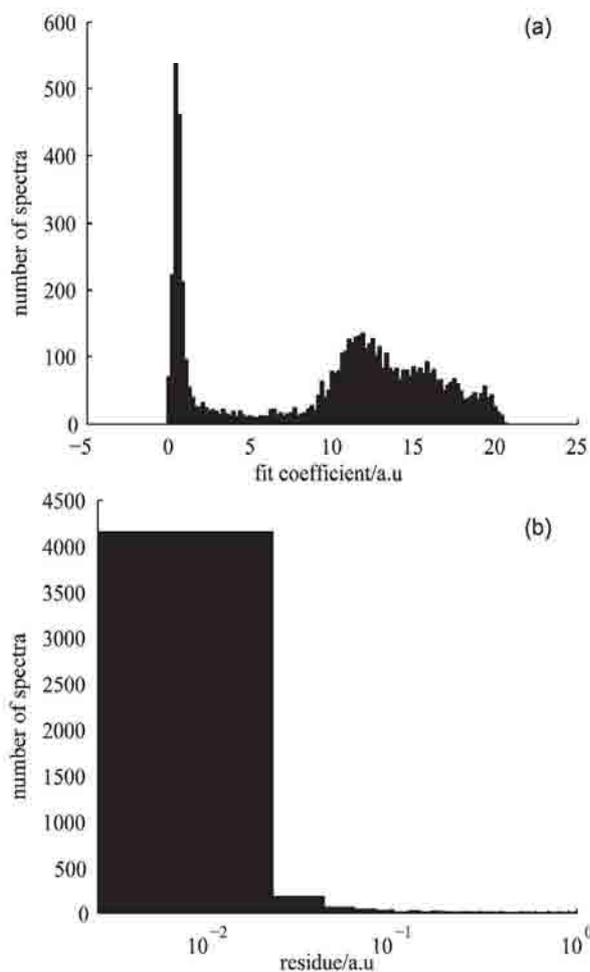
**Fig. 1** Average spectrum and first 15 PCs of paraffin spectra (left, from top to bottom) and three randomly chosen spectra (right) from block A on a CaF<sub>2</sub> window (a,d), block A on a ZnSe window (b,e) and block B on a ZnSe window (c,f). Percentages on the right-hand side correspond to the percentage of the variance accumulated with the first 3, 9 and 15 principal components respectively.

spectrum corresponds here to the average of 3700 spectra collected on a thin section of the same paraffin than the one employed for the tissue embedding. Although main skin layers are detected (epidermis in yellow, dermis in blue and green), the model lacks sensitivity as one of the two tumour sites (right-hand side) is not identified properly.

A better way of modelling paraffin is applying Principal Component Analysis on the set of paraffin spectra. It helps to reduce the number of variables while keeping the maximum of variance of the dataset.<sup>28</sup> The major issue using PCA is the selection of the number of principal components that best describes the dataset. Plethora of criteria are currently used in



**Fig. 2** Cluster maps on a superficial BCC sample. Panel (a): H&E stained section (\* epidermis, + dermis, BCC is outlined). Panel (b): K-means map obtained on the IR image without outlier elimination. Each colour corresponds to a particular cluster. Panels (c)–(f): cluster maps with outlier elimination for different paraffin models (average spectrum, 3, 9 or 15 first principal components respectively).



**Fig. 3** Fit coefficient and residue (log scale) from the EMSC model for all the spectra within a superficial BCC IR image.

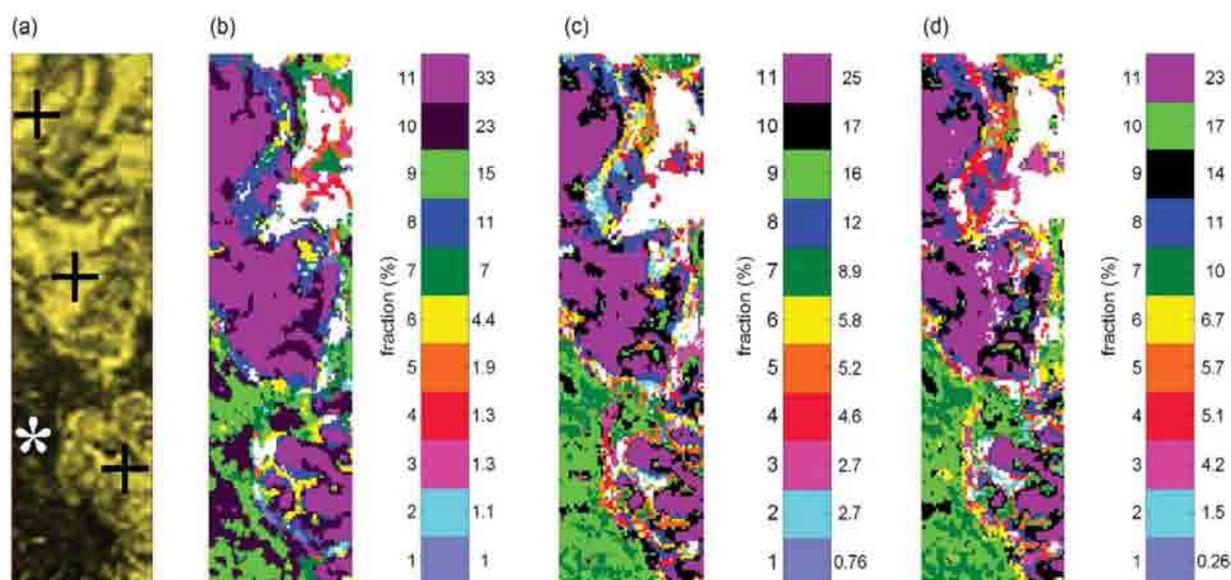
chemometrics for this selection: among them are the cumulative percentage variance (CPV), the average Eigen value (AEV), Cattell's scree test and the scree test on the residual percent variance (RPV). Valle *et al.* made a comparison of these methods and discussed their effectiveness.<sup>28</sup> Briefly, CPV computes the percentage of the variance described by the PCs kept in the model and the user defines a threshold value (usually 90–99% of the variance), the AEV approach keeps PCs in which the Eigen value is superior to 1 (1 corresponding to the average Eigen value), Cattell's scree test and the scree test on the RPV plot the Eigen value or the RPV against the number of PCs. The RPV is described as:

$$RPV(l) = 100 \left[ \frac{\sum_{j=l+1}^m \lambda_j}{\sum_{j=1}^m \lambda_j} \right] \quad (3)$$

where  $l$  is the number of PCs kept in the model,  $\lambda_j$  the Eigen value associated with the  $j$ th PC and  $m$  the number of variables. The scree test searches for a 'knee' point in the curve, which is where the optimal number of PCs is reached. Table 1 summarizes the different threshold values obtained with the

**Table 1** Number of principal components that should be kept depending on the different criteria, for the two paraffin blocks

Type of paraffin	Cumulative percentage variance		Average Eigen value	Cattell's scree test	Residual percent variance
	90%	99%			
Paraffin block A	4	10	2	7	6
Paraffin block B	3	10	1	6	6



**Fig. 4** Cluster maps on a colon carcinoma xenograft. Panel (a): photomicrograph of the tissue section deposited on a ZnSe substrate (\* necrotic tissue, + tumour tissue). Panels (b)–(d): *K*-means map obtained on the IR image. Each colour corresponds to a particular cluster. Note that only the paraffin model changes (first 3, 9 and 15 principal components respectively).

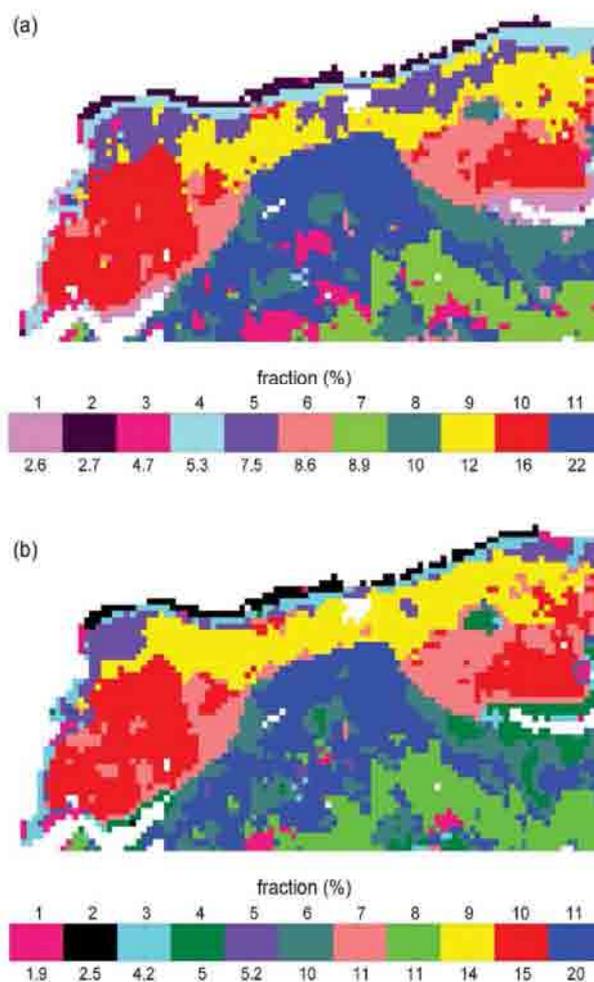
two paraffin blocks used in this study. The appropriate method is not obvious, which is why we tested three paraffin models using the first 3, 9 and 15 PCs. Because PCA on paraffin spectra was run on mean-centred spectra, the average spectrum of paraffin was added to the first principal components chosen for each paraffin model studied.

#### *K*-means maps

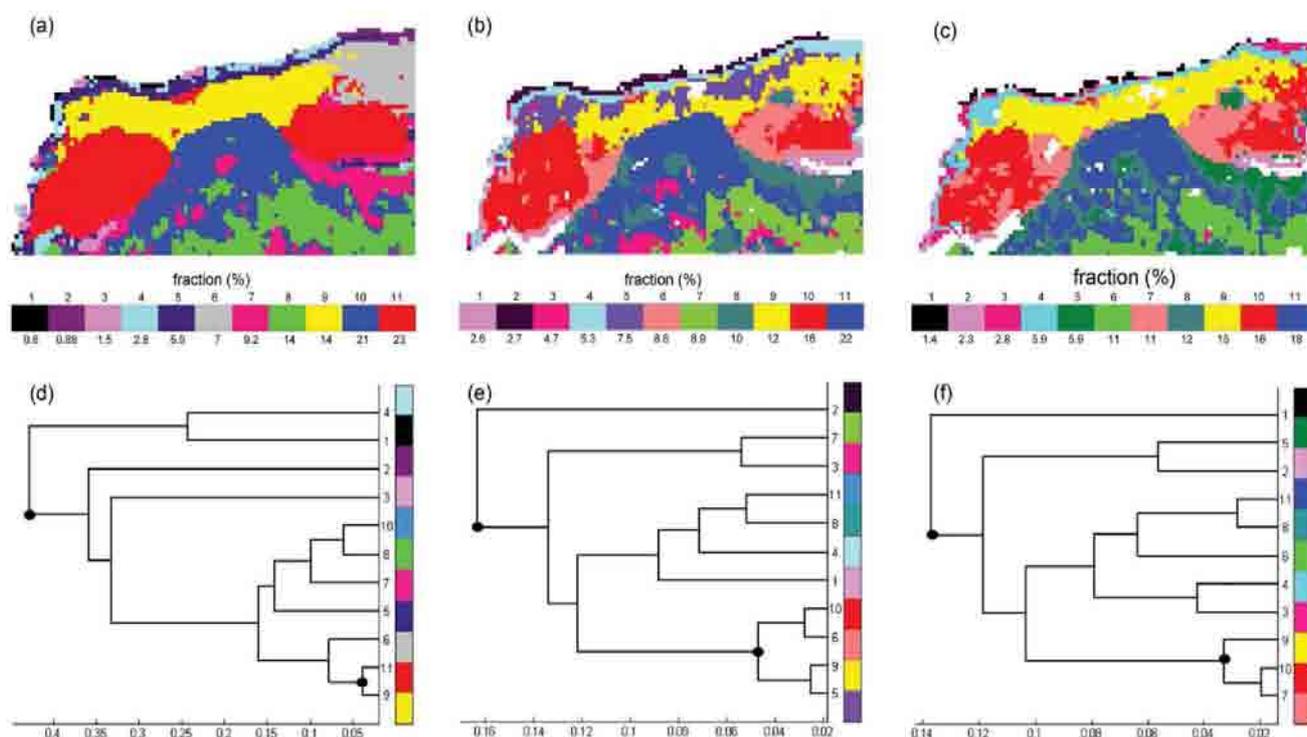
Fig. 2(d)–(f) depicts cluster maps on the BCC sample using, respectively, the first 3, 9 and 15 principal components for the paraffin model. Similar processing parameters were used for all three images. Clusters are sorted out following an increasing order. The percentage of spectra within the three main clusters varies depending on the paraffin model used, which clearly indicates an impact on the spectral correction. At first glance, main skin layers are outlined. Dark blue and green clusters are associated with the dermis, yellow areas correspond to the epidermis and the light blue cluster corresponds to the stratum corneum. In all cases, BCC sites (red and light red) are localized, which proves that IR spectroscopy is sensitive enough for the identification of lesions within a complex tissular structure. When 9 or 15 principal components are used to model paraffin, tumour heterogeneity is highlighted (which could be associated to tumour progression) and more clusters appear at the level of the dermis. Furthermore, there is a perfect matching between the H&E stained image and the reconstructed pseudo-colour image. This methodology was used to process infrared spectral images from other types of paraffin-embedded cancerous skin lesions (basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma) and again, tumour areas were perfectly outlined, without any false positives (data not shown).

Similar processing methods were applied on the colon sample. Outlier detection was undertaken by plotting the values of the fit coefficient and the residue from the EMSC correction to determine threshold values. Fig. 4 displays

cluster maps obtained from the colon sample. Panel (a) is the photomicrograph of the specimen, mainly constituted of tumour and necrotic tissues. Panels (b)–(d) depict cluster maps



**Fig. 5** Cluster map on a superficial BCC sample. Distances for *K*-means clustering were computed (a) across the 900–1800  $\text{cm}^{-1}$  range and (b) outside the paraffin region (1350–1500  $\text{cm}^{-1}$ ).



**Fig. 6** Cluster maps [panels (a)–(c)] and matching dendrograms on cluster average spectra from the superficial BCC sample [(d)–(f)]. Panels (a)–(c) refer to the number of principal components used in the paraffin model (first 3, 9 and 15, respectively). Each colour in the dendrogram accounts for the corresponding cluster in the *K*-means image.

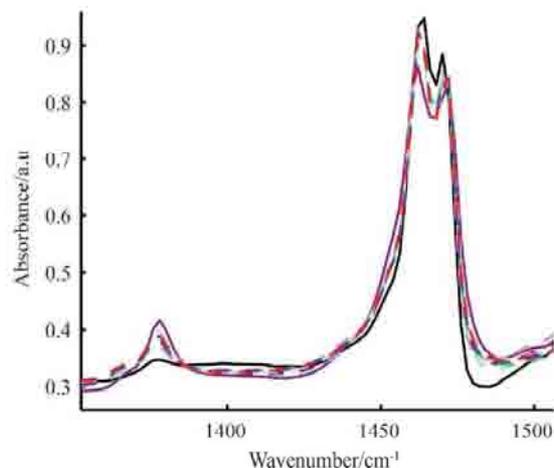
obtained with the first 3, 9 and 15 PCs of paraffin. Again, clusters are sorted out according to their relative importance. For all cases, it is clear that the method performs well and permits the identification of any tumour, particularly by discriminating it from the necrotic tissue and other histological structures (stroma).

In the previous examples of clustering, inter-spectral distances were calculated on the 900–1800  $\text{cm}^{-1}$  range. Fig. 5 shows cluster maps computed on the BCC sample on two different spectral ranges with a paraffin model of 9 principal components. In panel (a), distances were computed on the 900–1800  $\text{cm}^{-1}$  range. In panel (b), distances were computed outside the paraffin region, on the 900–1350 and 1500–1800  $\text{cm}^{-1}$  ranges. A peculiar cluster, cluster 5, is differently spatially distributed across the image. Spectra within that cluster might contain meaningful information in the spectral paraffin region [panel (a)] but are not noticeable in panel (b). Those spectra might describe a possible heterogeneity during the paraffinisation of the tissue. It seems that this phenomenon is localized in the junction between the stratum corneum and the epidermis.

### Hierarchical clustering analysis (HCA)

Because it is difficult to assess the effectiveness of the paraffin modelling (especially between 9 and 15 principal components) on cluster images, we computed dendrograms on cluster averages from the BCC sample for the different paraffin models [pseudo-colour maps presented in Fig. 2(d)–(f)]. Fig. 6 panels (d)–(f) display dendrograms on cluster averages from the BCC sample using 3, 9 and 15 first PCs for the paraffin model respectively.

The heterogeneity scale in the first dendrogram is much higher, reflecting the fact that the underlying variability of the dataset is more important. Because only 3 PCs from paraffin were used for the EMSC, skin spectra still contain paraffin features. Indeed, if we compare the number of outlier spectra detected by the method described earlier, fewer paraffin spectra are removed from the spectral image when a 3 PCs model is used (1819 out of 6344) compared to a 9 or 15 PCs paraffin model (2221 and 2329 respectively). In addition, the clustering of the data after EMSC with the first three PCs of paraffin contains two clusters (1 and 2) that are irrelevant. These clusters, localized in the tissue/paraffin junction correspond to spectra where the contribution of paraffin has



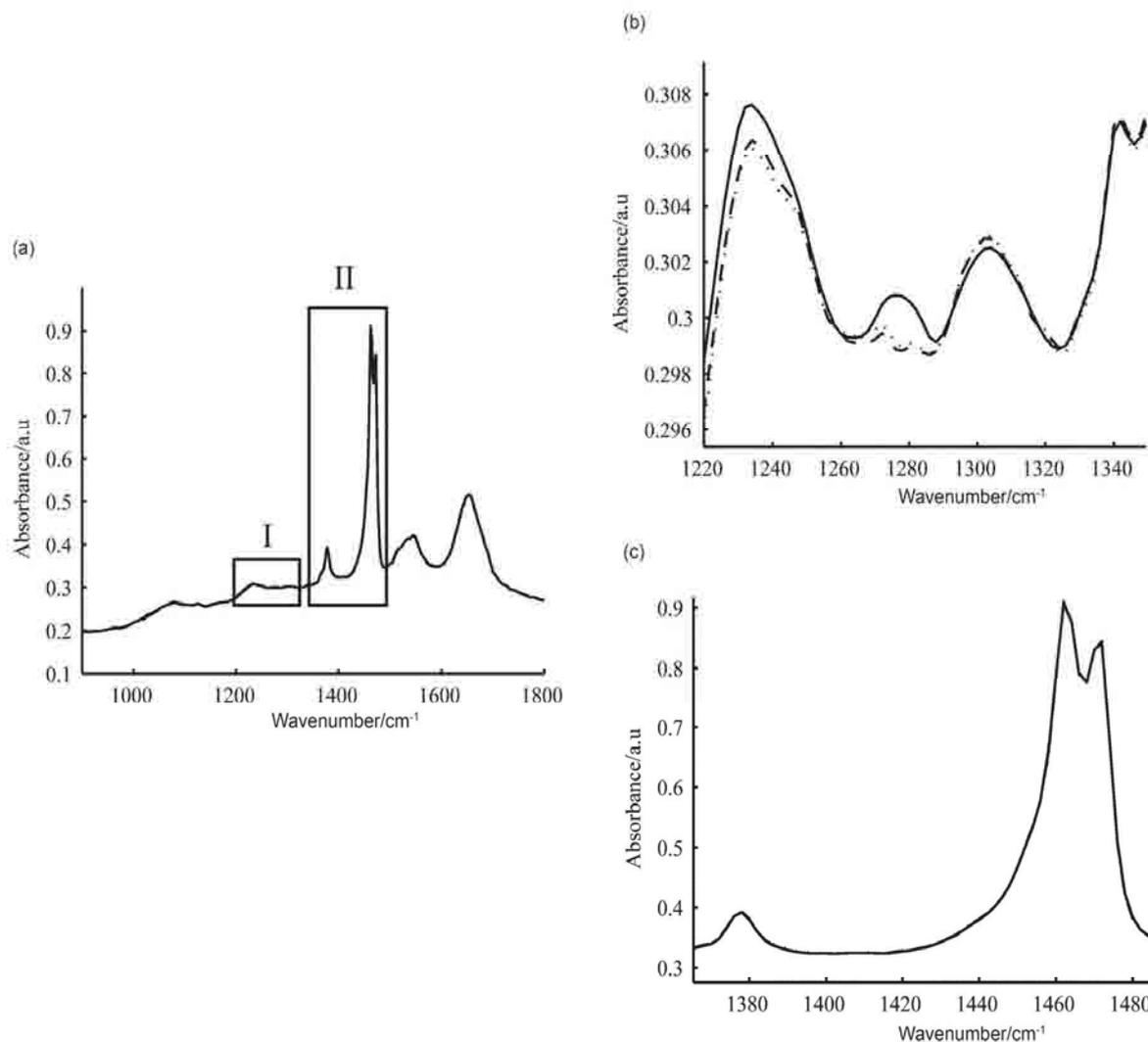
**Fig. 7** Cluster centres from the *K*-means map in Fig. 2(d) in the paraffin region. Each colour corresponds to the colour of the cluster. Cluster averages from clusters 1 and 2 are in solid lines.

not been corrected properly and convey little information. As shown in Fig. 7, paraffin peaks (located between 1360 and 1500  $\text{cm}^{-1}$ ) from the average spectra of clusters 1 and 2 stand out from the other spectra due to their peak heights and baselines in this spectral region. Considering the irrelevance of these two clusters, the data were further processed using 13 clusters but no supplementary information could be extracted at the level of tumour areas (data not shown).

Besides, all models succeed to classify BCC cluster averages (red and light red) in the same cluster. BCC cluster averages are linked to epidermis-like clusters, which is coherent with the fact that superficial BCC develops from keratinocytes of the basal cell layer of the epidermis. Differences can be observed in the epidermis: two clusters (5 and 9) are associated with this skin layer with a paraffin model using 9 PCs whereas only one (cluster 9) corresponds to the epidermis with a model with 15 PCs. As shown in Fig. 8, the average spectra of clusters 5 and 9 from Fig. 6(b) are very similar. Moreover, they are very similar to the average spectrum of cluster 9 from Fig. 6(c) in region II (corresponding to paraffin vibration bands) but differences are quite significant in the 1200–1350  $\text{cm}^{-1}$  region (where there are no paraffin vibration bands). As noted earlier, the contribution from interferences between refracted beams

appeared from the 12th PC for paraffin block A on a  $\text{CaF}_2$  substrate. It is the consequence of these interferences that intervenes between panels (b) and (c) and it is not associated with the modelling of paraffin vibration bands. Similar remarks are noticeable among clusters associated with the dermis [clusters 3, 7, 8 and 11 for panel (b) and clusters 5, 6, 8 and 11 for panel (c)]. This phenomenon is even more important when a ZnSe substrate is employed for they are present as from the second principal component.

A proposed method to assess the accuracy of a model to discriminate between the epidermis and BCC is to focus on the heterogeneity. Ratios between the heterogeneity between the epidermis and BCC and the highest heterogeneity within the dendrogram (excluding the small clusters mentioned above) could give information on the discriminative power of the processing method (see corresponding black dots in Fig. 6). A 3 PCs model for paraffin resulted in a lower ratio (0.0913) compared to a 9 PCs model (0.352) or a model with 15 PCs (0.278). Thus it seems that 9 PCs are best to describe the paraffin block A. A lower discriminating power for a 15 PCs model might be associated with a less accurate modelling of the dataset. In fact, there should be a compromise between good modelling and an over parameterization of the



**Fig. 8** Cluster centres from clusters 9 and 5 (dashed lines) from Fig. 6(b) and cluster 9 from Fig. 6(c) (solid line). Panel (a) depicts spectra in the 900–1800  $\text{cm}^{-1}$  range, panels (b) and (c) give a magnified view of regions I and II.

data. Indeed, in the latter case, spectra are modelled with interferences between refracted light beams at the interface between the paraffin layer and the  $\text{CaF}_2$  substrate, which are not associated with molecular vibrations from biomolecules. In addition, these interferences are modelled from a 'paraffin on  $\text{CaF}_2$ ' system which is not our real system (skin embedded in paraffin on  $\text{CaF}_2$ ). However, one can notice that the spatial repartitioning of clusters associated with BCC [clusters 6 and 10 for Fig. 6(b) and clusters 7 and 10 for Fig. 6(c)] is not much affected by the modelling compared to the structures of the dermis.

## Conclusions

Because formalin-fixed paraffin-embedded tissues are an important source of information for retrospective approaches, particularly in cancer studies, they are widely used in standard analyses as well as in new methodologies such as FTIR spectroscopy. Paraffin has the advantage of preserving molecular structures and of being compatible with immunohistochemistry but its absorption bands are significant in the mid-infrared region and mask molecular vibrations associated with the tissue. We have shown that EMSC performed very well for correcting spectra from the paraffin contribution. Owing to the high variability of the paraffin signal, it was better to run Principal Component Analysis on paraffin spectra to improve the EMSC efficiency. When combined with EMSC, *K*-means clustering was very powerful for the identification of different types of tumours (colon and skin). This methodology permitted both precious molecular and spatial information to be obtained. We see this processing as a valuable tool for the analysis of spectral images of paraffined tissues and it represents a real breakthrough in the development of FTIR spectral imaging as an innovative tool for the histopathological examination of tissues. In fact, spectral acquisition is undertaken directly on the sample, without any chemical treatment, and data processing can be automated in order to highlight histological structures without any staining. Further investigation will focus on the development of the automation of the paraffin correction by taking into account the variability (due to aging and origin for example) of the paraffin signal across the range of tissue banks. Such a development could give new types of diagnosis and prognosis markers in cancer pathologies.

## Acknowledgements

We thank R. Damay and M. Simon for technical assistance. The authors acknowledge Cancéropole Grand Est (Axe IV) for financial support. R. W. is a post-doctoral fellow of the INCA. E. L. is a postgraduate fellow from CNRS and Région Champagne-Ardenne.

## References

- 1 *Cancer Facts and Figures 2007*, American Cancer Society, Atlanta, GA, 2007.
- 2 L. B. Rorke, *Cancer*, 1997, **79**, 665–667.
- 3 M. R. Tosi, V. Tugnoli, G. Bottura, P. Lucchi, A. Battaglia and P. Giorgianni, *J. Mol. Struct.*, 2001, **565–566**, 323–327.
- 4 L. Brancalione, A. J. Durkin, J. H. Tu, G. Menaker, J. D. Fallon and N. Kollias, *Photochem. Photobiol.*, 2001, **73**, 178–183.
- 5 E. Crowell, G. Wang, J. Cox, C. P. Platz and L. Geng, *Anal. Chem.*, 2005, **77**, 1368–1375.
- 6 R. Na, I. M. Stender and H. C. Wulf, *Acta Derm. Venereol.*, 2001, **81**, 246–249.
- 7 Y. A. Glickman, O. Filo, M. David, A. Yayon, M. Topaz, B. Zamir, A. Ginzburg, D. Rozenman and G. Kenan, *Skin Res. Technol.*, 2003, **9**, 262–268.
- 8 V. P. Wallace, A. J. Fitzgerald, E. Pickwell, R. J. Pye, P. F. Taday, N. Flanagan and T. Ha, *Appl. Spectrosc.*, 2006, **60**, 1127–1133.
- 9 B. W. de Jong, T. C. Schut, K. Maquelin, T. van der Kwast, C. H. Bangma, D. J. Kok and G. J. Puppels, *Anal. Chem.*, 2006, **78**, 7761–7769.
- 10 M. A. Short, H. Lui, D. McLean, H. Zeng, A. Alajlan and X. K. Chen, *J. Biomed. Opt.*, 2006, **11**, 34004.
- 11 A. Nijssen, T. C. Bakker Schut, F. Heule, P. J. Caspers, D. P. Hayes, M. H. Neumann and G. J. Puppels, *J. Invest. Dermatol.*, 2002, **119**, 64–69.
- 12 P. Lasch, W. Haensch, D. Naumann and M. Diem, *Biochim. Biophys. Acta*, 2004, **1688**, 176–186.
- 13 L. M. McIntosh, M. Jackson, H. H. Mantsch, M. F. Stranc, D. Pilavdzic and A. N. Crowson, *J. Invest. Dermatol.*, 1999, **112**, 951–956.
- 14 B. R. Wood, L. Chiriboga, H. Yee, M. A. Quinn, D. McNaughton and M. Diem, *Gynecol. Oncol.*, 2004, **93**, 59–68.
- 15 C. Paluszkiwicz and W. M. Kwiatek, *J. Mol. Struct.*, 2001, **565–566**, 329–334.
- 16 R. Eckel, H. Huo, H. W. Guan, X. Hu, X. Che and W. D. Huang, *Vib. Spectrosc.*, 2001, **27**, 165–173.
- 17 A. Tfayli, O. Piot, A. Durlach, P. Bernard and M. Manfait, *Biochim. Biophys. Acta*, 2005, **1724**, 262–269.
- 18 C. Petitbois and G. Deleris, *Trends Biotechnol.*, 2006, **24**, 455–462.
- 19 C. Krafft, L. Shapoval, S. B. Sobottka, K. D. Geiger, G. Schackert and R. Salzer, *Biochim. Biophys. Acta*, 2006, **1758**, 883–891.
- 20 D. C. Fernandez, R. Bhargava, S. M. Hewitt and I. W. Levin, *Nat. Biotechnol.*, 2005, **23**, 469–474.
- 21 R. Bhargava, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2007, **389**, 1155–1169.
- 22 E. O. Faolain, M. B. Hunter, J. M. Byrne, P. Kelehan, H. A. Lambkin, H. J. Byrne and F. M. Lyng, *J. Histochem. Cytochem.*, 2005, **53**, 121–129.
- 23 J. Lee, E. Gazi, J. Dwyer, M. D. Brown, N. W. Clarke, J. M. Nicholson and P. Gardner, *Analyst*, 2007, **132**, 750–755.
- 24 H. Martens, J. P. Nielsen and S. B. Engelsen, *Anal. Chem.*, 2003, **75**, 394–404.
- 25 H. Martens and E. Stark, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1991, **9**, 625–635.
- 26 X. Y. Wang and J. M. Garibaldi, *Second International Conference in Computational Intelligence in Medicine and Healthcare – The Biopattern Conference*, held 29 June–1 July 2005, Costa da Caparica, Lisbon, Portugal.
- 27 D. Steinley, *Br. J. Math. Stat. Psychol.*, 2006, **59**, 1–34.
- 28 S. Valle, W. Li and S. J. Qin, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 1999, **38**, 4389–4401.

*Perspectives de l'article 1*

Le déparaffinage numérique des images IR développé ici permet de retirer artificiellement les zones de paraffine et de s'affranchir de sa variabilité dans les spectres enregistrés sur le tissu, mais sans éliminer le signal de la paraffine. Les méthodes basées sur la **séparation de sources** permettent quant à elles d'extraire des spectres de référence contenus dans un mélange. Ces méthodes ont été appliquées avec succès au sein de notre laboratoire pour le déparaffinage numérique de spectres Raman enregistrés sur une coupe de mélanome (Gobinet et al., 2009; Gobinet et al., 2007). Dans le cadre de la thèse de M. David Sebiskveradze (financement Institut National du Cancer, INCa), ces méthodes de séparation de sources ont été appliquées aux spectres IR. Elles reposent sur

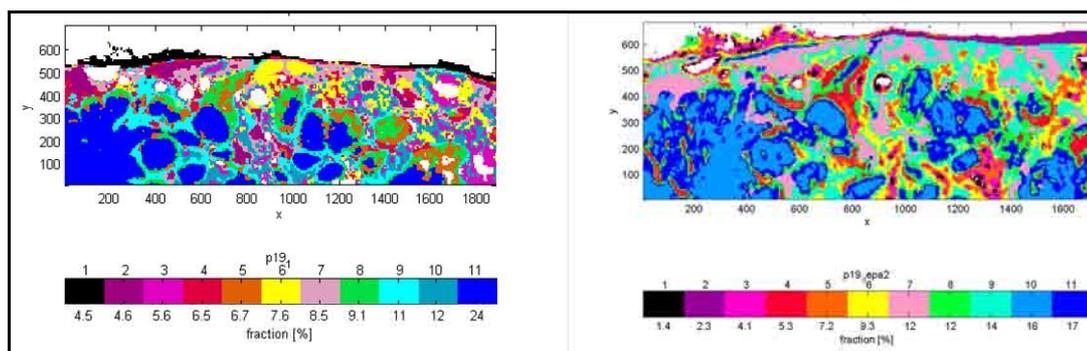
1/ l'analyse en composantes indépendantes (ACI) qui est une généralisation de l'ACP, pour extraire des spectres de référence de la paraffine

2/ la soustraction des spectres de référence à chaque spectre de l'image.

L'estimation de la contribution des spectres de référence repose sur les NCLS (Non-negatively Constrained Least Squares) qui permettent d'avoir des concentrations positives, ce qui est physiquement admissible.

Après déparaffinage numérique des spectres IR, une classification classique de type K-means a été appliquée et comparée à la classification obtenue par la méthode référencée dans l'article #1. Les premiers résultats obtenus par ICA suivie des NCLS n'ont pas été concluants jusqu'à présent (Sebiskveradze et al., 2008).

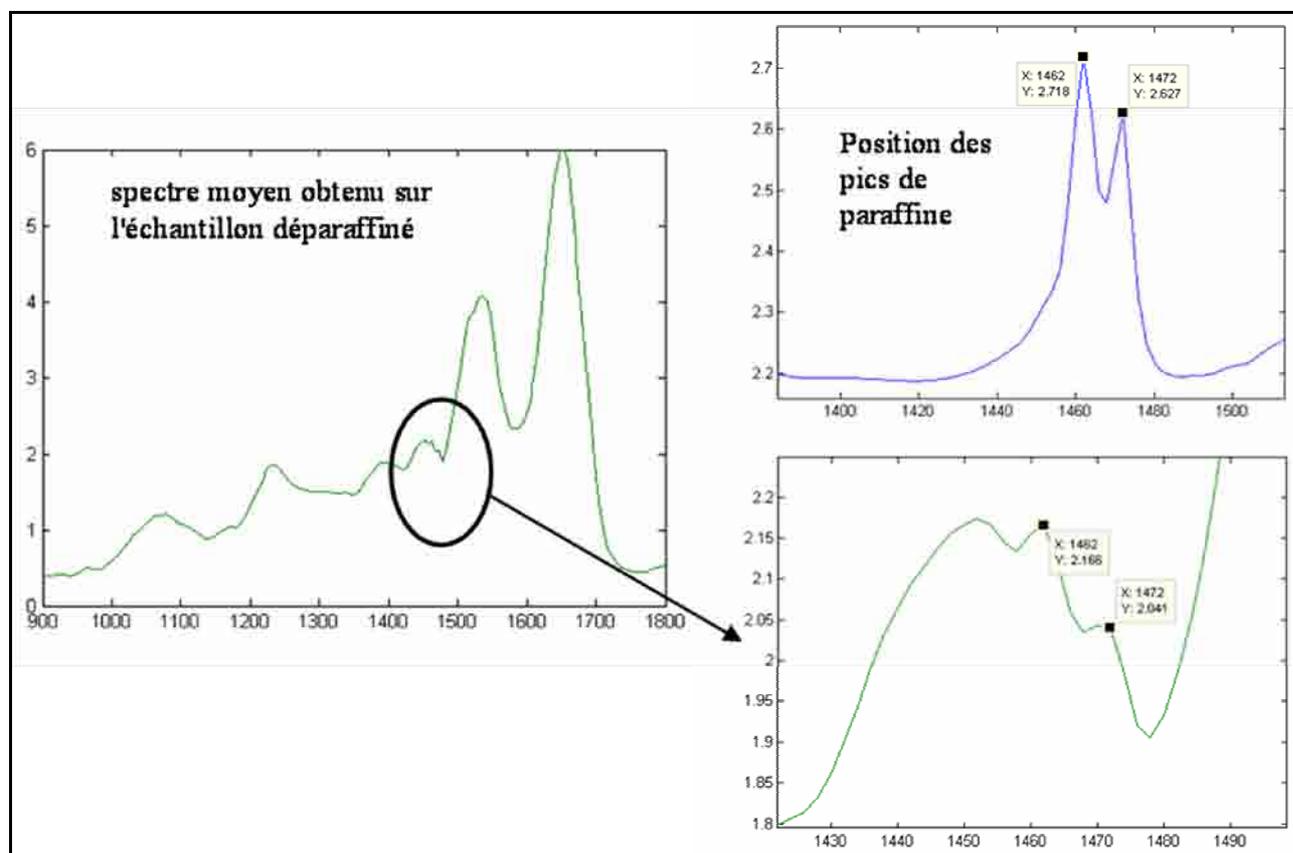
Par ailleurs, peu d'études sur les effets du déparaffinage chimique sont disponibles à l'heure actuelle. Il a été montré que le **déparaffinage chimique est rarement complet** et que quelques résidus de paraffine sont détectables par spectroscopie Raman (O Faolain et al., 2005a; O Faolain et al., 2005b; Short et al., 2006). Nous avons comparé l'effet des déparaffinages chimique et numérique par EMSC sur les résultats d'une classification par K-means pour une coupe de tumeur cutanée (Figure II.02).



