

# THÈSE

Pour obtenir le grade de

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

*Discipline : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE*

*Spécialité : Biophysique*

Présentée et soutenue publiquement par

**Nathalie MAINRECK-MAILLOT**

Le 24 janvier 2017

---

## **Apport potentiel de la spectroscopie Raman dans le traitement chirurgical des carcinomes cutanés (CBC)**

---

Thèse dirigée par **OLIVIER PIOT** et **JEAN-FRANÇOIS ANGIBOUST**

### **JURY**

M. Philippe Bernard,	Professeur,	Centre Hospitalier Universitaire de Reims,	<b>Président</b>
M. Olivier Piot,	Professeur,	Université de Reims Champagne-Ardenne,	<b>Directeur de thèse</b>
M. Jean-François Angiboust,	Maître de Conférence HDR,	Université de Reims Champagne-Ardenne,	<b>Co-Directeur de thèse</b>
M. Philippe Humbert,	Professeur,	Centre Hospitalier Universitaire de Besançon,	<b>Rapporteur</b>
M. Igor Chourpa,	Professeur,	Université de Tours,	<b>Rapporteur</b>
Mme Anne Durlach,	Docteur,	Centre Hospitalier Universitaire de Reims,	<b>Examineur</b>
M. Jacques Klossa,	Docteur,	Société TRIBVN, Paris,	<b>Examineur</b>



*Aux êtres les plus chers à mon cœur.*

*A mes parents,*

*A ma sœur,*

*Merci pour tout.*

*A mon fils,*

*Fière d'être ta maman.*

## Remerciements

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

Je vous remercie de m'avoir accueillie au sein de l'unité et de m'avoir choisie pour la réalisation de ce projet de recherche. Merci pour la confiance que vous m'avez accordée, ainsi que de m'avoir permis de présenter mes résultats dans différents congrès nationaux et internationaux. Merci également pour votre gentillesse vis-à-vis de ma situation actuelle. Sachez que j'ai été ravie d'intégrer le laboratoire de spectroscopie et d'avoir pris part à l'aventure que vous avez initiée lors de sa création. Soyez assuré de mon profond respect.

### *A Monsieur le Professeur Olivier Piot,*

Je te remercie pour ton encadrement et ton enseignement tout au long de mes travaux de thèse. J'ai beaucoup appris. Je tiens également à te remercier pour ton appui, du jour où les événements extérieurs me contraignaient à prendre une autre direction que celle de la recherche. Merci pour tes encouragements et ta bienveillance. Ta réaction a été décisive dans la poursuite de ma thèse. Je n'aurais jamais eu la force de continuer sans ta compréhension, ta patience et ton soutien. Très sincèrement : merci !

### *A Monsieur le Docteur Jean-François Angiboust,*

Je vous remercie de votre aide technique, que j'ai souvent sollicitée, et de votre disponibilité tout au long de ma thèse. Je savais qu'en cas de problème, je pouvais toujours compter sur vous. Merci également pour votre gentillesse à toute épreuve.

***A Monsieur le Professeur Philippe Humbert,***

Veillez accepter mes remerciements les plus respectueux pour me faire l'honneur d'être rapporteur de ces travaux de thèse.

***A Monsieur le Professeur Igor Chourpa,***

Veillez accepter mes remerciements les plus respectueux pour me faire l'honneur d'être rapporteur de ces travaux de thèse.

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

Je vous remercie de me faire l'honneur de faire partie de mon jury de thèse. Merci de votre collaboration sans laquelle ces travaux n'auraient pas été possibles. Je vous suis reconnaissante de m'avoir permis d'accéder au bloc opératoire du service de Dermatologie pour les acquisitions spectrales *in vivo*. Soyez assuré de mon profond respect et de toute ma gratitude.

***A Madame le Docteur Anne Durlach,***

Je vous remercie de me faire l'honneur de faire partie de mon jury de thèse. Merci de l'intérêt que vous avez porté à ce projet et de votre aide pour l'interprétation des résultats obtenus, en particulier sur coupes histologiques. Je tiens également vivement à vous remercier pour votre réponse chaleureuse lorsque je vous ai sollicité, plusieurs années après, pour la relecture des parties médicales de mon manuscrit avant publication. Merci pour le temps que vous m'avez consacré, ainsi que pour votre gentillesse et tous vos encouragements pour la finalisation de ma thèse.

***A Monsieur le Docteur Jacques Klossa,***

Je vous remercie de me faire l'honneur de faire partie de mon jury de thèse. Merci pour votre enthousiasme et pour l'intérêt que vous portez à ces travaux. Veillez accepter l'expression de mes sentiments les plus respectueux.

***A Monsieur le Docteur Ziad Reguiat,***

Je vous remercie de votre collaboration active dans ce projet. Merci d'avoir aménagé vos plannings d'interventions chirurgicales pour me laisser le temps nécessaire à l'acquisition des données *in vivo*. Merci également du temps consacré au renseignement des fiches-patients.

***A Madame le Docteur Anne-Laure Goeldel,***

Je vous remercie de votre collaboration active dans ce projet. Merci pour votre disponibilité et votre participation au travail sur coupes histologiques. Merci également pour m'avoir permis de collecter des données *in vivo* supplémentaires lors de vos interventions au bloc opératoire.

***A Monsieur le Docteur Cyril Gobinet,***

Je te remercie pour le développement du programme de traitement des données *in vivo* sans lequel ces travaux n'auraient pu aboutir, et de toute l'aide que tu m'as apportée du début à la fin de ma thèse. Merci également d'avoir travaillé sur le développement de programmes plus généraux utilisables par tous pour le traitement de base des spectres optiques vibrationnels. Ces interfaces conviviales nous ont vraiment simplifié le travail et permettent aujourd'hui d'aborder Matlab avec tellement plus de sérénité !

Je remercie également le laboratoire pharmaceutique ***Galderma*** pour son soutien scientifique, ainsi que pour l'accueil chaleureux qui nous a été réservé lors des différentes réunions sur place ; et en particulier ***Monsieur le Docteur Bernard Schoot*** pour son investissement dans ce projet.

J'adresse ma reconnaissance pour le soutien financier apporté par la ***Région Champagne-Ardenne (CPER)*** ainsi que par la ***Fondation ARC***.

Les années passent, le laboratoire change de visage mais certaines personnes restent incontournables. Parmi elles, il me reste encore à remercier **Ganesh** pour ses encouragements, ses conseils avisés ainsi que sa sympathie et sa bonne humeur. Un grand merci également à **Valérie** pour ... tout ! Merci de m'avoir aidée à y voir plus clair au moment où tout est devenu flou dans ma vie. C'est aussi grâce à toi que j'ai trouvé l'énergie de revenir pour reprendre le cours de ma thèse. Merci pour ton amitié et ton soutien. Toutes ces discussions partagées autour d'un café vont me manquer. **Mohammed, David**, vous étiez tous les deux déjà là à mon arrivée au laboratoire, merci pour votre sympathie qui ne s'est pas démentie au fil du temps. A tous les membres de l'équipe de spectroscopie, vous côtoyez pendant toutes ces années a été un vrai plaisir.

Aux personnes avec qui j'ai débuté ma thèse notamment **Elodie, Sana, Jaya, The Thuong, Hadrien, Teddy, Marie, Mathilde, Caroline, Aurélie et Marine** : merci pour ces trois belles années. Je garde un bon souvenir de cette période-là. Une pensée pour **Alexandre Mazine**.

Merci également pour la convivialité de ceux avec qui j'ai partagé mes dernières années de thèse en particulier **Que, Vincent, Michael, Christophe, Louis et Shawn**, ainsi que pour la bonne ambiance des déjeuners en compagnie de **Lila, Pascaline, Brigitte, Christine, Nathalie et Marie-Pierre**. Je terminerai par un clin d'œil amical à **Irène, Catherine, Aurore et Goutam**.

Que de belles rencontres l'on fait pendant une thèse !

## APPORT POTENTIEL DE LA SPECTROSCOPIE RAMAN DANS LE TRAITEMENT CHIRURGICAL DES CARCINOMES CUTANES (CBC)

**Résumé :** Le carcinome basocellulaire (CBC) est un cancer cutané très fréquent représentant un problème de santé publique majeur. Il métastase rarement mais peut devenir très invasif localement s'il n'est pas pris en charge rapidement. Actuellement, le diagnostic de certitude du CBC est obtenu par examen anatomopathologique de coupes fines ; ce qui présente pour inconvénient d'être invasif et de donner une réponse différée. De plus, la chirurgie du CBC ne bénéficie pas d'outil permettant de définir en temps réel la largeur optimale des marges de sécurité ; celles-ci devant être minimales pour éviter les séquelles esthétiques mais suffisantes pour empêcher toute récurrence. L'objectif de ces travaux de thèse est d'évaluer l'apport potentiel de la spectroscopie Raman dans la prise en charge du CBC. Cette technologie applicable *in vivo* grâce au développement de sondes adaptées, permet une exploration tissulaire à un niveau moléculaire relativement rapide. Au total, 32 patients ont été inclus dans cette étude. A partir des spectres enregistrés *in vivo*, un modèle de discrimination CBC / peau saine a été développé, à partir duquel les marges d'excision latérales ont pu être évaluées. Les marges profondes ont également été étudiées après enregistrement de spectres sur les pièces fraîchement excisées. Des marqueurs Raman de discrimination ont été identifiés aux différentes échelles *in vivo*, *ex vivo* et *in vitro* ; ils constituent des bio-indicateurs potentiels pour orienter la prise de décision chirurgicale. Enfin, la contribution des fonds spectraux, habituellement écartés des analyses Raman, a été considérée et leur intérêt dans le cadre de ce projet a été discuté.

## POTENTIAL CONTRIBUTION OF RAMAN SPECTROSCOPY IN THE SURGICAL TREATMENT OF SKIN CARCINOMAS (BCC)

**Abstract:** Basal cell carcinoma (BCC) is the most common skin cancer and a major problem for healthcare services worldwide. BCC rarely metastasizes but can become highly damaging for surrounding tissue in case of late diagnosis. Actually, the gold standard for BCC diagnosis relies on histopathological assessment of thin sections, but it is an invasive method which provides a delayed response. Moreover, it will be helpful during surgery of BCC to assess in real-time the optimal size of the security margins, which has to be small enough to minimize aesthetic sequelae but sufficient to avoid recurrence. The aim of this work is to evaluate the potential contribution of Raman spectroscopy in the management of BCC. This technology can be applied *in vivo* thanks to the development of appropriate probes and allows a relatively rapid tissue exploration at a molecular level. A total of 32 patients were included in this study. From *in vivo* recorded spectra, a model of discrimination BCC / healthy skin was implemented, from which the width of excision margins was evaluated. Deep margins were also studied after recording spectra on freshly excised pieces. Discriminant Raman markers were identified at different levels *in vivo*, *ex vivo* and *in vitro*; they are potential bio-indicators to help the surgeon to define ideal excision margins. In addition, the contribution of spectral backgrounds, usually removed from Raman analysis, was considered and their interest in this project was discussed.

**Mots-clés :** Spectroscopie Raman, Cancer cutané, Analyse *in vivo*, Applicabilité clinique, Marqueurs spectroscopiques

**Key words :** Raman spectroscopy, Skin cancer, *In vivo* analysis, Clinical applicability, Spectroscopic markers

**DISCIPLINE :** SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

**Spécialité :** Biophysique

**UNITE DE RECHERCHE :** Université de Reims Champagne-Ardenne - MéDIAN, CNRS UMR 7369 – MEDyC – UFR de Pharmacie - 51 rue Cognacq-Jay - 51096 Reims Cedex - France

## Liste des abréviations

ACP	Analyse en Composante Principale
ADL	Analyse Discriminante Linéaire
BCC	Basal Cell Carcinoma
CBC	Carcinome BasoCellulaire
CCD	Charge-Coupled Device
CHA	Classification Hiérarchique Ascendante
CMM	Chirurgie Micrographique de Mohs
CP	Composante Principale
CSC	Carcinome SpinoCellulaire
EMSC	Extended Multiplicative Signal Correction
FPS	Follicule Pilo-Sébacé
FT	Transformée de Fourier
HCA	Hierarchical Cluster Analysis
IR	InfraRouge
KM	K-means
LDA	Linear Discriminant Analysis
LOOCV	Leave-One-Out Cross-Validation
LMOCV	Leave-M-Out Cross-Validation
MSC	Melanoma Skin Cancer
NIST	National Institute of Standards and Technology
NL	Non Lésionnel
NMSC	Non-Melanoma Skin Cancer
PC	Principal Component
PCA	Principal Component Analysis
SCC	Squamous Cell Carcinoma
SG	Savitzky-Golay
SNR	Signal-to-Noise Ratio
UV	UltraViolet

## Liste des figures

Figure 1 Représentation schématique de la peau humaine et de ses principaux composants .....	17
Figure 2 Représentation schématique d'une coupe transversale de l'épiderme humain.....	18
Figure 3 Représentation schématique de la jonction dermo-épidermique .....	27
Figure 4 Coupe colorée de tissu cutané.....	29
Figure 5 Représentation schématique du tissu adipeux et de sa composition cellulaire .....	32
Figure 6 La glande sudoripare.....	35
Figure 7 Le follicule pilo-sébacé.....	38
Figure 8 Schéma du cycle pileaire .....	39
Figure 9 Représentation schématique de l'organisation de la microcirculation cutanée .....	43
Figure 10 Représentation schématique d'une anse capillaire.....	44
Figure 11 Schéma topographique des vaisseaux lymphatiques dermiques et sous-cutanés .....	47
Figure 12 Illustration de quelques terminaisons de fibres nerveuses sensibles de la peau .....	50
Figure 13 Aspect typique d'un CBC et d'un CSC.....	55
Figure 14 Aspect typique des principaux sous-types de CBC.....	57
Figure 15 Champs électrique et magnétique de l'onde électromagnétique.....	73
Figure 16 Les divers domaines spectraux du rayonnement électromagnétique .....	74
Figure 17 Valeurs respectives des contributions électroniques, vibrationnelles et rotationnelles d'une molécule.....	75
Figure 18 Modes de vibration moléculaire.....	76
Figure 19 Interaction entre un photon et la matière caractérisée par des niveaux d'énergie vibrationnelle .....	80
Figure 20 Microspectromètre Raman LabRAM (HORIBA Jobin Yvon) .....	83
Figure 21 Système d'obtention du laser incident proche infrarouge (Spectra-Physics) .....	84
Figure 22 Spectromètre Raman fibré HE (HORIBA Jobin Yvon) .....	88
Figure 23 Photographie et schéma interne de la sonde RamanProbe (InPhotonics) .....	89
Figure 24 Microspectromètre infrarouge Spectrum Spotlight 300 (Perkin Elmer) .....	91
Figure 25 Composants internes du système d'imagerie Spectrum Spotlight .....	92
Figure 26 Schéma d'un interféromètre de Michelson .....	93
Figure 27 Spectre infrarouge de l'atmosphère et système d'isolation atmosphérique installé sur le Spotlight .....	95
Figure 28 Modélisation linéaire d'un spectre d'une image spectrale par EMSC .....	99
Figure 29 Protocole expérimental global .....	108
Figure 30 Graphe affichant la répartition des âges des patients ayant participé à l'étude .....	110
Figure 31 Bilan bibliographique des vibrations discriminant in vivo les CBC de la peau normale.....	115
Figure 32 Points d'acquisition in vivo des spectres Raman issus du premier protocole .....	117
Figure 33 Points d'acquisition in vivo des spectres Raman issus du deuxième protocole .....	118
Figure 34 Photographies des 18 CBC nodulaires sélectionnés .....	123
Figure 35 Photographies des 4 CBC superficiels sélectionnés .....	123
Figure 36 Spectres Raman bruts de produits purifiés et commercialisés par Sigma.....	126
Figure 37 Spectres Raman bruts in vivo de deux types de lésions cutanées différentes .....	127
Figure 38 Spectres Raman bruts de peau obtenus en fonction de l'appareil de mesure utilisé .....	129
Figure 39 Principaux signaux de fluorescence modélisés du spectre Raman brut de peau in vivo .....	129
Figure 40 Spectres Raman bruts d'une pièce d'exérèse cutanée obtenus avec des systèmes optiques différents ...	130
Figure 41 Spectres Raman bruts d'un produit pur obtenus avec des systèmes optiques différents. ....	131
Figure 42 Spectres de la mélanine obtenus avec le système optique spectromètre HE - sonde RamanProbe.....	131
Figure 43 Photographies des lésions utilisées pour l'évaluation de la variabilité intratumorale .....	160
Figure 44 Classification des 49 spectres de peau in vivo.....	164
Figure 45 Classification des 49 spectres de peau in vivo (recherche de l'influence des différentes zones cutanées)	165
Figure 46 Classification des 49 spectres in vivo (recherche de l'influence du sexe des patients).....	167

Figure 47 Classification des 49 spectres in vivo (recherche de l'influence de l'âge des patients) .....	167
Figure 48 Classification des 49 spectres in vivo (recherche de l'influence du caractère gras ou sec de la peau).....	168
Figure 49 Classification des 49 spectres in vivo (recherche de l'influence du phototype cutané) .....	168
Figure 50 Représentation 3D du modèle de discrimination des CBC superficiels et des CBC nodulaires.....	171
Figure 51 Représentation 3D du modèle de discrimination des CBC superficiels et de la peau non tumorale.....	172
Figure 52 Représentation bidimensionnelle du modèle de prédiction in vivo développé (spectres C vs N) .....	173
Figure 53 Schéma d'une pièce d'exérèse après incision centrale.....	178
Figure 54 Les différents profils de spectres Raman bruts non tumoraux enregistrés sur les coupes congelées .....	184
Figure 55 Les différents profils de spectres Raman bruts tumoraux enregistrés sur les coupes congelées .....	185
Figure 56 Lignes de spectres acquises avec le microspectromètre LabRAM sur les pièces d'exérèse .....	187
Figure 57 Lignes de spectres acquises avec le spectromètre Raman fibré HE sur les pièces d'exérèse.....	191
Figure 58 Localisation des images spectrales enregistrées sur la photographie de la coupe congelée de P25 .....	194
Figure 59 Localisation de l'image spectrale enregistrée sur la photographie de la coupe congelée de P30.....	195
Figure 60 Localisation de l'image spectrale enregistrée sur la photographie de la coupe congelée de P32.....	196
Figure 61 Comparaison des fonds de spectres in vitro bruts pris sur zones tumorales et non tumorales.....	202
Figure 62 Lissage « excessif » d'un spectre tumoral in vitro brut.....	204
Figure 63 Superposition du spectre brut aux spectres lissés .....	205
Figure 64 Hétérogénéité tissulaire : classification KM de l'image Raman d'un nodule de CBC isolé .....	214
Figure 65 Hétérogénéité tissulaire : classification FCM de l'image Raman d'un nodule de CBC isolé .....	215
Figure 66 Hétérogénéité tissulaire : classification KM et CHA de l'image Raman de nodules de CBC .....	216
Figure 67 Hétérogénéité tissulaire : classification FCM de l'image Raman de nodules de CBC .....	217
Figure 68 Origine du CBC : classification KM de l'image infrarouge d'une coupe tissulaire de CBC et FPS.....	219
Figure 69 Origine du CBC : classification FCM de l'image infrarouge d'une coupe tissulaire de CBC et FPS.....	220
Figure 70 Origine du CBC : classification KM de l'image Raman d'une coupe tissulaire de CBC et FPS .....	221
Figure 71 Origine du CBC : classification FCM de l'image Raman d'une coupe tissulaire de CBC et FPS .....	222
Figure 72 Origine du CBC : classification KM et CHA de l'image Raman d'un nodule de CBC accolé à l'épiderme ...	223
Figure 73 Origine du CBC : classification FCM de l'image Raman d'un nodule de CBC accolé à l'épiderme .....	224
Figure 74 Origine du CBC : CHA de l'image infrarouge d'un nodule de CBC accolé à l'épiderme.....	225
Figure 75 Origine du CBC : classification FCM de l'image infrarouge d'un nodule de CBC accolé à l'épiderme .....	226
Figure 76 Différenciation du FPS : classifications KM d'images Raman et infrarouge de FPS et trichofolliculome ..	229
Figure 77 Différenciation du FPS : classification FCM de l'image infrarouge de FPS et trichofolliculome.....	230
Figure 78 Différenciation du FPS : classification KM d'images infrarouges de CBC, FPS et trichofolliculome.....	231
Figure 79 Différenciation du FPS : classification FCM d'images infrarouges de CBC, FPS et trichofolliculome.....	232

## Liste des tableaux

Tableau 1	Classification et propriétés des différentes fibres nerveuses sensitives cutanées .....	50
Tableau 2	Classification et propriétés des différentes fibres nerveuses motrices cutanées.....	52
Tableau 3	Les 4 cas de figure possibles obtenus lors de l'évaluation d'une méthode de diagnostic. ....	66
Tableau 4	Informations relatives aux patients et lésions de l'étude extraites des « fiches-patients ». ....	109
Tableau 5	Bilan des patients et des lésions de l'étude .....	110
Tableau 6	Publications ayant identifié des pics Raman discriminant in vivo les CBC de la peau NL .....	116
Tableau 7	Diagnostic histopathologique des patients éligibles à l'étude in vivo. ....	119
Tableau 8	Détail des caractéristiques individuelles et cutanées du panel de patient de l'étude in vivo .....	163
Tableau 9	Paramètres d'acquisition des spectres ex vivo (pièce d'exérèse du patient 25) .....	179
Tableau 10	Paramètres d'acquisition des spectres ex vivo (pièce d'exérèse du patient 30).....	180
Tableau 11	Paramètres d'acquisition des spectres ex vivo (pièce d'exérèse du patient 32).....	181
Tableau 12	Paramètres d'acquisition des spectres points in vitro (coupes congelées des patients 25, 30 et 32).....	183
Tableau 13	Evolution de l'intensité des pics Raman de la surface vers la profondeur des pièces d'exérèse.....	188
Tableau 14	Profils d'intensité intégrée de pics potentiellement discriminants (microspectroscopie Raman) .....	189
Tableau 15	Profils d'intensité intégrée de pics potentiellement discriminants (spectroscopie Raman fibrée) .....	192
Tableau 16	Tentative d'attribution des pics Raman potentiellement discriminants ex vivo.....	197
Tableau 17	Analyses monovariées d'images Raman de coupes de CBC (644, 720, 829 et 896 $\text{cm}^{-1}$ ) .....	199
Tableau 18	Analyses monovariées d'images Raman de coupes de CBC (1316, 1344, 1447 et 1473 $\text{cm}^{-1}$ ) .....	200
Tableau 19	Analyses monovariées d'images Raman de coupes de CBC (855, 920, 1251, 1271 et 1554 $\text{cm}^{-1}$ ) .....	201
Tableau 20	Images Raman de CBC (brutes et normalisées) pseudo-colorées selon les valeurs d'intensité intégrée	203
Tableau 21	Images Raman de CBC (brute et lissées) pseudo-colorées selon les valeurs d'intensité intégrée .....	205
Tableau 22	Profils d'intensité intégrée du fonds des spectres des lignes ex vivo des patients 25, 30 et 32.....	206

# Table des matières

<i>LISTE DES ABREVIATIONS</i> .....	6
<i>LISTE DES FIGURES</i> .....	7
<i>LISTE DES TABLEAUX</i> .....	9

## **INTRODUCTION SUR LA PEAU SAINES**

---

I- EPIDERME ET SURFACE CUTANEE .....	18
1. Couche basale ou couche germinative de l'épiderme .....	19
2. Couche du corps muqueux de Malpighi ou épineuse de l'épiderme.....	21
3. Couche granuleuse de l'épiderme .....	22
4. Couche claire ou brillante de l'épiderme .....	22
5. Couche cornée de l'épiderme .....	23
6. Surface cutanée .....	24
II- JONCTION DERMO-EPIDERMIQUE .....	26
1. Lamina lucida .....	28
2. Lamina densa.....	28
3. Sub-lamina .....	28
III- DERME.....	29
1. Derme papillaire ou derme superficiel .....	30
2. Derme réticulaire.....	30
IV- HYPODERME .....	31
V- ANNEXES CUTANEEES .....	34
1. Glandes sudoripares eccrines .....	34
2. Follicules pilo-sébacés .....	37
VI- VASCULARISATION CUTANEE.....	42
1. Vascularisation sanguine.....	42
2. Vascularisation lymphatique.....	46
VII- INNERVATION CUTANEE.....	49
1. Voies afférentes du système nerveux cutané.....	49
2. Voies efférentes du système nerveux cutané.....	52

## **INTRODUCTION SUR LES CARCINOMES BASO-CELLULAIRES**

---

I-	DEFINITION ET SOUS-TYPES.....	55
II-	DONNEES EPIDEMIOLOGIQUES .....	58
1.	Facteurs de risque.....	58
2.	Incidence .....	61
3.	Facteurs et groupes pronostiques .....	62
III-	METHODES DIAGNOSTIQUES.....	65
1.	Evaluation d'une méthode diagnostique .....	65
2.	Examen clinique.....	66
3.	Dermoscopie.....	67
4.	Evaluation histopathologique.....	68
5.	Autres méthodes de diagnostic.....	68
IV-	PRISE EN CHARGE THERAPEUTIQUE .....	69
1.	Excision chirurgicale.....	69
2.	Autres traitements .....	71

## **INTRODUCTION SUR LES SPECTROSCOPIES OPTIQUES VIBRATIONNELLES**

---

I-	INTRODUCTION.....	73
1.	Rayonnement, champ et spectre électromagnétiques.....	73
2.	Niveaux d'énergie moléculaire .....	75
3.	Modes de vibration moléculaire.....	75
4.	Interaction matière-rayonnement .....	77
5.	Spectroscopies optiques vibrationnelles.....	77
II-	PRINCIPE .....	78
1.	Approche classique .....	78
2.	Approche quantique .....	79
III-	COMPARATIF DES SPECTROSCOPIES RAMAN ET INFRAROUGE .....	82
IV-	INSTRUMENTATION.....	83
1.	Microspectromètre Raman LabRAM.....	83
2.	Spectromètre Raman HE / Sonde RamanProbe .....	88
3.	Microspectromètre infrarouge Spotlight .....	91

V-	PRETRAITEMENTS DES SPECTRES VIBRATIONNELS .....	96
1.	Correction de ligne de base .....	96
2.	Lissage .....	96
3.	Normalisation .....	97
4.	EMSC .....	98
VI-	TRAITEMENTS DES SPECTRES VIBRATIONNELS .....	100
1.	Méthodes de classification de données .....	100
2.	Méthode de réduction de données .....	105

### **RESULTATS OBTENUS AVEC LES TUMEURS *IN VIVO***

---

I-	INTRODUCTION.....	112
1.	Niveaux d'amélioration possibles de la prise en charge des CBC .....	112
2.	Intérêt de la spectroscopie Raman fibrée .....	114
II-	MATERIELS ET METHODES.....	117
1.	Mise au point et évolution du protocole expérimental .....	117
2.	Patients, lésions et spectres bruts sélectionnés .....	119
III-	RESULTATS ET DISCUSSION.....	124
1.	Le fond spectral : avantage ou inconvénient ? .....	124
2.	Résultats soumis .....	135
3.	Résultats non concluants .....	160
IV-	CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....	174

### **RESULTATS OBTENUS AVEC LES PIECES D'EXERESE**

---

I-	INTRODUCTION.....	177
II-	MATERIELS ET METHODES.....	178
III-	RESULTATS ET DISCUSSION.....	182
1.	Evaluation de la marge profonde des pièces d'exérèse .....	182
2.	Etude des fonds spectraux .....	202
IV-	CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....	208

## **RESULTATS OBTENUS AVEC LES COUPES CONGELEES**

---

I-	INTRODUCTION.....	210
II-	MATERIELS ET METHODES.....	211
III-	RESULTATS ET DISCUSSION.....	212
1.	Hétérogénéité du CBC nodulaire et du tissu environnant.....	212
2.	Origine cellulaire du CBC.....	218
3.	Différents degrés de différenciation tumorale du follicule pileux.....	227
IV-	CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	233
	<i>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....</i>	234
	<i>BIBLIOGRAPHIE.....</i>	238
	<i>PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS.....</i>	245

# INTRODUCTION

*Introduction sur*

---

# **LA PEAU SAIN**

---

*Références principales* : (1) (2) (3) (4)

La peau, aussi appelée tégument (du latin *tegumentum*, couverture), présente une architecture complexe et constitue beaucoup plus qu'une simple enveloppe corporelle : c'est un véritable organe. C'est d'ailleurs l'organe le plus lourd du corps humain (4 kg vidé de son sang) et le plus étendu (2 m<sup>2</sup> chez un adulte jeune de taille moyenne). Son épaisseur est de 2 mm en moyenne et peut varier de 1 mm au niveau de la peau fine (paupières) à 4 mm au niveau de la peau épaisse (paumes des mains et plantes des pieds). Sur le plan structural, la peau est constituée de trois tissus superposés. L'épiderme est la couche la plus superficielle et correspond à un épithélium de revêtement dont la fonction première est la protection de l'organisme contre les agressions extérieures. Le derme sous-jacent est un tissu conjonctif qui joue un rôle de soutien mais a aussi un rôle nutritif (vaisseaux). Il est également traversé par les nerfs et est le lieu d'implantation des annexes cutanées. Épiderme et derme sont séparés par une région particulière : la jonction dermo-épidermique. Enfin l'hypoderme est la couche la plus profonde. Il s'agit d'un tissu adipeux constituant un « coussin graisseux » qui se moule sur les muscles sous-jacents (**Figure 1**).