**Figure II.02 : Effets du déparaffinage chimique sur un clustering K-means**

La figure de gauche a été obtenue par un clustering des spectres corrigés de la paraffine (cf méthode EMSC de l'article 1) cette image pseudo-couleurs a été validée par l'anatomo-pathologiste. L'image de droite représente le clustering obtenu sur la même zone d'acquisition mais après déparaffinage chimique de la coupe.

Dans les deux cas, les zones tumorales (en bleu) sont globalement les mêmes, bien que la morphologie soit un peu modifiée sur l'échantillon déparaffiné chimiquement. Il semble en effet que les marges de la tumeur ne soient pas aussi bien définies. Nous avons également calculé le spectre moyen de l'image spectrale enregistrée sur l'échantillon déparaffiné et nous avons pu mettre en évidence des **pics résiduels de la paraffine** (Figure II.03). Compte tenu de ces résultats, il est préférable de continuer l'analyse par EMSC des tissus non déparaffinés.

**Figure II.03 : Le déparaffinage chimique n'est pas complet**

Si on calcule le spectre moyen sur une coupe de peau déparaffinée chimiquement, alors ce spectre moyen comporte des pics résiduels de la paraffine. La paraffine n'a donc pas été complètement enlevée.

La classification en K-means est appelée une **classification dure** dans le sens où un spectre appartient ou n'appartient pas à un cluster donné, il n'est donc pas possible de nuancer le degré d'appartenance à un cluster. A l'opposé, il existe des **classifications floues** telles que les fuzzy C-

means. Cette méthode de classification permet d'attribuer à chaque spectre des "degrés d'appartenance" aux différents clusters. Si pour simplifier, on assimile ce degré d'appartenance à une probabilité d'appartenance, il est alors possible de mettre en évidence des spectres qui sont par exemple à 80% dans le cluster associé à l'épiderme sain mais aussi à 20% dans le cluster associé à la tumeur. Cette approche permet ainsi d'avoir accès à des informations complémentaires sur l'organisation tissulaire, notamment au niveau de l'interface entre deux clusters. Ces méthodes sont actuellement développées au sein du laboratoire dans le cadre de la thèse de David Sebiskveradze (financement INCa).

## **II.4 Article #2 : Differential diagnosis of cutaneous carcinomas by infrared micro-imaging combined with pattern recognition**

### *Contexte*

Le déparaffinage numérique d'une image spectrale infrarouge est désormais possible, et la combinaison avec une classification de type K-means permet de reconstruire des images pseudo-couleurs de contraste élevé. Cette analyse est purement "descriptive" dans le sens où elle permet de décrire et de mettre en évidence différentes structures au sein d'un tissu, en y associant une signature moléculaire/spectrale. L'identification des structures complexes passe par une étape cruciale de comparaison des images IR pseudo-couleurs avec les coupes histologiques colorées HE correspondantes; ceci requiert l'expertise d'un partenaire anatomo-pathologiste. L'analyse de la signature associée à un cluster permet également d'accéder à des informations sur la composition moléculaire de la structure correspondante. Cette analyse permet de construire une banque de marqueurs spectroscopiques spécifiques des différentes structures tissulaires normales, bénignes et/ou malignes.

### *Méthodes*

Environ vingt coupes de biopsies incluses en paraffine ont été analysées. Sur la base des correspondances cluster/structure histologique, un modèle de prédiction par analyse discriminante linéaire a été développé. Ceci a permis d'analyser en aveugle des échantillons dont l'examen histologique conventionnel et le diagnostic sont inconnus au moment de l'analyse. Différents prétraitements des données spectrales ont été testés afin d'optimiser la discrimination : dérivation, réduction de données par ACP, sélection de gammes spectrales par des tests statistiques (test non-paramétrique de Kruskal-Wallis) ou par des algorithmes génétiques.

### *Résultats*

L'optimisation des modèles de prédiction construits par LDA nous a permis d'opter pour un modèle à huit classes, permettant de décrire l'ensemble des structures histologiques que l'on peut rencontrer au niveau des carcinomes cutanés (épiderme sain, épiderme réactionnel, stratum corneum, stroma, stroma inflammatoire, carcinome basocellulaire, carcinome spinocellulaire, maladie de Bowen). Une fonction Matlab a été créée afin d'appliquer le modèle de prédiction directement sur une image spectrale. Un code-couleurs simplifié a été adopté, trois couleurs pour les trois types tumeur, une quatrième couleur pour le tissu normal et une dernière pour mettre en évidence les pixels/spectres qui n'ont pas été classés avec précision par l'algorithme (probabilité d'appartenance à la classe inférieure à 0.75).

### *Conclusion*

L'optimisation des prétraitements ainsi que la sélection des variables discriminantes (nombres d'onde) est une étape fastidieuse ; mais une fois les paramètres optimaux déterminés, l'analyse par LDA d'une image spectrale d'environ 35 000 spectres (soit une zone d'environ 1800x700  $\mu\text{m}^2$ ) dure moins de dix secondes. Avec les imageurs infrarouge de nouvelle génération ultra-rapides, il est maintenant tout-à-fait envisageable d'implémenter l'imagerie infrarouge au sein des laboratoires d'anatomo-pathologie.

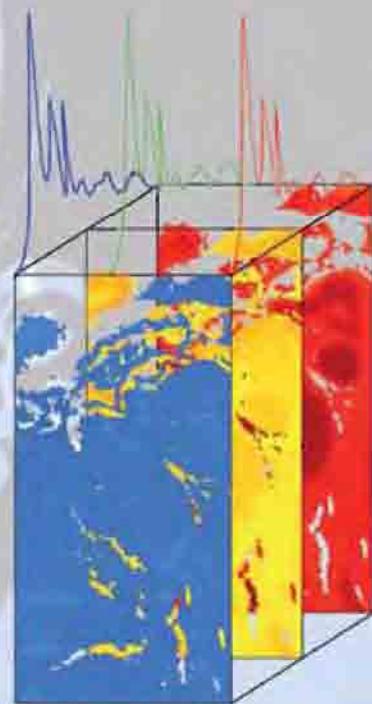
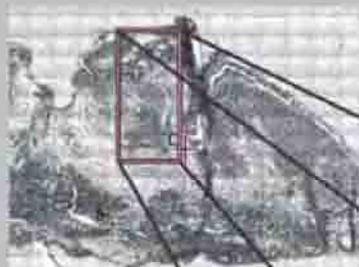
En ce qui concerne les modèles prédictifs développés lors de cette étude, un point important concernant l'apprentissage du modèle doit être amélioré. En effet, dans un premier temps, nous avons préféré de ne pas considérer les annexes cutanées, celles-ci présentant des structures assez complexes. Bien entendu, il est indispensable de les inclure pour obtenir un modèle amélioré, et plus en rapport avec la structure réelle des tissus. Les annexes cutanées sont des zones de forte prolifération cellulaire qui doit être distinguée de la prolifération tumorale.

# Analyst

Interdisciplinary detection science

[www.rsc.org/analyst](http://www.rsc.org/analyst)

Volume 134 | Number 6 | June 2009 | Pages 1013–1248



Themed Issue on Optical Diagnosis

ISSN 0003-2654

RSC Publishing

**CRITICAL REVIEW**

Nicholas Stone *et al.*  
Vibrational spectroscopy: a clinical tool for cancer diagnostics

**CRITICAL REVIEW**

Pavel Matousek and Nicholas Stone  
Emerging concepts in deep Raman spectroscopy of biological tissue

**PAPER**

Elodie Ly *et al.*  
Differential diagnosis of cutaneous carcinomas by infrared spectral micro-imaging combined with pattern recognition

# Differential diagnosis of cutaneous carcinomas by infrared spectral micro-imaging combined with pattern recognition†

Elodie Ly,<sup>a</sup> Olivier Piot,<sup>\*a</sup> Anne Durlach,<sup>b</sup> Philippe Bernard<sup>cd</sup> and Michel Manfait<sup>a</sup>

Received 24th November 2008, Accepted 5th February 2009

First published as an Advance Article on the web 24th February 2009

DOI: 10.1039/b820998g

Non-melanoma skin cancer includes basal cell carcinoma (BCC), squamous cell carcinoma (SCC) and Bowen's disease. The differential diagnosis of these lesions is sometimes difficult and relies on the histopathological examination of surgical specimens. However, a precise differential diagnosis is crucial for an accurate therapy and thus better patient care. FTIR spectral micro-imaging was applied directly on formalin-fixed paraffin-embedded samples of non-melanoma skin cancers. Chemometric and multivariate statistical analyses were developed to generate an automated IR-based histology without any chemical dewaxing. Different prediction models were developed using linear discriminant analysis combined with data reduction by Principal Component Analysis (PCA) or by wavenumber selection using statistical tests or genetic algorithms. Pseudo-colour maps were reconstructed and compared to conventional histology procedures. High correlation was obtained between the prediction maps and the histology which proves the great potential of FTIR spectroscopy for the differential diagnosis of skin carcinomas.

## Introduction

Skin cancer is now one of the most common types of cancer in the light-skinned population. Non-melanoma skin cancers (NMSCs) are the most frequent: more than one million cases occur annually in the United States.<sup>1</sup> They include basal cell carcinoma (BCC) and squamous cell carcinoma (SCC). BCC accounts for about 80% of these lesions: it mainly affects people over 55 years of age in sun-exposed body areas. Its origins are still unclear, and it may arise from interfollicular basal cells or keratinocytes in hair follicles or sebaceous glands.<sup>2–4</sup> While BCCs develop *de novo* (i.e. in the absence of a precursor lesion), skin SCC development is a multistep process. They mostly develop from precancerous lesions such as actinic keratosis or Bowen's disease (carcinoma *in situ*) and can, for example, produce metastases in the lung.<sup>5,6</sup> The histopathological characterisation of a biopsy remains the gold standard for the diagnosis of NMSC. It is based on the morphological interpretation of hematoxylin-and-eosin (H&E) stained sections of the biopsy. It relies on the expertise and the know-how of clinicians and pathologists, and can therefore lead to some discrepancies in the interpretation.<sup>7</sup> Since BCC and SCC

present different growth patterns with metastatic risks for SCC, a precise differential diagnosis is crucial for an accurate therapy and thus better patient care.

Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy has been successfully used to discriminate between tumours and healthy skin<sup>8,9</sup> and appears as a method of choice to tackle this issue. It probes structural and molecular information which is characteristic of the histopathological state of the tissue. Contrary to conventional histological H&E staining, spectral imaging can be performed directly on paraffin-embedded tissues without any staining, avoiding also possible alteration of the tissue induced by chemical dewaxing. Because formalin-fixed paraffin-embedded biopsies represent a considerable source of samples for retrospective studies, we have recently developed a chemometric processing of IR spectral data for the direct analysis of these samples by FTIR imaging.<sup>10</sup> In addition, the technique is computer-processed, making the interpretation of the data automated, objective and less prone to operator errors.

We report here a study carried out on a selected set of paraffin-embedded skin biopsies in order to assess the relevance of FTIR micro-imaging for the differential diagnosis of skin carcinomas. For this purpose, K-means clustering was applied on pre-processed images (numerical dewaxing) to highlight relevant histological structures. Different prediction models were subsequently built and tested using Linear Discriminant Analysis (LDA).

## Experimental

### Sample preparation

Nineteen samples of formalin-fixed paraffin-embedded BCC ( $n = 7$ ), SCC ( $n = 7$ ) and Bowen's disease ( $n = 5$ ) have been selected by a pathologist (A. D.) from archives for this study. Two samples of non-tumoral skin obtained from negative secondary revisions of melanomas were also included. All the

<sup>a</sup>Unité MéDIAN CNRS UMR 6237 MEDyC, Université Reims-Champagne Ardenne, Faculté de Pharmacie, 51 rue Cognacq-Jay, 51096 REIMS CEDEX, France. E-mail: olivier.piot@univ-reims.fr; Fax: +33 3 26913550; Tel: +33 3 26918128

<sup>b</sup>Laboratoire de Pathologie Pol Bouin, CHU Maison Blanche, 45 rue Cognacq-Jay, 51092 REIMS CEDEX, France

<sup>c</sup>Service de Dermatologie, CHU Robert Debré, Avenue du Général Koenig, 51092 REIMS CEDEX, France

<sup>d</sup>Laboratoire de Biochimie et de Dermatologie CNRS UMR 6237 MEDyC, Université Reims-Champagne Ardenne, Faculté de Médecine, 51 rue Cognacq-Jay, 51095 REIMS CEDEX, France

† This paper is part of an *Analyst* themed issue on Optical Diagnosis. The issue includes work which was presented at SPEC 2008 Shedding Light on Disease: Optical Diagnosis for the New Millennium, which was held in São José dos Campos, São Paulo, Brazil, October 25–29, 2008.

different samples were taken from different patients. Ten micron-thick sections were cut and mounted on a calcium fluoride (CaF<sub>2</sub>) window (Crystran Ltd., Dorset, UK) for spectral acquisition without further treatment. Sections were fixed with a drop of distilled water and the windows were subsequently placed onto a slide warmer until complete water evaporation for paraffin to melt and adhere to the window. Adjacent sections from the same blocks were H&E stained for histological diagnosis by the pathologist. For a better correspondence between the histological assessment and the spectral images, some samples were directly H&E stained on the CaF<sub>2</sub> window after spectral acquisition.

### FTIR data collection

Infrared transmission spectra were collected with the Spectrum Spotlight 300 Imaging System coupled to a Spectrum One FTIR spectrometer (both from Perkin Elmer Sciences, France) using the image mode. The device is equipped with a nitrogen-cooled mercury cadmium telluride 16-pixel-line detector for imaging and a computer-controlled stage. Prior to acquisition, a visible image of the sample was recorded and the area of interest was selected by comparison to the corresponding H&E stained section. Spectral images were collected at 16 accumulations with a resolution of 4 cm<sup>-1</sup> (2 cm<sup>-1</sup> data point interval). Each image pixel sampled a 6.25 μm × 6.25 μm area at the sample plane in order to record detailed tissular structures. A background spectrum was collected (240 accumulations, 4 cm<sup>-1</sup> resolution) on the CaF<sub>2</sub> window to ratio against the single beam spectra. The microscope was isolated in a venting Plexiglas housing to enable purging with dry air and to eliminate atmospheric interferences. Each spectral image consisted of about 10 000–40 000 spectra (depending on the size of the image), each containing 1641 values of absorbances, spanning the spectral range of 720–4000 cm<sup>-1</sup>.

### Data processing

Spectral images were corrected from the contribution of atmospheric water vapour and CO<sub>2</sub> absorption bands by a built-in function of the Perkin Elmer Spotlight software. All data processing was carried out directly on spectral images using programmes written in Matlab 7.2 (The Mathworks, Natick, MA) supplied with the PLS toolbox 2.0 (Eigenvector Research Inc., Manson, WA) and the Discrim toolbox (Michael Kieft, available at [www.mathworks.com](http://www.mathworks.com)).

### Removal of paraffin contribution

The paraffin-embedded samples have been analysed without any prior treatment. To correct for the contribution of paraffin in FTIR spectra, we have developed an automated processing method based on Extended Multiplicative Signal Correction.<sup>10</sup> For this correction, spectra were analysed in the fingerprint region (900–1800 cm<sup>-1</sup>), the number of principal components of paraffin was set to 9 and the order of the polynomial to 4. For each image, outlier spectra were determined by plotting the fit coefficient and the residue. For a more comprehensive description of these parameters, the reader should refer to our previous article.<sup>10</sup>

### K-means clustering

For each image, K-means clustering was used to regroup spectra that show similar spectral characteristics, hence similar molecular properties. This unsupervised method has already proved its potential for the processing of IR data of cancerous tissues.<sup>10,11</sup> K-means maps were calculated several times to make sure a stable solution was reached. The percentage of convergence was set to 99.9% and the number of clusters was set to 11; which appeared to match the histology of the cutaneous tissues analysed.<sup>10</sup> The cluster-membership information was then plotted as a pseudo-colour map by assigning a colour to each different cluster. Each pseudo-colour map was then provided to the collaborating pathologist to correlate the spectral maps and the corresponding H&E stained sections. It was then possible to build a spectral databank for each tissue type.

### Prediction model

An LDA-based model was constructed on a set of 17 different samples (15 from NMSC and 2 normal cases). The four remaining NMSC samples (chosen randomly) were retained for the external validation. LDA was chosen because it has been successfully applied on spectral data collected on various tissue types such as brain,<sup>12,13</sup> prostate,<sup>14,15</sup> lung,<sup>16</sup> lymph nodes<sup>17</sup> and skin.<sup>9</sup> LDA is a supervised modeling technique that aims at maximizing the between-class variance and minimizing the within-class variance.<sup>18</sup> About 300 000 spectra were retained in the library. They were then split into two groups: two-thirds in a training set and the last third in a validation set. The LDA model was constructed on the spectra from the training set and subsequently tested on the spectra from the validation set. Different strategies have been tested to construct the LDA model. First the classical 'LDA preceded by PCA (Principal Component Analysis)' method was applied on the training set.<sup>13,19–21</sup> PCA retains the maximum information about the variance in the dataset while reducing the number of variables.<sup>20</sup> The resulting scores were then used as inputs for LDA. Alternatively, first-order derivatives were directly used as inputs for LDA, either by using the whole fingerprint zone (900–1800 cm<sup>-1</sup>) or by reducing the wavenumber axis using either univariate (Kruskal–Wallis test; KW) or multivariate (genetic algorithm; GA) statistics.

### Reconstruction of LDA images

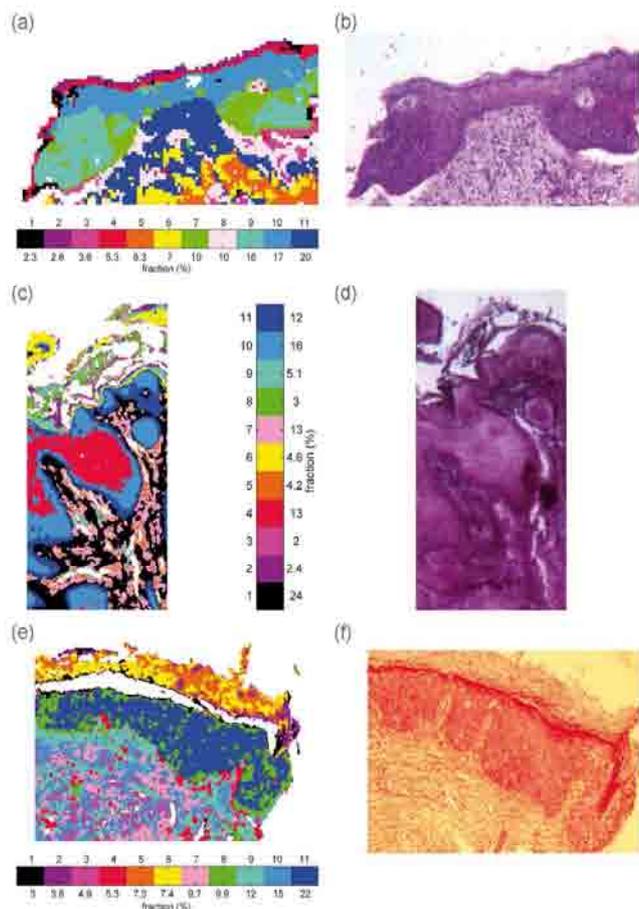
LDA maps can then be reconstructed by applying the LDA model to each spectrum-pixel of the images and by assigning a colour to each different class. For each spectrum, a probability of belonging to each class is calculated, and the class assignment is then based on the maximum probability. Because we were mainly interested in the localisation and the differential diagnosis of the tumours, a five-colour code was adopted. Three colours correspond to the three types of tumours (black: BCC; red: SCC; yellow: Bowen's disease). Green corresponds to non-tumour-bearing skin. When the maximum probability was below 0.75, the class assignment was considered ambiguous, and the pixel was then coloured in blue (class 5: unidentified spectra).

The different prediction models were then applied on totally independent samples (test set,  $n = 4$ ) analysed in a blind study.

## Results and discussion

### K-means maps

Fig. 1 shows K-means maps and their corresponding H&E stained sections obtained from the three different types of tumours. Fig. 1(a) and 1(b) correspond to a superficial BCC tumour (clusters 9 and 7) that is still attached to the epidermis



**Fig. 1** Paraffin-embedded tissue analysis using FTIR spectroscopy and K-means clustering. Panels (a)–(f): pseudo-colour images from BCC (a), SCC (c) and Bowen's disease (e) and their corresponding H&E stained sections (panels (b), (d) and (f) respectively).

(cluster 10). Fig. 1(c) and 1(d) display an SCC tumour (clusters 11, 10 and 4) and Fig. 1(e) and 1(f) a carcinoma *in situ* (Bowen's disease, clusters 11 and 8). Each image was processed independently, thus the colour-code is totally arbitrary and does not permit the direct comparison of the morphological structures associated with identical colours in different spectroscopic maps. White pixels represent outlier spectra that have been removed from the image and correspond to regions where there is no tissue but only paraffin. There is almost a one-to-one correlation between the IR K-means-clustered images and the histology, which proves the great potential of the technique for the direct analysis of paraffin-embedded biopsies by FTIR. However, no application to clinical diagnosis can be considered as K-means clustering does not permit differentiation between multiple pathologies and is more adapted to exploratory or descriptive investigations.<sup>14</sup>

### Pattern recognition techniques

A supervised pattern recognition algorithm was thus chosen for the differential diagnosis of skin carcinomas. For this purpose, an initial 4-class library was built (BCC, SCC, Bowen's disease, non-tumour-bearing skin) but the outcomes of the LDA were not satisfactory whatever the inputs for LDA (first-order derivatives or scores from PCA, on the whole fingerprint region or on the reduced wavenumber axis; data not shown). After discussion with the clinician and the pathologist, an 8-class model was retained (BCC, SCC, Bowen's disease, normal epidermis, reactional epidermis, stroma, inflammatory stromal reaction and stratum corneum). This model permitted to better distinguish the different skin structures that can be found in most biopsies.

### PCA-LDA

Prior to LDA, first-order derivatives were calculated and the whole dataset was modeled using the first eight principal components (describing more than 95% of the total variance) as suggested in the scree plot. Different derivative orders and numbers of principal components were tested (data not shown) and the results presented in this manuscript correspond to the optimal parameters. Table 1 is the confusion matrix from PCA-LDA performed on spectra from the validation set. Percentages situated in the matrix diagonal correspond to the sensitivity between the model prediction and the histological assignment performed by the pathologist. The average good

**Table 1** Confusion matrix from the PCA-LDA model<sup>a</sup>

Histology	Prediction model							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1	<b>68.2%</b>	0.3%	6.9%	11.1%	0%	3.1%	10.4%	0%
2	0.3%	<b>83.6%</b>	12.5%	0.5%	0.1%	0.3%	2.2%	0.5%
3	0%	0.1%	<b>65.4%</b>	12.8%	13.9%	0%	7.8%	0%
4	0%	2.6%	22.4%	<b>64.4%</b>	0%	9.4%	0.9%	0.3%
5	0%	0%	19.3%	0%	<b>79.7%</b>	0%	1%	0%
6	2.1%	3.6%	1.3%	4.0%	0%	<b>84.8%</b>	4.2%	0%
7	0%	0%	6.6%	0.2%	1.3%	13.7%	<b>77.3%</b>	0.9%
8	0%	0.2%	0.9%	25.4%	0%	0.1%	0.1%	<b>73.3%</b>

<sup>a</sup> 1: BCC; 2: SCC; 3: Bowen; 4: epidermis; 5: reactional epidermis; 6: stroma; 7: inflammatory stromal reaction; 8: stratum corneum.

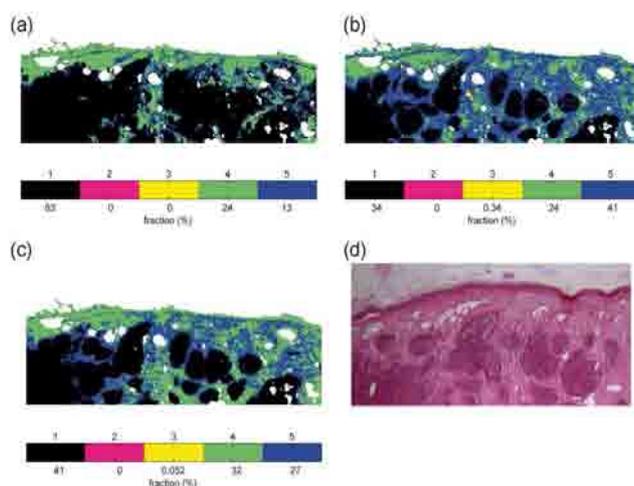
prediction rate is 74.6% (trace of the confusion matrix) on the spectra from the validation set which is not satisfactory enough for the in-routine use of this model for the differential diagnosis of skin carcinomas. It thus seems that data reduction by PCA is not recommended for the precise detection of these types of tumours. Although most of the variance in the dataset is described by the first eight principal components, the information retained is not precise enough for describing the spectral differences between the eight groups.

### LDA on first-order derivatives

Table 2 shows LDA results obtained on first-order derivatives without any previous data reduction. The results are much more convincing as this method results in an overall correct prediction rate of 91.4%. In addition, the prediction rate for NMSC (BCC and SCC) is still better (>95%) and very promising for Bowen's disease. Furthermore, there is no mixing between the three types of tumours, illustrating the high potential of the IR approach for the differential diagnosis of skin carcinomas. The slightly lower sensitivity for Bowen's disease could be explained by the fact that it is a precancerous state and likely to bear both normal/reactional and tumoral molecular information. Some pixels denoted as normal epidermis by the pathologist are actually false positives, they are particularly classified as Bowen's disease and SCC lesions. This discrepancy may come from pixels bordering the tumour. For this purpose, LDA maps have to be compared to H&E stained sections for a precise localisation of misidentified spectra. Fig. 2(a) and 2(d) show the LDA map obtained from a nodular BCC lesion using LDA on first-order derivatives and its corresponding H&E stained section. Although tumour characterisation is correct (BCC), numerous false positive pixels are present in the image. In fact, tumour lobes are not well defined in the pseudo-colour map. It thus seems that this method (LDA using first-order derivative spectra) leads to an unsatisfactory localisation of tumour areas.

### Improving the LDA performance

For improving LDA results, a reduction of the wavenumber axis to the most statistically discriminative wavenumbers was tested using either univariate or multivariate strategies.



**Fig. 2** LDA maps on a nodular BCC sample using (a) LDA on the whole wavenumber axis, (b) a KW test followed by LDA and (c) a GA followed by LDA. Panel (d) is the corresponding H&E stained section. Black: BCC; red: SCC; yellow: Bowen's disease; green: non-tumour; blue: unidentified spectra.

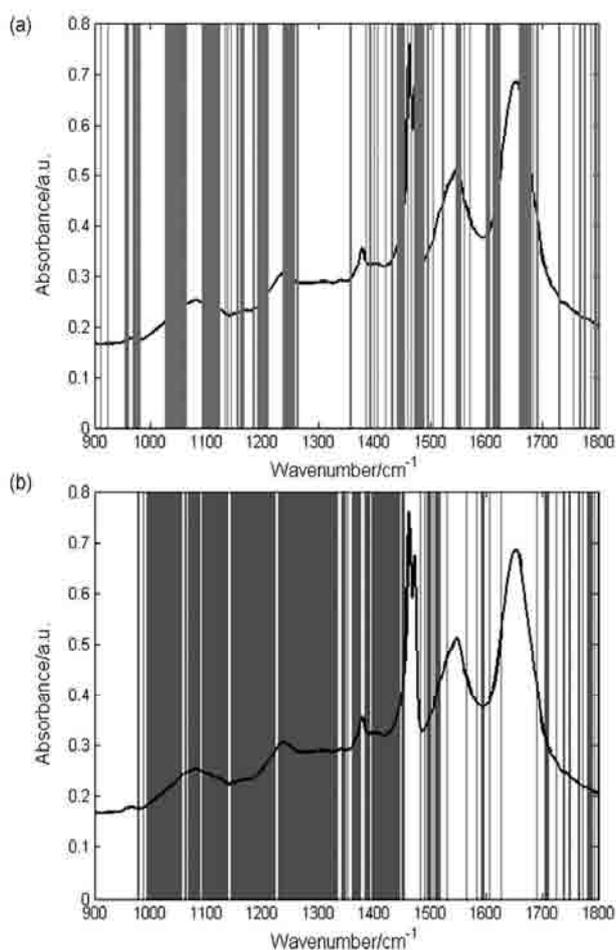
**Wavenumber selection by a Kruskal–Wallis test.** A Kruskal–Wallis (KW) test (Matlab Statistics Toolbox) was applied on spectroscopic data to assess the significance of the spectral differences between the three types of tumours and normal epidermis at each wavenumber. First-order derivative spectra were computed on the mean spectra of the four classes of tissue from the training set, and normalised (standard normal variate). The *p*-value was computed at each wavenumber; when it was below 0.05, the wavenumber was considered discriminatory and thus selected for LDA. The selection of these wavenumbers is depicted in Fig. 3(a). A total of 163 wavenumbers were selected from the initial 451 wavenumbers from the fingerprint region.

**Wavenumber selection by a genetic algorithm.** Genetic algorithms (GAs) are now becoming powerful tools for solving multivariate problems.<sup>9,21–25</sup> They are numerical search routines that mimic the concepts of evolution. In our study, a population of wavenumbers is randomly selected from the spectra of the training set and only those which are the best solutions of a so-called fitness function are kept to breed a new generation of wavenumbers. The aim of the fitness function was to maximize the between-groups variance to within-groups variance ratio, as

**Table 2** Confusion matrix from the LDA model built from first-order derivatives<sup>a</sup>

Histology	Prediction model							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1	<b>96.4%</b>	0%	0%	2.6%	0%	0.2%	0.8%	0%
2	0%	<b>96.1%</b>	0.1%	0.8%	0%	0.1%	2.7%	0.2%
3	0%	0%	<b>89.4%</b>	2.3%	7.3%	0%	1%	0%
4	1%	7.6%	8.3%	<b>74.5%</b>	0%	7.9%	0.4%	0.3%
5	0%	0%	0.7%	0%	<b>98.4%</b>	0%	0.2%	0.7%
6	1.9%	2.7%	0.2%	0.8%	0%	<b>93%</b>	1.4%	0%
7	0.1%	3.1%	6%	0.6%	0.6%	3.5%	<b>85.8%</b>	0.3%
8	0%	0.4%	0%	2.1%	0%	0.2%	0%	<b>97.3%</b>

<sup>a</sup> 1: BCC; 2: SCC; 3: Bowen; 4: epidermis; 5: reactional epidermis; 6: stroma; 7: inflammatory stromal reaction; 8: stratum corneum.



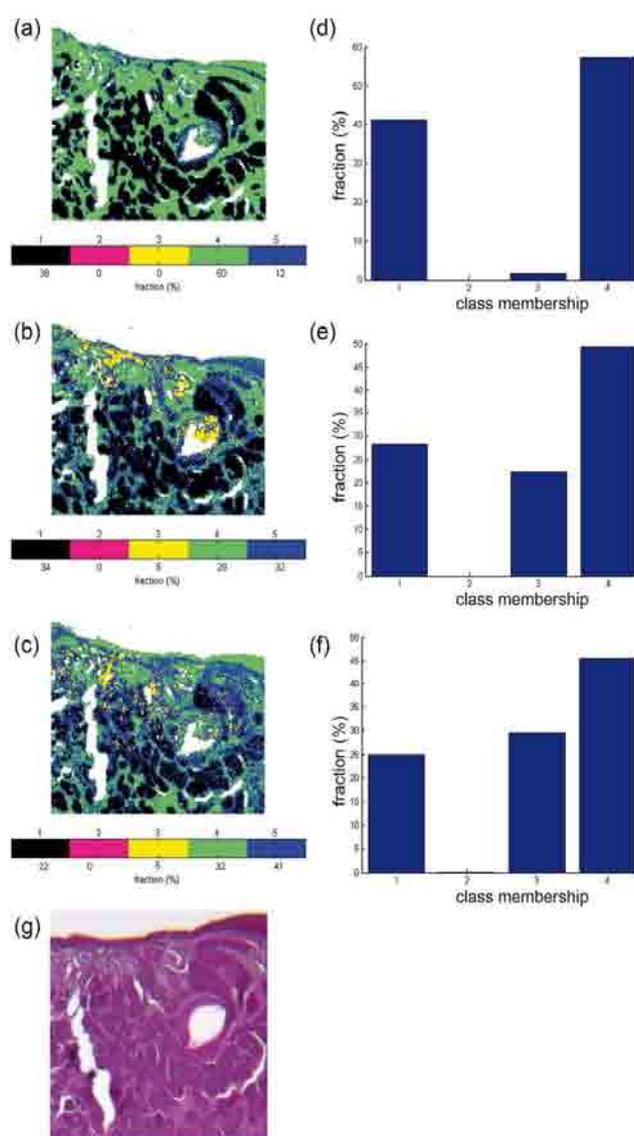
**Fig. 3** Wavenumber axis selected by (a) a Kruskal-Wallis test and (b) a genetic algorithm on first-order derivatives prior to LDA.

in canonical variate (CV) analysis, where the groups correspond to the eight classes of the LDA model. The algorithm which can be found elsewhere<sup>23</sup> included a cross-validation step using the spectra from the validation set to prevent over-fitting. The initial population consisted of 80 chromosomes (wavenumbers) and evolved over a period of 1000 generations so that a stable solution could be reached. The outputs of the algorithm were the canonical variate loads (linear combination of wavenumbers) that best separate the eight classes. Because GAs are lengthy processes, the procedure was applied on 10% of the spectra from the training and validation sets and the algorithm was run 100 times for stability reasons.<sup>21</sup> Briefly, the first two canonical variate loads (CV1 and CV2) were saved after each iteration of the algorithm, and for each their magnitude at each wavenumber was compared. The first 30 variables (wavenumbers) that correspond to the highest magnitudes were retained and sorted in ascending order because they are the most discriminant variables. This operation was repeated for CV1 and CV2, for the 100 iterations of the GA. Then, the occurrence of each wavenumber was normalised to the maximum occurrence and plotted. The wavenumbers with an occurrence above 5% were retained for LDA. The final axis used for LDA was the union of the discriminant wavenumbers found using CV1 and CV2 and is depicted in Fig. 3(b). A total of 254 wavenumbers were selected from the initial 451 wavenumbers from the fingerprint region. It is interesting to note that the KW and the GA methods lead to significant differences in wavenumber selection, particularly in the Amide I and II regions.