La peau est le siège de nombreuses fonctions. La plus essentielle est la protection de l'organisme contre les agressions extérieures, que ces dernières soient d'ordre physique, chimique, infectieuse, ou qu'il s'agisse de rayonnements solaires ou de chaleur. En ce sens la peau constitue une véritable barrière, mais c'est une barrière sélective puisqu'elle permet quand-même certains échanges avec le milieu extérieur (eau, énergie thermique, molécules). La peau a aussi des fonctions métaboliques : elle est le lieu de synthèse de la vitamine D et constitue un réservoir d'énergie et d'hormones pour l'organisme. Sa fonction sensorielle très développée lui permet d'intervenir dans la défense et l'adaptation au milieu environnant. Toutes ces fonctions lui donnent un caractère vital, et pour contrer toute défaillance, la peau a les capacités de maintenir elle-même son intégrité. Elle est ainsi capable de renouvellement et de synthèse, de réguler son hydratation et est douée d'auto-réparation (réparation de l'ADN, cicatrisation). Enfin, la peau est l'interface entre l'individu et la société et s'affirme donc comme un organe « relationnel » contribuant à la première impression donnée à autrui, au même titre que le regard, le geste, l'attitude, etc. Elle est aussi parfois le reflet de notre état de santé physique ou moral (fatigue, maladie interne) et de notre personnalité (rides).

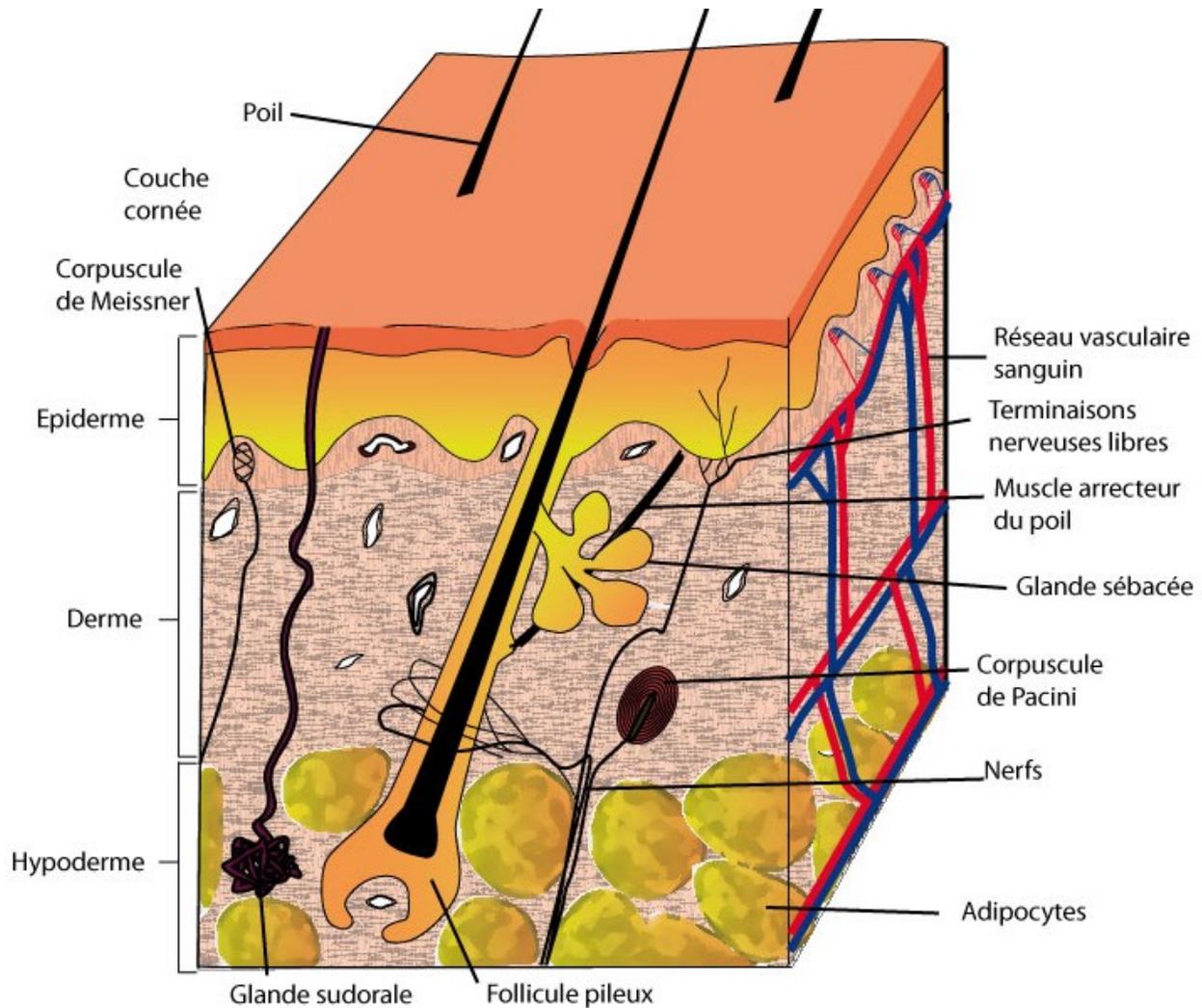


Figure 1 Représentation schématique de la peau humaine et de ses principaux composants.  
<http://biologiedelapeau.fr/spip.php?article9>

Dans l'objectif de faciliter l'interprétation des résultats de spectroscopie vibrationnelle obtenus au cours de cette thèse, nous nous intéresserons plus particulièrement dans ce chapitre à l'aspect structural de la peau saine : son organisation tissulaire, ses populations cellulaires, ses annexes, son réseau vasculaire et son réseau veineux.

## I- EPIDERME ET SURFACE CUTANEE

L'épiderme est lui-même constitué de plusieurs couches cellulaires et correspond à un épithélium dit « stratifié » (**Figure 2**). Selon qu'il soit situé en zone de peau fine ou épaisse, on distingue respectivement 4 ou 5 sous-couches cellulaires, et l'épaisseur épidermique peut ainsi varier de 0,05 mm à 1,5 mm, avec une moyenne de 0,1 mm. Cet épithélium de revêtement est également caractérisé de « pavimenteux » en raison de l'aplatissement de ses cellules superficielles, et de « kératinisé » car ses cellules sont responsables de la synthèse d'une protéine particulière : la kératine. En effet les kératinocytes représentent 80 % de la population cellulaire épidermique, et leur stratification reflète les étapes d'un processus étroitement contrôlé dont la finalité est la formation d'une barrière imperméable à l'eau : la couche cornée. Ainsi les kératinocytes naissent au niveau de la couche basale épidermique puis migrent vers la surface tout en se différenciant et en se remplissant de kératine jusqu'à atteindre le stade de kératinocytes cornés au niveau de la couche cornée. Nous allons décrire ci-dessous les différentes couches cellulaires constituant l'épiderme en suivant le processus de différenciation kératinocytaire de la profondeur vers la surface, puis nous aborderons les particularités de la surface cutanée.

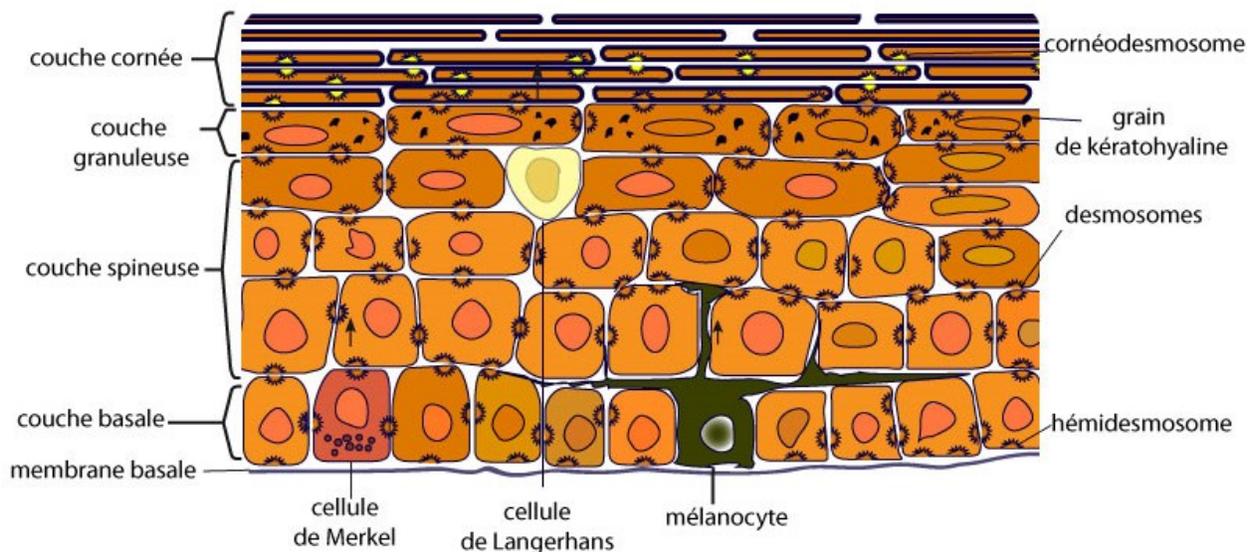


Figure 2 Représentation schématique d'une coupe transversale de l'épiderme humain.  
<http://biologiedelapeau.fr/spip.php?article10>

## 1. Couche basale ou couche germinative de l'épiderme (*stratum basalis* ou *stratum germinativum*)

### *Kératinocytes basaux*

La couche basale épidermique est constituée d'une unique couche de kératinocytes reposant sur la jonction dermo-épidermique, qui elle-même s'appuie sur les papilles dermiques dont elle épouse la forme. Ainsi la couche basale et la jonction dermo-épidermique apparaissent ondulées sur une coupe cutanée transversale. Les kératinocytes de cette couche sont de forme cylindrique ou cubique avec une implantation perpendiculaire à la surface des papilles dermiques sous-jacentes. Leur observation au microscope électronique révèle la présence de nombreux filaments intermédiaires appelés tonofilaments qui sont regroupés en faisceaux : les tonofibrilles. Ces derniers sont soit orientés vers le pôle basal de la cellule où ils se lient aux hemidesmosomes, permettant ainsi l'ancrage à la jonction dermo-épidermique ; soit orientés vers les pôles cellulaires apical ou latéraux où la liaison se fait cette fois avec des desmosomes, permettant la jonction entre kératinocytes adjacents. L'ancrage des kératinocytes entre eux est également assuré par des jonctions communicantes non associées au cytosquelette et qui leur permet d'échanger directement des petites molécules à faible poids moléculaire telles que des ions ou des seconds messagers des systèmes de transduction. Les kératinocytes basaux sont également appelés cellules germinatives car ce sont les seules cellules de l'épiderme capables de se diviser et leur activité mitotique est importante. Chacune d'entre elles peut donner naissance à deux cellules-filles identiques dont l'une migrera progressivement vers la surface (différenciation kératinocytaire), alors que l'autre gardera les mêmes caractéristiques que la cellule initiale et restera sur place pour se diviser à nouveau (renouvellement ou réparation épidermique). On parle de cellules souches épidermiques. Pour compenser la prolifération ininterrompue des kératinocytes basaux, certains d'entre eux peuvent rester quiescents ou s'engager dans un processus de mort cellulaire programmée afin de maintenir l'homéostasie cellulaire.

### *Mélanocytes*

C'est dans la couche basale épidermique que l'on trouve les mélanocytes, principaux responsables de la coloration de la peau via la synthèse d'un pigment cutané : la mélanine. Ces cellules représentent 13 % de la population cellulaire épidermique totale, et sont réparties de façon non

homogène : 2400 / mm<sup>2</sup> sur les organes génitaux, 2000 / mm<sup>2</sup> sur les régions exposées au soleil, et 1500 / mm<sup>2</sup> en moyenne sur le reste du corps. Le nombre de mélanocytes est le même chez tous les individus quel que soit leur âge ou leur couleur de peau : seule leur activité varie. Ainsi, le nombre de mélanocytes actifs diminue de 10 à 20 % tous les 10 ans, ce qui se manifeste surtout par le grisonnement des cheveux après 40 ans ; et les différences de coloration cutanée ont en fait pour origine des différences dans la mélanogenèse qui est le processus de synthèse, distribution et transfert des mélanines dans l'épiderme. Les mélanocytes sont des cellules de grande taille à corps globuleux qui, contrairement aux kératinocytes, n'ont pas d'attache aux cellules avoisinantes et ont un faible taux de renouvellement. Elles possèdent des prolongements cytoplasmiques appelés dendrites qui peuvent atteindre la troisième assise de kératinocytes épidermiques (couche épineuse). Leur cytoplasme renferme les mélanosomes, organites spécifiques à la synthèse des mélanines (eumélanines et phéomélanines). Une fois ces organites totalement remplis de mélanine, ils vont migrer en bout de dendrite pour être transférés aux kératinocytes. Chaque mélanocyte délivre ainsi la mélanine qu'il produit à 36 kératinocytes avoisinants : l'ensemble forme ce que l'on appelle une unité épidermique de mélanisation. Une fois dans le cytoplasme kératinocytaire, les mélanosomes vont se concentrer autour du noyau. Les mélanines assurent de cette manière un rôle photoprotecteur vital en absorbant les rayonnements non réfléchis à la surface cutanée et en neutralisant les radicaux libres se formant sous l'influence des ultraviolets, ce qui évite l'atteinte des organes vitaux de la cellule et des structures physiologiques environnantes.

### *Cellules de Merkel*

On trouve également dans cette couche la population la plus minoritaire de l'épiderme : les cellules de Merkel. Ce sont des cellules encore assez mystérieuses impliquées dans la fonction du tact avec un rôle mécanorécepteur, et qui produisent des neuromédiateurs dont le rôle reste à préciser. Elles sont particulièrement nombreuses au niveau des paumes des mains et des plantes des pieds, ainsi que des lèvres et des régions supérieures des bras et du visage. Les cellules de Merkel sont de forme ovale, disposées parallèlement à la surface cutanée et projettent des expansions villositaires entre les kératinocytes adjacents auxquels elles sont reliées par des desmosomes. Certaines présentent des dendrites très courtes, et d'autres plus longues qui s'insinuent entre les kératinocytes basaux et supra-basaux. Elles contiennent des quantités relativement faibles de filaments de kératine, dont la composition diffère de ceux des kératinocytes. On trouve dans leur cytoplasme de nombreux

granules sécrétoires dans lesquels sont stockés les neuromédiateurs. Les cellules de Merkel sont associées à des fibres nerveuses et leur zone de contact ressemble à une synapse nerveuse classique. Elles peuvent être regroupées en amas appelé corpuscule ou disque de Merkel.

## 2. Couche du corps muqueux de Malpighi ou épineuse de l'épiderme (*stratum spinosum* ou *stratum filamentosum*)

### *Kératinocytes épineux*

On observe en général 5 ou 6 assises de kératinocytes épineux dans la couche du corps muqueux de Malpighi. Ces cellules sont volumineuses, de forme polygonale et ont tendance à s'aplatir horizontalement dans la région la plus superficielle de cette couche. Elles sont attachées entre elles par un nombre particulièrement important de desmosomes, ce qui leur donne une allure épineuse en observation histologique à l'origine de leur nom. Ces attaches assurent une grande cohésion cellulaire qui donne une très grande résistance mécanique à cette couche. De plus, les cellules épineuses synthétisent de la kératine de manière plus active que les kératinocytes basaux, et on trouve à l'intérieur de leur cytoplasme des tonofilaments plus compacts et en nombre plus important. Il est à noter que les kératines jouent un rôle important dans le processus de différenciation kératinocytaire observé de la couche basale à la couche cornée, et les kératines synthétisées vont être de type différent en fonction de la couche épidermique dans laquelle se situent les kératinocytes.

### *Cellules de Langerhans*

Les cellules de Langerhans sont les cellules sentinelles du système immunitaire de la peau. Il s'agit de cellules dendritiques c'est-à-dire spécialisées dans la capture, le transport et la présentation des antigènes aux lymphocytes T des ganglions lymphatiques vers lesquels elles peuvent migrer. Ces cellules sont localisées entre les kératinocytes des couches basale et épineuse, et surtout dans la couche épineuse. Elles ne constituent que 2 à 5 % de la population cellulaire épidermique avec une densité de 400 à 800 / mm<sup>2</sup>, mais grâce aux longs prolongements dendritiques qu'elles possèdent, elles forment un véritable réseau qui couvre la totalité de la surface épidermique. Leur nombre

diminue au cours du vieillissement. Les cellules de Langerhans ont un cytoplasme clair dépourvu de tonofilaments, de desmosomes et de mélanosomes, mais dans lequel on trouve des organites spécifiques appelés granules de Birbeck à fonction encore hypothétique.

### **3. Couche granuleuse de l'épiderme (*stratum granulosum*)**

La couche granuleuse de l'épiderme est composée de 3 assises de kératinocytes de forme très aplatie. On observe dans leur cytoplasme une répartition aléatoire des tonofilaments ainsi qu'une raréfaction des organites. On y trouve également deux sortes de granulations à l'origine du nom donné à cette couche : les kératohyalines et les kératinosomes. Les granulations de kératohyaline sont volumineuses, dépourvues de membrane externe et contiennent de la profilaggrine. Les kératinosomes sont également appelés corps lamellaires d'Odland. Ce sont des granulations plus petites qui ont un contenu lipidique. Elles sont entourées d'une double membrane qui fusionne avec la membrane plasmique du kératinocyte pour déverser son contenu dans l'espace extracellulaire. Les lipides déversés vont jouer le rôle de ciment intercellulaire pour consolider les adhésions cellulaires assurées par les desmosomes toujours nombreux.

### **4. Couche claire ou brillante de l'épiderme (*stratum lucidum*)**

Cette couche épidermique n'existe pas dans tous les épidermes cutanés. En effet, on ne l'observe qu'au niveau de peaux particulièrement épaisses, telles que les paumes des mains ou les plantes des pieds. Elle est constituée de plusieurs assises de cellules aplaties d'aspect clair et homogène. Ces cellules sont appelées cellules « T » car elles font la « transition » entre les cellules granuleuses et cornées. En dehors des zones de peau épaisse, les cellules T existent mais de manière isolée. Certains classent la couche claire parmi les sous-couches de la couche épidermique cornée.

## 5. Couche cornée de l'épiderme (*stratum corneum*)

Suivant la localisation, la couche cornée est constituée de 4 à 20 assises cellulaires. Les cellules de cette couche sont complètement aplaties (leur surface équivaut à la surface occupée par 25 kératinocytes de la couche basale). Elles ne possèdent plus de noyau ni d'organites cytoplasmiques. Ce sont les kératinocytes cornés ou cornéocytes. Ce sont des cellules complètement kératinisées. En effet, elles sont remplies de faisceaux de filaments de kératine agglutinés à l'intérieur d'une matrice dense de filaggrine. Cette protéine amorphe provient de la déphosphorylation et du clivage de la profilaggrine contenue initialement dans les granulations de kératohyaline observées dans le cytoplasme des cellules granuleuses. La membrane plasmique des cornéocytes est fortement épaissie. Du côté intracellulaire, elle est bordée d'une structure protéique constituant un véritable squelette interne appelé enveloppe cornée. Du côté extracellulaire, elle est doublée par une couche de lipides organisés en feuillets intercornéocytaires (organisation lamellaire) jouant un rôle important dans la cohésion des cornéocytes. Ces lipides proviennent des corps lamellaires d'Odland dont le contenu a été déversé au niveau de la couche granuleuse. On peut distinguer deux sous-couches à l'intérieur de la couche cornée : la couche compacte et la couche desquamante.

### *Couche compacte (stratum compactum)*

Cette sous-couche de la couche cornée fait directement suite à la couche granuleuse (ou claire pour les peaux épaisses) est appelée la couche compacte (*stratum compactum*). Les desmosomes de cette couche sont remplacés par des cornéodesmosomes, de structure plus simple et qui continuent à assurer une certaine cohésion intercellulaire.

### *Couche desquamante de Ranvier (stratum disjunctum)*

La sous-couche la plus superficielle est le siège de la desquamation, et est de ce fait appelée couche desquamante (*stratum disjunctum*). Dans cette zone épidermique, la filaggrine est complètement protéolysée produisant les acides aminés impliqués dans l'hydratation des couches épidermiques superficielles (Natural Moisturing Factor) ainsi que l'acide urocanique à effet photo-immunosuppresseur et capable d'absorber les rayonnements ultraviolets. La desquamation est le processus par lequel les cornéocytes les plus superficiels et donc les plus « usés » par le contact

avec le milieu extérieur, sont éliminés par détachement des autres cellules épidermiques et libération dans l'environnement extérieur. Pour ce faire, les cellules subissent une mort cellulaire programmée particulière appelée cornéification, accompagnée d'une déstructuration des membranes lipido-protéiques cornéocytaires et de la dégradation des cornéodesmosomes. La desquamation des cellules cornées est un mécanisme parfaitement régulé et compensé par le renouvellement perpétuel de l'épiderme à partir des cellules souches basales. Ainsi, chaque fois qu'une cellule cornée est éliminée en surface, une division cellulaire se produit dans la couche germinative. En moyenne, 9 à 17 mg de cellules cornées sont perdus chaque jour de façon souvent imperceptible car elles desquament de façon isolée ou par petits paquets de moins de 5 cellules.

C'est la couche cornée qui assure la fonction barrière de l'épiderme contre la fuite du milieu intérieur d'une part, et contre les agressions extérieures d'autre part (mécaniques, thermiques, radiations électromagnétiques, agents chimiques ou infectieux); et tout le processus de différenciation kératinocytaire a pour objectif ultime la formation de cette couche cornée, ainsi que son renouvellement régulier qui renforce son imperméabilité. Le temps de renouvellement de l'épiderme humain (incluant la division des kératinocytes basaux, la migration dans l'épiderme et la desquamation) est normalement de 30 à 45 jours, avec un temps de transit dans la couche cornée d'environ 14 jours.

## 6. Surface cutanée

La couche cornée n'est pas en contact direct avec l'extérieur. Elle est recouverte d'un film cutané et on y retrouve des micro-organismes constituant la flore cutanée.

### Film cutané de surface

Il existe en surface cutanée un film hydrolipidique dans lequel on retrouve des cellules desquamantes et les lipides qui composaient le ciment intercellulaire dans la couche cornée. Ce film hydrolipidique est une émulsion de type eau dans l'huile. La phase aqueuse est constituée essentiellement de sueur, dans laquelle on peut y retrouver des substances dissoutes minérales ou organiques. La phase lipidique est composée de lipides issus du sébum et de lipides élaborés par les cellules épidermiques. Le film cutané de surface joue un rôle important contre la pénétration de substances étrangères en renforçant la fonction barrière de la couche cornée. De plus, sa teneur en

lipide et son acidité ( $4,2 < \text{pH} < 6,1$  en général) favorisent la flore bactérienne résidente en empêchant la croissance des germes pathogènes. Ce film hydrolipidique assure également d'autres fonctions comme la protection contre les agressions chimiques grâce à son pouvoir tampon, la protection contre les rayonnements solaires, et le maintien de l'hydratation cutanée. En tant que véhicule d'odeurs propres à chaque individu, il joue également un rôle de discrimination, moins important chez l'Homme que chez l'animal, mais non négligeable pour autant.

### *Flore cutanée de surface*

La couche cornée est imperméable aux grosses molécules et aussi aux micro-organismes, mais il existe malgré tout en surface cutanée des zones pouvant être colonisées. En effet, les infundibula des follicules pileux constituent un excellent milieu pour les micro-organismes, et les espaces vides laissés par la dissolution du ciment intercellulaire intervenant dans le processus de desquamation peuvent aisément accueillir des colonies. Ainsi, il existe au niveau de la surface cutanée, une flore bactérienne, mycosique (et probablement virale) résidente dont la présence est essentielle au maintien de la « santé » de la peau. En effet, elle entre en compétition avec une flore transitoire composée de germes ne se multipliant pas normalement en surface cutanée, mais qu'il est possible de rencontrer dans l'environnement. La flore transitoire est plus polymorphe et peut comporter des micro-organismes potentiellement pathogènes.

### *Relief cutané de surface*

Il est à noter que la surface cutanée présente un relief formé des orifices folliculaires, des pores sudoripares, et surtout de sillons qui s'entrecroisent et entre lesquels on distingue la saillie de chaque cornéocyte. On parle de réseau microdépressionnaire. On ne peut l'observer que sur la peau *in vivo* qui est sous tension permanente car c'est cette tension qui est à l'origine de ce réseau. En effet, il n'existe plus sur une pièce d'exérèse cutanée car la peau est alors libre de se rétracter. L'aspect du réseau microdépressionnaire est lié à l'organisation du derme papillaire sous-jacent. Le rôle principal de ce microrelief est mécanique : en se dépliant partiellement, il permet une extension de la surface cutanée, de l'épiderme et du derme papillaire. C'est une sorte de « réservoir d'étirement », en particulier pour l'épiderme qui est très peu élastique et qui serait incapable de faire face aux tractions auxquelles il est soumis (par exemple au niveau des plis de flexion). Il reflète la direction des contraintes mécaniques subies par la peau au niveau de chaque région cutanée. L'existence de ce réseau microdépressionnaire a aussi pour conséquence l'augmentation

de la surface d'échange entre la peau et le milieu extérieur. Les sillons servent de canaux d'écoulement et de rétention du sébum et de la sueur. Au niveau des paumes des mains et des plantes des pieds, ce relief semble spécialement adapté pour l'adhésion au sol et aux objets.

## II- JONCTION DERMO-EPIDERMIQUE

Derme et épiderme sont reliés par une zone d'adhérence appelée jonction dermo-épidermique et centrée autour de la membrane basale épidermique (appelée aussi lame basale épidermique). Cette zone apparaît ondulée sur une coupe car elle repose sur les papilles dermiques qui s'imbriquent dans l'épiderme. C'est une matrice d'ancrage de l'épiderme au derme qui constitue aussi une barrière physique sélective entre ces deux couches cutanées en contrôlant l'invasion cellulaire tout en permettant une diffusion contrôlée des cellules du système immunitaire et d'éléments nutritifs et métaboliques du derme vers l'épiderme. Elle intervient également dans plusieurs autres fonctions fondamentales telles que la polarité épidermique, la cicatrisation cutanée, et l'apport d'informations extérieures grâce aux récepteurs moléculaires qu'elle contient. D'un point de vue structural, la jonction dermo-épidermique est une région acellulaire de 50 à 80 nm d'épaisseur, élaborée à la fois par les kératinocytes basaux de l'épiderme et les fibroblastes du derme et constituée de trois couches de matrice extracellulaire spécialisée appelées *lamina lucida*, *lamina densa* et *sub-lamina* de la surface vers la profondeur (**Figure 3**).

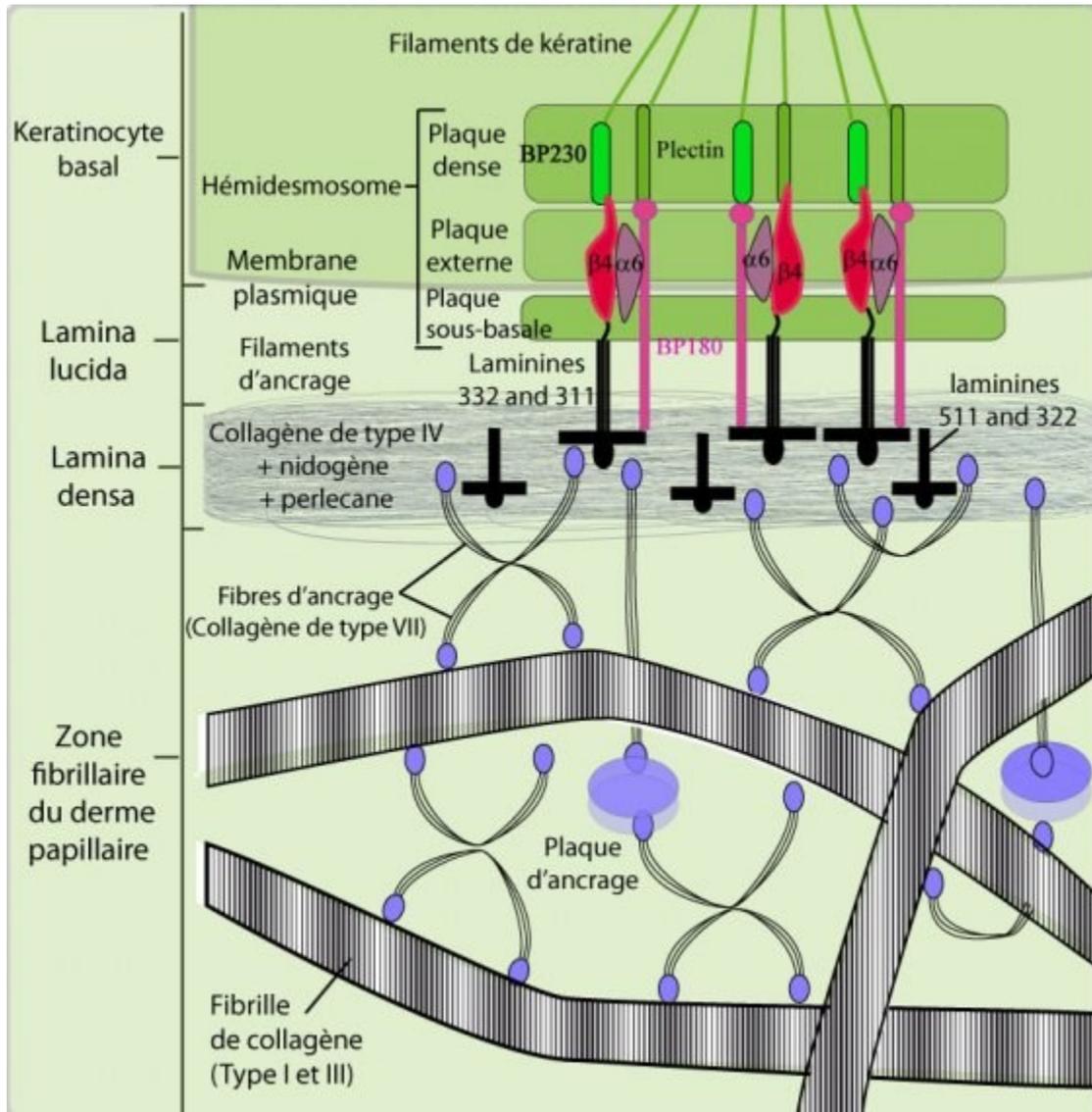


Figure 3 Représentation schématique de la jonction dermo-épidermique.  
<http://biologiedelapeau.fr/spip.php?article47>

### 1. Lamina lucida

La couche la plus superficielle de la jonction dermo-épidermique est directement en contact avec les kératinocytes épidermiques. Elle est appelée *lamina lucida* car elle se révèle transparente aux électrons en microscopie électronique. Elle est traversée par des filaments d'ancrage riche en laminine reliant la couche centrale de la jonction dermo-épidermique aux kératinocytes basaux, principalement au niveau de leurs hémidesmosomes.