Fig. 2(b) and 2(c) display the LDA maps obtained on the same nodular BCC lesion as in the previous section using the most discriminant wavenumbers determined by the KW and the GA approaches, respectively. Tumour identification appears perfect again: there is no mixing with either SCC or Bowen's disease. In addition, the spatial repartitioning of the pixels attributed to tumour is much better – tumour lobes are well defined. Unidentified pixels (in blue) are more numerous in panels (b) and (c) than in panel (a). These blue pixels were erroneously attributed to tumour (BCC class) using the LDA model built on the whole wavenumber axis displayed in panel (a).

### Validation on a test set

Fig. 4 shows the LDA prediction for an independent sample from the test set using the different models tested. The



**Fig. 4** LDA maps on an independent sample from the test set (nodular BCC) using (a) LDA on the whole fingerprint axis, (b) a KW test followed by LDA, (c) a GA followed by LDA. Black: BCC; red: SCC; yellow: Bowen's disease; green: non-tumour; blue: unidentified spectra. Bar graphs (panels d, e and f) correspond to the distribution of the unidentified pixels (class 5) among the four classes from panels a, b and c, respectively. Panel g is the corresponding H&E stained section.

distribution of the blue pixels (unidentified spectra) among the four other classes (1: BCC; 2: SCC; 3: Bowen; 4: non-tumour) is compared in the bar graphs by plotting their class membership (maximum probability).

The diagnosis is accurate for the three models as the sample is identified as BCC (class 1, black pixels), which is in agreement with the corresponding H&E stained section. However, some discrepancies are noticeable between the H&E stained section and the pseudo-colour images from the KW- and GA-LDA models (panels b and c). Some spectra (5%) are wrongly classified as Bowen's disease (yellow) which underlines a lack of specificity. In addition, these models lead to a greater amount of unidentified spectra (blue pixels); and they are mostly similar to the spectra of Bowen's disease (see corresponding bar graphs, panels e and f). This result on an independent sample suggests that selecting the statistically discriminant wavenumbers by univariate or multivariate approaches could lead to a lack of specificity for the differential diagnosis of cutaneous carcinoma. Similar conclusions can be drawn from the other samples of the test set.

It seems that working on the whole fingerprint region brings valuable information for discriminating the different types of tumour but can sometimes lead to a bad definition of tumour margins (Fig. 2a).

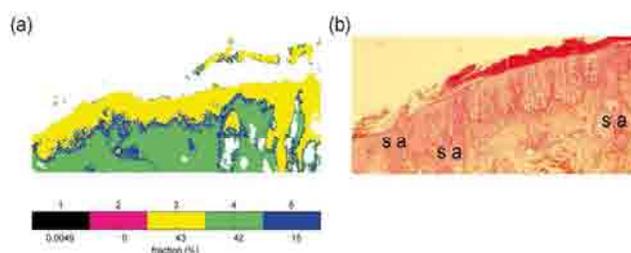
Genetic algorithms have been successfully used to discriminate between cutaneous lesions and normal skin,<sup>9</sup> but in our case, the GA approach has been tested to discriminate between different types of skin carcinomas and between different histological structures of the skin. The results on the test set could be improved by optimising the different input parameters used in genetic algorithms. However, GAs are very lengthy processes that require a lot of input parameters and should be monitored carefully to prevent over-fitting. For example, the computation time required to run the hundred iterations of the algorithm was 48 hours on the relatively small subset of our dataset (10% of the spectra).

Concerning the KW-LDA approach, these preliminary results on the test set suggest, as well as for GA-LDA, a lack of specificity as there is a mixing between BCC and Bowen's disease.

Improvements of the KW-LDA and GA-LDA models could involve the development of mathematical morphology analyses on the pseudo-colour maps to remove small areas that are not representative of any histological structures. In addition, more samples are required to determine whether these approaches are relevant for the differential diagnosis of skin carcinomas in clinics.

### The case of skin appendages

In the eight-class model constructed on the selected sample set, skin appendages such as sebaceous glands, eccrine glands or hair follicles were not taken into account. To assess the performance of the LDA model on a specimen containing skin appendages, a supplementary sample was studied. Fig. 5 displays the LDA map reconstructed on a Bowen's disease sample containing numerous skin appendages. LDA on first-order derivatives was used to build the map and is compared to the corresponding H&E stained section. Tumour identification is correct as the pixels related to the tumour are classified as Bowen's disease (yellow) and there is no mixing with either BCC or SCC.



**Fig. 5** (a) LDA map on a sample containing a lot of skin appendages (s a) and (b) corresponding H&E stained section. Black: BCC; red: SCC; yellow: Bowen's disease; green: non-tumour; blue: unidentified spectra.

However, numerous false positives are present. They correspond to the skin appendages (sebaceous glands, eccrine glands and hair follicles) that should be classified as non-tumour-bearing skin (class 4, green). In addition, the unidentified spectra (class 5, blue) correspond to the pixels bordering the tumour, which could suggest the presence of a transitional state.

The model was not trained to distinguish spectra that correspond to skin appendages and has classified them as tumour. Cell proliferation is high in skin appendages<sup>26</sup> but should be discriminated from tumour proliferation. Ongoing work within the laboratory is focused on the spectral characterisation of skin appendages in order to build a nine-class model permitting to distinguish skin appendages from other structures.

## Conclusions

This manuscript proves the great potential of infrared spectral micro-imaging for the differential diagnosis of cutaneous lesions from paraffin-embedded samples. Direct analysis can be performed without any solvent-based removal of paraffin and prediction algorithms can be developed for an automatic classification of spectral data. Optimisation of the algorithms can be performed by wavenumber selection using either univariate or multivariate approaches. However, it seems that working directly on the fingerprint region for the discriminant analysis brings the most reliable outcomes, and could benefit from the combination of mathematical morphology analyses. The integration of this method to conventional laboratory procedures is feasible and could provide additional molecular information to conventional stainings. Further investigation will focus on the validation of the models on a large test set analysed in a blind study for the clinical translation of the methodology.

## Acknowledgements

E. L. is a postgraduate fellow from CNRS and Région Champagne-Ardenne. The authors acknowledge Ligue contre le cancer, comité de l'Aisne and INSERM PNR Imagerie for financial support.

## References

- 1 T. L. Diepgen and V. Mahler, *Br J Dermatol*, 2002, **146**(Suppl. 61), 1–6.
- 2 A. N. Crowson, *Mod Pathol*, 2006, **19**(Suppl. 2), S127–147.
- 3 J. P. Lacour, *Br J Dermatol*, 2002, **146**(Suppl. 61), 17–19.
- 4 A. C. Markey, E. B. Lane, D. M. Macdonald and I. M. Leigh, *Br J Dermatol*, 1992, **126**, 154–160.

- 5 P. Boukamp, *Carcinogenesis*, 2005, **26**, 1657–1667.
- 6 M. H. Rinker, N. A. Fenske, L. A. Scalf and L. F. Glass, *Cancer Control*, 2001, **8**, 354–363.
- 7 L. B. Rorke, *Cancer*, 1997, **79**, 665–667.
- 8 P. T. Wong, S. M. Goldstein, R. C. Grekin, T. A. Godwin, C. Pivik and B. Rigas, *Cancer Res*, 1993, **53**, 762–765.
- 9 L. M. McIntosh, M. Jackson, H. H. Mantsch, M. F. Strane, D. Pilavdzic and A. N. Crowson, *J Invest Dermatol*, 1999, **112**, 951–956.
- 10 E. Ly, O. Piot, R. Wolthuis, A. Durlach, P. Bernard and M. Manfait, *Analyst*, 2008, **133**, 197–205.
- 11 P. Lasch, W. Haensch, D. Naumann and M. Diem, *Biochim Biophys Acta*, 2004, **1688**, 176–186.
- 12 C. Krafft, S. B. Sobottka, K. D. Geiger, G. Schackert and R. Salzer, *Anal Bioanal Chem*, 2007, **387**, 1669–1677.
- 13 S. Koljenovic, L. P. Choo-Smith, T. C. Bakker Schut, J. M. Kros, H. J. van den Berge and G. J. Puppels, *Lab Invest*, 2002, **82**, 1265–1277.
- 14 R. Bhargava, *Anal Bioanal Chem*, 2007, **389**, 1155–1169.
- 15 D. C. Fernandez, R. Bhargava, S. M. Hewitt and I. W. Levin, *Nat Biotechnol*, 2005, **23**, 469–474.
- 16 C. Krafft, D. Codrich, G. Pelizzo and V. Sergio, *Analyst*, 2008, **133**, 361–371.
- 17 B. Bird, M. Miljkovic, M. J. Romeo, J. Smith, N. Stone, M. W. George and M. Diem, *BMC Clin Pathol*, 2008, **8**, 8.
- 18 M. Khanmohammadi, M. A. Ansari, A. B. Garmarudi, G. Hassanzadeh and G. Garoosi, *Cancer Invest*, 2007, **25**, 397–404.
- 19 F. L. Martin, M. J. German, E. Wit, T. Fearn, N. Ragavan and H. M. Pollock, *J Comput Biol*, 2007, **14**, 1176–1184.
- 20 L. Wang and B. Mizaikoff, *Anal Bioanal Chem*, 2008, **391**, 1641–1654.
- 21 S. Dharmaraj, A. S. Jamaludin, H. M. Razak, R. Valliappan, N. A. Ahmad, G. L. Harn and Z. Ismail, *Vibrational Spectroscopy*, 2006, **41**, 68–72.
- 22 R. M. Jarvis and R. Goodacre, *Bioinformatics*, 2005, **21**, 860–868.
- 23 E. K. Kemsley, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 1998, **17**, 24–34.
- 24 B. K. Lavine, C. E. Davidson and A. J. Moores, *Vibrational Spectroscopy*, 2002, **28**, 83–95.
- 25 T. E. M. Nordling, J. Koljonen, J. Nyström, I. Bodén, B. Lindholm-Sethson, P. Geladi and J. T. Alander, Proceedings of EMBEC'05, Prague, Czech Republic, 2005.
- 26 E. Fuchs, *Nature*, 2007, **445**, 834–842.

*Remarques sur l'article #2*

La finalité de cette étude est d'évaluer le potentiel de la microspectroscopie vibrationnelle dans le diagnostic différentiel BCC/SCC/maladie de Bowen. Ces types de tumeurs, d'origine cellulaire commune, sont difficilement distinguables lors de l'examen clinique. Il est cependant crucial de pouvoir les différencier car, contrairement aux BCC, les SCC présentent des risques d'évolution en métastases ganglionnaires et à distance. Les SCC requièrent par conséquent un traitement et une surveillance spécifiques. Il aurait été aussi pertinent de s'intéresser aux lésions de **type kératose actinique** car près de 10% des kératoses actiniques peuvent se développer en SCC (Fuchs and Marmur, 2007). Cependant, peu de kératoses actiniques incluses en paraffine étaient disponibles lors de l'étude, car celles-ci sont principalement traitées par cryothérapie. Les lésions de type maladie de Bowen représentaient alors un bon compromis car ce sont des lésions de l'épiderme de même type que les SCC mais qui ne franchissent pas la lame basale.

De manière générale, les études spectroscopiques par LDA nécessitent une étape préliminaire de réduction de données par ACP. En effet, il convient d'avoir un nombre beaucoup plus élevé de spectres que de variables (Wang and Mizaikoff, 2008). Le nombre de composantes principales doit ensuite être estimé par des validations croisées. Dans notre étude, plus de 200 000 spectres ont été collectés, la réduction de données n'était donc pas nécessaire.

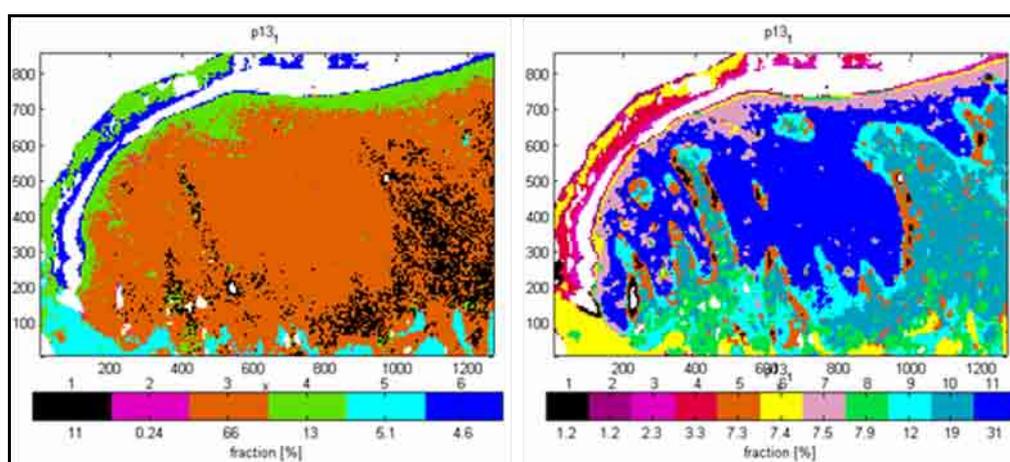
Le **choix du nombre de classes** est un facteur très important. Pour les premiers essais, nous ne nous sommes intéressés qu'à la discrimination épiderme/différents types de tumeur, la finalité du projet étant la mise au point d'un outil d'aide au diagnostic différentiel. Cependant, lors de l'analyse en aveugle d'une coupe, des structures telles que le derme ou la réaction inflammatoire étaient mal classées car elles n'étaient pas incluses dans le modèle. L'inconvénient de la LDA est que chaque objet est obligatoirement attribué à une, et il n'est pas possible de créer une classe de type "structure inconnue". Un modèle à 4 classes n'était donc pas la solution optimale dans notre cas. En concertation avec nos collaborateurs cliniciens, nous avons ajouté deux classes (stroma et stratum corneum) et avons reconstruit un modèle LDA à 6 classes (BCC, SCC, maladie de Bowen, épiderme sain, stroma, stratum corneum). La matrice de confusion sur les spectres de la validation interne alors obtenue est la suivante :

Prediction \ Anapath.	BCC	SCC	Bowen	Epiderme	Stroma	SC
BCC	94.77	0.20	0	3.85	1.13	0.0437
SCC	0.20	95.47	0.15	1.8	2.21	0.17
Bowen	0.14	0.023	96.81	3.03	0	0
Epiderme	8.23	5.42	13.55	66.82	5.77	0.21
Stroma	0.68	3.19	0.009	1.75	93.73	0.64
SC	0.76	0.45	0.0517	3.31	0.22	95.20

**Tableau 1 : Matrice de confusion pour un modèle à 6 classes**

La matrice de confusion compare l'attribution des classes données (en ligne) par l'anatomopathologiste et (en colonne) celles données par le modèle LDA. Les chiffres correspondent aux pourcentages de classification des spectres. Les valeurs sur la diagonale (en rouge) représentent les bonnes prédictions effectuées par le modèle.

L'analyse de ce tableau permet de valider le fort potentiel de la technique. En effet, les tumeurs sont bien caractérisées (plus de 94% de bonne prédiction) et il y a très peu de mélange entre les types de tumeurs. Par contre, on note la présence de nombreux **faux-positifs**, en particulier pour la maladie de Bowen : plus de 13% des spectres d'épiderme sont attribués par le modèle comme faisant partie de la classe maladie de Bowen. Une analyse complémentaire a permis d'isoler ces spectres d'épiderme mal classés et de voir qu'ils provenaient tous du même échantillon. Un second examen histologique approfondi a mis en évidence un **épiderme particulier de type réactionnel** (modification de l'épiderme due à la présence de la lésion). De plus, la reconstruction des images LDA permet de comparer les classifications LDA avec les classifications de type K-means, ces dernières ayant été validées par les cliniciens, par comparaison avec les coupes colorées (cf. Figure II.04).


**Figure II.04 : Comparaison d'une classification LDA (6 classes) et d'un clustering K-means**

La figure LDA (gauche) comporte 6 couleurs différentes, chacune représentant une classe définie (1 : BCC, 2 : SCC, 3 : Bowen, 4 : Epiderme sain, 5 : Stroma, 6 : SC). La figure K-means (droite) comporte autant de couleurs différentes que de clusters (ici 11). Elle met en évidence des structures

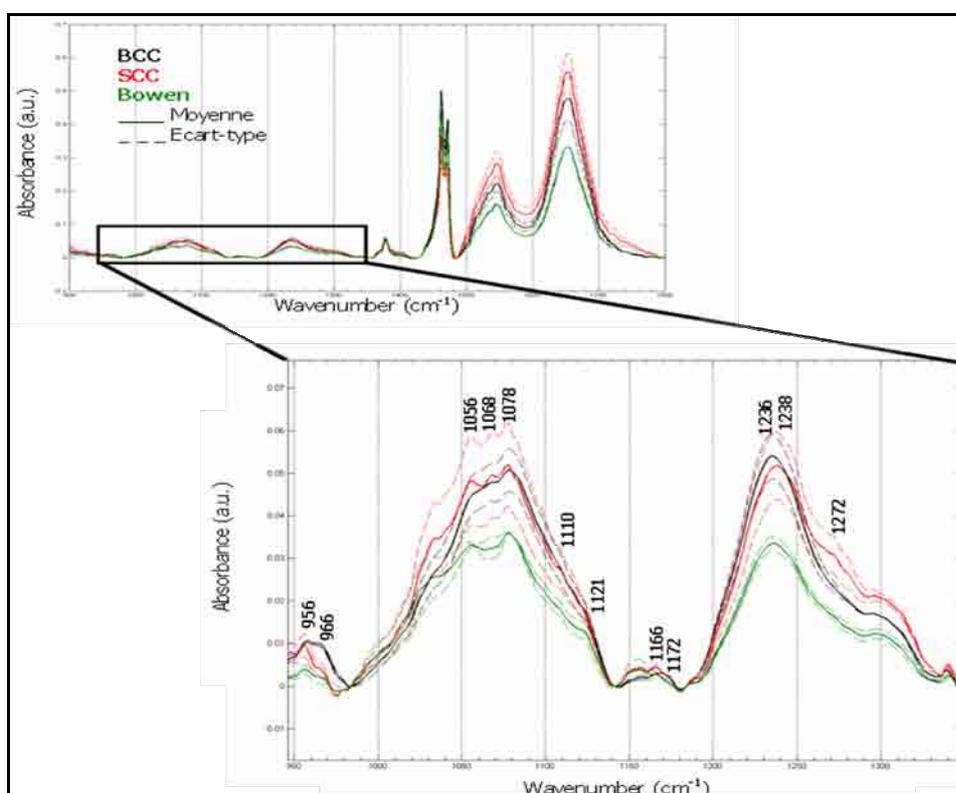
au sein de la coupe, la comparaison avec la coupe colorée nous a permis d'effectuer les attributions suivantes pour la coupe K-means :

- clusters 2-3-4-6 : SC
- cluster 7 : Epiderme sain
- cluster 11 : Tumeur : maladie de Bowen
- clusters 9-10-8-5 : Inflammation

D'après cette figure, l'inflammation (non prise en compte dans le modèle à 6 classes) apparaît comme appartenant à la classe de type BCC par le modèle à 6 classes, ce qui n'est évidemment pas acceptable pour une application clinique. Compte tenu des résultats obtenus, nous avons cherché à améliorer le modèle en ajoutant **deux classes supplémentaires** : épiderme réactionnel et stroma inflammatoire.

*Perspectives l'article #2*

Nous avons également comparé les signatures spectrales des trois types de lésion. Pour cela, les spectres moyens des trois classes correspondantes (à partir du "training set" du modèle) ainsi que les spectres "écart-type" ont été calculés. La Figure II.05 représente les spectres moyens +/- l'écart-type pour les trois types de tumeurs.



**Figure II.05 : Mise en évidence des différences spectrales entre les trois types de lésion**  
 La comparaison des spectres moyens (en gras) +/- l'écart-type (en pointillés) permet de mettre en évidence des différences spectrales significatives entre les spectres de BCC, SCC et maladie de Bowen.

Ces résultats mettent en évidence une variabilité plus importante pour les lésions de type carcinome spinocellulaire, ceci est sans doute lié aux différents stades de différenciation de la tumeur, qui n'existent pas chez les deux autres types de lésion. Les différences moléculaires mises en évidence correspondent principalement aux vibrations associées à l'ADN et à l'ARN et suggèrent des différences de structure et de concentration relative (en acides nucléiques ou en ADN et ARN) entre les trois types de tumeur.

Les perspectives de ce travail sont

- 1/ l'enrichissement de la banque de données en incluant les annexes cutanées
- 2/ la validation sur un plus grand nombre d'échantillons analysés en aveugle
- 3/ l'amélioration du modèle pour pouvoir discriminer les différents sous-types histologiques du carcinome basocellulaire (superficiel, nodulaire, infiltrant) pour une meilleure prise en charge. En effet, le taux de survie à 5 ans dépend du type histologique.

## **II.5 Article #3 : Histopathological characterization of primary cutaneous melanoma using infrared micro-imaging: a proof-of-concept study**

### *Contexte*

Le mélanome est le cancer de la peau le plus agressif, il représente 5% des cancers cutanés. La précocité du diagnostic est un paramètre clé dans l'évolution de la lésion, notamment vis-à-vis du risque métastatique. C'est dans ce cadre de développement de nouveaux outils biophotoniques d'aide au diagnostic précoce, que s'inscrivent nos travaux. Au regard des résultats très prometteurs obtenus sur les coupes de carcinomes cutanés, nous avons entrepris une analyse selon la même méthodologie sur des échantillons de mélanomes présentant des degrés d'agressivité différents. Plus précisément, nous nous sommes intéressés à exploiter l'hétérogénéité tissulaire (au sein de la tumeur et du stroma) mise en évidence par analyse statistique multivariée.

### *Méthodes*

Dix échantillons de mélanomes inclus en paraffine ont été sélectionnés par notre partenaire anatomo-pathologiste (Dr N. Cardot-Leccia, CHU de Nice). Les principaux sous-types histologiques ont été analysés : SSM (4 cas), nodulaire (3 cas), lentigineux-acral (1 cas), mélanome sur naevus (2 cas). Un échantillon de naevus bénin ainsi qu'un cas de métastase sous-cutanée ont également été inclus dans l'étude. Les images spectrales ont été enregistrées avec une résolution

spectrale de  $2\text{ cm}^{-1}$  et ont été traitées par analyse chimiométrique : déparaffinage numérique et clustering K-means (11 clusters).

### *Résultats*

Une très bonne concordance a pu être obtenue entre les images pseudo-couleurs K-means et les coupes colorées H&E adjacentes. Nous avons pu mettre en évidence

1/ des clusters associés à des structures très fines telles que les vaisseaux

2/ une hétérogénéité intra-tumorale reposant des différences spectrales au niveau des bandes IR de l'ADN et de l'ARN. Nous avons pu relier cette hétérogénéité à des différences de morphologie des cellules mélanocytaires (épithéliodes/fusiformes).

3/ une organisation tissulaire très particulière (réaction inflammatoire, tissu péri-tumoral) en présence de la tumeur. Ce résultat a été obtenu en combinant l'analyse cartographique de la distribution des clusters et l'analyse par HCA de l'hétérogénéité des signatures spectrales des différents clusters.

### *Conclusion*

Cette histologie spectrale permet de mettre en évidence de façon automatique et non supervisée l'hétérogénéité tissulaire qui est peu contrastée sur les coupes colorées H&E. L'analyse des dendrogrammes suggère une forte interaction entre les acteurs de la réaction inflammatoire (lymphocytes, vaisseaux, stroma péri-tumoral) et les cellules tumorales. La banque de spectres est en cours de construction et pourra être utilisée pour construire un algorithme de prédiction par LDA.

**Histopathological characterization of primary cutaneous melanoma using infrared micro-imaging: a proof-of-concept study**

**Article à soumettre à Histopathology**

Elodie Ly<sup>1</sup>, Nathalie Cardot-Leccia<sup>2</sup>, Jean-Paul Ortonne<sup>3</sup>, Maxime Benchetrit<sup>2</sup>, Jean-François Michiels<sup>2</sup>, Michel Manfait<sup>1</sup> and Olivier Piot<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Unité MéDIAN, CNRS UMR 6237 MEDyC, Université de Reims-Champagne Ardenne, IFR 53, 51 rue Cognacq-Jay, 51096 Reims Cedex, France

<sup>2</sup> Laboratoire central d'anatomie pathologique, Hôpital Pasteur, CHU de Nice, 30, avenue de la Voie-Romaine, 06000 Nice, France

<sup>3</sup> Service de Dermatologie, Hôpital de L'Archet 2, CHU de Nice, BP 3079, 06202 Nice Cedex 3, France

\* Corresponding author:

Email : olivier.piot@univ-reims.fr

Tel: +33 3 26918128

Fax: +33 3 26913550

**Keywords:** melanoma, Fourier Transform Infrared spectroscopy, cluster analysis

**Running title:** Infrared imaging of cutaneous melanoma

## **ABSTRACT**

**Aim:** The diagnosis of malignant melanoma is based upon the histological evaluation of the lesion. As such, the morphological interpretation relies on the expertise of a dermatopathologist. Infrared micro-imaging is emerging as a new powerful tool to investigate tissue biochemistry. Infrared spectra probe the biochemical constitution of the sample and are real tissue-specific spectroscopic fingerprints. The aim of this study was to assess the potential of infrared micro-imaging to aid in the analysis of tissue sections from primary cutaneous melanomas.

**Methods and results:** Ten samples of melanoma sections from the main histological subtypes were investigated using infrared micro-imaging combined with multivariate statistical analyses. This methodology yielded highly-contrasted colour-coded images that could highlight tissue architecture without any staining. It was possible to discriminate tumour areas from normal epidermis automatically, and intra-tumoral heterogeneity as revealed by this technique was correlated with the aggressiveness of the tumour.

**Conclusion:** This proof-of-concept study suggests that infrared micro-imaging could help in the diagnosis of primary cutaneous melanoma and provide with additional prognostic markers.

## INTRODUCTION

Malignant melanoma accounts for less than 5% of the reported skin cancers but it is the most aggressive form of skin cancer as its incidence and mortality are on the rise(ACS, 2007). The ABCDE mnemonic (Asymmetry, Border, Colour, Diameter, and Evolution) can aid in the clinical detection of melanoma, but its diagnosis is based upon the histological evaluation(Marghoob and Scope, 2009) of the lesion. As the morphological interpretation is somewhat subjective, especially for intraepidermal lesions, some discrepancies in the diagnosis have been reported and it relies consequently on the expertise of the dermatopathologist(Farmer et al., 1996; Glusac, 2003; Urso et al., 2005a; Urso et al., 2005b). Much efforts dedicated to the development of objective automatic image analysis softwares have been reported but as the structures in histological sections are usually complex, the results have not been conclusive yet(Gerger and Smolle, 2003).

Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy appears as a method of choice to tackle this limitation. Infrared (IR) spectra probe intrinsic molecular composition and interactions which are characteristic of the histopathological state of the tissue; they can be considered as real tissue-specific spectroscopic fingerprints. Considering the recent developments in the spectroscopic systems, tissue sections can be scanned in two dimensions to record spectral images. Contrary to conventional histological hematoxylin-and-eosin (HE) staining, spectral imaging can be performed directly on archival fixed and paraffin-embedded tissues without staining, avoiding also possible alterations of the tissue induced by chemical dewaxing(Ly et al., 2009; Ly et al., 2008; Tfayli et al., 2005; Wolthuis et al., 2008). As for skin lesions, some reports have shown that it is possible to diagnose melanoma from normal epidermis(Hammody et al., 2008; Mordechai et al., 2004) or to discriminate between melanoma and benign naevi(Tfayli et al., 2005) on the basis of the IR markers specific of the tissue type. To date, no spectral studies rely on the possibility to distinguish between the

different types of melanoma, neither to access prognostic markers relative to patient outcome. Yet, the main challenge now is to screen patients as early as possible as the prognosis of melanoma is closely associated with the disease stage at the time of diagnosis. Therefore, studies on various methods facilitating its diagnosis and its treatment are underway. In this retrospective study, our objective was twofold: first, to assess the potential of FTIR micro-imaging for characterizing various melanoma types, and second, to investigate whether IR spectral markers in primary melanoma could correlate with some dermatopathological parameters recognized as powerful prognostic factors. A selected set of paraffin-embedded thin sections of 10 melanomas representative of the different histological types was analyzed by FTIR micro-imaging. IR spectra were clustered using a K-means classification algorithm and highly contrasted colour-coded images generated for investigating tissue and tumour heterogeneities.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Patients**

Ten patients affected with one of the four subtypes of primary cutaneous melanoma, namely superficial spreading melanoma (4 cases), nodular melanoma (3 cases), acral-lentiginous melanoma (1 case) and melanoma on naevus (2 cases) were analyzed in this study. One sample of benign naevus and one of subcutaneous melanoma metastasis were also included. Of these patients examined, 5 were men and 5 women, aged 36 from 82 years (Table 1). Four cases corresponded to melanoma of thickness <1mm and in this category of depth no case presented ulceration; 5 cases had a thickness of 1-4 mm, including 2 cases with ulceration; and one case had a thickness >4 mm with ulceration.

### **Sample preparation**

Tissue specimens were fixed in 10% buffered formalin and paraffin-embedded. For each sample, three ten micron-thick serial sections were cut. The first and last sections were deposited on a glass slide for hematoxylin and eosin (HE) staining and histological diagnosis by the pathologist. The second section was mounted on a calcium fluoride (CaF<sub>2</sub>) window (Crystran Ltd., Dorset, UK) for spectral acquisition without further treatment. The section was fixed with a drop of distilled water and the CaF<sub>2</sub> window was subsequently placed onto a slide warmer until complete water evaporation for paraffin to melt and adhere to the window. A paraffin section was also included to be used as a reference for the infrared signal of paraffin.

### **Dermatopathological parameters**

Seven dermatopathological parameters were evaluated, corresponding to ulceration, Breslow thickness, Clark's level of invasion, mitoses, regression, cellular type, presence of naevus.

### **FTIR data collection**

Infrared transmission spectral images were collected with the Spectrum Spotlight 300 imaging system coupled to a Spectrum One FTIR spectrometer (both from Perkin Elmer, Courtaboeuf, France) using the image mode. The device is equipped with a nitrogen-cooled mercury cadmium telluride 16-pixel-line detector for imaging and a computer-controlled stage. Prior to acquisition, a visible image of the sample was recorded and the area of interest was selected by comparison to the corresponding HE stained sections. Spectral images were recorded at 8 accumulations with a resolution of 2 cm<sup>-1</sup> (1 cm<sup>-1</sup> data point interval). Each image pixel sampled a 6.25 μm x 6.25 μm area at the sample section, permitting the recording of detailed tissular structures. A background spectrum was collected (240 accumulations, 2 cm<sup>-1</sup> resolution) on the CaF<sub>2</sub> window to ratio against the single beam spectra. The microscope was isolated in a venting Plexiglas housing to enable purging with dry air and to eliminate atmospheric interferences. Each spectral image consisted in about 30 thousands of spectra, each containing 3282 values of absorbance, spanning the spectral range of 720-4000 cm<sup>-1</sup>.

### **Data processing**

Spectral images were corrected from the contribution of atmospheric water vapour and CO<sub>2</sub> absorption bands by a built-in function of the Perkin Elmer Spotlight software. All further data processing was carried out directly on spectral images using programs written in Matlab 7.2 (The Mathworks, Natick, MA) supplied with the PLS toolbox 2.0 (Eigenvector Research Inc., Manson, WA). Spectra were analyzed in the fingerprint region (900-1800 cm<sup>-1</sup>) which has been proved to be the most informative for the IR analysis of biological samples (Ly et al., 2009; Ly et al., 2008).

### **Removal of paraffin contribution**

The paraffin-embedded samples have been analyzed directly without any prior treatment. To correct for the contribution of paraffin in FTIR spectra, we have developed an automated processing method based on Extended Multiplicative Signal Correction (Ly et al., 2008). This method has been successfully applied on skin and colon cancer samples (Ly et al., 2009; Wolthuis et al., 2008). For this correction, the number of principal components of paraffin was set to 9 and the order of the polynomial to 4. For each image, outlier spectra were determined by plotting the fit coefficient and the residue. For a more comprehensive description of these parameters, the reader should refer to our previous article (Ly et al., 2008).

### **K-means clustering**

For each image, K-means clustering was used to regroup spectra that show similar spectral characteristics, hence similar biomolecular properties. This classification method has already proved its potential for the processing of IR data of cancerous tissues (Lasch et al., 2004; Ly et al., 2009; Ly et al., 2008; Wolthuis et al., 2008). It is considered as unsupervised except for the number of clusters determined by the operator. K-means maps were calculated several times to make sure a stable solution was reached. The percentage of convergence was set to 99.99% and the number of clusters was set to 11, which appeared to match the histology of

the cutaneous tissues analyzed in this manuscript and in previous studies(Ly et al., 2009; Ly et al., 2008). The cluster-membership information was then plotted as a colour-coded map by assigning a colour to each different cluster. Each colour-coded map was then provided to the collaborating pathologist for a microscopic comparison with the corresponding HE stained sections.

### **Unsupervised hierarchical clustering analysis (HCA)**

For each image, HCA was performed on the 11 cluster centres (average spectra of the 11 K-means clusters) in order to quantify the spectral distances between the K-means cluster centers(Ly et al., 2008). HCA regroups spectra into groups on a minimal distance criterion. The result of such a clustering is displayed in a tree-like diagram called a dendrogram. Neighbouring spectra are grouped into a same group. The distance between the groups formed gives an estimation of their spectral differences. K-means cluster centres that belong to the same group in the dendrogram describe therefore similar biomolecular composition. Euclidian distances and HCA clustering using Ward's algorithm were calculated using built-in Matlab functions from the Statistical toolbox.

### **Derivatization**

K-means cluster centres were normalized across the whole protein content (Amide I and Amide II vibrations) and second-order derivatives calculated using Savitsky-Golay smoothing (15 points, second order)(Savitzky and Golay, 1964) on normalized spectra.

## **RESULTS**

### **Histological structures as revealed by IR micro-imaging**

In each colour-coded image, pixels assigned to the same cluster represent an area of similar biochemical composition. Note that clustering was performed for each sample separately; no correspondence in the colours from one image to another exists. On the ten melanoma

samples analyzed, a one-to-one correlation from those highly-contrasted images to the adjacent corresponding HE section was possible. A precise assignment of the image clusters to the tissular structures visible on the HE stained sections was thus feasible. It was possible to recover very detailed histological structures such as blood vessels and lymphocytes. In all cases, tumour areas were very well delineated and demarcated from the epidermis. For example, Figure 1A depicts the colour-coded image obtained from a superficial spreading melanoma (case n°5) with a low Breslow thickness (0.35 mm). In this example, tumour cells (cluster 6, yellow) were located in the epidermal pegs but also in the invasive component. The stratum corneum (cluster 2, purple) and normal epidermis (cluster 7, pink) appear also very clearly. In addition, in each sample analyzed, IR spectra from the tumour and those from the epidermis were clearly bearing different biochemical profiles, as revealed by unsupervised HCA. In fact, this clustering analysis was performed on the cluster centres (average IR spectra of K-means clusters) of each pseudo-colour image to assess the spectral difference between the K-means clusters. The colour code of the dendrogram corresponds to the colour code used in the K-means image. The dendrogram obtained on the IR spectra from Figure 1A is shown in Figure 1C. It shows that cluster 7 is quite different (in terms of spectral distance) to cluster 6.

### **Correlation between IR clusters and dermatopathological parameters**

A significant association was observed between the presence of different tumour clusters and some dermatopathological parameters, in particular ulceration, Breslow thickness, Clark's level and number of mitoses per mm<sup>2</sup>. Interestingly, only one tumour cluster was observed for good prognosis melanomas (3 cases) whereas 2 or 3 different tumour clusters were simultaneously present for bad prognosis melanoma (7 cases). No difference in the number of cluster was found between tumours with and without an adjacent naevus. Figure 2A corresponds to the colour-coded K-means image obtained from an ulcerated nodular

melanoma (case n°1). In this sample, three clusters (9-10-11) were assigned to tumoral melanocytes. The HCA (Fig. 2C) confirms that these three clusters carried similar biomolecular profiles. Figure 3A shows the spectral analysis performed on a section from an invasive melanoma developed on a pre-existing nevus (case n°3). Tumour cells, assigned here to two clusters (10 and 11), were well demarcated from the basal layer (cluster 5) and the mucosal layer (cluster 6) of the epidermis. Some residues of the adjacent benign naevus (cluster 8) remained in close contact to the tumour. This phenomenon was also observed in the dendrogram (Fig. 3C).