### 2. Lamina densa

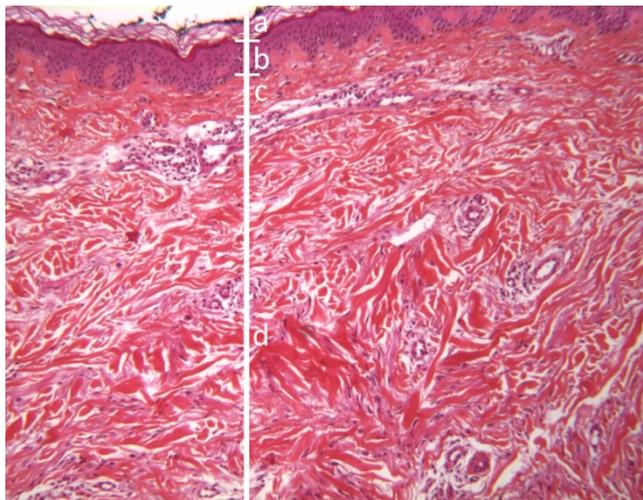
La couche centrale de la jonction dermo-épidermique constitue la zone d'ancrage effective pour les filaments d'ancrage issus de l'épiderme et les fibres d'ancrage issues du derme papillaire. Elle est appelée *lamina densa* car elle se révèle dense aux électrons en microscopie électronique. Elle contient en majorité du collagène non fibrillaire de type IV qui forme un réseau bidimensionnel en treillis à l'origine de sa rigidité et servant de charpente pour l'arrimage de glycoprotéines (laminine et nidogène) et de protéoglycannes (perlécan).

### 3. Sub-lamina

Enfin la couche la plus inférieure de la jonction dermo-épidermique est en continuité avec le derme papillaire sous-jacent et est de ce fait appelée zone fibrillaire du derme papillaire ou *sub-lamina*. Elle correspond à une zone fibreuse contenant des fibres de collagène striées de type I et III. On y trouve des fibres d'ancrage constituées de collagène de type VII reliant soit des plaques d'ancrage de collagène IV à la *lamina densa*, soit deux zones différentes de la *lamina densa* formant ainsi une boucle à l'intérieur de la *sub-lamina*.

### III- DERME

L'essentiel de l'épaisseur de la peau est constitué par son tissu intermédiaire : le derme. Il s'agit d'un tissu conjonctif fibreux composé de cellules fixes et de cellules migratrices baignant dans une matrice extracellulaire. Les fibroblastes sont les cellules majoritaires du derme. Ce sont les cellules fixes ou résidentes du derme. Les cellules du système immunitaire (leucocytes, cellules dendritiques, mastocytes, macrophages) sont les cellules migratrices. Les fibroblastes ont un corps cellulaire aplati et de forme stellaire ou allongée en fuseau. Ils possèdent de fins prolongements cytoplasmiques. Ces cellules interagissent avec la matrice extracellulaire qui les entoure via des récepteurs membranaires de type intégrine. Elles sont responsables de la synthèse de cette matrice, de son entretien et sont également capables de la dégrader par sécrétion de collagénases et de protéases. La matrice extracellulaire dermique est composée d'un réseau de fibres de collagène et d'élastine engluées dans une substance fondamentale formée d'eau, de sels minéraux et de macromolécules (protéoglycannes, glycosaminoglycannes). On y trouve également des glycoprotéines de structure. De plus, le derme renferme la majorité du système vasculaire de la peau, ainsi que des fibres nerveuses, et constitue le sol d'implantation des annexes cutanées. Tout comme l'épiderme, l'épaisseur du derme varie en fonction de la localisation cutanée. Ainsi il est plus fin au niveau des paupières et du prépuce et plus épais au niveau de la paume des mains et de la plante des pieds. Son épaisseur moyenne est de 1 à 2 mm. On peut y distinguer deux zones de structure différente : le derme papillaire et le derme réticulaire (**Figure 4**).



*Figure 4 Coupe colorée de tissu cutané. (a) Couche cornée. (b) Epiderme (couches basale, épineuse et granuleuse). (c) Derme papillaire. (d) Derme réticulaire. (Avec la permission du Dr A. Durlach, Reims.)*

## 1. Derme papillaire ou derme superficiel

Le derme papillaire est la couche dermique immédiatement sous-jacente à la jonction dermo-épidermique. A sa surface, on observe les papilles dermiques qui sont à l'origine de son nom. Ces papilles s'imbriquent dans l'épiderme et permettent les échanges nutritifs et hormonaux avec les couches profondes de l'épiderme. De plus, on trouve dans le derme papillaire les plexus artériels, veineux et lymphatiques. C'est donc un tissu très vascularisé. Dans les zones cutanées particulièrement sensibles, il renferme des terminaisons nerveuses encapsulées (corpuscules de Meissner, de Pacini ou de Ruffini). De plus, il est traversé par les fines connexions axonales des terminaisons nerveuses libres sensitives de l'épiderme. Le derme papillaire est riche en fibres de collagène entrelacées qui sont orientées perpendiculairement à l'épiderme. Les fibres élastiques sont ancrées à la jonction dermo-épidermique. Les fibres élastiques et de collagène sont fines et de texture assez lâche. L'essentiel de la partie réactionnelle de la peau est concentré dans cette fine couche de tissu conjonctif. En effet, en plus de ses fonctions architecturale et sensorielle et d'assurer la nutrition et les échanges hormonaux avec l'épiderme sus-jacent, le derme papillaire joue un rôle dans de nombreuses autres fonctions telles que la cicatrisation, la thermorégulation, l'immunité et l'absorption percutanée. Il constitue également un important réservoir d'eau pour l'organisme.

## 2. Derme réticulaire

La couche profonde du derme appelée derme réticulaire constitue la majeure partie du derme. Elle représente en effet  $4/5^{\text{ème}}$  de l'épaisseur totale du derme et est parfois subdivisée en derme moyen et derme profond. Son nom a pour origine l'agencement particulier de ses fibres de collagène appelées aussi réticulines. Ces fibres sont disposées en faisceaux particulièrement épais qui s'entrecroisent horizontalement par rapport à la surface de la peau. L'épaisseur de ces fibres est d'autant plus importante qu'elles se situent en profondeur. Les fibres élastiques associent leur réseau à cette trame serrée. On y trouve peu de cellules, essentiellement des fibroblastes. Le derme réticulaire est traversé par quelques vaisseaux sanguins de transfert, reliant le plexus sous-papillaire au plexus cutané sous-jacent situé à la jonction derme-hypoderme. Aux paumes et plantes, s'ajoutent de nombreuses communications artério-veineuses jouant un rôle dans la thermorégulation des extrémités. De plus, il héberge les follicules pilo-sébacés, et dans sa partie profonde, des glandes sudorales. Au niveau de sa partie inférieure, il est en contact direct avec

l'hypoderme. La fonction du derme réticulaire est essentiellement mécanique. Véritable charpente de la peau, il est le tissu de soutien solide, tout en étant à la fois compressible, extensible et élastique. Il permet ainsi le maintien de la forme et de l'architecture de la peau, et assure la protection des annexes cutanées contre les agressions mécaniques.

#### IV- HYPODERME

L'hypoderme est la couche la plus profonde de la peau. Il s'agit d'un tissu adipeux blanc sous-cutané, appelé ainsi par opposition au tissu adipeux brun (persistant chez l'adulte sous la clavicule et le long de la colonne vertébrale, dont le rôle reste à confirmer) et au tissu adipeux profond (en position viscérale ou intra-abdominale, ayant une activité métabolique propre). Le tissu adipeux de l'hypoderme forme ce que l'on appelle le panicule adipeux correspondant à un matelas graisseux qui enveloppe complètement l'organisme, sur lequel repose le derme et qui se moule sur les muscles et les os sous-jacents. Il a une épaisseur variable selon la localisation anatomique : mince sur le front et épais sur les fesses, par exemple. De plus, il se distribue différemment chez l'homme et la femme. A ce titre, il constitue un véritable caractère sexuel secondaire et on observe que le panicule adipeux est plus particulièrement développé en-dessous de l'ombilic chez la femme (répartition gynoïde), et au-dessus de l'ombilic chez l'homme (répartition androïde). Ce tissu représente 15 à 20 % du poids corporel chez un individu de poids moyen, et est fortement souligné en cas d'obésité.

Histologiquement, l'hypoderme est une forme particulière de tissu conjonctif qui est relié à la partie inférieure du derme par des expansions de fibres de collagène et de fibres élastiques. Il contient des lobes graisseux séparés par des travées de fibres de collagène issues du derme et qui vont se fixer aux aponévroses des muscles ou au périoste des os, limitant ainsi la mobilité de la peau. Ces lobes graisseux sont eux-mêmes subdivisés en petits lobules graisseux délimités par de fines cloisons conjonctives contenant des fibrilles de collagène, des fibroblastes, des macrophages et des mastocytes. Entre ces lobules, on trouve aussi de très nombreux capillaires sanguins et des fibres nerveuses. L'importance de la vascularisation et de l'innervation du tissu adipeux varie selon

la localisation anatomique. A l'intérieur des lobules graisseux, on peut observer les adipocytes matures, nommés aussi cellules graisseuses, qui sont tassés les uns contre les autres. Ce sont des cellules sphériques contenant une large vacuole remplie de triglycérides. Elles peuvent changer rapidement de volume lors d'un amaigrissement ou d'une prise de poids et subir ainsi une variation de 27 fois en volume. Les adipocytes matures constituent la masse principale de l'hypoderme. Les autres populations cellulaires constituent la fraction stroma-vasculaire du tissu adipeux. Celle-ci inclue les préadipocytes (précurseurs des cellules graisseuses), les cellules souches du tissu adipeux, les cellules endothéliales participant à la néovascularisation donc au développement du réseau capillaire, les fibroblastes sécrétant procollagène et proélastine, ainsi que les cellules d'origine hématopoïétique impliquées dans l'inflammation (lymphocytes et macrophages notamment) (**Figure 5**).

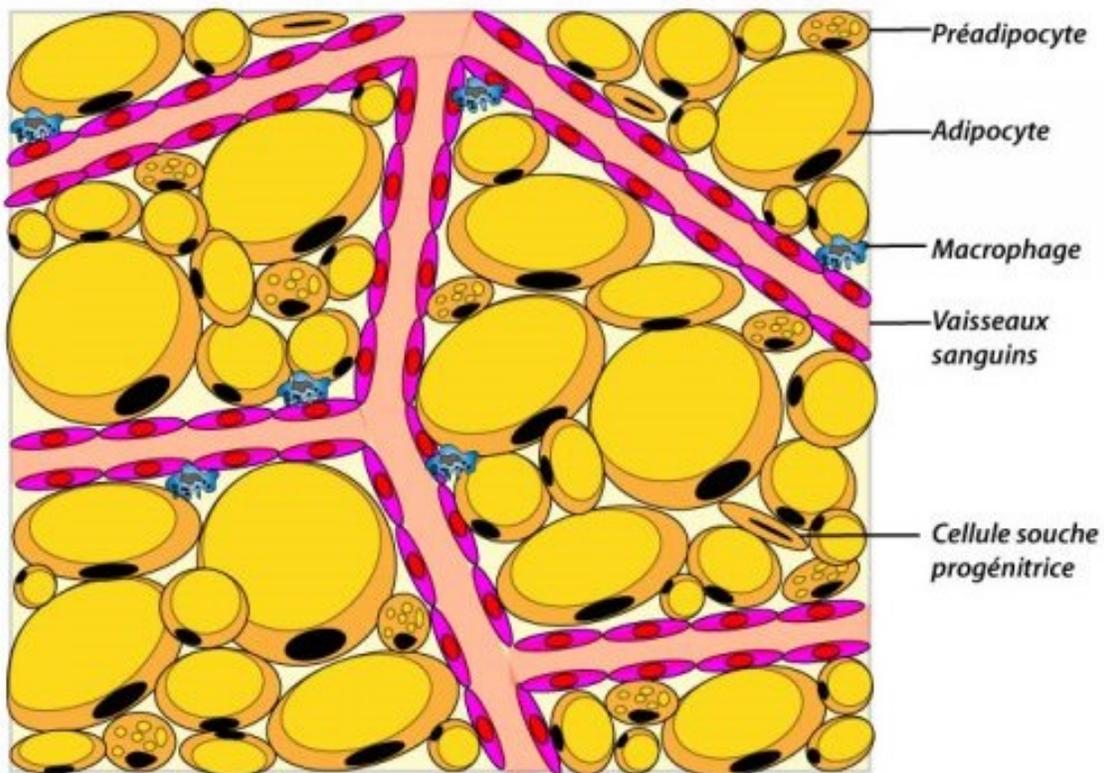


Figure 5 Représentation schématique du tissu adipeux et de sa composition cellulaire.  
<http://biologiedelapeau.fr/spip.php?article28>

L'hypoderme assure quatre fonctions principales : énergétique, sécrétoire, protectrice et plastique.

1/ Tout d'abord, il constitue la plus grande réserve énergétique de l'organisme. En effet, grâce à ses fonctions métaboliques particulières, il est capable d'accumuler et de stocker les lipides sous forme de triglycérides en période post-prandiale (captation), et à l'inverse de les libérer sous forme d'acides gras et de glycérol en période de jeûne (lypolyse) de façon à fournir l'énergie nécessaire aux tissus qui en ont besoin (tissu musculaire en particulier). Il gère ainsi les réserves énergétiques de l'organisme selon les besoins et les approvisionnements. Les tissus adipeux situés dans la partie supérieure du corps sont métaboliquement plus actifs.

2/ Deuxièmement, les cellules du tissu adipeux (adipocytes notamment) produisent une quantité notable de molécules bioactives appelées adipokines. Ces molécules sont de nature variée, et certaines ont un statut d'hormone pouvant agir au niveau local (autocrine ou paracrine) ou systémique, conférant au tissu adipeux un rôle endocrinien. Par exemple la leptine qui est sécrétée exclusivement par les adipocytes blancs joue de nombreux rôles dont celui d'hormone de la satiété agissant directement sur l'hypothalamus. Le tissu adipeux est également capable de métaboliser des hormones stéroïdes et en constitue d'ailleurs un réservoir important. Malgré tout, la fonction sécrétoire du tissu adipeux sous-cutané est moins développée que sa fonction métabolique (à l'inverse des tissus adipeux profonds).

3/ Ensuite, le panicule adipeux a un rôle protecteur. C'est un isolant mécanique jouant un rôle d'amortisseur en cas de choc, mais aussi un isolant thermique jouant un rôle fondamental dans la thermorégulation.

4/ Enfin, il modèle le corps en lui donnant sa forme (silhouette).

## V- ANNEXES CUTANÉES

Les annexes cutanées sont de petites structures anatomiques fonctionnelles et autonomes de la peau. Il en existe trois types : les glandes sudoripares eccrines, les appareils pilo-sébacés ainsi que les ongles que nous n'aborderons pas dans ce manuscrit.

### 1. Glandes sudoripares eccrines

On compte 2 à 5 millions de glandes sudoripares (ou sudorales) eccrines par individu. Ce sont des glandes exocrines responsables de la majorité de la sécrétion de la sueur. Elles sont réparties sur toute la surface du corps, excepté au niveau du lit de l'ongle et des lèvres, et ont une densité maximale dans les régions palmo-plantaires. Ces glandes prennent la forme d'un tube d'environ 5 mm de long, qui s'ouvre en surface cutanée par un pore localisé en général aux croisements des sillons du réseau microdépressionnaire. L'extrémité la plus profonde de ce tube est borgne et se replie en un peloton appelé glomérule sudoripare qui se loge dans le derme profond le plus souvent, et parfois dans la zone de transition derme-hypoderme. Ce peloton se prolonge par un segment tubulaire relativement droit qui traverse verticalement le derme. La glande pénètre ensuite dans l'épiderme, en général au niveau d'une crête épidermique interpapillaire, où elle prend une structure hélicoïdale jusqu'à aboucher en surface cutanée (**Figure 6**). La portion intradermique des glandes eccrines est entourée d'un triple réseau de fibres nerveuses, de capillaires et de fibres élastiques, particulièrement dense au niveau du peloton.

On peut distinguer deux parties physiologiquement distinctes au sein d'une glande sudoripare eccrine, et qui sont séparées par une petite dilatation (l'ampoule de Loewenthal). En profondeur, on trouve la portion sécrétrice appelée peloton sécrétoire qui correspond aux deux tiers initiaux du glomérule sudoripare. Le reste de la glande correspond à la portion excrétrice, appelée aussi conduit sudorifère, et inclut le tiers suivant du glomérule sudoripare, le segment dermique droit et le segment épidermique hélicoïdal. La sueur primitive est synthétisée dans le peloton sécrétoire à partir du plasma provenant de la riche vascularisation entourant ce type de glande. Elle va subir ensuite, lors de son passage dans le conduit sudorifère, des phénomènes de sécrétion et de réabsorption. La sueur définitive ainsi obtenue est totalement limpide, composée de 99 % d'eau, 0,5 % de sels minéraux et 0,5 % de substances organiques. Elle est excrétée de façon pulsatile (0,3

à 12 émissions par minute selon les régions corporelles, les individus et les circonstances) et de façon cyclique (alternance de phases de sécrétions pulsatiles avec des phases de repos). De plus, toutes les glandes sudoripares eccrines d'un organisme ne sont jamais actives simultanément. Elles fonctionnent en effet par groupes, qui alternent leur phase de sécrétion sudorale. Ainsi même en cas de sudation abondante, 50 % environ des pores sudoraux sont en phase de repos (émission de vapeur d'eau seulement). Le volume de sueur excrétée par jour varie de 0,5 litre au repos à plus de 10 litres dans des conditions extrêmes.

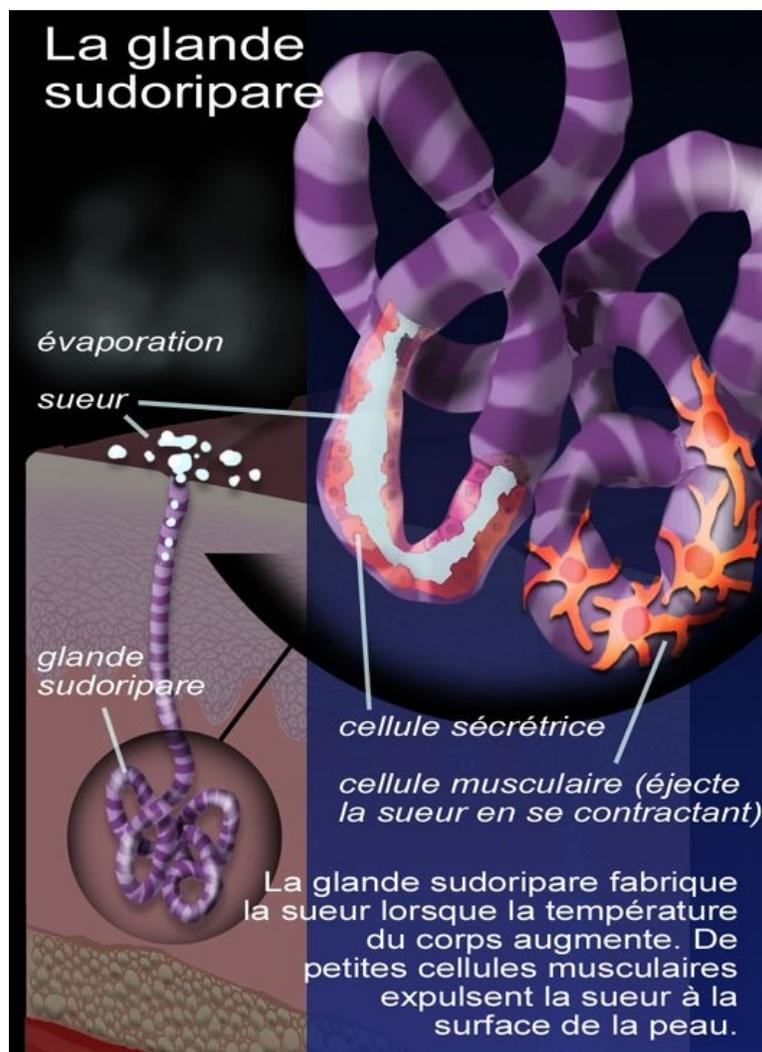


Figure 6 La glande sudoripare.  
[http://dermato-info.fr/article/Un\\_organisme\\_multifonction](http://dermato-info.fr/article/Un_organisme_multifonction)

Le rôle essentiel des glandes sudoripares eccrines est de refroidir l'organisme en déversant de l'eau à la surface de la peau, afin de maintenir constante la température du corps. En effet, le métabolisme de base de l'organisme, mais aussi certaines circonstances particulières comme l'élévation de la température extérieure ou le travail musculaire, produisent de la chaleur. Le processus de sudation thermique relève d'un mécanisme réflexe dont le stimulus est l'élévation de la température centrale.

Il existe aussi, en plus de la sudation thermique, une sudation psychique. Sous l'influence de facteurs émotionnels, cette sudation est de survenue immédiate. Elle est localisée au front, aux aisselles, aux paumes et aux plantes. Il s'agit d'une sueur « froide », sans vasodilatation cutanée, de fonction inconnue.

Les paumes des mains et les plantes des pieds sont le siège habituel d'une sécrétion spontanée. On y trouve en effet des glandes plus primitives, fonctionnellement distinctes de celles du reste du corps, et qui ne manifestent pas de sudation thermique. Cette sécrétion spontanée élève considérablement le coefficient de friction de la peau au niveau palmo-plantaire et permet d'améliorer la préhension des objets ainsi que la marche et la course en évitant le glissement. Elle peut être accentuée par un stress psychique.

Enfin, la composition particulière de la sueur produite par les glandes sudoripares eccrines permet d'assurer d'autres fonctions telles que le maintien d'une hydratation minimale cutanée, la défense de l'organisme (immunoglobulines et pH acide), la filtration des rayons ultraviolets B (acide urocanique). Enfin il est à noter que les glandes sudoripares eccrines permettent l'élimination de certaines substances exogènes comme les toxiques, les colorants, l'alcool ou les médicaments.

## 2. Follicules pilo-sébacés

Le follicule pilo-sébacé est une unité anatomique et fonctionnelle complexe comprenant : un poil ou tige pileaire – lui-même inclus dans le follicule pileux, un muscle pilo-moteur – dit aussi horripilateur ou arrecteur du poil, une glande sébacée, et éventuellement une glande apocrine (seulement dans certaines régions cutanées). On dénombre environ 5 millions de follicules pilo-sébacés chez l'Homme dont environ 1 million sur l'extrémité céphalique et 100 000 sur le cuir chevelu. On en trouve sur toute la surface cutanée, excepté les paumes, les plantes et les dermo-muqueuses buccales et génitales. On en distingue trois grands types. Dans les zones cutanées dites pileuses, on rencontre les follicules terminaux ou barbus qui hébergent des poils longs, épais et pigmentés appelés poils terminaux ou matures. Ce sont les cheveux, les sourcils, les cils, les poils des aisselles et du pubis, et chez l'homme : la barbe et la moustache. Ailleurs, on trouve les follicules duveteux et les follicules sébacés qui hébergent tous deux des poils presque invisibles (courts, minces et incolores) appelés poils duveteux ou duvet. Ces deux derniers types de follicules pilo-sébacés occupent ainsi la plus grande partie de la surface cutanée et se distinguent principalement par leur localisation et la taille de leur pore et de leur glande sébacée. Les follicules duveteux se situent principalement au niveau des membres et de la partie inférieure du tronc, alors que les follicules sébacés résident au niveau de la tête, des épaules et du thorax (zones dites séborrhéiques). Ces derniers présentent un grand pore et une glande sébacée particulièrement volumineuse (multilobée et s'évacuant par plusieurs canaux).

D'un point de vue structural, un follicule pilo-sébacé ressemble à un sac cylindrique dont la partie la plus profonde, qui atteint la limite dermo-hypodermique ou l'hypoderme, se renfle pour former un bulbe dont le fond est déprimé par une papille dermique appelée papille du poil. Il s'agit du bulbe pileux qui est une zone de division et de différenciation cellulaire aboutissant à la formation du poil - qui correspond essentiellement à un assemblage compact de cellules kératinisées, ainsi qu'à la formation de la gaine épithéliale interne qui l'entoure, formée également de cellules kératinisées. Cette gaine épithéliale disparaît au-dessus de l'abouchement du canal de la glande sébacée et on appelle canal pileaire ou infundibulum pileaire la partie supérieure du follicule pilo-sébacé qui en est dépourvue et qui abouche en surface cutanée. Juste au-dessus du bulbe pileux, on observe un petit renflement appelé bulge sur lequel s'insère le muscle horripilateur du

poil. L'ensemble est délimité par la gaine épithéliale externe qui est composée de cellules qui ne se kératinisent pas (sauf au niveau du canal pileaire) et qui ont la particularité d'être riche en glycogène. Cette gaine externe est elle-même entourée par une membrane basale particulière : la membrane vitrée qui sépare le follicule pilo-sébacé du compartiment dermique. La gaine épithéliale externe est en continuité avec l'épiderme et la membrane vitrée est en continuité avec la membrane basale épidermique, ce qui s'explique par le fait que les follicules pilo-sébacés résultent d'invaginations épidermiques durant la vie intra-utérine : l'épiderme plonge dans le derme comme un doigt de gant. Dans le compartiment dermique, le follicule pilo-sébacé est entouré d'une gaine de tissu conjonctif qui forme une sorte de hamac qui le maintient, et qui se prolonge à la base du follicule par la papille dermique. La gaine et la papille sont richement vascularisées et innervées, et assurent la nutrition et les échanges métaboliques (**Figure 7**).

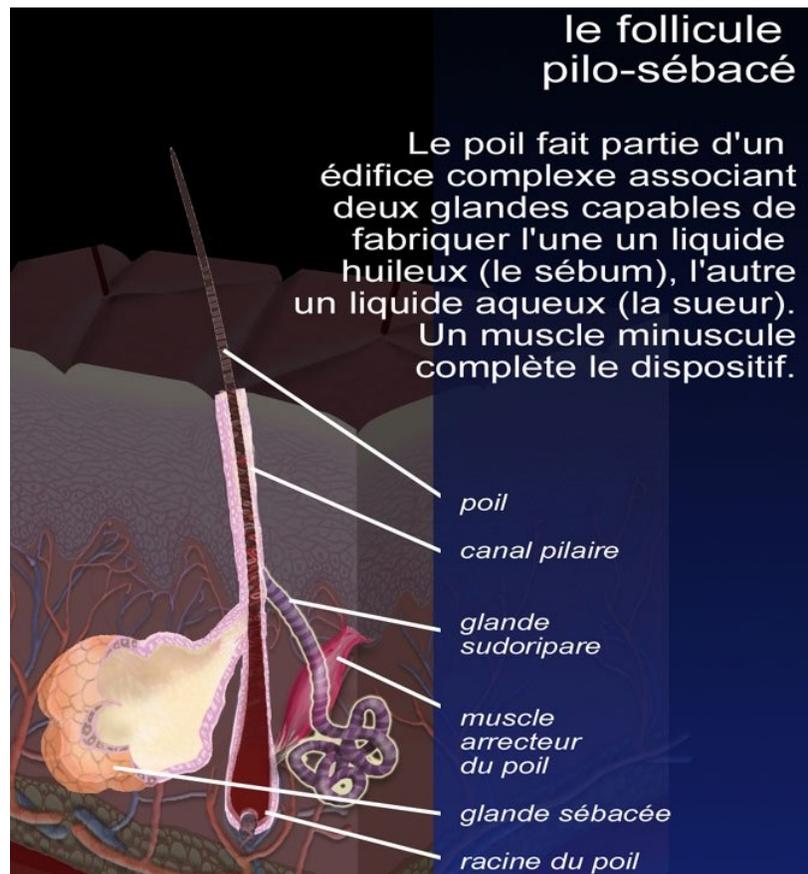


Figure 7 Le follicule pilo-sébacé.  
[http://dermato-info.fr/article/Un\\_organisme\\_multifonction](http://dermato-info.fr/article/Un_organisme_multifonction)

Le fonctionnement du follicule pilo-sébacé est cyclique et sa structure est régulièrement régénérée. En phase anagène, le follicule pilo-sébacé est profond et le bulbe pileux est volumineux. Ce dernier est le siège de divisions cellulaires intenses, initiant ainsi la formation et la croissance de la tige pileuse. Des mélanocytes synthétisent activement les mélanines responsables de la coloration du poil. La phase catagène est une phase de transition caractérisée par l'arrêt des mitoses et de la synthèse des mélanines. Le follicule pilo-sébacé rétrécit. En effet, le bulbe pileux subit une régression par apoptose cellulaire et s'éloigne de la papille dermique à laquelle il reste néanmoins relié par un cordon épithélial formé par la gaine épithéliale externe. La papille dermique monte dans le derme pour atteindre la zone du bulge. L'ascension du poil se poursuit et il finira par chuter, en phase télogène, lorsqu'il atteindra le canal pileux. Lors de cette dernière phase, la profondeur du follicule pilo-sébacé est réduite de moitié. En parallèle, un nouveau bourgeon pileux apparaît et entre en contact avec la papille dermique sous-jacente, ce qui entraîne la reformation du bulbe par activation de ses cellules souches, ainsi que le recrutement des cellules souches mélanocytaires situées au niveau du bulge. Il y a alors début d'une nouvelle phase anagène avec formation d'une nouvelle tige pileuse. L'ancien poil, en fin de phase télogène, peut coexister avec le nouveau poil en début de phase anagène si bien que, quand le poil tombe, l'orifice folliculaire est rarement vacant (**Figure 8**).