A closer examination of the HE stained sections at a higher magnification permitted to associate each different tumour cluster to a specific morphological characteristic of the tumour cells. In the ulcerated nodular melanoma (case n°7, Fig. 2A), cluster 9 corresponded to the superficial region of the tumour, composed of epithelioid tumour cells, a high number of mitoses per mm<sup>2</sup> and a high heterogeneity in cell morphology. Cluster 11 was composed of spindle-shaped melanocytic cells, cellular density was higher and anisokaryosis less significant than in the neighbouring cluster 9. As the tumour infiltrated the surrounding stroma, tumour cells (cluster 10) seemed to cluster into small groups and lost their spindle shape, in addition, the number of mitoses per mm<sup>2</sup> decreased. Similar correlations between the different tumour clusters and cellular morphology were found for the other samples analyzed in this study.

In order to investigate the molecular differences between the epithelioid and spindle morphologies, we compared their corresponding spectral signatures. For this purpose, the cluster centres associated to these cell morphologies were extracted from each K-means image. The resulting mean and standard deviation spectra were plotted to assess the significance of the differences observed (Fig. 4). Second-order derivatives were computed in order to enhance spectral differences. Table 2 lists the IR bands where major differences were

observed, together with tentative band assignments (Baker et al., 2008; Martin et al., 2007; Meade et al., 2007; Wong et al., 1993). Main spectral differences were attributed to DNA and RNA vibrations. Some modifications of protein content and protein conformation were also revealed (Amide III vibrations) (Baker et al., 2008; Meade et al., 2007). Taken together these results, it seemed that the biomolecular differences between the two types of melanoma cells corresponded mainly to DNA and RNA. These differences between the distinctive tumoral structures as identified by IR micro-imaging could reflect modifications of relative concentration of DNA and RNA and/or differences of degrees of phosphorylation.

### **Tissue organization as revealed by spectral analysis**

The analysis of dendrograms obtained by unsupervised HCA analysis highlighted tissue organization based on its biochemical constitution. Tissular structures which spectral clusters are close in the dendrogram may not be necessarily in close contact but do reflect similar biomolecular information. For example, blood vessels, lymphocytes and erythrocytes dispersed within a tissue section were generally grouped in the same HCA cluster and all play crucial roles in the inflammatory reaction process. Spectra as defined by the pathologist as corresponding to peritumoral stroma or intratumoral stroma were closely associated to those of the tumour, as shown in Figure 1. In this example, the dense stroma in the peritumoral dermis (clusters 9-10) and lymphocytes (cluster 11) were grouped in the same HCA cluster as the tumour cells (cluster 6). In addition, blood vessels (clusters 5-4) and melanophages (cluster 8) were also clustered in the same group. In only one case, the tumour cluster was spectrally closed to the one of the mucosal layer of the epidermis. These spectra corresponded to a tumoral area located in the intra-epidermal region of case n°7.

## **DISCUSSION**

To date, the gold standard for the diagnosis of primary cutaneous melanoma is based on the histopathological diagnosis. The ability of a clinician to make a correct diagnosis is critical since patient life may depend on how early melanoma is diagnosed. Many attempts have been made to develop imaging techniques as reliable methods to allow differentiating between clinical suspected tumours. Thus, the identification of specific IR spectroscopic markers for the early diagnosis of lesions of poor prognosis would help optimize the therapeutic strategy.

The purpose of this proof-of-concept study was to demonstrate the potential of FTIR imaging for providing additional prognostic values to patients with primary cutaneous melanoma. The combination of FTIR imaging and multivariate statistical analyses has been previously used on other tissue types to reproduce histology(Lasch et al., 2004; Ly et al., 2008; Wolthuis et al., 2008). As a precise association between IR spectra and tissue structures can be performed, it is possible to build a spectral library and to identify spectral markers of each tissue type. Consequently, automatic predictive diagnostic algorithms using pattern recognition techniques such as linear discriminant analysis(Krafft et al., 2007; Ly et al., 2009) and artificial neural networks(Lasch et al., 2006) can be developed for an objective diagnosis of tissue samples. This methodology has been recently proved to be very efficient by our group for the differential diagnosis and characterization of skin carcinomas (basal cell carcinoma, squamous cell carcinoma and Bowen's disease)(Ly et al., 2009). To the best of our knowledge, this is the first report on the FTIR imaging analysis of a collective series of primary cutaneous melanoma including different histological subtypes.

Among the primary cutaneous melanoma included in our study sample, one had a Clark level I (10%), two were level II (20%), one was level III (10%) and six were level IV (60%). As reported previously, FTIR imaging was able to identify spectroscopic markers of melanoma cells compared to normal epidermis (Hammody et al., 2008; Mordechai et al., 2004; Tfayli et al., 2005). The highly contrasted colour-coded images generated in our study clearly separate

melanoma cells from epidermis and benign adjacent naevus. In addition, an interesting finding from our survey was that the different tumour clusters revealed by FTIR imaging were associated with differences in cell morphology. On histological examination, this heterogeneity appeared very marked in nodular melanoma or in melanoma associated with a high level of invasion. In these cases, melanoma cells were packed and presented an epithelioid or spindle form. Melanoma cells can present different phenotypes, and the presence of different tumour cell morphologies in the same biopsy has been correlated to the metastatic risk(Okcu et al., 1996). Likewise, in the biopsies analyzed in this study, tumour heterogeneity was only detected in poor prognosis melanomas. As such, the combination of IR imaging and pattern recognition techniques might be an innovative, label-free, rapid and automatic technology to screen high-risk metastatic melanoma patients.

Interestingly, in these same cases, the clusters obtained by FTIR imaging were associated with dominant dermatopathological parameters of poor prognosis, such as melanoma thickness, ulceration, level of invasion and mitotic rate. We found no difference between tumours with and without an adjacent naevus. It is necessary to admit that solely 10 cases were observed in this study, which may not be very representative of conventional primary melanoma. For such reasons, further investigation will focus on the validation of this methodology on a larger sample set, including distant metastases, and on the development of prediction algorithms based on linear discriminant analysis. These prediction algorithms will permit to identify tumoral zones automatically, based on the spectral data bank gathered from the analysis of a large number of samples.

Moreover, the interactions between melanoma tumours and their surrounding stromas have been widely studied as they may also reflect the invasive potential of the tumour cells(Labrousse et al., 2004; Smolle et al., 1995). The cluster images provide with highly contrasted colour images that make it possible to identify easily different types of stromal

reactions. Indeed, the peritumoral stroma and the intratumoral stroma could be clearly distinguished from the normal stromal reaction. HCA revealed that these peritumoral and intratumoral stromal reactions carry similar IR bio-profiles related to those of melanoma cells. This analysis confirms the hypothesis that strong interactions exist between the tumour cells and their matrix environment. Remodelling of the stroma at the neighbourhood of the tumour is related to first, a high aggregation of inflammatory cells (e.g. lymphocytes, fibroblasts and macrophages), and second, to changes in vascular structures. In fact, in melanoma, blood vessels predominantly surround a closely packed neoplastic proliferation, whereas in normal dermis, the vascular network is widely distributed.

## **CONCLUSION**

In conclusion, owing to the small number of cases in our series, our results should be interpreted with caution. However, FTIR imaging has promising applications in the diagnosis of primary cutaneous melanoma. Direct analysis of paraffin-embedded sections can be performed without any solvent-based removal of paraffin, and multivariate statistical analyses provide with highly contrasted colour-coded images that can reproduce tissue histology automatically. Good correlation between IR spectral clusters and dermatopathological parameters was feasible, suggesting that this rapid and automated procedure could help in improving and optimizing the diagnosis of primary cutaneous melanoma, and also provide with additional prognostic markers. The integration of this method to conventional laboratory procedures is feasible and could help in the guidance of the surgical procedure. As infrared imaging systems are becoming more and more efficient, it is now possible to record a spectral image from a large tissue sample within a matter of minutes, making it possible to pose a diagnosis in less than hour after biopsy.

## REFERENCES

1. ACS. *Cancer Facts and Figures 2007*. Atlanta: American Cancer Society, 2007.
2. Marghoob AA, Scope A. The complexity of diagnosing melanoma. *J Invest Dermatol* 2009;**129**;11-13.
3. Urso C, Rongioletti F, Innocenzi D *et al*. Histological features used in the diagnosis of melanoma are frequently found in benign melanocytic naevi. *J Clin Pathol* 2005;**58**;409-412.
4. Urso C, Rongioletti F, Innocenzi D *et al*. Interobserver reproducibility of histological features in cutaneous malignant melanoma. *J Clin Pathol* 2005;**58**;1194-1198.
5. Farmer ER, Gonin R, Hanna MP. Discordance in the histopathologic diagnosis of melanoma and melanocytic nevi between expert pathologists. *Hum Pathol* 1996;**27**;528-531.
6. Glusac EJ. Under the microscope: doctors, lawyers, and melanocytic neoplasms. *J Cutan Pathol* 2003;**30**;287-293.
7. Gerger A, Smolle J. Diagnostic imaging of melanocytic skin tumors. *J Cutan Pathol* 2003;**30**;247-252.
8. 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.
9. Ly E, Piot O, Wolthuis R, Durlach A, Bernard P, Manfait M. Combination of FTIR spectral imaging and chemometrics for tumour detection from paraffin-embedded biopsies. *Analyst* 2008;**133**;197-205.
10. Wolthuis R, Travo A, Nicolet C *et al*. IR spectral imaging for histopathological characterization of xenografted human colon carcinomas. *Anal Chem* 2008;**80**;8461-8469.
11. Ly E, Piot O, Durlach A, Bernard P, Manfait M. Differential diagnosis of cutaneous carcinomas by infrared spectral micro-imaging combined with pattern recognition. *Analyst* 2009;**DOI: 10.1039/B820998G**.
12. Mordechai S, Sahu RK, Hammody Z *et al*. Possible common biomarkers from FTIR microspectroscopy of cervical cancer and melanoma. *J Microsc* 2004;**215**;86-91.
13. Hammody Z, Argov S, Sahu RK, Cagnano E, Moreh R, Mordechai S. Distinction of malignant melanoma and epidermis using IR micro-spectroscopy and statistical methods. *Analyst* 2008;**133**;372-378.
14. 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.
15. Savitzky A, Golay MJE. Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures. *Analytical Chemistry* 1964;**36**;1627-1639.
16. Baker MJ, Gazi E, Brown MD, Shanks JH, Gardner P, Clarke NW. FTIR-based spectroscopic analysis in the identification of clinically aggressive prostate cancer. *Br J Cancer* 2008;**99**;1859-1866.
17. Martin FL, German MJ, Wit E, Fearn T, Ragavan N, Pollock HM. Identifying variables responsible for clustering in discriminant analysis of data from infrared microspectroscopy of a biological sample. *J Comput Biol* 2007;**14**;1176-1184.
18. Meade AD, Lyng FM, Knief P, Byrne HJ. Growth substrate induced functional changes elucidated by FTIR and Raman spectroscopy in in-vitro cultured human keratinocytes. *Anal Bioanal Chem* 2007;**387**;1717-1728.
19. Wong PT, Goldstein SM, Grekin RC, Godwin TA, Pivik C, Rigas B. Distinct infrared spectroscopic patterns of human basal cell carcinoma of the skin. *Cancer Res* 1993;**53**;762-765.

20. Krafft C, Sobottka SB, Geiger KD, Schackert G, Salzer R. Classification of malignant gliomas by infrared spectroscopic imaging and linear discriminant analysis. *Anal Bioanal Chem* 2007;**387**;1669-1677.
21. Lasch P, Diem M, Hänsch W, Naumann D. Artificial neural networks as supervised techniques for FT-IR microspectroscopic imaging. *J Chemometrics* 2006;**20**;209-220.
22. Okcu A, Hofmann-Wellenhof R, Woltsche I, Smolle J, Kerl H. Pathological findings suggestive of interclonal stabilization in a case of cutaneous melanoma. *Clin Exp Metastasis* 1996;**14**;215-218.
23. Smolle J, Woltsche I, Hofmann-Wellenhof R, Haas J, Kerl H. Pathology of tumor-stroma interaction in melanoma metastatic to the skin. *Human Pathology* 1995;**26**;856-861.
24. Labrousse AL, Ntayi C, Hornebeck W, Bernard P. Stromal reaction in cutaneous melanoma. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004;**49**;269-275.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

E.L is a post-graduate fellow from CNRS and région Champagne-Ardenne. The authors acknowledge Ligue contre le Cancer, comité de l'Aisne and INSERM PNR Imagerie for financial support.

Table1: Histological and clinical information on primary cutaneous melanoma patients

N°	Sex	Age	Tumor site	Histological type	ulceration	Clark's level	Breslow thickness (mm)	Cellular type	Mitoses /mm <sup>2</sup>
1	M	82	Shoulder	NM	yes	4	2	Epit Spin	> 20
2	M	55	Back	SSM	yes	4	2	Epit	2
3	F	47	Leg	M on naevus	no	4	1.45	Epit	7
4	F	36	Scapula	SSM	no	2	0.48	Epit	0
5	M	41	Back	M on naevus	no	2	0.35	Epit	0
6	M	61	Scalp	SSM	no	1	0	Epit	0
7	F	65	Arm	SSM	no	3	0.76	Epit	1
8	F	44	Ear	NM	no	4	1.45	Epit	2
9	M	61	Back	NM	yes	4	7.5	Epit Spin	6
10	F	39	Foot	ALM	no	4	1.92	Epit	4
11				BN		/	/		
12	F	74		Metastasis	no	/	/	Epit	2

Patient Sex: M= male, F = female

NM = nodular melanoma, SSM = superficial spreading melanoma, ALM = acral-lentiginous melanoma

Epit: epithelioid cells, Spin: spindle cells

Table 2: Main spectral differences observed between spindle and epithelioid melanoma cells

<b>Band position (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Assignment</b>
937	
963	PO <sub>4</sub> <sup>-</sup> symmetric stretching
	Deoxyribose phosphate Skeletal motions
988	RNA stretching, ring bending of uracil
993	RNA stretching, ring bending of uracil
1052	C-O stretching in deoxyribose, ribose, DNA and RNA
1056	C-O stretching and bending of C-OH groups of carbohydrates
1101	
1112	Phosphate groups in DNA and RNA
1162	Phosphate groups in DNA and RNA
1191	Amide III vibrations (proteins)
1252	Amide III vibrations (proteins)
1264	Amide III vibrations (proteins)

## LIST OF FIGURES

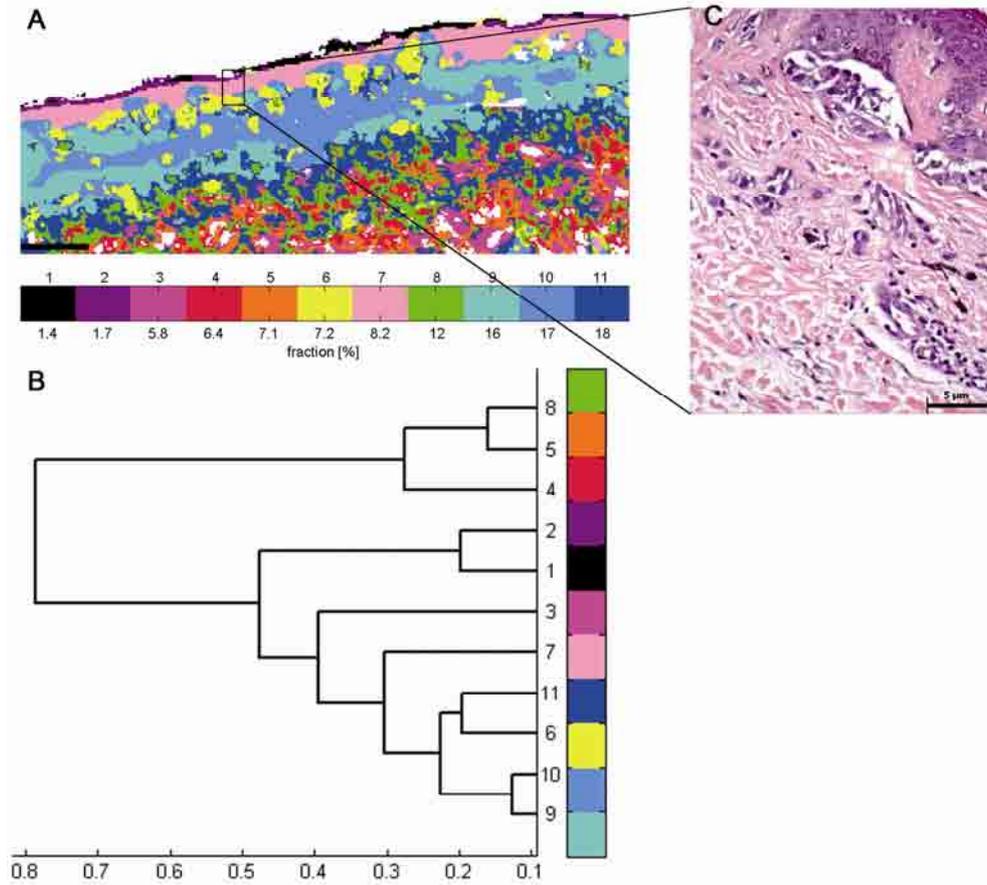


Figure 1: Spectral histology obtained from a superficial spreading melanoma (case n°5). A, K-means color-coded image built with 11 clusters, scale bar: 200 μm. B, Dendrogram obtained using HCA on the K-means cluster centers. C, HE stained image of the framed area in panel A, scale bar: 50μm.

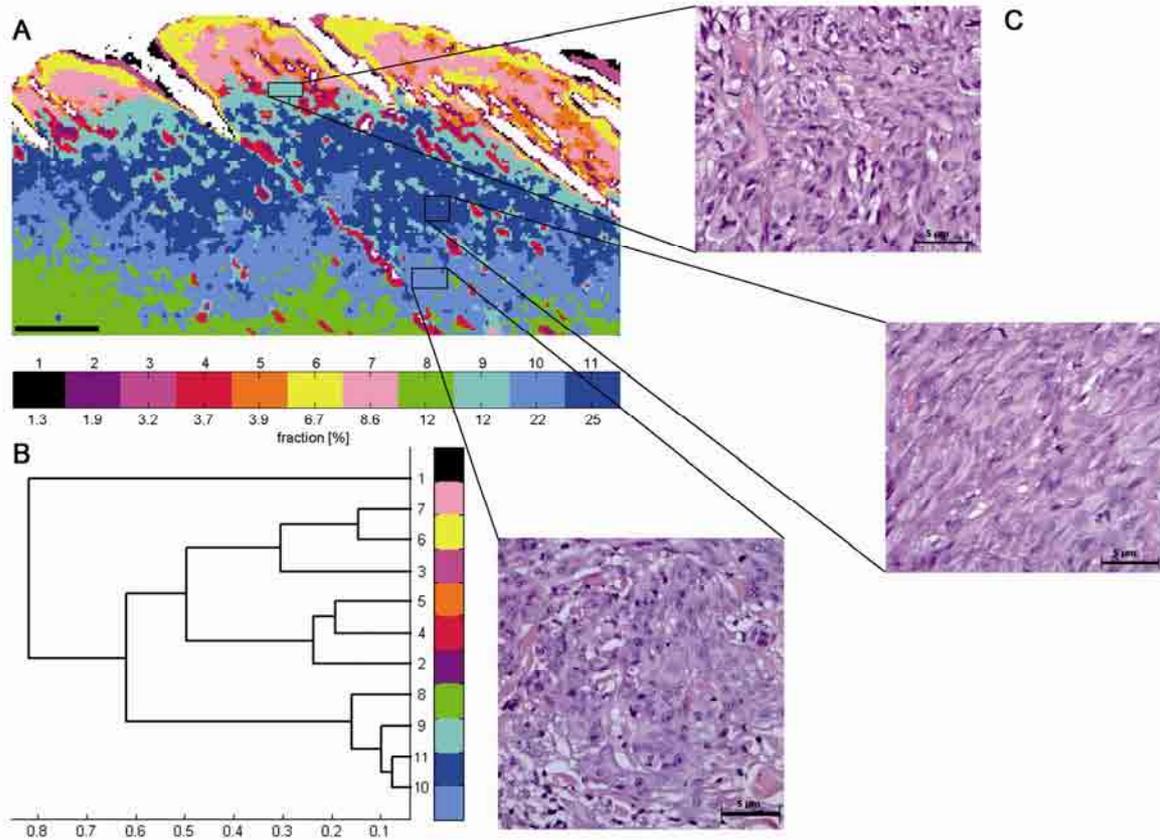


Figure 2: Spectral histology obtained from an ulcerated nodular melanoma (case n°1). A, K-means color-coded image built with 11 clusters, scale bar: 200 μm. B, Dendrogram obtained using HCA on the K-means cluster centers. C, HE stained images of the framed areas in panel A, scale bar: 50μm.

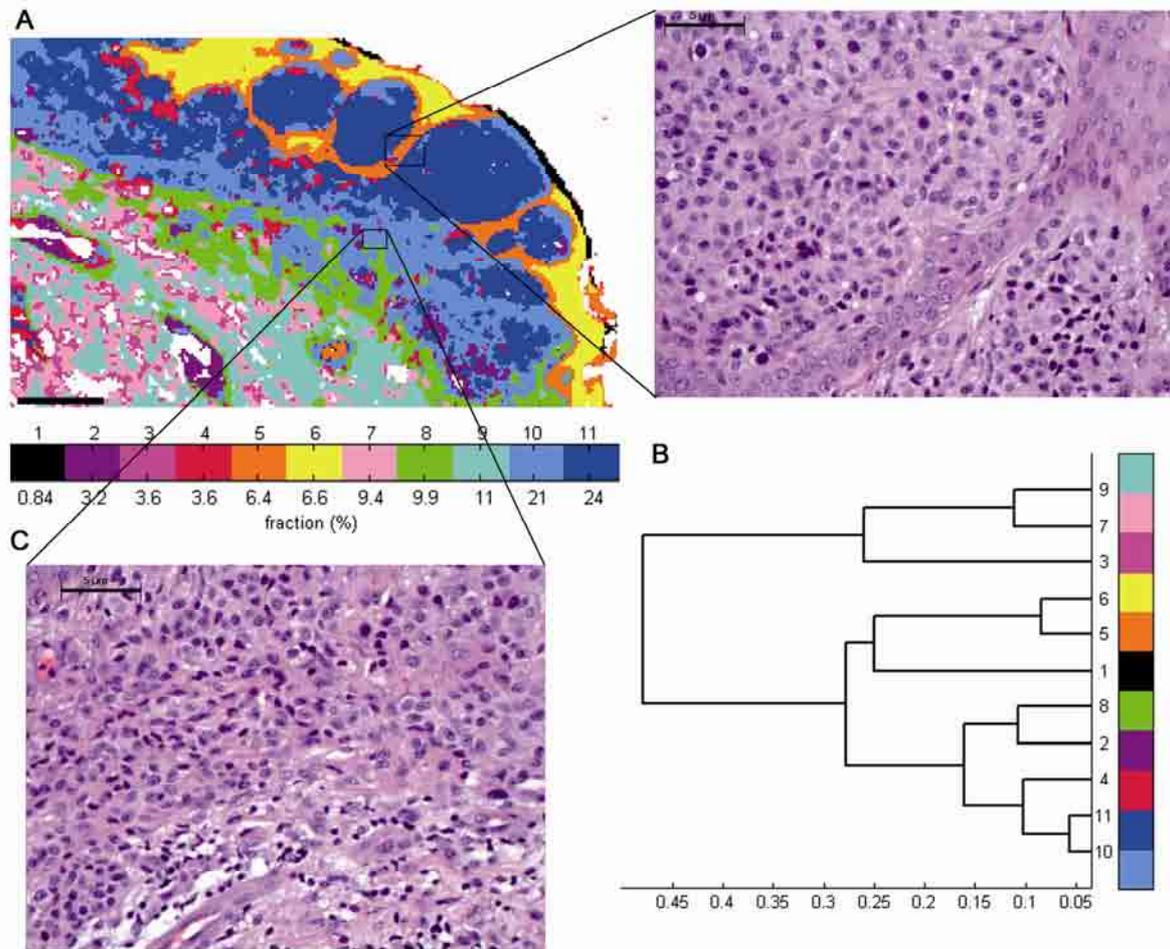


Figure 3: Spectral histology obtained from an invasive melanoma on naevus (case n°3). A, K-means color-coded image built with 11 clusters, scale bar: 200 μm. B, Dendrogram obtained using HCA on the K-means cluster centers. C, HE stained image of the framed areas in panel A, scale bar: 50 μm.

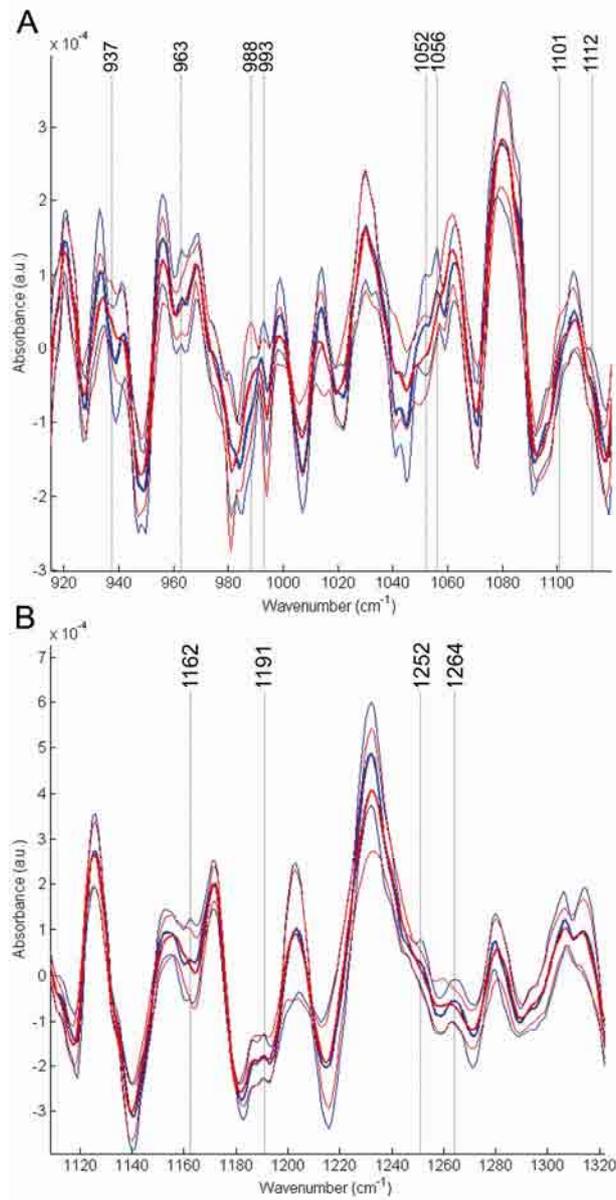


Figure 4: Second-order derivatives from spindle (blue) and epithelioid (red) melanoma cells. The mean (bold) +/- standard deviation spectra are shown in A, the 920-1110 cm<sup>-1</sup> region, and B, in the 1120-1320 cm<sup>-1</sup> region.

*Remarques sur l'article 3*

Le choix du nombre de clusters est un point sensible en classification de données. Ici, 11 clusters ont été utilisés pour classifier les spectres enregistrés sur des coupes de mélanomes. Des structures histologiques très fines (vaisseaux, lymphocytes) ainsi qu'une hétérogénéité tumorale et stromale ont ainsi été mises en évidence. Si le nombre de clusters avait été plus faible, cette hétérogénéité n'aurait pas été mise en évidence. Ici, une association parfaite a pu être établie entre les différents clusters de la tumeur et la morphologie des cellules mélanocytaires observées par l'anatomopathologiste.

*Perspectives de l'article 3*

Les études complémentaires porteront sur deux aspects :

1/ la validation de la méthodologie sur un plus grand nombre d'échantillons. Ceci permettra la création d'une banque de marqueurs spectroscopiques associés aux structures tissulaires des mélanomes. Un algorithme de prédiction (basé sur la LDA, par exemple) pourra ensuite être développé, pour une analyse automatique et en aveugle des coupes paraffinées. Cette banque de données pourra également compléter celle établie pour le diagnostic différentiel des carcinomes cutanés, dans le but de construire un outil d'aide au diagnostic des cancers de la peau, carcinomes et mélanomes confondus.

2/ l'exploitation de l'hétérogénéité tumorale et stromale. Nous avons mis en évidence des différences spectrales nettes entre le stroma à proximité et à distance de la tumeur. Il est envisagé d'analyser les différences moléculaires sous-jacentes, afin de mieux comprendre les phénomènes d'invasion de la tumeur. Pour cela, nous envisageons de coupler la micro-imagerie infrarouge avec d'autres techniques d'imagerie telles que l'imagerie de masse MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization).

**A RETENIR SUR CE CHAPITRE**

**- Il est possible de travailler sur des coupes paraffinées, sans déparaffinage chimique préalable. Ceci permet de mener des études rétrospectives, permettant de développer des outils biophotoniques afin d'identifier des marqueurs spectroscopiques à visée diagnostique, pronostique et prédictive.**

**- Nous avons développé des modèles mathématiques pour minimiser les contributions spectrales non-informatives de la paraffine.**

- La classification non supervisée par K-means des données spectrales permet de mettre en évidence des zones d'intérêt, de façon automatique. Une correspondance entre ces zones d'intérêt et la coupe adjacente colorée H&E est nécessaire pour établir une banque de marqueurs spectroscopiques spécifiques des différentes structures histologiques normales et pathologiques.

- Une analyse discriminante linéaire reposant sur la banque de marqueurs ainsi créée permet de construire un modèle de prédiction (modèle à 8 classes), capable de mettre en évidence automatiquement et de prédire le type de la lésion.

- Le modèle de prédiction peut être optimisé en affinant la banque de données spectrales, notamment en incluant les annexes cutanées.

**CHAPITRE III**  
**DEVELOPPEMENT DE LA MICROSPECTROSCOPIE RAMAN**  
**POLARISEE POUR LA CARACTERISATION DES CARCINOMES**  
**BASOCELLULAIRES**

---

### III.1 Motivation

Les études présentées dans le chapitre II montrent le fort potentiel de la micro-imagerie infrarouge en association avec le traitement statistique des données, pour la caractérisation histopathologique des tissus cancéreux. La plupart des prélèvements (biopsie ou exérèse) étant inclus en paraffine, nous avons développé une technique chimiométrique permettant d'analyser directement des coupes fines tissulaires sans déparaffinage chimique préalable. Ceci offre la possibilité de réaliser des études sur un grand nombre d'échantillons archivés au sein des tumorothèques. Dans ce chapitre, nous allons nous intéresser aux **spectroscopies Raman et Raman polarisée**, techniques complémentaires de la spectroscopie infrarouge en termes de vibrations moléculaires détectées.

L'utilisation de la spectroscopie Raman polarisée pour l'analyse des tissus représente un développement technologique dans le sens où elle reste essentiellement appliquée en sciences des matériaux (Tanaka and Young, 2006). L'objectif ici est de **renforcer le potentiel discriminant** de la spectroscopie Raman conventionnelle en considérant, en complément des vibrations moléculaires Raman, des informations liées à **la polarisation des signaux**. Certaines vibrations sont sensibles à la polarisation de la lumière excitatrice, d'autres au contraire sont totalement ou partiellement dépolarisées. Le formalisme théorique nécessite d'aborder des notions complexes (étude des tenseurs de polarisabilité) difficilement applicables sur des systèmes multimoléculaires complexes tels que les tissus biologiques. Néanmoins, la polarisation de certaines raies Raman est liée à l'arrangement (**structure et organisation**) des biomolécules au sein du tissu.

Au niveau des carcinomes cutanés, des études utilisant différentes techniques telles que l'immunohistochimie sur coupes (van Kempen et al., 2004), l'imagerie OCT (Gambichler et al., 2007; Strasswimmer et al., 2004; Welzel, 2001) ou l'imagerie non linéaire (Cicchi et al., 2008) ont montré que les fibres de collagène du derme conjonctif étaient déstructurées au niveau du **derme péri-tumoral**. La mise en évidence de cette altération pourrait constituer un **marqueur précoce lié à la malignité**, et en particulier au **risque invasif de la tumeur** vers le tissu conjonctif.

Notre objectif a été d'évaluer le potentiel des microspectroscopies Raman et Raman polarisée pour identifier cette altération moléculaire. Pour cela, nous avons analysé, en spectroscopies Raman polarisée et Raman conventionnelle, un échantillon congelé de carcinome cutané de type BCC superficiel. Plus précisément, nous avons étudié le derme péri-tumoral, localisé au voisinage de la tumeur, et le derme normal situé à distance de la tumeur. Il est à noter qu'aucune modification

morphologique n'est détectable par coloration HE au niveau de ces structures tissulaires (cf. **Article #4**).

A l'issue de cette étude de faisabilité, d'autres échantillons de carcinomes basocellulaires (superficiels et nodulaires) ont été analysés. Nous avons montré que le potentiel discriminant derme péri-tumoral/derme sain est renforcé par spectroscopie Raman polarisée. Nous avons également évalué l'apport de la spectroscopie Raman polarisée dans la discrimination tumeur/épiderme normal. Il apparaît que le potentiel discriminant de la spectroscopie Raman est également renforcé par l'analyse de la polarisation des signaux diffusés (cf **Article #5**).

### **III.2 Article #4 : Polarized Raman microspectroscopy can reveal structural changes of peritumoral dermis in basal cell carcinoma**

#### *Contexte*

Plusieurs études ont permis d'identifier, par microspectroscopie Raman conventionnelle, des différences spectrales nettes entre une peau normale et une lésion de type BCC (Choi et al., 2005; Gniadecka et al., 1997; Lieber et al., 2008a; Nijssen et al., 2002; Short et al., 2006; Sigurdsson et al., 2004). Plus récemment, Short et al. se sont intéressés à **l'environnement de la tumeur** en analysant le stroma péri-tumoral et ont mis en évidence une dégradation du collagène à proximité de la tumeur (Short et al., 2006). Nous souhaitons évaluer ici la microspectroscopie Raman polarisée pour l'analyse du tissu péri-tumoral au sein d'une lésion de type BCC superficiel. Celle-ci permet d'obtenir des informations complémentaires par rapport à la spectroscopie Raman conventionnelle quant à l'organisation du derme péri-tumoral.

#### *Méthodes*

Un système de filtres analyseurs a été incorporé au spectromètre Raman Labram, il permet de sélectionner le signal Raman polarisé parallèlement ( $I_{//}$ ) ou perpendiculairement ( $I_{\perp}$ ) à la polarisation du champ électrique du laser. Des images spectrales ont été enregistrées sur une coupe congelée de 20  $\mu\text{m}$  d'épaisseur. Deux zones ont été sélectionnées, une correspondant au **derme péri-tumoral** (en contact avec la tumeur) et une autre à **distance de la tumeur** (derme sain). Pour chaque point d'acquisition, **trois spectres** ont été enregistrés : un spectre en mode Raman conventionnel, un spectre en mode polarisé parallèle et un dernier en mode polarisé perpendiculaire.

### *Résultats*

Nous avons comparé l'aire de certaines raies Raman (sélectionnées manuellement et selon la littérature) provenant de spectres enregistrés au niveau du derme péri-tumoral et au niveau du derme sain (à distance de la tumeur). Une analyse statistique a permis de montrer que la discrimination était plus marquée lorsque la technique Raman polarisée était utilisée. De plus, la décomposition de la bande amide I (reflétant les structures secondaires des protéines) a suggéré une modification de la structure en triple hélice du collagène à proximité de la tumeur.

### *Conclusion*

Cette **étude de faisabilité** a permis de montrer la possibilité d'analyser des tissus complexes par microspectroscopie Raman polarisée et suggère que cette technique permet de renforcer le potentiel discriminant de la spectroscopie Raman pour l'étude des cancers cutanés. Néanmoins, pour que de solides conclusions cliniques soient établies, un plus grand nombre d'échantillons doit être analysé.

# Polarized Raman Microspectroscopy Can Reveal Structural Changes of Peritumoral Dermis in Basal Cell Carcinoma

ELODIE LY, OLIVIER PIOT,\* ANNE DURLACH, PHILIPPE BERNARD, and MICHEL MANFAIT

Unité MéDIAN UMR CNRS 6237 MEDyC, UFR de Pharmacie, IFR 53, Université Reims-Champagne Ardenne, 51 rue Cognacq-Jay, 51096 Reims Cedex, France (E.L., O.P., M.M.); Laboratoire Pol Bouin, CHU Maison-Blanche, 45 rue Cognacq-Jay, 51092 Reims Cedex, France (A.D.); Service de Dermatologie, CHU Robert Debré, Avenue du Général Koenig, 51092 Reims Cedex, France (P.B.); and Laboratoire de Biochimie et de Dermatologie UMR CNRS 6237 MEDyC, UFR de Médecine, IFR 53, Université Reims-Champagne Ardenne, 51 rue Cognacq-Jay, 51095 Reims Cedex, France (P.B.)

Polarized Raman microspectroscopy can provide precious information regarding the orientation and ordering of the molecules in a sample without staining or particular preparation. This technique is used for the first time on a human skin section to probe the molecular modifications of the surrounding dermis in superficial basal cell carcinoma. Spectra using polarized and conventional Raman microspectroscopies were recorded on dermis bordering either the tumor or healthy epidermis. Band areas and spectral decomposition on selected vibrations were computed. Significant differences in dermal collagen vibration bands are detected using both polarized and conventional micro-spectroscopies, but the spectral changes between tumor and healthy tissues are enhanced using polarized Raman microspectroscopy. The analysis of these spectral differences highlights structural modifications of the triple helix of collagen. We see polarized Raman microspectroscopy as a potential tool that could be implemented for clinical analyses to guide clinicians and surgeons in the treatment of aggressive skin cancers. The information obtainable could also help better elucidate the molecular mechanisms induced in basal cell carcinoma development.

Index Headings: Polarized Raman microspectroscopy; Raman microspectroscopy; Basal cell carcinoma; Collagen.

## INTRODUCTION

Skin cancer is now one of the most common types of cancer in the light-skinned population.<sup>1</sup> Non-melanoma skin cancers (NMSC), which include basal cell carcinoma (BCC) and squamous cell carcinoma (SCC), are the most frequent; more than one million cases occur annually in the United States.<sup>2</sup> Basal cell carcinoma accounts for about 80% of these lesions.<sup>3</sup> It mainly affects people over 55 years of age in sun-exposed body areas.<sup>1</sup> Although BCC lesions rarely metastasize, the cost of treatment and the morbidity of certain histological types are significant.<sup>4,5</sup> The origin of BCC is still unclear. It may arise from interfollicular basal cells or keratinocytes in hair follicles or sebaceous glands.<sup>6,7</sup> Local invasion of BCC is highly prevalent and is associated with a degradation of the surrounding stroma by matrix metalloproteinases.<sup>8,9</sup> The histopathological diagnosis of a biopsy remains the gold standard for the identification of NMSC. It therefore relies on the expertise and the know-how of clinicians and pathologists; however, discrepancies in the interpretation often occur.<sup>10</sup> Relevant markers for the early diagnosis of BCC have not yet been identified, although early detection results in a better prognosis.<sup>11</sup>

Different biophysical techniques are now being assessed as promising tools for the early diagnosis of NMSC, including,

for example, electrical impedance,<sup>12–14</sup> phase-contrast X-ray microscopy,<sup>15</sup> optical coherence tomography,<sup>16</sup> and fluorescence,<sup>17,18</sup> terahertz,<sup>19</sup> and infrared<sup>20,21</sup> spectroscopies. Among these techniques, Raman spectroscopy is particularly interesting as it probes the intrinsic chemical composition of the sample under investigation while preserving its biochemical integrity and can be applied for *in vivo* approaches. These assets make it a potential diagnostic tool for NMSC directly applicable in hospitals. In fact, several studies using Raman analysis have already demonstrated clear spectral differences between normal skin and BCC lesions,<sup>22–28</sup> but these analyses aimed only at discriminating BCC from normal skin. Recently, Short et al. carried out a study focusing on peritumoral collagen in basal cell carcinoma. They showed that peritumoral dermis is not only lacking collagen but also presents structural changes correlated to the degradation of the stroma by matrix metalloproteinases.<sup>29</sup> For this purpose, they compared conventional Raman spectra recorded at distances close to the tumor ( $\leq 10 \mu\text{m}$ ) and far from the tumor ( $\geq 100 \mu\text{m}$ ).

We propose here to evaluate the potential of polarized Raman micro-spectroscopy to reveal the disorganization of the peritumoral stroma induced in BCC. Such information could be of interest to assess the aggressiveness and invasive potential of skin cancers. First, we will discuss the concepts of polarized Raman spectroscopy and then apply them to a histologically proven frozen sample of BCC. For this analysis of peritumoral tissue, polarization-dependant spectra of tumor-bordering papillary dermis and normal papillary dermis underlying normal epidermis were recorded and compared. Band ratios and band decomposition were performed on vibration peaks that are representative for the structure of collagen and are sensitive to light polarization.

## THEORY

Polarized Raman measurements can give meaningful information about the conformation and orientation of the molecules probed. The Raman effect is the result of the inelastic interaction between an exciting electric field and the molecules constituting the sample. More precisely, the intensity of a Raman vibrational mode of a molecule depends on  $(\partial\alpha/\partial q_k)_{q_k=0}$ , where  $\alpha$  is the polarizability tensor of the corresponding molecular bond (it accounts for the ability of the electronic cloud to be distorted) and  $q_k$  is the displacement of the  $k$ th atom of the molecule from its equilibrium position ( $q_k = 0$ ).  $(\partial\alpha/\partial q_k)_{q_k=0}$  is called the Raman tensor; it is the differential of the polarizability tensor and depends on the geometrical properties of the molecules constituting the

Received 10 April 2008; accepted 10 July 2008.

\* Author to whom correspondence should be sent. E-mail: olivier.piot@univ-reims.fr.

sample.<sup>30</sup> Therefore, if the molecule is highly oriented, the Raman tensor will exhibit specific spatial symmetries. These properties can be exploited when the exciting laser beam is polarized because the intensity of some Raman bands will be stronger in certain spatial directions.

Therefore, the intensity of the Raman vibrations in the directions parallel and perpendicular to the laser polarization can be obtained by rotating the orientation of an analyzer placed before the detector. The variation of intensity of the Raman bands between the two configurations gives precious information about the shape of the Raman tensor, and hence about the molecular ordering of the sample. For example, the signal from totally symmetric vibrations will be strongly polarized in the direction parallel to the electric field of the laser beam. The measurement of the depolarization ratio  $\rho$ , defined as

$$\rho = \frac{I_{\perp}}{I_{\parallel}} \quad (1)$$

(where  $I_{\perp}$  and  $I_{\parallel}$  are the intensities of the Raman signal when the analyzer is oriented perpendicular and parallel to the polarization of the incident beam, respectively) is a method to obtain information about the coefficients of the Raman tensor. In the case of an isotropic sample (in liquid or gases), if  $\rho = 0.75$ , then the vibration is depolarized (not totally symmetric vibrations) and if  $\rho < 0.75$ , then it is polarized (totally symmetric vibrations). As an example,  $I_{\perp}$  and  $I_{\parallel}$  are shown in Fig. 1a for a molecule as simple as cyclohexane. Two polarized bands are present at  $800 \text{ cm}^{-1}$  (ring breathing mode) and  $1157 \text{ cm}^{-1}$ , while the bands at  $1027 \text{ cm}^{-1}$  (ring vibration),  $1265 \text{ cm}^{-1}$  (C–H scissoring mode), and  $1444 \text{ cm}^{-1}$  ( $\text{CH}_2$  scissoring mode) are depolarized, which is in agreement with the symmetry of the vibrations of cyclohexane and with previous results.<sup>31</sup> In this case, polarized Raman spectroscopy can provide information about the symmetry of the vibration and hence can facilitate the assignment of spectral bands. Much work involving polarized Raman spectroscopy has been carried out in materials science on polymers,<sup>30</sup> nanowires,<sup>32</sup> and crystals.<sup>33</sup> For biological samples, the results are less straightforward because of the numerous vibration bands that are present and because the system does not always present any symmetrical ordering at the level of its molecular components. In fact, Fig. 1b shows  $I_{\perp}$  and  $I_{\parallel}$  for a tryptophan powder (L-Tryptophan, SIGMA, Ref. TO254), which is a common amino acid. Numerous peaks are present and the interpretation is more complex than the polarized Raman spectra of cyclohexane; however, for example, the bands at  $755 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1007 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1231 \text{ cm}^{-1}$ , and  $1422 \text{ cm}^{-1}$  present peculiar polarization behaviors worth analyzing. Because of the complex nature of a Raman tensor in biological materials, most studies are based on highly oriented samples such as protein crystals,<sup>34</sup> wool and feather,<sup>35</sup> filamentous matters,<sup>36–41</sup> plant cell walls,<sup>42</sup> muscle,<sup>43</sup> bone,<sup>44</sup> and teeth.<sup>45–47</sup> Only one study using polarized Raman spectroscopy has been carried out on skin, but there was no biological consideration. It consisted of a purely instrumental development in order to separate the Raman signal of a biological tissue from the one of a highly diffusing substrate. The analyzed system was used as a model mimicking a multilayer structure.<sup>48</sup>

## MATERIALS AND METHODS

**Sample Preparation.** A sample of histologically confirmed frozen superficial basal cell carcinoma was obtained from the

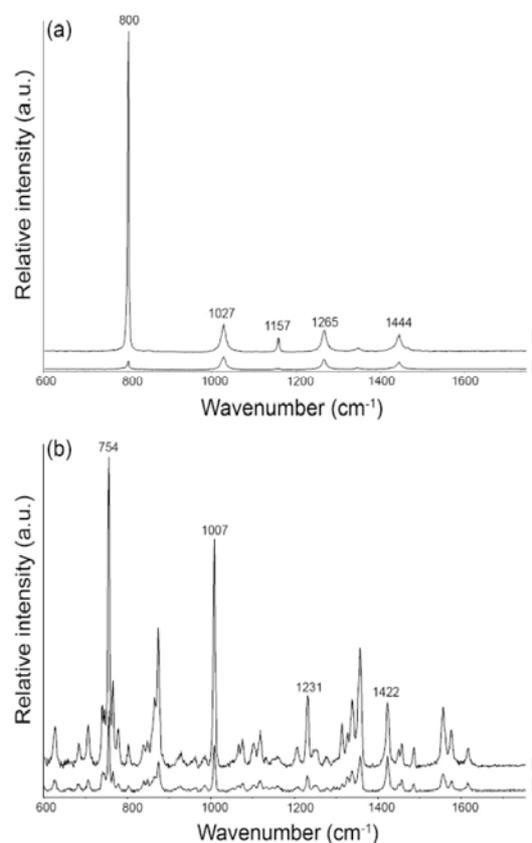


Fig. 1. Parallel ( $I_{\parallel}$ ) and perpendicular ( $I_{\perp}$ ) components of the Raman spectra from (a) cyclohexane and (b) a tryptophan powder.

Pathology Department of the Maison-Blanche University Hospital (Reims, France). The tissue block was mounted on to the cryostat chuck with a drop of optical cutting medium (OCT) and a  $20 \mu\text{m}$  thick section was cut and deposited on a  $\text{CaF}_2$  window (Crystran Ltd., Dorset, UK). The sample was stored at  $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$  until spectra acquisition. Raman measurements were performed when the sample had thawed. Areas of interest were precisely identified following the guidelines of a pathologist on an adjacent section conventionally stained with hematoxylin-phloxine-saffron (HPS).

**Reference Spectra.** Reference spectra of collagen type I fibers were obtained from rat tail tendons.<sup>49</sup> Fibers were kept in PBS prior to acquisition. For Raman acquisition, one fiber was deposited on a  $\text{CaF}_2$  window and maintained at its ends with some tape. The fiber was oriented along the  $x$ -axis, parallel to the electric field of the exciting laser beam.

**Raman Instrumentation.** The setup used for Raman measurements is described in Fig. 2. Polarization-dependant Raman spectra were recorded with a Labram microspectrometer (Horiba Jobin Yvon, Lille, France). The excitation beam from a titanium sapphire (TiSa) laser (Spectra Physics, Les Ulis, France) generating polarized light along the  $x$  direction at  $785 \text{ nm}$  was focused on the sample using a  $100\times$  objective (numerical aperture: 0.9, Olympus). Rayleigh elastic scattering was removed by a notch filter. For these experiments, the confocal hole was set to  $200 \mu\text{m}$ . The Raman Stokes signal was dispersed with a holographic grating (950 grooves/mm) and data was recorded via a charge-coupled device (CCD) detector ( $1024 \times 256$  pixels) with a  $4 \text{ cm}^{-1}$  spectral resolution. As displayed in Fig. 2, a polarization analyzer (Melles Griot, Voisins-le-Bretonneux, France) was placed before the entrance

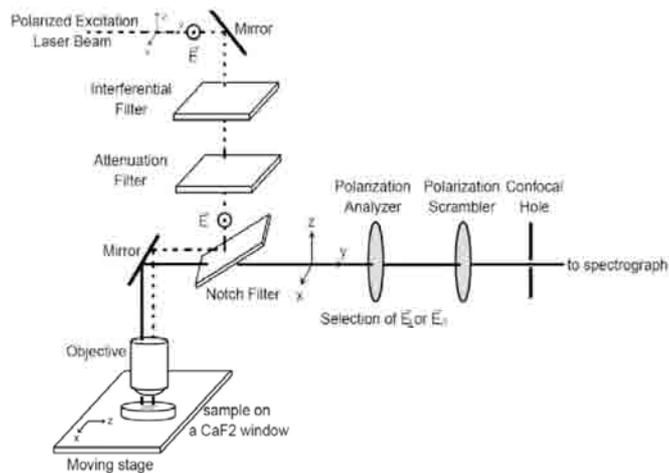


FIG. 2. Instrumental setup used for acquiring polarization-dependent Raman spectra.

slit to allow the detection of the polarized scattered light along the directions parallel and perpendicular to the laser polarization. A broad-band quarter-wave plate (Melles Griot, Voisins-le-Bretonneux, France) was placed after the analyzer to compensate for the polarization dependence of the detector. Three spectra were recorded at each position, one using conventional Raman spectroscopy and two using polarized Raman, with the analyzer oriented along the  $x$ - or  $z$ -axis. Rotating the laser polarization did not give additional information (data not shown), suggesting that there is no preferential orientation in our skin sample. The system was equipped with a controlled stage permitting the recording of spectral images (mapping mode). A screen image recorder camera attached to the microscope enabled the acquisition of the white-light image for the selection of the regions of interest.

**Spectral Acquisition.** Spectra of collagen type I fibers were acquired using the point-mode of the spectrometer. Three spectra at five different locations were recorded as described in the previous section. The acquisition time was set to 30 seconds and the spectral range to  $600\text{--}1750\text{ cm}^{-1}$ .

Figure 3 shows the HPS stained section adjacent to the section used for Raman measurements. Tumor areas are well defined. The enlarged view corresponds to the same area on the unstained section. The investigated area of about  $90 \times 30\ \mu\text{m}^2$ , consisting of papillary dermis bordering tumor epidermis, is framed in black. Spectra were recorded every  $10\ \mu\text{m}$ . An area of approximately the same size, representative for papillary dermis bordering healthy epidermis, referred to as normal dermis, was selected very far from the tumor site (about 1.5 mm further). In these cases, the spectrometer was used in the mapping mode. Because the polarized Raman signal was weak, acquisition times were increased in order to obtain a higher signal-to-noise ratio. Conventional Raman spectra were recorded for 30 seconds, polarized spectra parallel to the laser (i.e., along the  $x$  direction) for 40 seconds, and polarized spectra perpendicular to the laser (i.e., along the  $z$  direction) for 50 seconds. In all cases, the spectral range was set from 600 to  $1750\text{ cm}^{-1}$ .

**Data Processing.** Except for the curve-fitting analysis, the spectral analyses were carried out using Matlab 7.2 (The Mathworks, Natick, MA).

**Wavenumber Calibration and Sensitivity Correction.** The spectrometer was calibrated using a neon source as a reference

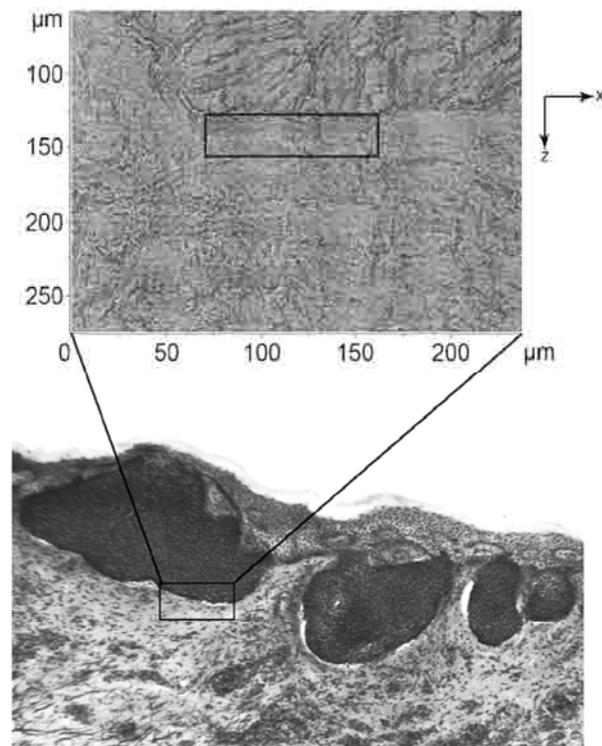


FIG. 3. HPS staining of the BCC section. Tumor lobes are well defined. The enlarged view was taken on the unstained section used for Raman experiments and corresponds to the framed area in the stained section. Spectra from peritumoral dermis ( $n = 40$ ) were recorded in the black rectangle. A similar surface was probed far from the tumor ( $>1.5\text{ mm}$ ) for normal dermis.

for absolute wavenumbers. The excitation wavelength was measured using the Raman spectrum of cyclohexane as a reference. The wavelength dependency of the detector was corrected for using the response of a white light spectrum from a halogen lamp. This spectrum was also used to correct for the polarization dependence of the optical elements of the Raman spectrometer. The contribution of the dark current was subtracted for each spectrum.

**Data Preprocessing.** Spectra were Savitzky-Golay filtered (11 points for the tissue images and 9 points for the collagen fibers). The order of the polynomial (from 3 to 5) was adapted depending on the type of the polarization and the signal-to-noise ratio. Spectra were background corrected using a polynomial function and normalized across the whole wavenumber range. Mean spectra corresponding to the average of 40 spectra collected on the selected tissue regions (Fig. 3) were also computed.

**Band Areas.** The integrated areas of selected bands of interest from papillary dermis underlying normal epidermis (normal dermis) and tumor-bordering papillary dermis (peritumoral dermis) were calculated and compared. The procedure was carried out on conventional Raman spectra and on polarization-dependent Raman spectra (along the  $x$  direction only). Non-parametric tests (two-sided Mann-Whitney U test) were performed (SYSTAT, Systat Software Inc., CA) on these band areas to evaluate the statistical significance ( $p < 0.05$ ) of the spectral differences between normal and peritumoral dermis using either conventional or polarized Raman spectroscopy.

**Decomposition of the Amide I Band.** The amide I region, centered around  $1660\text{ cm}^{-1}$ , is associated with vibrations of the proteins in the tissue. Spectral decomposition can give precious information on their secondary structures. For this purpose,

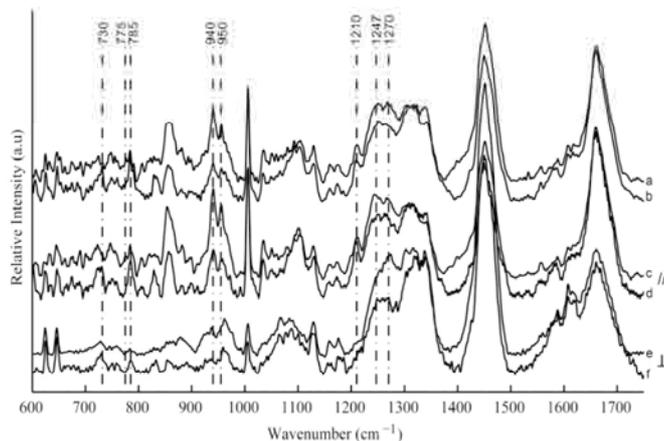


FIG. 4. Mean spectra from normal (*a, c, e*) and peritumoral (*b, d, f*) dermis using unpolarized Raman spectroscopy (**top**) and the components parallel (**middle**) and perpendicular (**bottom**) to the exciting laser beam. Spectra are offset for clarity.

spectra were cut in the 1540–1740  $\text{cm}^{-1}$  region, Savitzky–Golay filtered (13 points, third order), and the two intensities at 1540  $\text{cm}^{-1}$  and 1740  $\text{cm}^{-1}$  used as baseline points. The frequency positions of the vibrational bands contained in the envelope were localized by computing second-order derivatives. A combination of Gaussian and Lorentzian functions, centered on the previously identified frequencies, was used to perform curve-fitting on the normalized spectra (Labspec 4, Horiba Jobin Yvon, Lille, France). The fitting procedure stopped when the  $\chi^2$  value reached the order of  $10^{-5}$ .

## RESULTS

**Polarization Spectra.** Figure 4 depicts the average spectra from normal dermis (spectra *a, c, e*) and peritumoral dermis (spectra *b, d, f*) using conventional Raman spectroscopy (spectra *a* and *b*) and polarized spectroscopy with the analyzer parallel (spectra *c* and *d*) and perpendicular (spectra *e* and *f*) to the electric field of the laser beam. Spectra are offset for clarity. Spectra from normal dermis present different behaviors depending on the polarization. For example, the bands at 620 and 643  $\text{cm}^{-1}$ , corresponding to the ring deformations of phenylalanine and tyrosine, respectively, are more intense using the perpendicular mode of polarization. This result has also been reported by Tsuboi et al.<sup>40</sup> and may be due to peculiar orientations of the aromatic rings of phenylalanine and tyrosine in collagen. More work on this subject is now in progress to confirm or reject these hypotheses (unpublished results). In addition, intense peaks corresponding to collagen vibrations<sup>50</sup> (around 850 and 1210  $\text{cm}^{-1}$ ) are absent when the perpendicular configuration of the analyzer is used. Similar trends are observed for peritumoral dermis. Main spectral differences between normal and peritumoral dermis using conventional and polarized Raman spectroscopy are summarized in Table I and are indicated by dotted lines in Fig. 4. They are in agreement with previously published results in this field.<sup>22,24,29</sup> The Raman signal collected from the tissue in the direction perpendicular to the electric field of the laser was weak and noisy considering the acquisition time of the experiment, particularly in the regions corresponding to the bands of interest listed in Table I. This may be due to the orientation of the sample during the experiment. As a result, the analysis was focused on spectra collected from the tissue in the

TABLE I. Main spectral differences observed between normal and peritumoral dermis and their assignments.

Wavenumber ( $\text{cm}^{-1}$ )	Assignment	Spectral difference, Normal vs. peritumoral dermis
730	Adenine	Less intense
775	Unassigned	More intense
785	DNA, RNA	Less intense
940	C–C vibrations (protein backbone, collagen)	More intense
950	C–C vibrations (protein backbone, collagen)	More intense
1210	Tyrosine, phenylalanine, collagen, hydroxyproline	Less intense (polarized spectra only)
1247	Tropocollagen (proline-rich)	More intense
1270	Tropocollagen (proline-poor)	More intense (conventional spectra), less intense (polarized spectra)

direction parallel to the electric field of the laser, for which the signal was much stronger.

**Band Areas.** The significance of the spectral differences found on the average spectra was assessed by calculating and comparing the areas of the bands, listed in Table I, on a set of spectra from normal ( $n = 10$ ) and peritumoral dermis ( $n = 10$ ). The bands centered at 730  $\text{cm}^{-1}$ , 785  $\text{cm}^{-1}$ , and 1210  $\text{cm}^{-1}$  are more intense in the peritumoral dermis than in the normal dermis, contrary to the vibrations at 775  $\text{cm}^{-1}$ , 940  $\text{cm}^{-1}$ , and 950  $\text{cm}^{-1}$ . A two-sided Mann–Whitney U test assessed whether these differences were statistically significant. The results (*p*-values) from the statistical test are represented in Table II. The lower the *p*-value, the more significant the difference is. The area of each band is statistically different between normal and peritumoral dermis ( $p < 0.05$ ), which means that these bands can be used as potential discriminative markers between tumor-bordering and normal dermis. In addition, except for the bands associated with the vibrations of the protein backbone (940–950  $\text{cm}^{-1}$ ), the spectral differences are enhanced with polarization-sensitive Raman spectroscopy as the *p*-value is lower for the polarized analysis compared to conventional spectroscopy.

**Amide I Decomposition.** Differences at the level of the amide I band were more thoroughly analyzed using spectral decomposition. It permits the determination of the contribution of each component of the band. Each of these components accounts for a specific secondary structure of the protein content. Figure 5 shows an example of band decomposition for polarized spectra of a collagen fiber, peritumoral dermis, and normal dermis, collected with the analyzer in the parallel configuration. Figure 6 depicts the second-order derivatives of the spectra from peritumoral dermis (top) and normal dermis (bottom) presented in Fig. 5. The derivatives calculated on conventional Raman spectra (Figs. 6a and 6c) and polarized Raman spectra collected with the analyzer parallel to the exciting laser beam (Figs. 6b and 6d) are shown.

**Polarized Raman Spectra.** The bands centered at 1654  $\text{cm}^{-1}$  and 1671  $\text{cm}^{-1}$  are representative for the  $\alpha$ -chain structure of proteins<sup>51</sup> and the particular triple helix structure of collagen,<sup>50</sup> respectively. In fact, in Fig. 5a, the amide I band is centered at 1671  $\text{cm}^{-1}$  for the collagen fiber. Different patterns were observed depending on the nature of the sample under investigation. Three bands at 1661  $\text{cm}^{-1}$ , 1671  $\text{cm}^{-1}$ , and 1682  $\text{cm}^{-1}$  were found in the spectra from the collagen fiber.

TABLE II. Statistical significance (p-values) of the differences in band areas from selected peaks between normal and peritumoral dermis using either conventional or polarized Raman spectroscopy.<sup>a</sup>

Method	Band position (cm <sup>-1</sup> )						
	730	775	785	940	950	1210	1247/1270
Conventional	0.002**	0.004**	0.049*	<0.001***	0.013*	0.545	0.002**
Polarized	<0.001***	<0.001***	0.016*	0.001**	0.496	0.001**	0.001**

<sup>a</sup> (\*)  $p < 0.05$ , (\*\*)  $p < 0.01$ , (\*\*\*)  $p < 0.001$  (Mann-Whitney U test).

The bands for peritumoral dermis were at 1654 cm<sup>-1</sup>, 1658 cm<sup>-1</sup>, 1663 cm<sup>-1</sup>, 1672 cm<sup>-1</sup>, and 1681 cm<sup>-1</sup> while the bands for normal dermis were at 1659 cm<sup>-1</sup>, 1670 cm<sup>-1</sup>, 1674 cm<sup>-1</sup>, and 1688 cm<sup>-1</sup>. The band around 1660 cm<sup>-1</sup> is present in spectra from normal dermis and the collagen fiber but decreases significantly in peritumoral dermis. This band could be associated with the collagen triple helix structure, stabilized

by a high number of interchain hydrogen bonding.<sup>52</sup> The band at 1654 cm<sup>-1</sup>, specific for alpha helical structures, is only present in peritumoral dermis, suggesting the prevalence of intrachain hydrogen bonds as found in  $\alpha$ -chain structures. This spectral analysis thus indicates modifications at the level of molecular interactions. The transition from normal dermis to peritumoral dermis seems to induce a disordering of the collagen triple helix structure into single  $\alpha$ -chains, consecutive to changes in hydrogen bonding.

**Conventional versus Polarized Raman Spectroscopy.** The collagen fiber was oriented parallel to the electric field of the laser during our experiments. This particular orientation explains why no significant differences were found between the spectra of the collagen fiber recorded with conventional Raman spectroscopy or with the analyzer in the parallel configuration.

Whereas a single band (at 1659 cm<sup>-1</sup>) appears on the second-derivative spectra (conventional as well as polarized)

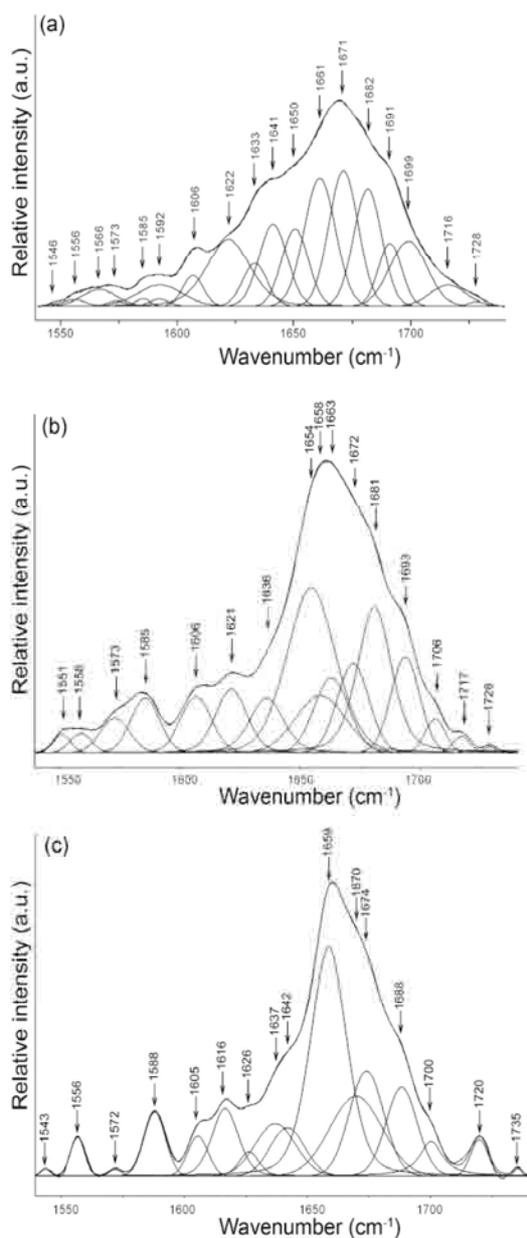


FIG. 5. Band decomposition of the parallel component of Raman signal from (a) a collagen fiber oriented along the  $x$ -axis, (b) peritumoral dermis, and (c) normal dermis.

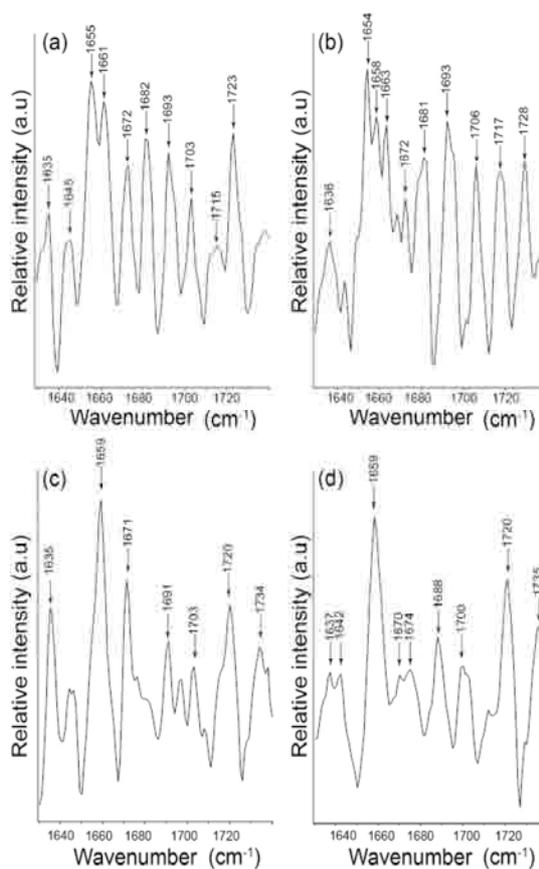


FIG. 6. Second-order derivatives (multiplied by  $-1$ ) from unpolarized Raman spectra (a, c) and the component parallel to the exciting laser beam (b, d) from peritumoral dermis (a, b) and normal dermis (c, d). Panels (b) and (d) correspond to the second-order derivatives of spectra (b) and (c) in Fig. 5.

from normal dermis (see Figs. 6c and 6d), two bands at 1655  $\text{cm}^{-1}$  and 1661  $\text{cm}^{-1}$  on the conventional Raman spectrum and three bands at 1654  $\text{cm}^{-1}$ , 1658  $\text{cm}^{-1}$ , and 1663  $\text{cm}^{-1}$  on the polarized spectrum are identified for peritumoral dermis (see Figs. 6a and 6b). The analysis of conventional Raman spectra could translate a degradation of the collagen triple helix into single  $\alpha$ -chains, while polarized Raman spectra could suggest the existence of a transitional state in the disordering of collagen. In fact, it has been demonstrated that the degradation of the collagen triple helix results in the dissociation of the triple helix into two components. The first one is a single strand and the second one corresponds to a double strand structure originating from the three strands of the tropocollagen molecule bonded together.<sup>53</sup> Thus, the band at 1658  $\text{cm}^{-1}$  could be attributed to the second component of the dissociation of the triple helix. The presence of this component was not detected using conventional Raman spectroscopy. More work is needed for a better characterization of this transition state.

## DISCUSSION

This study, based on a well-characterized BCC sample, shows the potential interest of polarized Raman spectroscopy for the analysis of collagen structural changes induced in BCC at the level of tumor-bordering dermis. Our objective was to assess the potential of polarized Raman spectroscopy compared to conventional Raman spectroscopy. In order to reinforce the significance of our results for further developments in the biomedical field, more samples have to be analyzed in order to take into account inter-individual variability. In this study, particular care was taken for the selection of the area of investigation with the help of an experienced pathologist. Data analysis was performed on vibration bands of interest associated with the main molecular species involved in stromal response. The examination of band areas showed that the bands around 730  $\text{cm}^{-1}$  and 785  $\text{cm}^{-1}$  (assigned to DNA vibrations) are more intense in peritumoral dermis than in normal dermis, which suggests a higher DNA content in peritumoral dermis. In addition, Table II shows that this trend is significantly enhanced using polarized Raman spectroscopy.

Several studies focusing on the stroma in BCC have shown that these lesions are always associated with an increased number of mast cells and dermal dendrocytes and of a migration of fibroblasts towards the tumor.<sup>54–56</sup> But the principal differences are associated with molecular vibrations of collagen. This is not surprising as collagen represents about 70% of the dry weight of the dermis and type I collagen about 80–90% of all the collagenous proteins of the dermis.<sup>57</sup> Our results demonstrate not only that the intensities of the collagen backbone stretching vibrations (940  $\text{cm}^{-1}$  and 950  $\text{cm}^{-1}$ ) are lower in peritumoral dermis, but also reveal structural modifications detectable at the level of the bands at 1247  $\text{cm}^{-1}$  and 1270  $\text{cm}^{-1}$ . Short et al. reported that the intensity of the band at 1210  $\text{cm}^{-1}$  using conventional Raman spectroscopy decreased from normal to peritumoral dermis, and they correlated this phenomenon to the degradation of collagen to gelatin.<sup>29</sup> However, we observed on our BCC sample that the difference of integrated area of this band between peritumoral and normal dermis was not statistically significant using conventional Raman spectroscopy ( $p = 0.545$ ). Still, this band could be used as a discriminative marker between peritumoral and normal dermis using polarized Raman spectroscopy as the

difference of band areas becomes statistically significant ( $p < 0.001$ ).