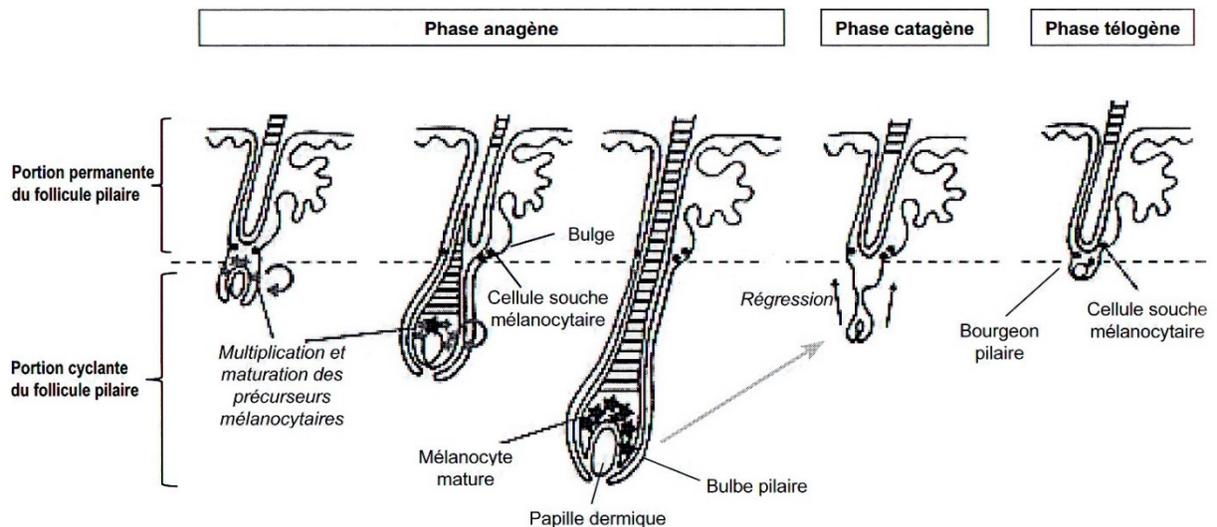


Figure 8 Schéma du cycle pileux. (1)

D'une manière générale, les poils ont un rôle important dans la régulation de la température du corps en particulier grâce aux muscles pilo-moteurs qui peuvent se contracter simultanément, dégageant ainsi chacun une petite énergie thermique qui, multipliée par quelques millions, finit par représenter un dégagement de chaleur capable de faire monter la température corporelle de quelques fractions de degré. Certains types de poils ont des rôles plus spécifiques, comme la chevelure qui protège efficacement le cuir chevelu des rayonnements solaires, ou encore les poils sexuels qui dissémineraient des odeurs spécifiques émises par le sébum ou la sueur apocrine. Les cils font partie des rares poils à avoir gardé des fonctions protectrice et tactile au cours de l'évolution.

Un follicule pileux est toujours associé à une glande sébacée, dont la fonction principale est de sécréter le sébum ou séborrhée. Cette glande loge dans le derme moyen et abouche dans le canal pileux par le canal sébacé. Elle est entourée par une membrane basale en continuité avec la membrane basale épidermique, ainsi que par un riche réseau vasculaire mais n'est pas innervée. C'est une glande acineuse en grappe : on observe plusieurs acini (ou grains) se groupant en un ou plusieurs lobes. Elle est composée de plusieurs couches cellulaires dont la plus externe est la couche germinative composée de cellules indifférenciées se divisant activement. Les cellules-filles issues de ces divisions vont se différencier en sébocytes et migrer vers le centre des acini puis vers le canal excréteur. Au cours de cette migration, elles synthétisent et stockent des lipides jusqu'à devenir sébocytes matures lorsqu'elles en sont totalement remplies. Arrivées à proximité du canal excréteur de la glande sébacée, elles se désintègrent et sont évacuées dans le canal pileux. Le sébum natif correspond donc à des cellules sébacées matures éclatées. Il est principalement composé de lipides : majoritairement des triglycérides (60 % environ), mais aussi des cires (25 %), du squalène (12 %) et un peu de cholestérol provenant de la désintégration des phospholipides membranaires (3 %). Le sébum sera ensuite excrété en surface où son rôle se confond avec celui du film cutané de surface dont il est l'un des constituants. Il joue notamment un rôle dans le maintien de l'hydratation cutanée, l'odeur spécifique de chaque individu et la protection contre les rayonnements solaires, les agressions chimiques et les pathogènes. On lui confère également un rôle de nutriment pour certaines bactéries résidentes de la peau, et certains composants du sébum peuvent être absorbés et utilisés par l'épiderme pour la synthèse de la couche cornée et de la

vitamine D. Enfin en graissant la peau et les tiges pileuses, le sébum permet de les protéger. Et la proportionnalité généralement observée entre la dimension de la glande sébacée et celle du follicule pileux lui suggère un rôle dans le maintien des qualités fonctionnelles de la tige pileuse. Notons qu'il existe des glandes sébacées particulières dans certaines régions cutanées (paupières, base des cils, lèvres, ...) qui s'ouvrent directement à la surface.

Les glandes apocrines sont des glandes sudoripares particulières également associées aux follicules pileux, mais seulement dans des zones cutanées très précises. On les retrouve notamment au niveau des aisselles, des régions génitales, sous les yeux, autour des oreilles, de l'aréole des seins et du nombril. Elles sont localisées dans le derme profond. Leur structure est semblable à celle des glandes sudoripares eccrines mais avec un conduit sécrétoire plus large qui débouche au voisinage ou dans un follicule pilo-sébacé, au niveau duquel sera sécrétée une sueur épaisse, laiteuse et visqueuse, de couleur blanchâtre ou jaunâtre. Cette sécrétion est peu ou non acide et riche en substances organiques : ammoniac, stéroïdes, protéines et lipides dont des phéromones. L'odeur désagréable que peut avoir cette sécrétion relève de sa dégradation par les bactéries en surface cutanée, et non de sa nature intrinsèque. La sécrétion des glandes apocrines est intermittente et résulte d'un stress émotif ou physique. La commande serait hormonale plutôt que nerveuse. Le rôle de cette sécrétion est de véhiculer des messages olfactifs spécifiques de chaque individu.

## VI- VASCULARISATION CUTANÉE

La vascularisation cutanée permet la nutrition, l'oxygénation et l'élimination des déchets métaboliques de toutes les couches de la peau, bien que les vaisseaux sanguins et lymphatiques ne soient présents que dans le derme et l'hypoderme.

### 1. Vascularisation sanguine

Ce sont les artères sous-cutanées qui alimentent en sang oxygéné le système sanguin cutané. Elles cheminent sous l'hypoderme parallèlement à la surface de la peau, et envoient des collatérales qui remontent entre les lobes graisseux et vont se regrouper en un réseau artériel anastomotique appelé plexus profond, qui se situe à la limite du derme et de l'hypoderme et qui est parallèle à la surface cutanée. Des artérioles ascendantes joignent ce plexus artériel profond à un second réseau artériel anastomotique situé dans la partie supérieure du derme : le plexus artériel superficiel ou sous-papillaire. De ce plexus naissent des artérioles qui se terminent en un réseau de capillaires au niveau des papilles dermiques. Le système veineux est calqué sur le système artériel. Les capillaires se résolvent en veinules qui quittent les papilles dermiques et ramènent le sang vers le plexus supérieur ou sous-papillaire des veines, enchevêtré avec celui des artères, et qui est drainé vers le plexus veineux profond dermique, enchevêtré avec le plexus profond des artères. Le plexus veineux profond est drainé par les veines sous-cutanées, parallèles aux artères sous-cutanées et qui retournent au cœur (**Figure 9**).

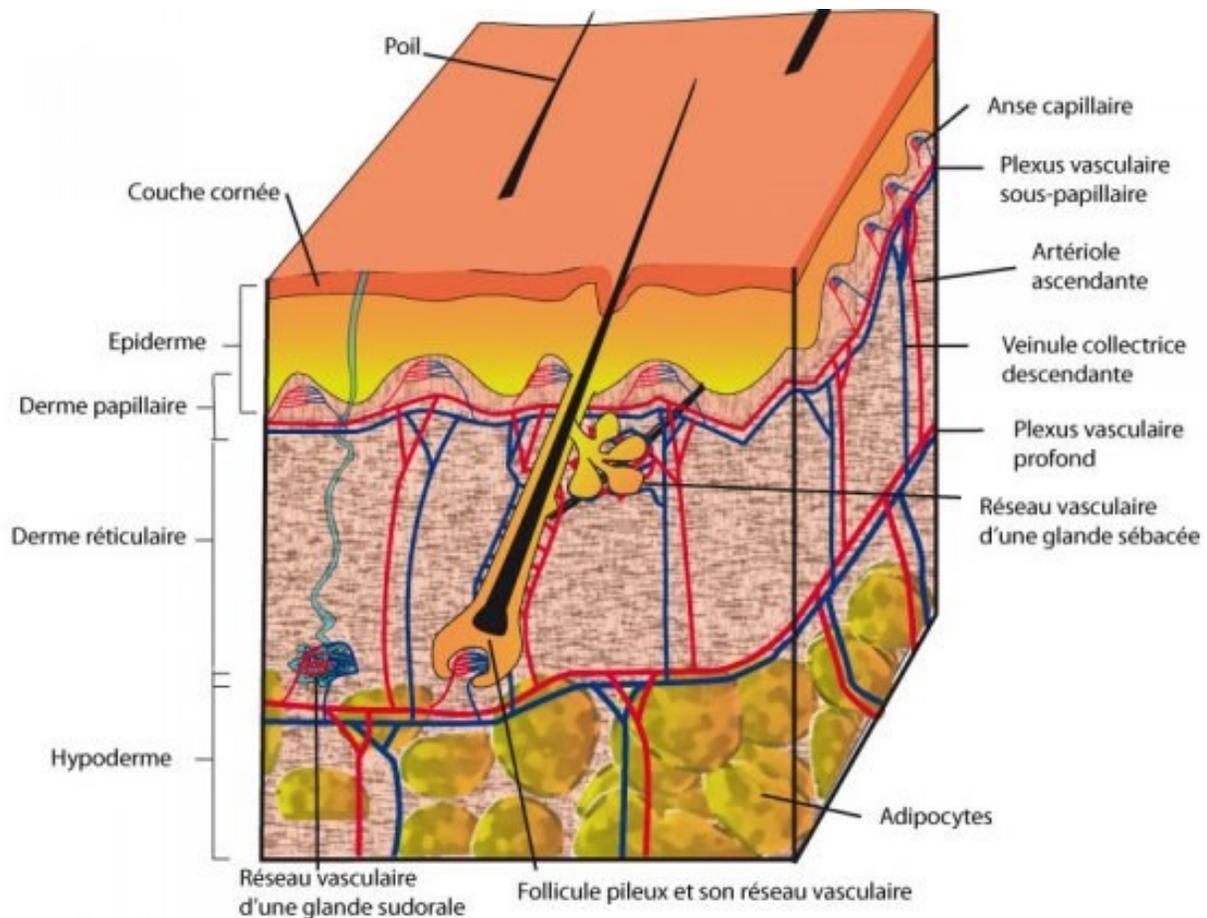


Figure 9 Représentation schématique de l'organisation de la microcirculation cutanée.  
<http://biologiedelapeau.fr/spip.php?article29>

Comme tout épithélium, les follicules pilo-sébacés et les glandes sudoripares sont avasculaires et ont donc besoin d'un réseau nutritif proche. En ce qui concerne l'épiderme, il est nourri indirectement par diffusion à partir des nombreux capillaires des papilles dermiques qui forment le système papillaire, et qui ont une configuration spéciale. Ils ont une forme d'anse dont la boucle épouse la convexité du sommet de la papille. Les capillaires artériels naissent de la métartériole – partie terminale des artérioles issues du plexus sous-papillaire. Ils vont libérer de l'oxygène et des nutriments dans le milieu intercellulaire. Ils se chargent également des déchets issus du métabolisme cellulaire et deviennent alors capillaires veineux se jetant dans la veinule post-capillaire (**Figure 10**).

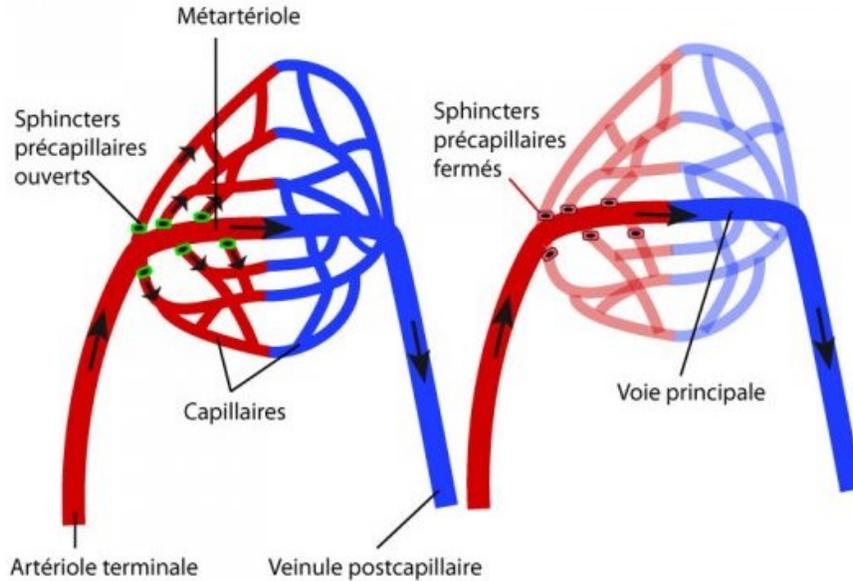


Figure 10 Représentation schématique d'une anse capillaire équipée de sphincters précapillaires. À gauche, les sphincters sont ouverts et le sang emprunte l'ensemble des capillaires sanguins. À droite, les sphincters sont fermés et la circulation du sang se limite à la métartériole.. <http://biologiedelapeau.fr/spip.php?article29>

Il existe une transition progressive entre les différents types de vaisseaux sanguins. Alors que les artères sont des vaisseaux de conduction et de distribution, les artérioles – de plus petit calibre – sont des vaisseaux de résistance et sont les principales responsables du maintien de la pression sanguine systémique. En effet, il existe dans les artérioles une contraction partielle (tonus) du muscle lisse vasculaire. De par la disposition circulaire des cellules musculaires de leur paroi, les artérioles ont une structure adaptée à la vasoconstriction et la vasodilatation, processus par lesquels elles régulent localement la distribution du sang dans les capillaires. Les artérioles ont une lumière d'environ 20  $\mu\text{m}$  et sont entourées d'une paroi d'environ 15  $\mu\text{m}$  d'épaisseur formée de trois couches cellulaires concentriques séparées par des fibres élastiques. De la lumière vers l'extérieur, on trouve l'intima principalement constituée d'un endothélium et d'un sous-endothélium, la media composée de plusieurs couches de cellules musculaires lisses, et l'adventice qui est une tunique externe de fibres de collagène. Dans les capillaires, la média et l'adventice ont disparu et la paroi d'environ 1  $\mu\text{m}$  d'épaisseur est uniquement formée d'une couche perméable de cellules endothéliales et d'une couche externe discontinue de péricytes (cellules non différenciées ressemblant à des cellules musculaires lisses modifiées) entourée d'une membrane basale. Ce sont des vaisseaux d'échange suffisamment fins pour laisser diffuser les gaz. Le transport des fluides et des solutés est assuré par

des cavéoles et des vésicules de pinocytose. Leur lumière de 5  $\mu\text{m}$  permet le passage d'un globule rouge. Les veinules post-capillaires drainent 4 à 5 capillaires et ont une structure ressemblant à celle des capillaires mais avec une lumière plus large. Ce sont des tubes de cellules endothéliales soutenues par une lame basale et une adventice de fibres de collagène et de fibroblastes. C'est principalement à partir des veinules post-capillaires que les leucocytes peuvent migrer dans les tissus. Ces veinules convergent pour former les veinules musculaires qui fusionnent pour former des veinules collectrices, ce qui se traduit par l'apparition dans la paroi de cellules musculaires lisses et également d'un enrichissement en fibres conjonctives et élastiques qui leur donnent un grand potentiel de distensibilité. En effet, les veinules (de même que les veines qui leur font suite) jouent le rôle de réservoir à capacité variable permettant de réguler le volume sanguin microcirculatoire. Ils ont une lumière d'environ 20  $\mu\text{m}$  et une paroi de 2  $\mu\text{m}$  d'épaisseur (5).