It thus seems that polarized Raman spectroscopy can reveal fine differences that conventional spectroscopy cannot. These differences are to be correlated to modifications of the structure and the ordering of the molecules. Frushour et al.<sup>50</sup> attributed the bands at 1247  $\text{cm}^{-1}$  and 1270  $\text{cm}^{-1}$  to amide III vibrations of proline-rich (nonpolar) and proline-poor (polar) regions of the tropocollagen molecule (precursor protein of collagen), respectively. More precisely, the band at 1247  $\text{cm}^{-1}$  is assigned to the amide III mode of the  $3_1$  helical chains in the tropocollagen molecule.<sup>50</sup> The modification of the ratio between these two bands suggests that the distribution of proline-poor and proline-rich regions is different, inducing a change of collagen conformation between normal and peritumoral dermis. Again, this change of conformation is significantly enhanced using polarized Raman spectroscopy (see Table II). In fact, these vibrations are sensitive to the ordering of the collagen molecule and are consequently of interest using polarization-sensitive Raman spectroscopy.

Our findings also confirm that BCC lesions induce a degradation of the neighboring collagen. They can bring complementary information for a better understanding of this degradation mechanism, which has been extensively studied in biological research. It has been associated with the action of matrix metalloproteinases to degrade collagen into gelatin.<sup>8,9,58</sup> As illustrated in this study of the peritumoral dermis on a BCC sample, polarized Raman spectroscopy can provide very detailed information regarding the molecular content without any time-consuming and/or destructive preparation of the sample. The molecular information of interest is more emphasized by exploiting the polarization of the Raman signal than by conventional Raman analysis. This approach is here particularly interesting and relevant as the molecular changes probed within the peritumoral tissue correspond to very subtle structural modifications that are not detectable by conventional HPS or hematoxylin and eosin staining. Indeed, collagen fibrils are being degraded at the vicinity of the tumor as spectral features of “normal” dermis are still visible in the spectra of peritumoral dermis. This partial degradation of collagen is not yet sufficient to induce morphological modifications of the tissue that could be revealed by standard histology.

## CONCLUSION

Our findings show that polarization-sensitive Raman spectroscopy permits a better discrimination between normal and peritumoral dermis compared to conventional Raman spectroscopy. Because it is based on the polarization of the scattered Raman signal, this method is sensitive to the orientation and ordering of the molecules under investigation. Also, it is particularly appropriate for analyzing the ordered molecular constituents of skin such as collagen, and for probing in BCC their structural degradation at the vicinity of the tumor. We have correlated the spectral differences between normal and peritumoral dermis to the action of matrix metalloproteinases. The structural modifications resulting from collagen degradation were clearly noticeable using polarized Raman spectroscopy. Further analysis will be carried out on samples from other patients in order to take into account patient variability. We see polarized Raman spectroscopy as a valuable tool for probing subtle molecular changes in skin lesions. As for the possibility to be implemented in clinics, this innovative

technique could be developed as a complementary tool for assessing the aggressiveness and invasive potential of skin cancers.

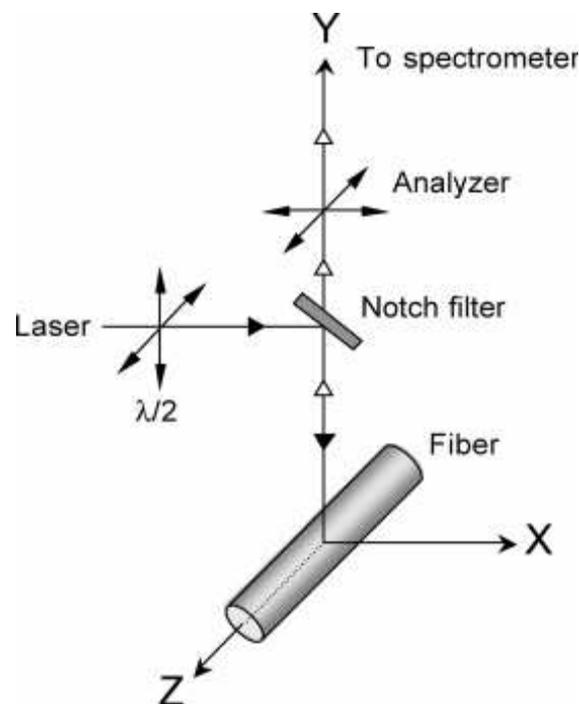
#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank M. Simon for technical assistance. E.L. is a postgraduate fellow from CNRS and Région Champagne-Ardenne.

1. T. L. Diepgen and V. Mahler, *Brit. J. Dermatol.* **146 Suppl 61**, 1 (2002).
2. A. C. Society, *Cancer Facts and Figures 2007* (American Cancer Society, Atlanta, 2007).
3. A. Katalinic, U. Kunze, and T. Schafer, *Brit. J. Dermatol.* **149**, 1200 (2003).
4. B. A. Raasch, P. G. Buettner, and C. Garbe, *Brit. J. Dermatol.* **155**, 401 (2006).
5. H. von Domarus and P. J. Stevens, *J. Am. Acad. Dermatol.* **10**, 1043 (1984).
6. J. P. Lacour, *Brit. J. Dermatol.* **146 Suppl 61**, 17 (2002).
7. A. C. Markey, E. B. Lane, D. M. Macdonald, and I. M. Leigh, *Brit. J. Dermatol.* **126**, 154 (1992).
8. J. Varani, Y. Hattori, Y. Chi, T. Schmidt, P. Perone, M. E. Zeigler, D. J. Fader, and T. M. Johnson, *Brit. J. Cancer* **82**, 657 (2000).
9. T. Yucel, A. Mutnal, K. Fay, S. E. Fligiel, T. Wang, T. Johnson, S. R. Baker, and J. Varani, *Exp. Mol. Pathol.* **79**, 151 (2005).
10. L. B. Rorke, *Cancer* **79**, 665 (1997).
11. M. Mogensen and G. B. Jemec, *Dermatol. Surg.* **33**, 1158 (2007).
12. P. Aberg, I. Nicander, J. Hansson, P. Geladi, U. Holmgren, and S. Ollmar, *IEEE Trans. Biomed. Eng.* **51**, 2097 (2004).
13. Y. A. Glickman, O. Filo, M. David, A. Yayon, M. Topaz, B. Zamir, A. Ginzburg, D. Rozenman, and G. Kenan, *Skin Res. Technol.* **9**, 262 (2003).
14. D. G. Beetner, S. Kapoor, S. Manjunath, X. Zhou, and W. V. Stoecker, *IEEE Trans. Biomed. Eng.* **50**, 1020 (2003).
15. S. W. Son, S. Y. Park, G. M. Park, S. H. Ha, G. W. Lee, O. S. Lee, Y. Hwu, A. R. Kim, J. H. Je, and C. H. Oh, *Skin Res. Technol.* **14**, 13 (2008).
16. J. Strasswimmer, M. C. Pierce, B. H. Park, V. Neel, and J. F. de Boer, *J. Biomed. Opt.* **9**, 292 (2004).
17. L. Brancalion, A. J. Durkin, J. H. Tu, G. Menaker, J. D. Fallon, and N. Kollias, *Photochem. Photobiol.* **73**, 178 (2001).
18. M. Panjehpour, C. E. Julius, M. N. Phan, T. Vo-Dinh, and S. Overholt, *Lasers Surg. Med.* **31**, 367 (2002).
19. V. P. Wallace, A. J. Fitzgerald, E. Pickwell, R. J. Pye, P. F. Taday, N. Flanagan, and T. Ha, *Appl. Spectrosc.* **60**, 1127 (2006).
20. L. M. McIntosh, M. Jackson, H. H. Mantsch, M. F. Stranc, D. Pilavdzic, and A. N. Crowson, *J. Invest. Dermatol.* **112**, 951 (1999).
21. M. Khanmohammadi, R. Nasiri, K. Ghasemi, S. Samani, and A. Bagheri Garmarudi, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **133**, 1001 (2007).
22. M. Gniadecka, H. C. Wulf, N. N. Mortensen, O. F. Nielsen, and D. H. Christensen, *J. Raman Spectrosc.* **28**, 125 (1997).
23. M. Gniadecka, H. C. Wulf, O. F. Nielsen, D. H. Christensen, and J. Hercogova, *Photochem. Photobiol.* **66**, 418 (1997).
24. A. Nijssen, T. C. Bakker Schut, F. Heule, P. J. Caspers, D. P. Hayes, M. H. Neumann, and G. J. Puppels, *J. Invest. Dermatol.* **119**, 64 (2002).
25. L. D. Nunes, A. A. Martin, L. Silveira, and M. Zampieri, *Spectrosc. Int. J.* **17**, 602 (2003).
26. S. Sigurdsson, P. A. Philipsen, L. K. Hansen, J. Larsen, M. Gniadecka, and H. C. Wulf, *IEEE Trans. Biomed. Eng.* **51**, 1784 (2004).
27. J. Choi, J. Choo, H. Chung, D. G. Gweon, J. Park, H. J. Kim, S. Park, and C. H. Oh, *Biopolymers* **77**, 264 (2005).
28. A. Nijssen, K. Maquelin, L. F. Santos, P. J. Caspers, T. C. Bakker Schut, J. C. den Hollander, M. H. Neumann, and G. J. Puppels, *J. Biomed. Opt.* **12**, 034004 (2007).
29. M. A. Short, H. Lui, D. McLean, H. Zeng, A. Alajlan, and X. K. Chen, *J. Biomed. Opt.* **11**, 34004 (2006).
30. M. Tanaka and R. J. Young, *J. Mater. Sci.* **41**, 963 (2006).
31. M. J. Pelletier, *Appl. Spectrosc.* **53**, 1087 (1999).
32. F. Lagugné-Labarthe, *Annu. Rep. Prog. Chem., Sect. C: Phys. Chem.* **103**, 326 (2007).
33. J. B. Burns, N. A. Stump, and J. R. Peterson, *J. Raman Spectrosc.* **26**, 39 (1995).
34. M. Tsuboi, T. Ueda, K. Ushizawa, Y. Ezaki, S. A. Overman, and G. J. Thomas, Jr., *J. Mol. Struct.* **379**, 43 (1996).
35. L. Rintoul, E. A. Carter, S. D. Stewart, and P. M. Fredericks, *Biopolymers* **57**, 19 (2000).
36. T. Lefevre, M. E. Rousseau, and M. Pezolet, *Appl. Spectrosc.* **60**, 841 (2006).
37. T. Lefevre, M. E. Rousseau, and M. Pezolet, *Biophys. J.* **92**, 2885 (2007).
38. M. E. Rousseau, T. Lefevre, L. Beaulieu, T. Asakura, and M. Pezolet, *Biomacromolecules* **5**, 2247 (2004).
39. G. J. Thomas, Jr., J. M. Benevides, S. A. Overman, T. Ueda, K. Ushizawa, M. Saitoh, and M. Tsuboi, *Biophys. J.* **68**, 1073 (1995).
40. M. Tsuboi, J. M. Benevides, P. Bondre, and G. J. Thomas, Jr., *Biochemistry* **44**, 4861 (2005).
41. M. Tsuboi, S. A. Overman, and G. J. Thomas, Jr., *Biochemistry* **35**, 10403 (1996).
42. U. P. Agarwal and R. H. Atalla, *Planta* **169**, 325 (1986).
43. M. Pezolet, M. Pigeon, D. Menard, and J. P. Caille, *Biophys. J.* **53**, 319 (1988).
44. M. Kazanci, P. Roschger, E. P. Paschalis, K. Klaushofer, and P. Fratzl, *J. Struct. Biol.* **156**, 489 (2006).
45. H. Tsuda and J. Arends, *J. Dentul Res.* **73**, 1703 (1994).
46. M. G. Sowa, D. P. Popescu, J. Werner, M. Hewko, A. C. Ko, J. Payette, C. C. Dong, B. Cleghorn, and L. P. Choo-Smith, *Anal. Bioanal. Chem.* **387**, 1613 (2007).
47. A. C.-T. Ko, L. P. Choo-Smith, M. Hewko, M. G. Sowa, C. C. S. Dong, and B. Cleghorn, *Opt. Exp.* **14**, 203 (2006).
48. Z. J. Smith and A. J. Berger, *Opt. Lett.* **30**, 1363 (2005).
49. N. Rajan, J. Habermehl, M. F. Coté, C. J. Doillon, and D. Mantovani, *Nat. Protoc.* **1**, 2753 (2006).
50. B. G. Frushour and J. L. Koenig, *Biopolymers* **14**, 379 (1975).
51. F. S. Parker, *Applications of Infrared, Raman, and Resonance Raman Spectroscopy in Biochemistry* (Plenum Press, New York, 1983).
52. K. Beck and B. Brodsky, *J. Struct. Biol.* **122**, 17 (1998).
53. K. Altgelt, A. J. Hodge, and F. O. Schmitt, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **47**, 1914 (1961).
54. S. Erkilic and Z. Erbagci, *J. Dermatol.* **28**, 312 (2001).
55. T. R. Humphreys, M. R. Monteiro, and G. F. Murphy, *Dermatol. Surg.* **26**, 200 (2000).
56. L. C. van Kempen, D. J. Ruiter, G. N. van Muijen, and L. M. Coussens, *Eur. J. Cell Biol.* **82**, 539 (2003).
57. S. Tajima, T. Nishikawa, H. Hatano, and Y. Nagai, *Arch. Dermatol. Res.* **273**, 115 (1982).
58. E. A. Bauer, J. M. Gordon, M. E. Reddick, and A. Z. Eisen, *J. Invest. Dermatol.* **69**, 363 (1977).

*Remarques sur l'article 4*

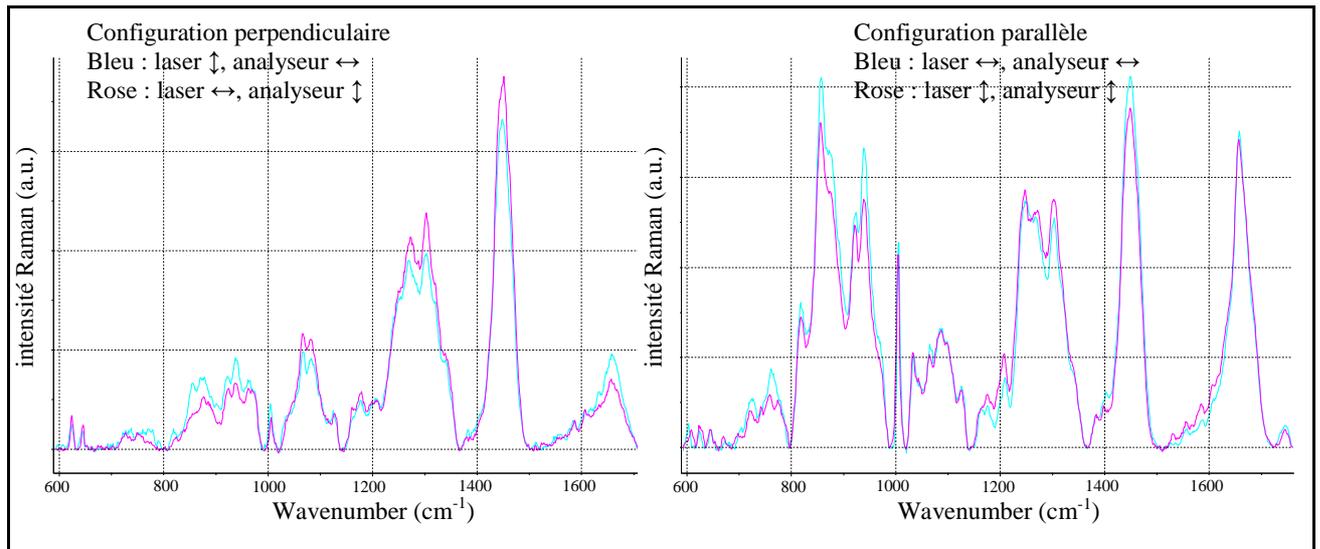
Dans le cas d'échantillons orientés selon un axe (par exemple, fibres orientées), pour une analyse complète, il convient de faire tourner soit l'échantillon, soit la polarisation du champ électrique du laser afin d'enregistrer les intensités  $I_{xx}$  et  $I_{zz}$  (avec  $I_{ij}$  l'intensité du signal Raman lorsque le champ électrique du laser est orienté selon la direction  $i$  et l'analyseur est orienté selon l'axe  $j$ ). Pour le cas d'une fibre isolée, les coordonnées sont choisies telles que l'axe  $z$  corresponde à l'axe de la fibre (cf. Figure III.01). La comparaison de ces deux spectres permet d'obtenir des informations sur la conformation de certains groupes moléculaires par rapport à l'axe de l'échantillon. Par exemple, Rousseau et al. ont découvert que les groupes carbonyles des fibres de soie d'araignée étaient orientés perpendiculairement à l'axe de la fibre et que les feuillets  $\beta$  étaient orientés parallèlement à l'axe de la fibre (Rousseau et al., 2004).



**Figure III.01 : Système d'axes utilisées pour des mesures en Raman polarisé sur des fibres uniques** (Rousseau et al., 2004)

Dans un tissu complexe comme la peau, il n'est pas possible de cibler et d'analyser une fibre unique de collagène. Le volume analysé représente **un ensemble de fibres de collagène entremêlées tridimensionnellement**.

Dans notre étude, le changement de polarisation du laser (ou la rotation de l'échantillon) ne permet pas d'obtenir des informations supplémentaires puisqu'il est impossible de déterminer un axe préférentiel de géométrie au sein du tissu. En effet, la comparaison des spectres Raman polarisés dans les configurations "parallèle" et "perpendiculaire" (obtenus en faisant tourner la polarisation du laser excitateur) ne met pas en évidence de différence significative (Figure III.02).



**Figure III.02 : Influence de la polarisation du laser sur les spectres Raman enregistrés sur une coupe de peau**

Pour un même point d'acquisition, quatre spectres Raman polarisés ont été enregistrés, en configuration parallèle (laser et analyseur orientés selon la même direction) et en configuration perpendiculaire. Dans les deux types de configuration, il existe peu de différences entre les spectres bleus et les spectres roses. Changer la polarisation du laser (ou faire tourner l'échantillon) n'apporte pas d'informations supplémentaires.

### **III.3 Article #5 : Probing tumour and peritumoral tissues in superficial and nodular basal cell carcinoma using polarized Raman microspectroscopy**

#### *Contexte*

Après avoir montré l'intérêt de la microspectroscopie Raman polarisée dans la discrimination derme péri-tumoral/derme à distance de la tumeur, nous avons considéré dans cette nouvelle étude, différents types de carcinomes.

#### *Méthodes*

Six échantillons de BCC congelés (de types superficiel et nodulaire) ont été analysés. Quatre zones d'intérêt ont été sélectionnées : l'épiderme sain, la tumeur, le derme péri-tumoral et le derme à distance de la tumeur. Pour chaque point d'acquisition, trois spectres ont été enregistrés : en mode Raman conventionnel, en mode polarisé parallèle et en mode polarisé perpendiculaire.

#### *Résultats*

Les **ratios de dépolarisation** ( $\rho = \frac{I_{\perp}}{I_{\parallel}}$ ) de certaines raies Raman sont statistiquement différents selon la nature du tissu (sain/tumoral ou péri-tumoral/non péri-tumoral) et peuvent constituer des marqueurs spectroscopiques très sensibles pour l'aide au diagnostic de ces lésions. Une **analyse statistique multivariée** (HCA) des spectres permet de montrer que la discrimination en aveugle tumeur/épiderme sain est possible, mais surtout que la technique Raman polarisée renforce sensiblement le potentiel discriminant de la microspectroscopie Raman conventionnelle. Nous avons également mis en évidence des **modifications biomoléculaires très fines** au niveau du derme péri-tumoral, indétectables par coloration standard.

#### *Conclusion*

Cette étude sur les types histologiques de BCC les plus fréquemment rencontrés montre le réel potentiel de la technique Raman polarisée pour l'aide au diagnostic des carcinomes cutanés. Les mesures effectuées sont non destructives et ne nécessitent aucune préparation ou coloration particulière de l'échantillon. La spectroscopie Raman polarisée apparaît alors comme une technique présentant de nombreux atouts pour être développée comme outil d'aide au diagnostic des cancers cutanés.

En attente de validation des corrections

## Probing tumour and peritumoral tissues in superficial and nodular basal cell carcinoma using polarized Raman microspectroscopy

Journal:	<i>Experimental Dermatology</i>
Manuscript ID:	EXD-09-0105.R1
Manuscript Type:	Methods
Date Submitted by the Author:	
Complete List of Authors:	Ly, Elodie; Université de Reims-Champagne Ardenne, Unité MÉDIAN CNRS UMR 6237 MEDyC Durlach, Anne; CHU Maison Blanche, Laboratoire Pol Bouin Antonicelli, Frank; Université de Reims-Champagne Ardenne, Laboratoire de Biochimie et de Dermatologie, CNRS UMR 6237 MEDyC Bernard, Philippe; CHU Robert Debré, Service de Dermatologie; Université de Reims-Champagne Ardenne, Laboratoire de Biochimie et de Dermatologie, CNRS UMR 6237 MEDyC Manfait, Michel; Université de Reims-Champagne Ardenne, Unité MÉDIAN CNRS UMR 6237 MEDyC Piot, Olivier; Université de Reims-Champagne Ardenne, Unité MÉDIAN CNRS UMR 6237 MEDyC
Keywords:	basal cell carcinoma, peritumoral stroma, polarized Raman microspectroscopy

**Probing tumour and peritumoral tissues in superficial and nodular basal cell carcinoma  
using polarized Raman microspectroscopy**

**Elodie Ly<sup>1</sup>, Anne Durlach<sup>2</sup>, Frank Antonicelli<sup>3</sup>, Philippe Bernard<sup>3, 4</sup>, Michel Manfait<sup>1</sup> and  
Olivier Piot<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup> Unité MéDIAN UMR CNRS 6237 MEDyC, UFR de Pharmacie, IFR 53, Université Reims-  
Champagne Ardenne, 51 rue Cognacq-Jay, 51096 Reims Cedex, FRANCE,

Tel: +33 3 26918128, Fax: +33 3 26913550, Email: olivier.piot@univ-reims.fr

<sup>2</sup> Laboratoire Pol Bouin, CHU Maison-Blanche, 45 rue Cognacq-Jay, 51092 Reims Cedex,  
FRANCE

<sup>3</sup> Laboratoire de Biochimie et de Dermatologie UMR CNRS 6237 MEDyC, UFR de Médecine,  
IFR 53, Université Reims-Champagne Ardenne, 51 rue Cognacq-Jay, 51095 Reims Cedex,  
FRANCE

<sup>4</sup> Service de Dermatologie, CHU Robert Debré, Avenue du Général Koenig, 51092 Reims  
Cedex, FRANCE

\* Corresponding author

Key words: basal cell carcinoma, peritumoral stroma, polarized Raman microspectroscopy

Abbreviations: BCC, basal cell carcinoma; NMSC, non-melanoma skin cancer

## ABSTRACT

Basal cell carcinoma (BCC) can sometimes lead, through a possible invasion of the dermis and the subcutaneous tissue, to serious local damage to the patient. Several histological types of BCC are reported, among them, the superficial, nodular, and infiltrative forms. This study reports the use of polarized Raman microspectroscopy on the nodular and superficial types to discriminate between healthy epidermis and tumour, and between normal and peritumoral stroma. This technique probes additional information than conventional Raman spectroscopy because it is sensitive to the molecular ordering of tissue components. Depolarization ratios and hierarchical cluster analysis demonstrate that polarized Raman microspectroscopy can better identify the tumour and the peritumoral dermis than conventional Raman microspectroscopy, and hence gives potential complementary data about their molecular characteristics (molecular composition, secondary structure of proteins, intra- and/or inter-molecular bonding). Our findings also show that although superficial and nodular types of BCC were analyzed, clear differences between the spectra of peritumoral and normal dermis could be detected.

## INTRODUCTION

Basal cell carcinoma (BCC) accounts for about 80% of all non-melanoma skin cancers (NMSCs). It mainly affects people over 55 of age in sun-exposed body areas (1, 2). BCC appears *de novo*, and it has been suggested that it arises from interfollicular basal cells or keratinocytes in hair follicles or sebaceous glands (3, 4). It is slow growing and will exceptionally metastasize. However, certain histological types such as infiltrative or morpheaform BCCs are invasive locally, and can cause serious local damage (1, 5). These characteristics suggest the possibility of specific interactions with the surrounding stroma, although their mechanisms involved with regards to tumour proliferation or inhibition in BCC are largely unknown (6, 7).

Different biophysical techniques are now being assessed as promising tools for skin characterization, they include for example, ultrasound imaging (8), profilometry (9, 10), transmittance and reflectance measurements (11, 12), and optical coherence tomography (13-15).

Among them, Raman microspectroscopy is an optical method that relies on the inelastic interaction between light and matter. For this purpose, a monochromatic light is focused in order to probe the sample with a spatial resolution as small as 2 microns. In complex samples such as skin tissues, it can provide information about the vibrational energies of the biomolecular constituents of the sample. It is a non-destructive technique that does not require dyes and can be applied *in vivo* (16) using appropriate fibre optic probes (17-19). Molecular interactions and conformations can also be analyzed *in situ* (20-27). An original study recently carried out in our laboratory has shown the interest of polarization-sensitive Raman microspectroscopy to obtain additional information on ordered biomolecules such as collagen (28). In this study, we showed that certain vibrations are highly polarized and their Raman signal largely depends on the relative polarizations (parallel or perpendicular) of the exciting laser beam and of the Raman light. Based

1  
2  
3 on these findings, in the present study, we have analyzed conventional and polarization-sensitive  
4 Raman spectra collected on superficial and nodular types of BCC at different locations (tumour,  
5 peritumoral stroma, normal epidermis, and normal dermis). This study focuses on the spectral  
6 differences between tumour and normal epidermis, and between peritumoral stroma and normal  
7 dermis to evaluate the potential benefit of polarized microspectroscopy in patient care.  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16

## 17 MATERIALS AND METHODS

### 18 Sample preparation

19  
20 Six samples of typical superficial (n=4) and poorly-invasive nodular (n=2) BCCs were obtained  
21 from the Pathology department of the Maison-Blanche University Hospital (Reims). Each tissue  
22 block was mounted onto the cryostat chuck with a drop of optical cutting medium, 20 micron-  
23 thick cryosections were placed on a calcium fluoride (CaF<sub>2</sub>) substrate (Crystran Ltd., Dorset,  
24 UK) and stored at -20°C until acquisition. Raman measurements were performed when the  
25 samples had thawed at room temperature. Areas of interest were precisely identified following  
26 the guidelines of a pathologist on adjacent sections conventionally stained with hematoxylin-  
27 and-eosin (HE). Tumour regions were easily demarcated from the rest of the tissue but remained  
28 in close contact with the overlying epidermis, in the case of superficial BCCs, or with the  
29 superficial dermis. The region corresponding to the peritumoral stroma was located just below  
30 the tumour, in the dermis. Normal epidermis consisted in healthy-appearing uninvolved  
31 epidermis located at a great distance from the tumour in the tissue block (> 1 mm), and normal  
32 dermis was located in the superficial dermis adjacent to the normal epidermis. On one of the  
33 superficial BCC sample, the tumour was not present on the analyzed section.  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## Raman instrumentation

The polarized Raman instrumentation and the skin sample geometry have been described previously (28). Briefly, polarization-dependant Raman spectra were recorded with a Labram microspectrometer (Horiba Jobin Yvon, Lille, France) operating with a near-infrared laser excitation at 785 nm (Spectra Physics, Les Ulis, France). A polarization analyzer (Melles Griot, Voisins-le-Bretonneux, France) was placed before the entrance slit of the spectrometer to permit the detection of the polarized scattered Raman light along the directions parallel and perpendicular to the laser polarization. A broad-band quarter-wave plate (Melles Griot, Voisins-le-Bretonneux, France) was placed after the analyzer to compensate for the polarization dependence of the detector. The laser excitation was focused on the sample using a 100X objective (numerical aperture: 0.9, Olympus). The system was equipped with a controlled stage allowing the recording of spectral images (mapping mode). A screen image recorder camera attached to the microscope enabled the acquisition of the white-light image for the selection of the regions of interest.

## Raman data

For each tissue section, four areas of about  $100 \times 100 \mu\text{m}^2$  were analyzed, each corresponding to the tumour, the peritumoral stroma, the histologically-appearing-normal epidermis (referred as normal or healthy) and the normal dermis. These areas were scanned point-by-point (mapping mode) using a step size of  $20 \mu\text{m}$ . Three spectra were recorded at each position, one using conventional Raman spectroscopy, and two using polarized Raman spectroscopy, with the analyzer oriented along the directions parallel and perpendicular to the laser polarization. The signal collection time for each recording was adapted to the sample and to the signal polarization

(between 10 and 180 seconds) in order to have equivalent signal to noise ratios (28). In all cases, the spectral range was set from 600 to 1750  $\text{cm}^{-1}$  with a 4  $\text{cm}^{-1}$  spectral resolution.

## Data processing

The spectral analyses were carried out using Matlab 7.2 (The Mathworks, Natick, MA) and the Labspec 4 software (Horiba Jobin Yvon, Lille, France).

### *Wavenumber calibration and sensitivity correction*

The spectrometer was calibrated using a neon source as a reference for absolute wavenumbers.

The excitation wavelength was measured using the Raman spectrum of cyclohexane and a Petri dish as references. The wavelength dependency of the detector was corrected for using the response of a calibration standard (standard reference material #2241, NIST, Gaithersburg, MD).

This spectrum was also used to correct for the polarization dependence of the optical elements of the Raman spectrometer. The contributions of the dark current and of the background from the  $\text{CaF}_2$  window were also subtracted for each spectrum (28).

### *Data preprocessing*

Spectra were Savitsky-Golay filtered (11 points, third order), baseline corrected using a sixth-order polynomial and normalized across the whole wavenumber range (29).

### *Depolarization ratios*

The depolarization ratio of a vibration was computed by calculating the ratio between the integrated area of the peak in the perpendicular configuration to its integrated area in the parallel configuration.

## Statistical analysis

1  
2  
3 Data are presented as mean  $\pm$ SD and have been analyzed with Student's *t*-test (SYSTAT, Systat  
4 Software Inc., Chicago, IL) to evaluate the statistical significance ( $p < 0.05$ ) of the differences in  
5 the depolarization ratios. Statistically significant differences are denoted by asterisks as follows:  
6  
7  
8  
9  
10 \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , and \*\*\* $p < 0.001$ .

### 11 12 *Hierarchical Clustering Analysis*

13  
14  
15 Hierarchical clustering analysis (HCA) was used to quantify the discriminating power of the  
16 techniques used. It regroups spectra into clusters on a minimal distance criterion and such a  
17 clustering is displayed in a tree-like diagram called a dendrogram (30). Euclidian distances and  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
Ward's algorithm were applied using built-in Matlab functions from the Statistical Toolbox.

## 27 **RESULTS AND DISCUSSION**

### 28 29 **Depolarization ratios are potential markers of tumour progression**

30  
31  
32 To assess the diagnostic potential of polarized Raman microspectroscopy for superficial and  
33 nodular BCC, depolarization ratios were calculated using the polarized Raman spectra recorded  
34 in the perpendicular and parallel configurations (analyzer oriented perpendicular or parallel to  
35 the exciting laser polarization) on the vibrations bands listed in Table 1, selected from the  
36 literature (20-22, 24, 28, 31-33). Figure 1a shows the depolarization ratios calculated on a total  
37 of 115 spectra recorded from the six skin specimens in the tumour ( $n=45$ ) and in the healthy  
38 epidermis ( $n=70$ ). The depolarization ratios of the bands corresponding to phenylalanine ( $623$   
39  $\text{cm}^{-1}$ ,  $1339 \text{ cm}^{-1}$ ), tyrosine ( $644 \text{ cm}^{-1}$ ), polysaccharides ( $1128 \text{ cm}^{-1}$ ) and trans hydrocarbon chains  
40 ( $1128 \text{ cm}^{-1}$ ) in spectra from the tumour were lower from those recorded in the normal epidermis,  
41 representing potential markers to discriminate the tumour tissue and the epidermis. Figure 1b  
42 shows the depolarization ratios calculated from spectra recorded in the tumour-bordering stroma

(peritumoral stroma) (n=46) and in the dermis very far from the tumour (normal dermis) (n=77).

In this case, the depolarization ratios of the bands of the peritumoral stroma corresponding mainly to lipids ( $1065\text{ cm}^{-1}$ ), and to collagens and other various proteins ( $920\text{ cm}^{-1}$ ,  $940\text{ cm}^{-1}$ ,  $1065\text{ cm}^{-1}$  and  $1128\text{ cm}^{-1}$ ) were different from those of the healthy dermis.

Interestingly, the differences in spectra between the peritumoral and normal dermis were lower than the differences between the tumour tissue and the normal epidermis, as shown by the p-values in Figures 1a and 1b. The molecular modifications probed by polarized Raman microspectroscopy involved in the stroma were less significant than those involved in the tumour. This could reflect the fact that the modifications in the peritumoral stroma do not affect the morphology yet. In contrast, the morphology of the tumour is quite different from that of normal epidermis.

The use of polarized Raman microspectroscopy shows that depolarization ratios of selected vibrations could be potential diagnostic markers to distinguish between the tumour and normal epidermis, as between peritumoral and normal dermis. As such, polarized Raman microspectroscopy could bring additional relevant information over the conventional approach.

Similar results have been previously reported for the detection of carious lesions in teeth (34). Here the relevance of depolarization ratios is demonstrated for the first time on a tissue as complex as skin. The ratios were calculated on spectral bands that are characteristic of cellular constituents for the tumour, and of collagens and non-collagenous proteins for the surrounding stroma.

**Polarized Raman microspectroscopy is more discriminative than conventional Raman microspectroscopy**

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

The discriminative potential of the technique was assessed by performing hierarchical cluster analysis to discriminate between tumour and healthy epidermis in the 602-1200  $\text{cm}^{-1}$  spectral range. This spectral window corresponds mainly to vibrations of DNA, RNA and protein residues (22, 24, 32). This statistical analysis was performed on the Raman spectra in the conventional and parallel-polarized modes. Figure 2 shows the dendrograms obtained by classifying spectra from tumour and epidermis. A dendrogram allows visualizing the grouping of spectra into clusters according to a resemblance criterion. To evaluate the discriminative power of this approach, the ratio (denoted R) between the between-group distance (heterogeneity) and the within-group distance for the tumoral tissue was calculated (see black dots in Figure 2). The highest the ratio, the better the discrimination was. Raman spectra of tumour and healthy epidermis could be well differentiated (the dotted lines can separate the two groups) using either conventional or parallel-polarized Raman analysis as only few spectra were misclassified. Besides, the ratio R was higher for parallel-polarized Raman spectra compared to conventional Raman spectra. It therefore indicates that not only can polarized Raman spectroscopy discriminate between healthy epidermis and tumour, but it also enhances the discrimination, giving more sensitivity as a potential aid-to-diagnostic tool. The maximization of this ratio is a rule of thumb in classification algorithms (35). No additional results were obtained from perpendicular-polarized Raman spectra.

Some spectra recorded on the tumour area were misclassified as epidermis spectra (see frames in Figures 2a and 2b). These spectra presented spectral characteristics very similar to those from healthy epidermis, although they were recorded on the tumour tissue. Interestingly, all these misclassified spectra were recorded from a single superficial BCC sample. Importantly, all the analyses were carried out on relatively thick sections (20 micron-thick) where the three-

1  
2  
3 dimensional aspect of the tumour is lost. Consequently, although tumour areas could be clearly  
4 distinguishable in the adjacent hematoxylin-and-eosin-stained section of the misclassified  
5 superficial BCC sample, they could have been actually very small and thin in the analyzed  
6 unstained section.  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14

### 15 **Polarized Raman spectroscopy can monitor very subtle changes in the peritumoral stroma**

16  
17 Figure 3 displays parallel-polarized Raman spectra acquired on the peritumoral stroma of a  
18 representative sample of superficial BCC analyzed in this study, in order to compare spectra  
19 located very close to the tumour (~10  $\mu\text{m}$ ), close to the tumour (~30  $\mu\text{m}$ ), and at a greater  
20 distance (>30  $\mu\text{m}$ ). Spectral differences were clearly noticeable between the different locations  
21 (see shaded bars in Figure 3b), all located at the vicinity of the tumour. First, differences of the  
22 relative integrated areas of tyrosine Fermi resonance doublet (bands centred at 850  $\text{cm}^{-1}$  and 830  
23  $\text{cm}^{-1}$ ) indicated a modification of tyrosine conformation. More specifically, the decrease of the  
24 band ratios ( $A_{850}/A_{830}$ ) at the vicinity of the tumour suggested that the phenol group of tyrosine is  
25 exposed and acts as a hydrogen donor, likely to form intermolecular bonds near the tumour (36).  
26 Besides, the peak centred at 920  $\text{cm}^{-1}$  decreased in intensity and even completely disappeared in  
27 the tumour vicinity, while the band centred at 940  $\text{cm}^{-1}$  became larger. Such a phenomenon has  
28 already been reported by Frushour and Koenig who studied the Raman spectrum of gelatine (37).  
29 The analysis of perpendicular-polarized Raman spectra did not bring complementary information  
30 (data not shown). Taken together, these results could reflect collagen degradation by matrix  
31 metalloproteinases (human skin collagenase, MMP-1, MMP-8 and MMP-13) at the vicinity of  
32 the tumour (24, 38-41). In addition, changes of the Amide III band (around 1300  $\text{cm}^{-1}$ ) confirm  
33 these outcomes by revealing modifications of the protein secondary structure that are correlated  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 to the distance to the tumour. A previous feasibility study carried out in our laboratory has  
4 suggested the great potential of polarized Raman spectroscopy for detecting very subtle changes  
5 in the peritumoral dermis in BCC (28). The present study, performed on the superficial and  
6 nodular types of BCC, which account for about 80% of the clinical cases of BCC in France (42),  
7 confirms the original findings and strongly suggests the diagnostic potential of polarized Raman  
8 microspectroscopy for discriminating healthy epidermis from the tumour. Bertheim et al reported  
9 that in the superficial type of BCC, the stroma is not yet remodelled or modified by the tumour  
10 cells (6). In their study, immunohistochemistry by hyaluronan staining was used to compare the  
11 stromal reaction in the superficial, nodular and infiltrative types of BCC. In contrast, our present  
12 results show that the peritumoral dermis in superficial and nodular BCC can be easily  
13 demarcated from normal dermis, suggesting that the surrounding stroma is actually modified to a  
14 certain extent by the tumour tissue, such modifications being not detectable by hematoxylin-and-  
15 eosin or hyaluronan staining (6). The analysis of more aggressive types of BCC (such as  
16 infiltrating or morpheaform BCC) could permit the identification of spectral markers that are  
17 characteristic of the aggressiveness of the tumoral growth pattern, which remains unidentified  
18 using conventional protein expression profile analysis (40).

19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41 It has been reported that BCC tumours are extremely stromal dependent regarding their  
42 evolution, proliferation and invasive behaviours (2, 6). Polarized Raman microspectroscopy  
43 appears as an innovative optical tool with a high potential for improving the diagnosis and  
44 therefore help in the treatment of NMSC. Our present data demonstrate that the adjacent healthy  
45 skin can be easily discriminated from the tumour and that early stages of BCC invasion within  
46 the dermis can be detected. In addition, compared to conventional Raman spectroscopy, this  
47 study illustrates that the polarization of the Raman signal brings additional relevant information  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 on the molecular ordering of molecular biomolecules, and that it can better discriminate between  
4  
5 the tumour tissue and the normal epidermis.  
6  
7  
8  
9

## 10 **ACKNOWLEDGMENTS**

11  
12 E.L is a postgraduate fellow from CNRS and Région Champagne-Ardenne. This work was  
13  
14 supported by Ligue contre le cancer, Comité de l'Aisne and CNRS (projets PEPS).  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

For Review Only

**REFERENCES**

1. Crowson A N. Basal cell carcinoma: biology, morphology and clinical implications. *Mod Pathol* 2006; 19 Suppl 2: S127-147.
2. Rubin A I, Chen E H, Ratner D. Basal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2005; 353: 2262-2269.
3. Lacour J P. Carcinogenesis of basal cell carcinomas: genetics and molecular mechanisms. *Br J Dermatol* 2002; 146 Suppl 61: 17-19.
4. Markey A C, Lane E B, Macdonald D M, Leigh I M. Keratin expression in basal cell carcinomas. *Br J Dermatol* 1992; 126: 154-160.
5. Raasch B A, Buettner P G, Garbe C. Basal cell carcinoma: histological classification and body-site distribution. *Br J Dermatol* 2006; 155: 401-407.
6. Bertheim U, Hofer P A, Engstrom-Laurent A, Hellstrom S. The stromal reaction in basal cell carcinomas. A prerequisite for tumour progression and treatment strategy. *Br J Plast Surg* 2004; 57: 429-439.
7. van Kempen L C, Ruiter D J, van Muijen G N, Coussens L M. The tumor microenvironment: a critical determinant of neoplastic evolution. *Eur J Cell Biol* 2003; 82: 539-548.
8. Zhang E Z, Laufer J G, Pedley R B, Beard P C. In vivo high-resolution 3D photoacoustic imaging of superficial vascular anatomy. *Physics in Medicine and Biology* 2009; 54: 1035-1046.
9. Rallan D, Harland C C. Skin imaging: is it clinically useful? *Clin Exp Dermatol* 2004; 29: 453-459.
10. Lagarde J M, Rouvrais C, Black D, Diridollou S, Gall Y. Skin topography measurement by interference fringe projection: a technical validation. *Skin Res Technol* 2001; 7: 112-121.
11. Guitera P, Pellacani G, Longo C, Seidenari S, Avramidis M, Menzies S W. In vivo reflectance confocal microscopy enhances secondary evaluation of melanocytic lesions. *J Invest Dermatol* 2009; 129: 131-138.
12. Choi Y S, Hong H K, Kim B J, Kim M N, Park H D. Development of a non-invasive measurement system to the thickness of the subcutaneous adipose tissue layer. *Exp Dermatol* 2008; 17: 537-541.
13. Gambichler T, Orlikov A, Vasa R, et al. In vivo optical coherence tomography of basal cell carcinoma. *J Dermatol Sci* 2007; 45: 167-173.
14. Godavarty A, Thompson A B, Roy R, et al. Diagnostic imaging of breast cancer using fluorescence-enhanced optical tomography: phantom studies. *J Biomed Opt* 2004; 9: 488-496.

15. Strasswimmer J, Pierce M C, Park B H, Neel V, de Boer J F. Polarization-sensitive optical coherence tomography of invasive basal cell carcinoma. *Journal of Biomedical Optics* 2004; 9: 292-298.
16. Boncheva M, de Sterke J, Caspers P J, Puppels G J. Depth profiling of Stratum corneum hydration in vivo: a comparison between conductance and confocal Raman spectroscopic measurements. *Experimental Dermatology* 2009: In press.
17. Lieber C A, Majumder S K, Ellis D L, Billheimer D D, Mahadevan-Jansen A. In vivo nonmelanoma skin cancer diagnosis using Raman microspectroscopy. *Lasers Surg Med* 2008; 40: 461-467.
18. Chrit L, Bastien P, Sockalingum G D, 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: 207-215.
19. Chrit L, Hadjur C, Morel S, et al. In vivo chemical investigation of human skin using a confocal Raman fiber optic microprobe. *J Biomed Opt* 2005; 10: 44007.
20. Caspers P J, Lucassen G W, Puppels G J. Combined in vivo confocal Raman spectroscopy and confocal microscopy of human skin. *Biophys J* 2003; 85: 572-580.
21. Caspers P J, Lucassen G W, Wolthuis R, Bruining H A, Puppels G J. In vitro and in vivo Raman spectroscopy of human skin. *Biospectroscopy* 1998; 4: S31-39.
22. Nijssen A, Bakker Schut T C, Heule F, et al. Discriminating basal cell carcinoma from its surrounding tissue by Raman spectroscopy. *J Invest Dermatol* 2002; 119: 64-69.
23. Nijssen A, Maquelin K, Santos L F, et al. Discriminating basal cell carcinoma from perilesional skin using high wave-number Raman spectroscopy. *J Biomed Opt* 2007; 12: 034004.
24. Short M A, Lui H, McLean D, Zeng H, Alajlan A, Chen X K. Changes in nuclei and peritumoral collagen within nodular basal cell carcinomas via confocal micro-Raman spectroscopy. *J Biomed Opt* 2006; 11: 34004.
25. Lieber C A, Majumder S K, Billheimer D, Ellis D L, Mahadevan-Jansen A. Raman microspectroscopy for skin cancer detection in vitro. *J Biomed Opt* 2008; 13: 024013.
26. Zhang G, Moore D J, Mendelsohn R, Flach C R. Vibrational microspectroscopy and imaging of molecular composition and structure during human corneocyte maturation. *J Invest Dermatol* 2006; 126: 1088-1094.
27. Zhang G, Flach C R, Mendelsohn R. Tracking the dephosphorylation of resveratrol triphosphate in skin by confocal Raman microscopy. *J Control Release* 2007; 123: 141-147.
28. Ly E, Piot O, Durlach A, Bernard P, Manfait M. Polarized Raman microspectroscopy can reveal structural changes of peritumoral dermis in basal cell carcinoma. *Appl Spectrosc* 2008; 62: 1088-1094.

- 1  
2  
3 29. Savitzky A, Golay M J E. Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least  
4 Squares Procedures. *Analytical Chemistry* 1964; 36: 1627-1639.
- 5  
6 30. Lasch P, Haensch W, Naumann D, Diem M. Imaging of colorectal adenocarcinoma using  
7 FT-IR microspectroscopy and cluster analysis. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1688: 176-186.
- 8  
9 31. Tfayli A, Piot O, Draux F, Pitre F, Manfait M. Molecular characterization of  
10 reconstructed skin model by Raman microspectroscopy: Comparison with excised human skin.  
11 *Biopolymers* 2007; 87: 261-274.
- 12  
13 32. Thomas G J, Jr., Benevides J M, Overman S A, et al. Polarized Raman spectra of oriented  
14 fibers of A DNA and B DNA: anisotropic and isotropic local Raman tensors of base and  
15 backbone vibrations. *Biophys J* 1995; 68: 1073-1088.
- 16  
17 33. Meade A D, Lyng F M, Knief P, Byrne H J. Growth substrate induced functional changes  
18 elucidated by FTIR and Raman spectroscopy in in-vitro cultured human keratinocytes. *Anal*  
19 *Bioanal Chem* 2007; 387: 1717-1728.
- 20  
21 34. Ko A C, Hewko M, Sowa M G, Dong C C, Cleghorn B, Choo-Smith L P. Early dental  
22 caries detection using a fibre-optic coupled polarization-resolved Raman spectroscopic system.  
23 *Opt Express* 2008; 16: 6274-6284.
- 24  
25 35. Ripley B D. Pattern recognition and neural networks. Cambridge: Cambridge University  
26 Press: 1996.
- 27  
28 36. Siamwiza M N, Lord R C, Chen M C, et al. Interpretation of the doublet at 850 and 830  
29 cm<sup>-1</sup> in the Raman spectra of tyrosyl residues in proteins and certain model compounds.  
30 *Biochemistry* 1975; 14: 4870-4876.
- 31  
32 37. Frushour B G, Koenig J L. Raman scattering of collagen, gelatin, and elastin.  
33 *Biopolymers* 1975; 14: 379-391.
- 34  
35 38. Bauer E A, Gordon J M, Reddick M E, Eisen A Z. Quantitation and  
36 immunocytochemical localization of human skin collagenase in basal cell carcinoma. *J Invest*  
37 *Dermatol* 1977; 69: 363-367.
- 38  
39 39. Schlagenhauff B, Klessen C, Teichmann-Dorr S, Breuninger H, Rassner G.  
40 Demonstration of proteases in basal cell carcinomas. A histochemical study using amino acid-4-  
41 methoxy-2-naphthylamides as chromogenic substrates. *Cancer* 1992; 70: 1133-1140.
- 42  
43 40. Varani J, Hattori Y, Chi Y, et al. Collagenolytic and gelatinolytic matrix  
44 metalloproteinases and their inhibitors in basal cell carcinoma of skin: comparison with normal  
45 skin. *Br J Cancer* 2000; 82: 657-665.
- 46  
47 41. Yucel T, Mutnal A, Fay K, et al. Matrix metalloproteinase expression in basal cell  
48 carcinoma: relationship between enzyme profile and collagen fragmentation pattern. *Exp Mol*  
49 *Pathol* 2005; 79: 151-160.
- 50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4 42. Bernard P, Dupuy A, Sasco A, et al. Basal cell carcinomas and actinic keratoses seen in  
5 dermatological practice in France: a cross-sectional survey. *Dermatology* 2008; 216: 194-199.  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

For Review Only

Table 1. Peak frequency and assignment of the vibrations selected for the calculation of the depolarization ratios

Peak position ( $\text{cm}^{-1}$ )	Main molecular constituents probed
623	Phenylalanine
644	Tyrosine
784	DNA, RNA
920	Proline
940	Collagen and other various proteins
1002	Phenylalanine
1065	Fatty acids and phospholipids
1128	Polysaccharides and trans hydrocarbon chains
1210	Tyrosine, phenylalanine, collagen, hydroxyproline
1247	Tropocollagen (proline-rich)
1339	Phenylalanine
1450	Proteins

## FIGURE LEGENDS

### Figure 1

**Depolarization ratios are potential discriminative markers.** (a) Depolarization ratios calculated on healthy epidermis and the tumour, and (b) depolarization ratios calculated on healthy dermis and peritumoral dermis. Error bar: mean  $\pm$  SD

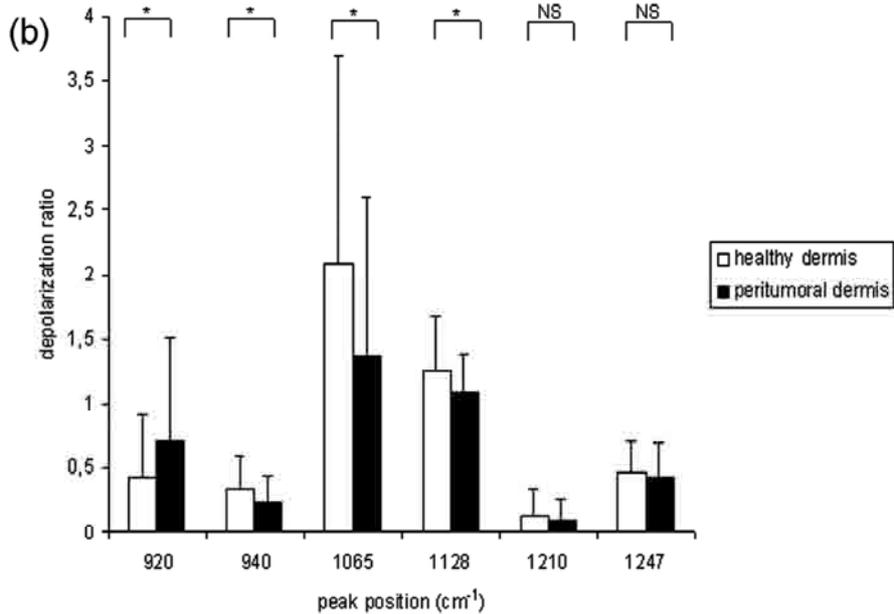
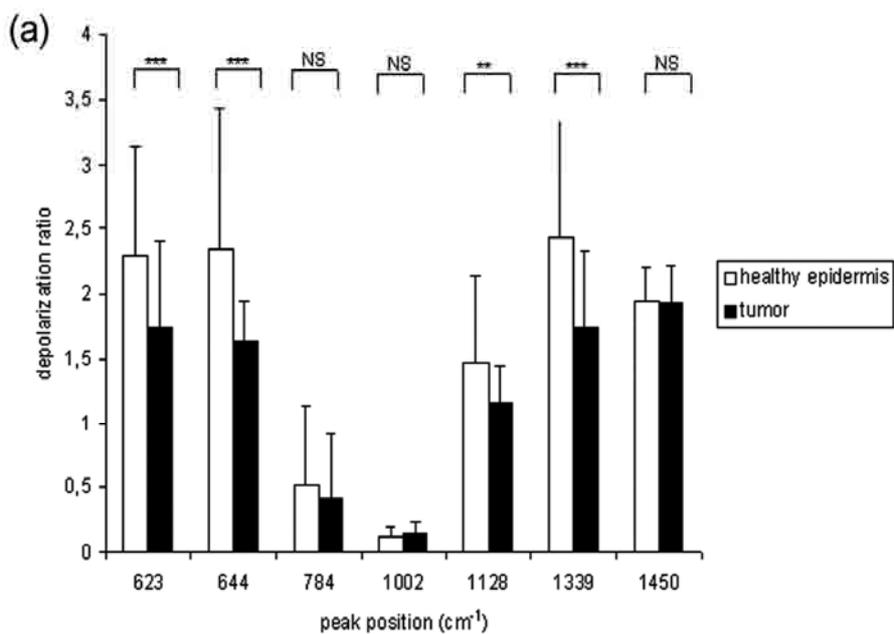
### Figure 2

**Polarized Raman microspectroscopy is more sensitive than conventional Raman microspectroscopy.** Hierarchical cluster analysis (HCA) on spectra from epidermis (black) and tumour (gray) using (a) conventional and (b) parallel-polarized Raman spectra. R is the ratio between the between-group variance and the within-group variance for the tumour.

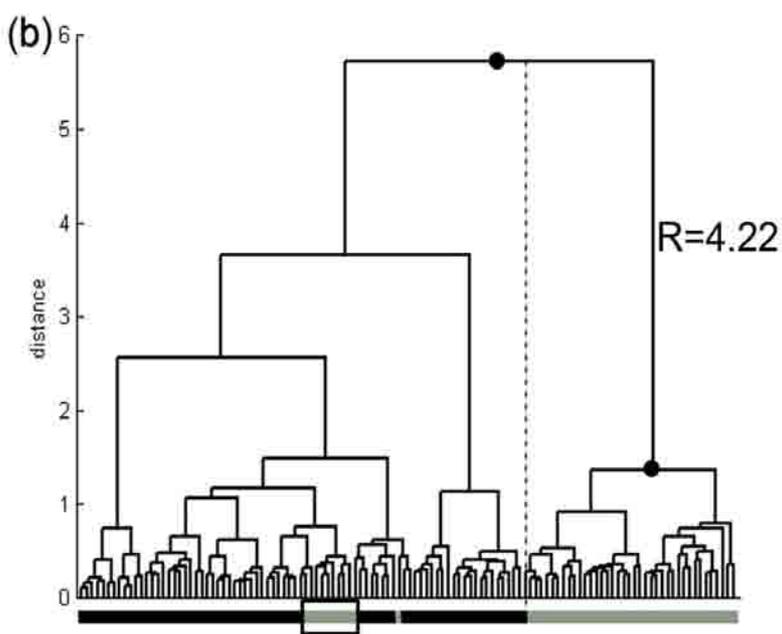
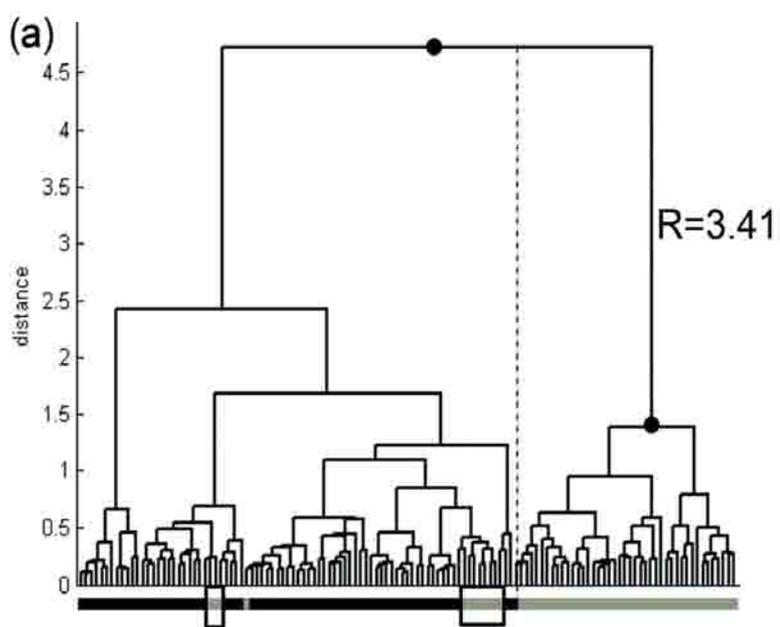
### Figure 3

**Polarized Raman microspectroscopy can monitor very subtle changes in the surrounding stroma.** (a) Photomicrograph of the peritumoral stroma of a superficial BCC. Dots correspond to positions where a Raman spectrum has been recorded: about 10  $\mu\text{m}$  from the tumour (circles), 30  $\mu\text{m}$  from the tumour (squares) and at a greater distance (triangles). T: tumour. (b) Parallel-polarized Raman spectra recorded at about 10  $\mu\text{m}$  from the tumour (top), 30  $\mu\text{m}$  from the tumour (middle) and at a greater distance (bottom). These results are representative of four experiments.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



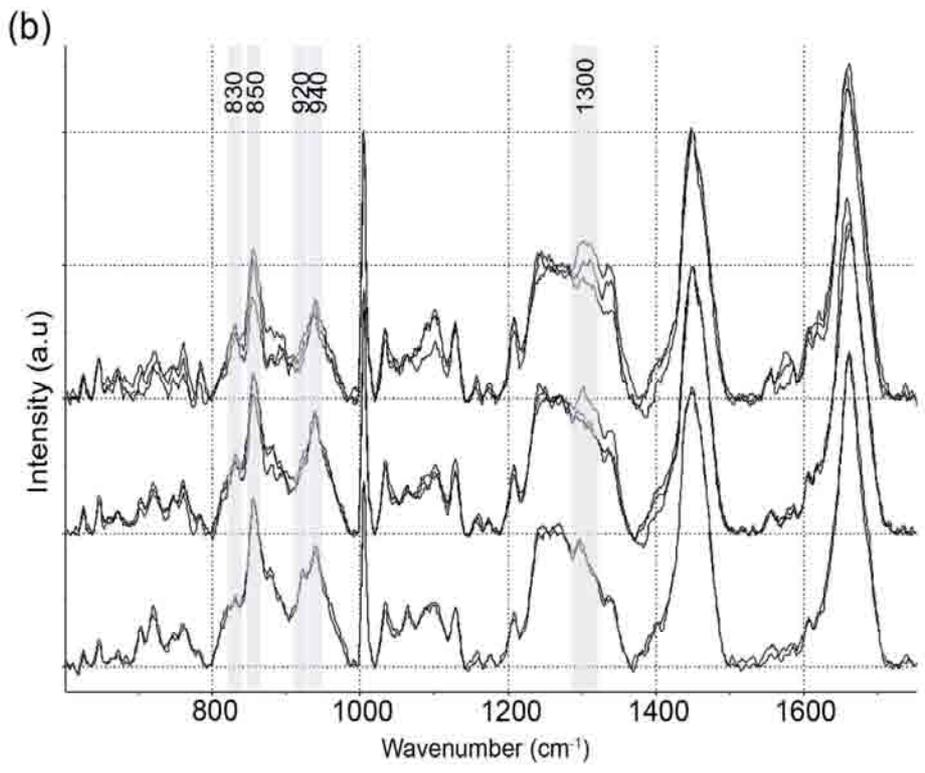
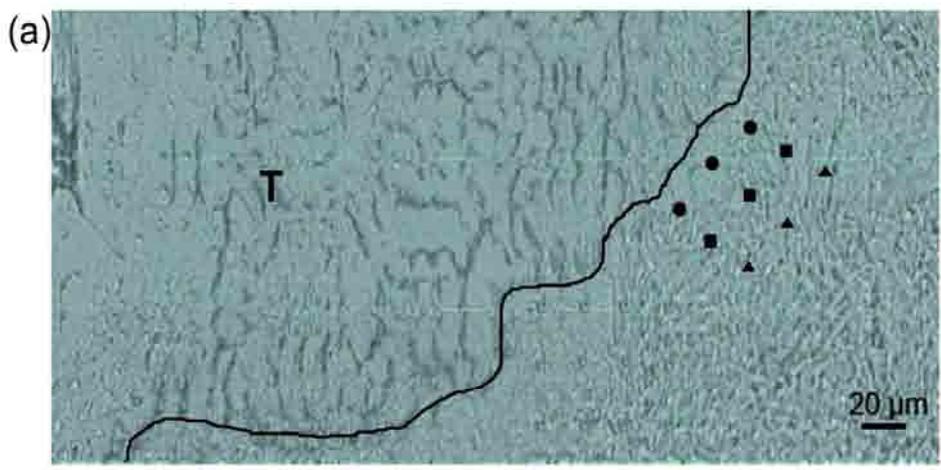
Depolarization ratios are potential discriminative markers  
80x102mm (600 x 600 DPI)



48 Polarized Raman microspectroscopy is more sensitive than conventional Raman microspectroscopy  
49 73x109mm (600 x 600 DPI)

50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



Polarized Raman microspectroscopy can monitor very subtle changes in the surrounding stroma  
80x99mm (600 x 600 DPI)

### **III.4. Perspectives**

Les études que nous avons menées visent à démontrer le potentiel de la spectroscopie Raman polarisée pour des applications diagnostiques en clinique. A notre connaissance, aucune autre étude n'a été réalisée jusqu'à présent dans ce domaine. En ce qui concerne l'analyse du tissu péri-tumoral, on dénombre deux études en spectroscopie Raman conventionnelle : Short et al. se sont intéressés au stroma péri-tumoral au niveau de coupes de BCC (Short et al., 2006) et Cluff et al. ont très récemment analysé le tissu conjonctif lors de l'invasion du tissu par des cellules de tumeur du poumon chez la souris (Cluff et al., 2009).

Nos résultats très prometteurs obtenus sur des coupes de BCC montrent qu'il est possible de discriminer un tissu péri-tumoral d'apparence normale d'un tissu sain. Il est envisagé d'analyser des échantillons de carcinomes cutanés spinocellulaires, présentant une réaction stromale moins efficace et par conséquent un risque de métastases plus marqué. De plus, il serait intéressant d'exploiter les différences spectrales observées de façon à accéder à des informations moléculaires inédites, permettant de mieux comprendre les mécanismes d'invasion des cellules tumorales vers le derme conjonctif. Pour cela, des modèles mimant l'invasion de cellules malignes au sein d'un tissu conjonctif sont en cours de développement au laboratoire dans le cadre du doctorat de Nathalie Mainreck. Des matrices (2D et 3D) de collagène, dans lesquelles sont déposés différents types de cellules de mélanomes présentant des propriétés invasives différentes, sont utilisées et analysées par spectroscopie Raman (conventionnelle et polarisée). L'étude de ces modèles permettra de mettre en évidence d'une part les signatures spectrales des différentes cellules en fonction de leur microenvironnement, et d'autre part les modifications spectrales du collagène au niveau du front de migration cellulaire.

#### **A RETENIR SUR CE CHAPITRE**

- **Nous avons montré la faisabilité de la spectroscopie Raman polarisée sur un tissu biologique complexe telle que la peau.**
- **L'exploitation du signal Raman polarisé apporte des informations complémentaires au signal Raman conventionnel.**
- **Le potentiel discriminant tumeur/peau saine et derme normal/derme péri-tumoral est renforcé par l'analyse des raies de vibrations sensibles à la polarisation.**
- **Les ratios de dépolarisation constituent des marqueurs spectroscopiques additionnels pour des applications diagnostiques.**

# CHAPITRE IV

## EVALUATION DU POTENTIEL DE LA SPECTROSCOPIE RAMAN POUR L'AIDE AU DIAGNOSTIC DES LESIONS CUTANÉES. APPLICATION *IN VIVO* EN CLINIQUE

---

### IV.1 Introduction

Le potentiel diagnostique des spectroscopies vibrationnelles étant établi *in vitro* au niveau de coupes fines tissulaires, nous nous sommes intéressés à développer ces méthodologies pour des applications cliniques. En dermatologie, l'approche spectroscopique intravitale permettrait la réalisation de "**biopsies optiques**" en temps réel, en vue d'aider au **diagnostic précoce** des lésions tumorales cutanées et à **l'identification des limites d'exérèse**.

Le développement de l'outil spectroscopique en milieu clinique est actuellement réalisable grâce à de récentes avancées instrumentales (Chrit et al., 2005; Kanter et al., 2009; Mahadevan-Jansen et al., 1998; Motz et al., 2004; Naito et al., 2008; Shim et al., 2000; Shim and Wilson, 1997). En effet, des améliorations significatives au niveau des sondes de mesures fibrées et des systèmes de détection offrent la possibilité de réaliser des mesures *in vivo* au moyen d'appareils transportables adaptés aux contraintes des services cliniques (stérilité des sondes de mesure, accessibilité au lit du patient, rapidité de la mesure, automatisation de la prise de mesure et convivialité d'utilisation des appareils). De par ses caractéristiques techniques, la spectroscopie Raman est particulièrement bien adaptée à la prise de spectres *in vivo*. La possibilité de coupler par fibres optiques un spectromètre Raman portable, une source de lumière de type diode laser et une sonde de mesure permet en effet de mettre en œuvre des systèmes compacts, facilement manipulables et totalement sécurisés.

Les premières analyses ont été menées au moyen d'une micro-sonde biomédicale à usage endoscopique, non filtrée et donc non optimisée pour la collection de la diffusion Raman d'origine tissulaire (SEDI Fibres Optiques, Courcouronnes, France). Cette sonde a été couplée à un spectromètre Raman portable de type axial (géométrie axiale tubulaire d'encombrement réduit, Horiba Jobin Yvon, Villeneuve d'Ascq). La longueur d'onde d'excitation était fixée à 830 nm. Les mesures *in vivo* ont été réalisées sur des patients consentants, pris en charge dans le service de Dermatologie du CHU Robert Debré de Reims (Pr Philippe Bernard), pour des lésions de type carcinome basocellulaire (BCC) dans le cadre de la thèse de Mr Ali Tfayli (Tfayli, 2007). Les spectres ont été enregistrés au niveau de la lésion, mais également à sa périphérie. Malgré un fort signal parasité de la sonde, cette étude a montré la faisabilité de l'approche *in vivo* pour discriminer les spectres enregistrés sur les lésions des spectres enregistrés à distance (Tfayli et al., 2006).

## IV.2 Matériels et méthodes

### IV.2.1 Appareil utilisé

Compte tenu des résultats précédemment obtenus, des améliorations techniques ont été effectuées. Une nouvelle sonde filtrée (RamanProbe™, InPhotonics, Norwood, MA, USA) a été couplée à un spectromètre Raman portable de type HE (Horiba Jobin Yvon, Villeneuve d'Ascq, France). Cette sonde est constituée d'une fibre émettrice (laser) de 105  $\mu\text{m}$  de diamètre et d'une fibre collectrice (200  $\mu\text{m}$ ) équipée d'un filtre passe-haut en son entrée de façon à éviter l'injection de lumière (laser en partie réfléchi + diffusion Rayleigh de même longueur d'onde que le laser) pouvant induire un signal Raman parasite de la silice constituant la fibre. La distance de travail optimale est de 5 mm. Pour plus de stabilité, un embout plastique permet d'avoir un support stable lors de la prise de mesure, mais également d'avoir une distance de travail constante. Une ouverture a été creusée dans cet embout afin de visualiser avec précision le point d'analyse. En termes de dimension, cette sonde de 12.7 mm de diamètre n'est pas utilisable par voie endoscopique mais convient aux analyses des lésions cutanées (Figure IV.01).



**Figure IV.01 : Sonde de mesure Raman InPhotonics**

La longueur d'onde d'excitation est fixée à **785 nm** ce qui semble être, en comparaison avec une excitation à 830 nm, un bon compromis entre l'intensité de la diffusion, l'émission de fluorescence parasite des tissus et la sensibilité des détecteurs CCD (Charge-Coupled Device) limitée dans le proche infrarouge. Un système de bridage limite la puissance de la source laser proche infrarouge selon les normes admissibles, de façon à réaliser les mesures en toute innocuité. Le système Raman de très faible encombrement est présenté sur la Figure IV.02. Il est composé d'une source laser (diode) et d'un spectromètre Raman piloté par un ordinateur portable par port USB. Un boîtier de commande permet de couper la sortie laser entre les prises de spectres.



**Figure IV.02 : Système Raman portable HE**

Le système est équipé d'une diode laser, d'un spectromètre miniaturisé relié par port USB à un ordinateur portable.

#### IV.2.2 Protocole de mesure

En concertation avec le Pr Philippe Bernard (Service de Dermatologie), un protocole de mesures *in vivo* a été défini. Ces mesures sont totalement non invasives, et elles sont effectuées sur la **peau non-ouverte du patient**, au niveau de la zone d'exérèse, préalablement définie par le chirurgien dermatologue. Aucune préparation particulière de la peau n'est requise pour l'analyse Raman. Le protocole a été défini de façon à ne pas affecter le déroulement des interventions chirurgicales ni incommoder les patients. Dans chaque cas, une fiche patient est établie. Celle-ci permet de recenser les informations sur les patients (âge, sexe, phototype, antécédents médicaux...) afin de construire une base de données permettant de corréler les données spectrales au dossier patient. Les mesures ont été effectuées en deux étapes :

1/ avant exérèse de la lésion par le chirurgien-dermatologue, directement sur le patient (acquisitions *in vivo*)

2/ après exérèse, directement sur une coupe transversale épaisse (quelques millimètres) de la pièce d'exérèse, avec l'appareil Raman HE, et également avec le microspectromètre Raman Labram (acquisitions *ex vivo*)

La pièce d'exérèse est ensuite portée au laboratoire d'anatomopathologie à l'état frais pour établir le diagnostic histologique et pour réaliser des coupes fines congelées (10 µm d'épaisseur). Ces coupes fines sont déposées sur des supports de CaF<sub>2</sub> pour analyse microspectroscopique.

Pour des raisons de confidentialité, les résultats obtenus lors de cette étude ne peuvent être présentés dans ce manuscrit.

## CONCLUSION GENERALE

---

La spectroscopie vibrationnelle (IR et Raman) repose sur l'interaction non-destructive lumière-matière. C'est une technique innovante, très informative, et particulièrement bien adaptée pour étudier la composition moléculaire de la peau. Un spectre vibrationnel, véritable "empreinte moléculaire" du tissu, permet l'étude qualitative et semi-quantitative des différents constituants de la peau.

Au cours de ce travail de thèse, nous avons montré le potentiel des spectroscopies vibrationnelles pour la caractérisation des cancers de la peau (carcinomes et mélanomes) :

1/ Nous avons travaillé à partir de coupes de peau paraffinées, disponibles au sein des laboratoires de pathologie, afin d'évaluer le potentiel diagnostique de la **micro-imagerie infrarouge**. Couplée à des méthodes de traitement de données puissantes, des images pseudo-couleurs très informatives sont générées, reflétant l'état physiopathologique de l'échantillon. Ces analyses ont été réalisées **directement sur des tissus paraffinés**, sans préparation particulière de l'échantillon. Une méthode de "déparaffinage numérique" de l'image spectrale IR a été développée et totalement automatisée. Un **algorithme de prédiction** reposant sur la LDA a été créé pour l'analyse automatique des coupes de carcinomes cutanés. Ce dernier est capable de différencier une zone pathologique d'une zone saine et de réaliser un diagnostic différentiel (carcinome basocellulaire, spinocellulaire ou maladie de Bowen). Une optimisation de cet algorithme est toutefois nécessaire (prise en compte des structures annexielles), pour des applications en clinique. De plus, il serait intéressant d'exploiter les capacités de nouveaux outils d'analyse discriminante, tels que les Support Vector Machines (SVM) ou les Artificial Neural Networks (ANN) (Han and Kamber, 2006; Krogh, 2008; Lasch et al., 2006).

De part sa complémentarité avec la spectroscopie IR, l'exploitation des cartographies 2D Raman de ces mêmes échantillons nous permettrait d'accéder à des informations supplémentaires, permettant d'enrichir la pertinence des marqueurs spectroscopiques associés aux structures tissulaires. Des traitements statistiques dédiés (ACI) ont été développés au sein du laboratoire pour le **déparaffinage numérique des spectres Raman** (Gobinet et al., 2009; Tfayli et al., 2009).

L'analyse effectuée sur les coupes de mélanomes cutanés nous a permis d'identifier et de caractériser l'hétérogénéité tissulaire au niveau de la tumeur et du stroma. Une perspective importante de ce travail consiste au couplage de la micro-imagerie IR avec d'autres techniques d'imagerie telles que **l'imagerie par spectrométrie de masse MALDI**, permettant la recherche, l'identification et la localisation de biomolécules d'intérêt telles que des peptides ou des protéines. Des développements récents au niveau de la préparation des échantillons permettent l'analyse par

---

---

imagerie de masse de tissus congelés ou fixés et inclus en paraffine. L'analyse par spectroscopie vibrationnelle (infrarouge ou Raman) présente l'avantage d'être totalement non destructive, préservant ainsi l'intégrité de l'échantillon; il sera alors possible de reprendre le tissu analysé en micro-imagerie vibrationnelle et d'enregistrer une image MALDI sur la même zone d'intérêt. La corrélation des données spectrales IR et de masse permettra une identification plus précise des constituants moléculaires associés à une signature spectrale spécifique d'un état physiopathologique particulier.

2/ Un développement innovant de la **microspectroscopie Raman polarisée** a été conduit pour l'analyse des carcinomes basocellulaires (coupes congelées). Nous avons montré que cette technique pouvait apporter des informations discriminantes complémentaires (ratios de dépolarisation) et qu'elle **renforçait le potentiel discriminant** de la microspectroscopie Raman conventionnelle pour l'analyse du tissu tumoral et péri-tumoral. Nous avons mis en évidence des différences spectrales reflétant des modifications moléculaires au niveau du stroma péri-tumoral des carcinomes basocellulaires superficiels et nodulaires, de telles altérations sont indétectables par histologie conventionnelle. Ces informations permettront de progresser dans la compréhension des mécanismes d'invasion tumorale et de réaction stromale associée.

3/ Dans une dernière partie, nous avons testé les performances d'un prototype portable de spectroscopie **Raman fibrée**, dédié à l'analyse *in vivo* des lésions cutanées. Bien que le signal de la fibre de mesure parasite fortement la diffusion Raman, nous avons pu extraire des marqueurs spectroscopiques permettant d'évaluer le potentiel diagnostique de cette instrumentation Raman intravitale. L'amélioration technique du système de mesure et la validation de l'approche sur un nombre plus élevé de patients constituent les principales perspectives de cette partie des travaux de thèse.

**Au regard des résultats obtenus, les spectroscopies vibrationnelles Raman et infrarouge présentent un réel potentiel pour l'aide au diagnostic des lésions cutanées, le tableau ci-après recense les avantages/inconvénients de ces deux techniques, ainsi que les applications futures possibles :**

	<b>Infrarouge</b>	<b>Raman</b>
<b>Liaisons moléculaires analysées</b>	Principalement les liaisons polaires (C=O, C-O, O-H, C-H) présentes dans les lipides, carbohydrates et les protéines	Principalement les liaisons non-polaires telles que (C-C, C=C, C≡C) présentes dans les acides aminés
<b>Rapport signal sur bruit</b>	Elevé	Plus faible (depend de la section efficace de diffusion)
<b>Résolution spatiale</b>	<b>De l'ordre de 10 µm</b> , les techniques de spectroscopie à réflexion totale atténuée (Attenuated Total Reflectance, ATR) ou l'utilisation de sources de type synchrotron permettent d'augmenter la résolution spatiale (de l'ordre de quelques microns)	Elevée et similaire à la microscopie optique: <b>de l'ordre du micromètre</b>
<b>Imagerie spectrale</b>	Possible sur des coupes fines de tissus (analyses <i>ex vivo</i> )	Possible sur des coupes ou des blocs de tissus (analyses <i>ex vivo</i> ) Possible également <i>in vivo</i> , en utilisant des sondes optiques à imagerie ("bundle" de fibres, en cours de développement)
<b>Analyses <i>ex vivo</i></b>	Les tissus peuvent être <b>congelés ou fixés et paraffinés</b> . Le déparaffinage chimique n'est pas nécessaire. Des corrections mathématiques sont applicables pour déparaffiner numériquement une image spectrale. Pour les tissus frais, il faudrait travailler sur des coupes très fines (difficiles à réaliser) et déshydrater l'échantillon.	De préférence, à <b>l'état frais ou congelé</b> . Pour les tissus paraffinés, des modèles mathématiques ont été développés (Analyse en Composantes Indépendantes), mais ils doivent être optimisés pour une application en routine.
<b>Apport de l'étude de la polarisation du signal</b>	Application intéressantes pour analyser des fibres. Permet de caractériser très finement la structure secondaire des protéines. N'a pas encore été appliquée à l'analyse tissulaire.	<b>Permet d'apporter des informations complémentaires</b> au niveau des lésions cutanées : - modifications structurales du collagène au cours de sa dégradation par la tumeur - renforce le potentiel diagnostique de la microspectroscopie Raman conventionnelle - les ratios de dépolarisation peuvent être utilisés en tant que nouveaux marqueurs spectroscopiques pour la discrimination (tumeur/épiderme et derme normal/péritumoral)

<b>Applications <i>in vivo</i></b>	<b>Difficiles à cause des bandes d'absorption de l'eau.</b> Des analyses ont été effectuées à l'aide d'une sonde optique ATR pour des applications diagnostiques (Li et al., 2005).	<b>Possibles, à l'aide de sondes de mesure appropriées.</b> Les sondes actuelles doivent être améliorées pour optimiser la collection du signal Raman tissulaire, en filtrant les signaux parasite.
<b>Perspectives</b>	<b>Idéale pour l'analyse de coupes fines.</b> Couplée à des techniques de chimométrie, elle permet de fournir des informations moléculaires permettant : - d'identifier l'histologie du tissu - de mettre en évidence des zones tissulaires particulières - d'effectuer un diagnostic différentiel dans le cas des carcinomes BCC et SCC. Les principales applications biomédicales sont <b>l'aide au diagnostic anatomopathologique et à une meilleure définition de la stratégie thérapeutique</b>	<b>Idéale pour les analyses <i>in vivo</i>,</b> dans le but d'aider au diagnostic clinique (avant exérèse de la lésion) pour : - déterminer les limites de la lésion - déterminer si la lésion est de type bénin / malin L'analyse de la <b>polarisation du signal</b> permettrait d'apporter des informations complémentaires pour l'aide à la décision, mais le développement d'une sonde intravitale constitue un challenge technique.

## REFERENCES

ACS

Cancer Facts and Figures 2007.  
Atlanta: American Cancer Society; 2007

AGACHE P

Physiologie de la peau et explorations fonctionnelles cutanées.  
Cachan: Editions médicales internationales; 2000

ANAES

Prise en charge diagnostique et thérapeutique du carcinome basocellulaire de l'adulte. 2004

ANONYME

Item n° 149 : Tumeurs cutanées épithéliales et mélaniques : carcinomes cutanés  
Ann Dermatol Venereol 2005a; 132 (10, Supplement 1): 127-133

ANONYME

Item n° 149 : Tumeurs cutanées épithéliales et mélaniques : mélanomes  
Ann Dermatol Venereol 2005b; 132 (10, Supplement 1): 140-146

BAKER MJ, GAZI E, BROWN MD, SHANKS JH, GARDNER P, CLARKE NW

FTIR-based spectroscopic analysis in the identification of clinically aggressive prostate cancer  
Br J Cancer 2008; 99 (11): 1859-1866

BARBILLAT J, BOUGEARD D, BUNTIX G, DELHAYE M, DHAMELIN COURT P, FILLAUX F

Spectrométrie Raman.  
Techniques de l'Ingénieur; 1999  
(Analyse et Caractérisation)

BERNARD P, DERANCOURT C, ARNOULT-COUDOUX E, PICOT R, DELVINCOURT C

[Skin cancer diagnosis by dermatologists in the region of Champagne-Ardenne: a prospective study]  
Ann Dermatol Venereol 2001; 128 (8-9): 883-887

BERNARD P, DUPUY A, SASCO A, BRUN P, DURU G, NICOLOYANNIS N, GROB JJ

Basal cell carcinomas and actinic keratoses seen in dermatological practice in France: a cross-sectional survey  
Dermatology 2008; 216 (3): 194-199

BRANCALEON L, DURKIN AJ, TU JH, MENAKER G, FALLON JD, KOLLIAS N

In vivo fluorescence spectroscopy of nonmelanoma skin cancer  
Photochem Photobiol 2001; 73 (2): 178-183

BRAUN RP, RABINOVITZ HS, OLIVIERO M, KOPF AW, SAURAT JH

Dermoscopy of pigmented skin lesions  
J Am Acad Dermatol 2005; 52 (1): 109-121

BUSAM KJ, CHARLES C, LOHMANN CM, MARGHOOB A, GOLDGEIER M, HALPERN AC

Detection of intraepidermal malignant melanoma in vivo by confocal scanning laser microscopy  
Melanoma Res 2002; 12 (4): 349-355

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 (5): 264-272

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 (4): 44007

CICCHI R, MASSI D, SESTINI S, CARLI P, DE GIORGI V, LOTTI T, PAVONE FS

Multidimensional non-linear laser imaging of Basal Cell Carcinoma  
Opt. Express 2007; 15 (16): 10135-10148

CICCHI R, SESTINI S, DE GIORGI V, MASSI D, LOTTI T, PAVONE FS

Nonlinear laser imaging of skin lesions  
J. Biophotonics 2008; 1 (1): 62-73

CLUFF GM, SHORT MA, LUI H, MCLEAN DI, ZENG H, KORBELIK M, CHEN MX

Comparison of connective tissue invaded by Lewis lung carcinoma to healthy connective tissue by means of micro-Raman spectroscopy  
J. Raman Spectrosc. 2009; 9999 (9999): n/a

COMON P

Independent component analysis, A new concept?  
Signal Processing 1994; 36 (3): 287-314

CONNEMANN BJ, BUSCHE H, KREUSCH J, TEICHERT H-M, WOLFF HH

Quantitative surface topography as a tool in the differential diagnosis between melanoma and naevus  
Skin Res Technol 1995; 1 (4): 180-186

CROWSON AN

Basal cell carcinoma: biology, morphology and clinical implications  
Mod Pathol 2006; 19 Suppl 2: S127-147

DALIBART M, SERVANT L

Spectroscopie dans l'infrarouge.  
Techniques de l'Ingénieur; 2000  
(Analyse et Caractérisation)

DEINUM G, RODRIGUEZ D, ROMER TJ, FITZMAURICE M, KRAMER JR, FELD MS

Histological Classification of Raman Spectra of Human Coronary Artery Atherosclerosis Using Principal Component Analysis  
Appl. Spectrosc. 1999; 53 (8): 938-942

DEPINHO RA

The age of cancer  
Nature 2000; 408 (6809): 248-254

DIEPGEN TL, MAHLER V

The epidemiology of skin cancer  
Br J Dermatol 2002; 146 Suppl 61: 1-6

DUBOIS J

La Peau, de la santé à la beauté.

Toulouse: Privat; 2001

(Regards sur la santé)

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

EPSTEIN EH

Basal cell carcinomas: attack of the hedgehog

Nat Rev Cancer 2008; 8 (10): 743-754

FARMER ER, GONIN R, HANNA MP

Discordance in the histopathologic diagnosis of melanoma and melanocytic nevi between expert pathologists

Hum Pathol 1996; 27 (6): 528-531

FENDEL S, SCHRADER B

Investigation of skin and skin lesions by NIR-FT-Raman spectroscopy

Fresenius Journal of Analytical Chemistry 1998; 360 (5): 609-613

FUCHS A, MARMUR E

The kinetics of skin cancer: progression of actinic keratosis to squamous cell carcinoma

Dermatol Surg 2007; 33 (9): 1099-1101

GAMBICHLER T, ORLIKOV A, VASA R, MOUSSA G, HOFFMANN K, STUCKER M, ALTMAYER P, BECHARA FG

In vivo optical coherence tomography of basal cell carcinoma

J Dermatol Sci 2007; 45 (3): 167-173

GERGER A, KOLLER S, WEGER W, RICHTIG E, KERL H, SAMONIGG H, KRIPPL P, SMOLLE J

Sensitivity and specificity of confocal laser-scanning microscopy for in vivo diagnosis of malignant skin tumors

Cancer 2006; 107 (1): 193-200

GERGER A, SMOLLE J

Diagnostic imaging of melanocytic skin tumors

J Cutan Pathol 2003; 30 (4): 247-252

GLUSAC EJ

Under the microscope: doctors, lawyers, and melanocytic neoplasms

J Cutan Pathol 2003; 30 (5): 287-293

GNIADACKA M, WULF HC, MORTENSEN NN, NIELSEN OF, CHRISTENSEN DH

Diagnosis of basal cell carcinoma by Raman spectroscopy

J. Raman Spectrosc. 1997; 28 (2-3): 125-129

GOBINET C, VRABIE V, MANFAIT M, PIOT O

Pre-Processing Methods of Raman Spectra for Source Extraction on Biomedical Samples: Application on Paraffin-Embedded Skin Biopsies  
IEEE Trans Biomed Eng 2009; 56 (5): 1371-1382

GOBINET C, VRABIE V, TFAYLI A, PIOT O, HUEZ R, MANFAIT M  
Pre-processing and source separation methods for Raman spectra analysis of biomedical samples  
Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc 2007; 2007: 6208-6211

GODAVARTY A, THOMPSON AB, ROY R, GURFINKEL M, EPPSTEIN MJ, ZHANG C, SEVICK-MURACA EM  
Diagnostic imaging of breast cancer using fluorescence-enhanced optical tomography: phantom studies  
J Biomed Opt 2004; 9 (3): 488-496

GUFLER H, FRANKE FE, RAU WS  
High-Resolution MRI of Basal Cell Carcinomas of the Face Using a Microscopy Coil  
Am. J. Roentgenol. 2007; 188 (5): W480-484

GUITERA P, PELLACANI G, LONGO C, SEIDENARI S, AVRAMIDIS M, MENZIES SW  
In vivo reflectance confocal microscopy enhances secondary evaluation of melanocytic lesions  
J Invest Dermatol 2009; 129 (1): 131-138

HAKA AS, SHAFER-PELTIER KE, FITZMAURICE M, CROWE J, DASARI RR, FELD MS  
Identifying microcalcifications in benign and malignant breast lesions by probing differences in their chemical composition using Raman spectroscopy  
Cancer Res 2002; 62 (18): 5375-5380

HAMMODY Z, ARGOV S, SAHU RK, CAGNANO E, MOREH R, MORDECHAI S  
Distinction of malignant melanoma and epidermis using IR micro-spectroscopy and statistical methods  
Analyst 2008; 133 (3): 372-378

HAN J, KAMBER M  
Data mining. Concepts and Techniques. 2nd Ed.  
San Francisco: Morgan Kaufman; 2006  
(The Morgan Kaufmann Series in Data Management Systems)

HAS  
Stratégie de diagnostic précoce du mélanome. 2006  
(Recommandation en santé publique)

HAS  
Tumeur maligne, affection maligne du tissu lymphatique ou hématopoïétique. Mélanome cutané. 2008  
(Guide - Affection de longue durée)

HENRY MM, THOMPSON JN  
Chirurgie clinique : Technique et pratique.  
Bruxelles: De Boeck Université; 2004

HUANG Z, LUI H, MCLEAN DI, KORBELIK M, ZENG H

Raman spectroscopy in combination with background near-infrared autofluorescence enhances the in vivo assessment of malignant tissues  
Photochem Photobiol 2005; 81 (5): 1219-1226

HUANG Z, ZENG H, HAMZAVI I, MCLEAN DI, LUI H  
Rapid near-infrared Raman spectroscopy system for real-time in vivo skin measurements  
Opt Lett 2001; 26 (22): 1782-1784

HYVÄRINEN A  
Survey on Independent Component Analysis  
Neural Computing Surveys 1999; 2: 94-128

HYVÄRINEN A, KARHUNEN J, OJA E  
Independent Component Analysis.  
New-York: Wiley; 2001

JACOB A  
Observations respecting an ulcer of peculiar character, which attacks the eyelids and other parts of the face  
Dublin Hospital Rep Commun Med Surg 1827; 4: 232-239

KANTER EM, VARGIS E, MAJUMDER S, KELLER MD, WOESTE E, RAO ANITA GG, MAHADEVAN-JANSEN A  
Application of Raman spectroscopy for cervical dysplasia diagnosis  
J. Biophotonics 2009; 2 (1-2): 81-90

KHAN SS, AHMAD A  
Cluster center initialization algorithm for K-means clustering  
Pattern Recognition Letters 2004; 25 (11): 1293-1302

KOTHARI R, PITTS D  
On finding the number of clusters  
Pattern Recognition Letters 1999; 20 (4): 405-416

KRAFFT C, SOBOTTKA SB, GEIGER KD, SCHACKERT G, SALZER R  
Classification of malignant gliomas by infrared spectroscopic imaging and linear discriminant analysis  
Anal Bioanal Chem 2007; 387 (5): 1669-1677

KRISHNA CM, SOCKALINGUM GD, VENTEO L, BHAT RA, KUSHTAGI P, PLUOT M, MANFAIT M  
Evaluation of the suitability of ex vivo handled ovarian tissues for optical diagnosis by Raman microspectroscopy  
Biopolymers 2005; 79 (5): 269-276

KROGH A  
What are artificial neural networks?  
Nat Biotechnol 2008; 26 (2): 195-197

LABROUSSE AL, NTAYI C, HORNEBECK W, BERNARD P  
Stromal reaction in cutaneous melanoma  
Crit Rev Oncol Hematol 2004; 49 (3): 269-275

- LAGARDE JM, ROUVRAIS C, BLACK D, DIRIDOLLOU S, GALL Y  
Skin topography measurement by interference fringe projection: a technical validation  
*Skin Res Technol* 2001; 7 (2): 112-121
- LASCH P, DIEM M, HÄNSCH W, NAUMANN D  
Artificial neural networks as supervised techniques for FT-IR microspectroscopic imaging  
*J Chemometrics* 2006; 20: 209-220
- LASCH P, HAENSCH W, NAUMANN D, DIEM M  
Imaging of colorectal adenocarcinoma using FT-IR microspectroscopy and cluster analysis  
*Biochim Biophys Acta* 2004; 1688 (2): 176-186
- LEE DH, KIM JI, LEE HK  
Investigation of biochemical changes in skin layers by NMR microscopy  
*Skin Res Technol* 1988; 4: 142-146
- LI QB, XU Z, ZHANG NW, ZHANG L, WANG F, YANG LM, WANG JS, ZHOU S, ZHANG YF, ZHOU XS, SHI JS, WU JG  
In vivo and in situ detection of colorectal cancer using Fourier transform infrared spectroscopy  
*World J Gastroenterol* 2005; 11 (3): 327-330
- LIEBER CA, MAJUMDER SK, BILLHEIMER D, ELLIS DL, MAHADEVAN-JANSEN A  
Raman microspectroscopy for skin cancer detection in vitro  
*J Biomed Opt* 2008a; 13 (2): 024013
- LIEBER CA, MAJUMDER SK, ELLIS DL, BILLHEIMER DD, MAHADEVAN-JANSEN A  
In vivo nonmelanoma skin cancer diagnosis using Raman microspectroscopy  
*Lasers Surg Med* 2008b; 40 (7): 461-467
- LY E, PIOT O, DURLACH A, BERNARD P, MANFAIT M  
Differential diagnosis of cutaneous carcinomas by infrared spectral micro-imaging combined with pattern recognition  
*Analyst* 2009; DOI: 10.1039/B820998G:  
LY E, PIOT O, WOLTHUIS R, DURLACH A, BERNARD P, MANFAIT M  
Combination of FTIR spectral imaging and chemometrics for tumour detection from paraffin-embedded biopsies  
*Analyst* 2008; 133 (2): 197-205
- MACNEIL S  
Progress and opportunities for tissue-engineered skin  
*Nature* 2007; 445 (7130): 874-880
- MAHADEVAN-JANSEN A, FOLLEN MITCHELL M, RAMANUJAM N, UTZINGER U, RICHARDS-KORTUM R  
Development of a Fiber Optic Probe to Measure NIR Raman Spectra of Cervical Tissue In Vivo  
*Photochemistry and Photobiology* 1998; 68 (3): 427-431
- MARGHOOB AA, SCOPE A  
The complexity of diagnosing melanoma  
*J Invest Dermatol* 2009; 129 (1): 11-13

MAROT L, WEYNAND B

Formes anatomocliniques : critères pour le diagnostic et la classification des mélanomes  
Louv Med 2007; 126 (6): 201-209

MARTIN FL, GERMAN MJ, WIT E, FEARN T, RAGAVAN N, POLLOCK HM

Identifying variables responsible for clustering in discriminant analysis of data from infrared microspectroscopy of a biological sample  
J Comput Biol 2007; 14 (9): 1176-1184

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 1999a; 112 (6): 951-956

MCINTOSH LM, MANSFIELD JR, CROWSON AN, MANTSCH HH, JACKSON M

Analysis and interpretation of infrared microscopic maps: Visualization and classification of skin components by digital staining and multivariate analysis  
Biospectroscopy 1999b; 5 (5): 265-275

MCINTOSH LM, SUMMERS R, JACKSON M, MANTSCH HH, MANSFIELD JR, HOWLETT M, CROWSON AN, TOOLE JWP

Towards non-invasive screening of skin lesions by near infrared spectroscopy  
J. Invest. Dermatol. 2001; 116 (1): 175-181

MEADE AD, LYNG FM, KNIEF P, BYRNE HJ

Growth substrate induced functional changes elucidated by FTIR and Raman spectroscopy in in-vitro cultured human keratinocytes  
Anal Bioanal Chem 2007; 387 (5): 1717-1728

METTE MOGENSEN GBEJ

Diagnosis of Nonmelanoma Skin Cancer/Keratinocyte Carcinoma: A Review of Diagnostic Accuracy of Nonmelanoma Skin Cancer Diagnostic Tests and Technologies  
Dermatologic Surgery 2007; 33 (10): 1158-1174

MORDECHAI S, SAHU RK, HAMMODY Z, MARK S, KANTAROVICH K, GUTERMAN H, PODSHYVALOV A, GOLDSTEIN J, ARGOV S

Possible common biomarkers from FTIR microspectroscopy of cervical cancer and melanoma  
J Microsc 2004; 215 (Pt 1): 86-91

MOTLEY R, KERSEY P, LAWRENCE C

Multiprofessional guidelines for the management of the patient with primary cutaneous squamous cell carcinoma  
Br J Dermatol 2002; 146 (1): 18-25

MOTZ JT, HUNTER M, GALINDO LH, GARDECKI JA, KRAMER JR, DASARI RR, FELD MS

Optical fiber probe for biomedical Raman spectroscopy  
Appl Opt 2004; 43 (3): 542-554

MURALI KRISHNA C, KEGELAER G, ADT I, RUBIN S, KARTHA VB, MANFAIT M, SOCKALINGUM GD

Characterisation of uterine sarcoma cell lines exhibiting MDR phenotype by vibrational spectroscopy

Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects 2005; 1726 (2): 160-167

NA R, STENDER IM, WULF HC

Can autofluorescence demarcate basal cell carcinoma from normal skin? A comparison with protoporphyrin IX fluorescence

Acta Derm Venereol 2001; 81 (4): 246-249

NAITO S, MIN YK, SUGATA K, OSANAI O, KITAHARA T, HIRUMA H, HAMAGUCHI H

In vivo measurement of human dermis by 1064 nm-excited fiber Raman spectroscopy

Skin Res Technol 2008; 14 (1): 18-25

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 (1): 64-69

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 (3): 034004

NORDLING TEM, KOLJONEN J, NYSTRÖM J, BODÉN I, LINDHOLM-SETHSON B, GELADI P, ALANDER JT

Wavelength selection by genetic algorithms in near infrared spectra for melanoma diagnosis.

IFMBE; 2005

(EMBE'05)

O FAOLAIN E, HUNTER MB, BYRNE JM, KELEHAN P, LAMBKIN HA, BYRNE HJ, LYNNG FM

Raman spectroscopic evaluation of efficacy of current paraffin wax section dewaxing agents

J Histochem Cytochem 2005a; 53 (1): 121-129

O FAOLAIN E, HUNTER MB, BYRNE JM, KELEHAN P, MCNAMARA M, BYRNE HJ, LYNNG FM

A study examining the effects of tissue processing on human tissue sections using vibrational spectroscopy

Vibrational Spectroscopy 2005b; 38 (1-2): 121-127

OKCU A, HOFMANN-WELLENHOF R, WOLTSCHKE I, SMOLLE J, KERL H

Pathological findings suggestive of interclonal stabilization in a case of cutaneous melanoma

Clin Exp Metastasis 1996; 14 (3): 215-218

PANJEHPOUR M, JULIUS CE, PHAN MN, VO-DINH T, OVERHOLT S

Laser-induced fluorescence spectroscopy for in vivo diagnosis of non-melanoma skin cancers

Lasers Surg Med 2002; 31 (5): 367-373

PAOLI J, SMEDH M, WENNBERG AM, ERICSON MB

Multiphoton laser scanning microscopy on non-melanoma skin cancer: morphologic features for future non-invasive diagnostics

J Invest Dermatol 2008; 128 (5): 1248-1255

PEÑA JM, LOZANO JA, LARRAÑAGA P

An empirical comparison of four initialization methods for the K-Means algorithm  
Pattern Recognition Letters 1999; 20 (10): 1027-1040

POWELL J

Skin physiology  
Surgery (Oxford) 2006; 24 (1): 1-4

RALLAN D, HARLAND CC

Skin imaging: is it clinically useful?  
Clin Exp Dermatol 2004; 29 (5): 453-459

ROUSSEAU ME, LEFEVRE T, BEAULIEU L, ASAKURA T, PEZOLET M

Study of protein conformation and orientation in silkworm and spider silk fibers using Raman  
microspectroscopy  
Biomacromolecules 2004; 5 (6): 2247-2257

RUBIN AI, CHEN EH, RATNER D

Basal-cell carcinoma  
N Engl J Med 2005; 353 (21): 2262-2269

SAVITZKY A, GOLAY MJE

Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures  
Analytical Chemistry 1964; 36 (8): 1627-1639

SCHARF LL

Statistical Signal Processing : Detection, Estimation, and Time Series Analysis.  
New-York: Addison-Wesley Education Publishers Inc.; 1991

SEBISKVERADZE D, GOBINET C, LY E, MANFAIT M, JEANNESSON P, HERBIN M, PIOT  
O, VRABIE V

Effects of digital dewaxing methods on K-means-clusterized IR images collected on formalin-fixed  
paraffin-embedded samples of skin carcinoma. 2008  
(8th IEEE International Conference on BioInformatics and BioEngineering)

SHIM MG, SONG LM, MARCON NE, WILSON BC

In vivo near-infrared Raman spectroscopy: demonstration of feasibility during clinical  
gastrointestinal endoscopy  
Photochem Photobiol 2000; 72 (1): 146-150

SHIM MG, WILSON BC

Development of an In Vivo Raman Spectroscopic System for Diagnostic Applications  
J. Raman Spectrosc. 1997; 28 (2-3): 131-142

SHORT MA, LUI H, MCLEAN D, ZENG H, ALAJLAN A, CHEN XK

Changes in nuclei and peritumoral collagen within nodular basal cell carcinomas via confocal  
micro-Raman spectroscopy  
J Biomed Opt 2006; 11 (3): 34004

SIGURDSSON S, PHILIPSEN PA, HANSEN LK, LARSEN J, GNIADOCKA M, WULF HC

Detection of skin cancer by classification of Raman spectra  
IEEE Trans Biomed Eng 2004; 51 (10): 1784-1793

SMOLLE J, WOLTSCHKE I, HOFMANN-WELLENHOF R, HAAS J, KERL H  
Pathology of tumor-stroma interaction in melanoma metastatic to the skin  
Human Pathology 1995; 26 (8): 856-861

STEINLEY D  
K-means clustering: a half-century synthesis  
Br J Math Stat Psychol 2006; 59 (Pt 1): 1-34

STRASSWIMMER J, PIERCE MC, PARK BH, NEEL V, DE BOER JF  
Polarization-sensitive optical coherence tomography of invasive basal cell carcinoma  
Journal of Biomedical Optics 2004; 9 (2): 292-298

STRUPLER M, PENA AM, HERNEST M, THARAUX PL, MARTIN JL, BEAUREPAIRE E,  
SCHANNE-KLEIN MC  
Second harmonic imaging and scoring of collagen in fibrotic tissues  
Opt. Express 2007; 15 (7): 4054-4065

TANAKA M, YOUNG RJ  
Polarized Raman spectroscopy for the study of molecular orientation distributions in polymers  
J Mater Sci 2006; 41: 963-991

TFAYLI A  
Caractérisation structurale et moléculaire de la peau par microspectroscopies optiques  
vibrationnelles. Applications au diagnostic précoce des tumeurs cutanées et à l'étude de la diffusion  
de principes actifs à visée thérapeutique.  
Th Pharm: Ingénierie de la santé: 2007;

TFAYLI A, GOBINET C, VRABIE V, HUEZ R, MANFAIT M, PIOT O  
Digital dewaxing of Raman signals: discrimination between nevi and melanoma spectra obtained  
from paraffin-embedded skin biopsies  
Appl Spectrosc 2009; 63 (5): 564-570

TFAYLI A, PIOT O, DERANCOURT S, CADIOT G, DIEBOLD MD, 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. 2006  
(Progress in Biomedical Optics and Imaging - Proceedings of SPIE)

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

TORTORA GJ, GRABOWSKI SR  
Principes d'anatomie et de physiologie. 3<sup>ème</sup> éd.  
Bruxelles: De Boeck Université; 2002

URSO C, RONGIOLETTI F, INNOCENZI D, BATOLO D, CHIMENTI S, FANTI PL, FILOTICO  
R, GIANOTTI R, LENTINI M, TOMASINI C, PIPPIONE M  
Histological features used in the diagnosis of melanoma are frequently found in benign melanocytic  
naevi

J Clin Pathol 2005a; 58 (4): 409-412

URSO C, RONGIOLETTI F, INNOCENZI D, SAEVA C, BATOLO D, CHIMENTI S, FILOTICO R, GIANOTTI R, LENTINI M, TOMASINI C, REBORA A, PIPPIONE M  
Interobserver reproducibility of histological features in cutaneous malignant melanoma  
J Clin Pathol 2005b; 58 (11): 1194-1198

VAN KEMPEN LC, RIJNTJES J, CLAES A, BLOKX WA, GERRITSEN MJ, RUITER DJ, VAN MUIJEN GN  
Type I collagen synthesis parallels the conversion of keratinocytic intraepidermal neoplasia to cutaneous squamous cell carcinoma  
J Pathol 2004; 204 (3): 333-339

WALLACE VP, FITZGERALD AJ, PICKWELL E, PYE RJ, TADAY PF, FLANAGAN N, HA T  
Terahertz pulsed spectroscopy of human Basal cell carcinoma  
Appl Spectrosc 2006; 60 (10): 1127-1133

WANG L, MIZAIKOFF B  
Application of multivariate data-analysis techniques to biomedical diagnostics based on mid-infrared spectroscopy  
Anal Bioanal Chem 2008; 391 (5): 1641-1654

WELZEL J  
Optical coherence tomography in dermatology: a review  
Skin Res Technol 2001; 7 (1): 1-9

WOLD H  
Estimation of principal components and related models by iterative least squares.  
New-York: Academic Press; 1966  
(Multivariate Analysis)

WOLTHUIS R, TRAVO A, NICOLET C, NEUVILLE A, GAUB MP, GUENOT D, LY E, MANFAIT M, JEANNESSON P, PIOT O  
IR spectral imaging for histopathological characterization of xenografted human colon carcinomas  
Anal Chem 2008; 80 (22): 8461-8469

WONG PT, GOLDSTEIN SM, GREKIN RC, GODWIN TA, PIVIK C, RIGAS B  
Distinct infrared spectroscopic patterns of human basal cell carcinoma of the skin  
Cancer Res 1993; 53 (4): 762-765

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 (1): 59-68

WOODWARD RM, WALLACE VP, PYE RJ, COLE BE, ARNONE DD, LINFIELD EH, PEPPER M  
Terahertz pulse imaging of ex vivo basal cell carcinoma  
J Invest Dermatol 2003; 120 (1): 72-78

ZABALLOS P, LLAMBRICH A, PUIG S, MALVEHY J  
Dermoscopy is useful for the recognition of benign-malignant compound tumours

Br J Dermatol 2005; 153 (3): 653-656

ZONIOS G, DIMOU A, BASSUKAS I, GALARIS D, TSOLAKIDIS A, KAXIRAS E  
Melanin absorption spectroscopy: new method for noninvasive skin investigation and melanoma  
detection

Journal of Biomedical Optics 2008; 13 (1): 014017-014018

**Elodie LY : CARACTERISATION DES LESIONS CUTANEEES PAR  
MICROSPECTROSCOPIES OPTIQUES VIBRATIONNELLES : APPLICATIONS EX VIVO ET  
IN VIVO**

**Th.Univ. : Reims : 2009**

**Résumé :**

La peau est notre organe le plus important de par sa surface et son poids. Véritable barrière aux agressions extérieures, elle représente notre première ligne de défense naturelle. C'est un organe complexe qui présente une forte hétérogénéité, et qui peut être altéré par des désordres cutanés liés à des pathologies. Les techniques de spectroscopie vibrationnelle représentent un outil innovant pour l'analyse de la peau. Elles reposent sur l'interaction non-destructive lumière-matière ; ce qui permet d'extraire une "empreinte moléculaire" caractéristique de l'état physiopathologique de l'échantillon analysé. Nous avons évalué le potentiel de ces techniques pour la caractérisation des lésions cutanées. A partir de coupes de biopsies paraffinées, la micro-imagerie infrarouge, combinée à des méthodes puissantes de statistiques multivariées, a été appliquée avec succès pour le diagnostic différentiel des carcinomes cutanés (carcinomes basocellulaires et spinocellulaires) et pour la caractérisation du mélanome cutané. De plus, la microspectroscopie Raman polarisée a été mise en œuvre pour l'examen des lésions de type carcinome basocellulaire. Nous avons analysé plus précisément les foyers tumoraux et le tissu péri-tumoral. Les résultats montrent que le potentiel discriminant de la microspectroscopie Raman est renforcé par l'analyse de la polarisation du signal. Enfin, nous avons développé en milieu clinique la spectroscopie Raman *in vivo* pour l'analyse de pathologies cutanées chez les patients pris en charge au sein du service de Dermatologie du CHU de Reims.

**Mots-clés :**

**micro-imagerie infrarouge, spectroscopies Raman conventionnelle et polarisée, chimiométrie, statistique multivariée, lésions cutanées**

**Jury**

Rapporteurs : Pr. Arlette BAILLET-GUFFROY  
Dr. Bernard SCHOOT  
Examineurs : Pr. Philippe BERNARD  
Dr. Hugh BYRNE  
Directeurs de thèse : Pr. Michel MANFAIT  
Dr. Olivier PIOT

**Adresse de l'auteure :**

Elodie LY – 3 rue Jean le Loup – 51100 REIMS