Comme nous l'avons vu, la microcirculation cutanée assure la nutrition et l'oxygénation de toutes les couches cutanées, ainsi que le maintien de la pression artérielle de la circulation générale, mais pas seulement. Elle joue également un rôle essentiel dans la thermorégulation, notamment grâce aux anastomoses (communications) artério-veineuses qui sont particulièrement abondantes au niveau de la peau du nez, des oreilles, de la paume des mains et de la plante des pieds, des doigts, et du lit de l'ongle. Citons en exemple celle existant dans le système papillaire entre la métartériole et la veinule post-capillaire. Grâce à la vasomotricité, la fermeture de cette anastomose dérive le sang vers le réseau capillaire, augmentant la perte de chaleur du sang par irradiation. A l'inverse, son ouverture exclut les voies capillaires et diminue les pertes de calories du sang. Pour réguler le passage du sang, il existe également des sphincters précapillaires à l'entrée des capillaires, qui sont formés de cellules épithéliales contractiles (**Figure 10**). De plus, la circulation cutanée joue également un rôle dans le processus immunitaire, ainsi que dans les phénomènes d'hémostase et d'angiogenèse. En effet, les cellules endothéliales peuvent se comporter comme des cellules présentatrices d'antigène ; elles sont également capables de se lier aux plaquettes lorsqu'elles sont stimulées ou endommagées, et elles produisent le facteur endothélial de croissance vasculaire VEGF. Enfin la couleur de la peau est en partie conditionnée par l'état des vaisseaux cutanés.

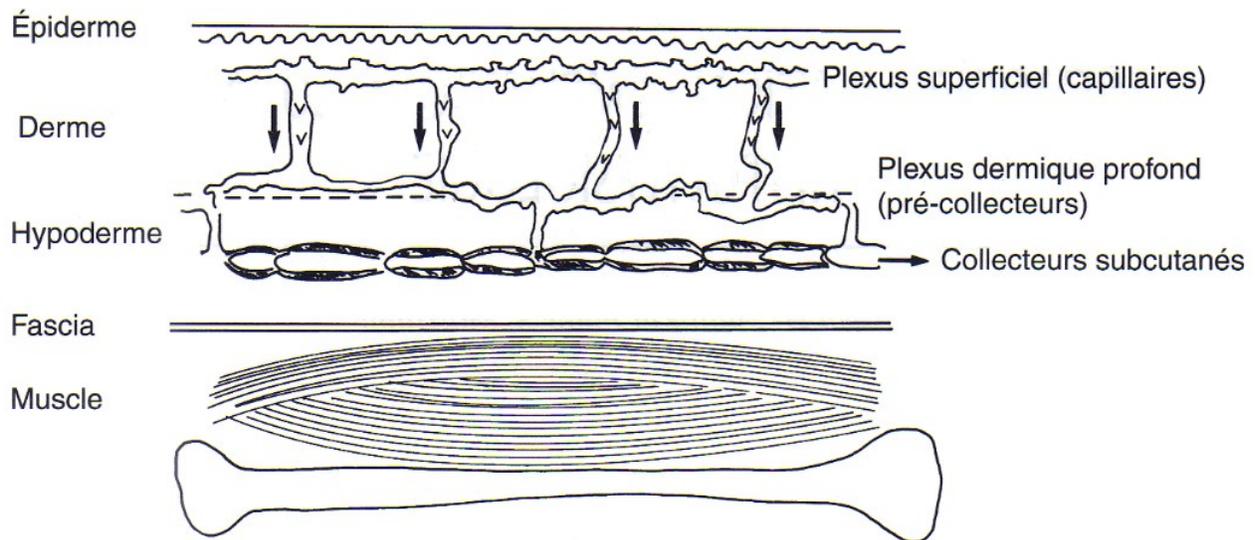
## 2. Vascularisation lymphatique

La vascularisation lymphatique draine le liquide extracellulaire en excès pour l'évacuer vers la circulation sanguine, en l'ayant préalablement filtré au niveau des ganglions lymphatiques. Cette vascularisation est assurée par les vaisseaux lymphatiques qui ont globalement un trajet parallèle aux veines. Ce sont les capillaires lymphatiques qui collectent le liquide extracellulaire, qui prendra alors le nom de lymphne une fois entré dans ces vaisseaux. Par conséquent, la lymphne a la même composition que le liquide extracellulaire (eau, électrolytes, protéines) et contient également de nombreux lymphocytes. Les capillaires lymphatiques constituent donc le point de départ de drainage, c'est pourquoi ils sont aussi appelés lymphatiques initiaux, mais il est à noter qu'il existe au sein de l'espace extracellulaire un chemin dit prélymphatique où les fibres conjonctives paraissent guider le fluide et les macromolécules vers les capillaires lymphatiques.

Dans la peau, les capillaires lymphatiques apparaissent comme des tubes dilatés localisés près des capillaires sanguins, qui commencent par une extrémité borgne se situant au sommet des papilles dermiques et qui suivent ensuite le trajet du réseau veineux. La paroi des capillaires lymphatiques est constituée d'une seule couche de cellules endothéliales avec une membrane basale peu développée. Des faisceaux de filaments (fibrilles de fibrilline) amarrent l'endothélium aux fibres élastiques du tissu conjonctif environnant (6). Les dispositifs de jonction cellulaire sont beaucoup plus lâches que ceux des capillaires sanguins : les cellules endothéliales se chevauchent légèrement, comme les ardoises d'un toit, formant des sortes de valves unidirectionnelles dont les bords ne sont pas fixés aux structures tissulaires voisines. Une augmentation de la pression du liquide extracellulaire dans les tissus entraîne l'étirement des prolongations fibreuses des cellules endothéliales, ce qui accroît le diamètre des capillaires. Cette pression pousse également les valves inter-endothéliales vers l'intérieur du capillaire et le liquide extracellulaire peut alors entrer. La pression à l'intérieur du capillaire va alors progressivement augmenter jusqu'à induire la fermeture des valves entre les cellules endothéliales, empêchant toute fuite de la lymphne (7). Le diamètre des capillaires lymphatiques est supérieur à celui des capillaires sanguins : il varie de 10 à 70  $\mu\text{m}$  en fonction des conditions métaboliques locales. Ils ont également une lumière beaucoup plus irrégulière.

En quittant la papille dermique, les capillaires s'anastomosent et forment le plexus lymphatique superficiel. Des lymphatiques précollecteurs (100  $\mu\text{m}$  de diamètre) drainent la lymphne

de ce plexus vers le plexus lymphatique dermique profond. Ces deux plexus lymphatiques ont des localisations globalement analogues aux plexus artériels et veineux. Du plexus profond, la lymphe est ensuite conduite vers de gros collecteurs sous-cutanés à paroi musculaire et contractile qui cheminent jusqu'aux ganglions (**Figure 11**). Concernant leur structure, les vaisseaux lymphatiques de plus petits calibres ressemblent aux capillaires lymphatiques, mais avec la présence de cellules musculaires et de fibres élastiques. Les lymphatiques plus volumineux possèdent trois couches similaires à celles des petites veines, mais avec une lumière plus large. Comme les veines, les vaisseaux lymphatiques possèdent des valves anti-retour, mais en plus grand nombre. L'espace compris entre deux valves s'appelle un lymphangion.



*Figure 11 Schéma topographique des vaisseaux lymphatiques dermiques et sous-cutanés. Les flèches indiquent le sens de la circulation de la lymphe. (3)*

Les ganglions lymphatiques sont de petits organes arrondis ou réniformes de 1 à 15 mm de diamètre. Chaque ganglion est entouré d'une capsule et a un parenchyme se divisant en trois zones (corticale, paracorticale et médullaire). On en dénombre environ un millier réparti dans tout l'organisme dont la peau. La lymphe arrive au niveau d'un ganglion lymphatique par des vaisseaux lymphatiques afférents et se répand dans l'espace sous-capsulaire. Elle traverse successivement les trois zones du parenchyme, et en ressort par un vaisseau lymphatique efférent. Les différents

vaisseaux efférents se réunissent ensuite pour former des troncs lymphatiques, vaisseaux plus volumineux, qui aboutissent au conduit lymphatique droit qui draine la lymphe du bras droit et de la partie droite de la tête et du thorax, ou au conduit thoracique qui accueille la lymphe du reste du corps. Ces deux conduits déversent ensuite leur contenu dans le terminus – confluent des veines sous-clavières et jugulaires.

Le système lymphatique ne comporte pas d'organe jouant le rôle de pompe, à l'instar du cœur dans le système sanguin, mais il existe néanmoins des contractions intrinsèques au niveau des vaisseaux lymphatiques. En effet, lorsqu'un lymphangion est rempli de lymphe, le muscle lisse de la paroi se contracte, la valve anti retour s'ouvre et la lymphe s'écoule dans le lymphangion suivant. Des facteurs extrinsèques interviennent également dans la propagation de la lymphe en modifiant les pressions autour des vaisseaux lymphatiques. On peut citer les contractions des muscles environnant les vaisseaux, lors de mouvements corporels comme la respiration ou les exercices physiques qui entraînent des successions de compressions et de décompressions des lymphatiques. De même la propulsion de la lymphe peut être induite par des compressions tissulaires dues à des forces extérieures (massages par exemple) ou encore les pulsations artérielles, certains lymphatiques étant accolés aux artères. Les valves anti-reflux des canaux lymphatiques font que la lymphe poussée par ces différents mécanismes peut seulement avancer dans une seule direction : vers le terminus.

Moins étudié que le système sanguin, le système lymphatique a néanmoins une grande importance car le drainage lymphatique a une fonction vitale. Premièrement, il participe au déclenchement des réponses immunitaires. En effet la circulation lymphatique permet le transport des antigènes et des cellules présentatrices d'antigène (dans la peau : cellules de Langerhans et cellules dendritiques dermiques par exemple) jusqu'aux ganglions lymphatiques qui sont le lieu de prolifération et de différenciation des cellules immunitaires en présence d'un antigène. Deuxièmement, le système lymphatique permet le maintien de l'homéostasie. Il évacue les produits de dégradation du métabolisme cellulaire ainsi que les molécules en excès (nettoyage du liquide extracellulaire). Et en relation étroite avec la circulation artério-veineuse, il préserve l'équilibre hydrique de l'organisme. Ainsi dans des conditions normales, il sort un peu plus de liquide des capillaires sanguins qu'il n'en est réabsorbé. L'excédent de liquide est récupéré par le système lymphatique.

## VII- INNERVATION CUTANÉE

Le système nerveux cutané est riche et complexe, et innerve la totalité de la peau à l'exception de sa couche cornée. Il appartient au système nerveux périphérique (SNP) qui comprend tous les éléments neuronaux en dehors du système nerveux central (SNC) (encéphale, moelle épinière et rétine) et qui a pour rôle de véhiculer l'information entre le SNC et le reste de l'organisme. Le SNP est schématiquement lui-même subdivisé en système nerveux somatique qui régit les sensations perçues consciemment et les actions volontaires, et en système nerveux autonome qui émet des signaux n'atteignant pas le seuil de la conscience et dont les réponses motrices sont involontaires. Selon le sens de circulation de l'information, on distingue des voies dites afférentes ou sensitives (périphérie vers SNC) qui renseignent le SNC sur l'environnement extérieur et sur l'état intérieur de l'organisme ; et des voies dites efférentes ou motrices (SNC vers périphérie) qui transmettent les instructions du SNC aux organes effecteurs.

### 1. Voies afférentes du système nerveux cutané (système nerveux somatique)

La peau est un organe sensitif majeur. Elle est continuellement le siège de la perception d'une grande quantité d'informations venant du monde extérieur avec lequel elle est en contact direct. Ces informations sont recueillies par des récepteurs ou des terminaisons nerveuses libres, et sont transmises par l'intermédiaire de différents types de fibres nerveuses sensitives qui, au niveau du derme, sont organisées en réseau. Ces fibres sont les prolongements de neurones qui véhiculent l'information sensitive en direction du SNC. Les voies afférentes du système nerveux cutané font partie du système nerveux somatique. En effet les stimuli sensitifs cutanés sont perçus par l'individu : il a conscience de leur existence.

#### *Le réseau dermique de fibres nerveuses sensitives*

Les fibres nerveuses empruntent les cloisons interlobaires de l'hypoderme pour arriver au niveau du derme profond où elles forment un premier plexus : le plexus nerveux dermique profond. Des fibres nerveuses s'échappent irrégulièrement de ce plexus pour atteindre la zone jonctionnelle entre le derme papillaire et le derme réticulaire, où elles forment un second plexus : le plexus nerveux sous-épidermique. Les fibres nerveuses sensitives sont classées selon leur calibre qui est directement relié à leur vitesse de conduction (**Tableau 1**). Seules les fibres A sont myélinisées.

	Fibres A $\alpha$	Fibres A $\beta$	Fibres A $\delta$	Fibres C
<i>Diamètre</i>	13-20 $\mu\text{m}$	6-12 $\mu\text{m}$	1-5 $\mu\text{m}$	0,2-1,5 $\mu\text{m}$
<i>Vitesse de conduction</i>	80-120 m/s	35-75 m/s	5-30 m/s	0,5-2 m/s
<i>Myélinisation</i>	oui	oui	oui	non

Tableau 1 Classification et propriétés des différentes fibres nerveuses sensitives cutanées.

### Les terminaisons cutanées des fibres nerveuses sensitives

Des deux plexus nerveux du derme, s'échappent des terminaisons nerveuses qui atteignent les différents niveaux cutanés, et qui vont jouer le rôle de récepteurs sensoriels. Leur répartition et leur densité varient suivant les régions du corps et le niveau de pilosité. Ces terminaisons nerveuses cutanées sont capables de recueillir des informations nombreuses et variées. On trouve par exemple des mécanorécepteurs sensibles aux stimuli mécaniques (vibration, tact...), des thermorécepteurs détectant la température, ou encore des nocicepteurs réagissant à tout type de stimuli douloureux (piqûre, brûlure, agents toxiques externes, démangeaison...). Les terminaisons nerveuses cutanées existent sous deux formes principales : libres ou encapsulées. Nous évoquerons également le cas particulier des terminaisons nerveuses du follicule pileux appelées terminaisons nerveuses périfolliculaires (**Figure 12**).

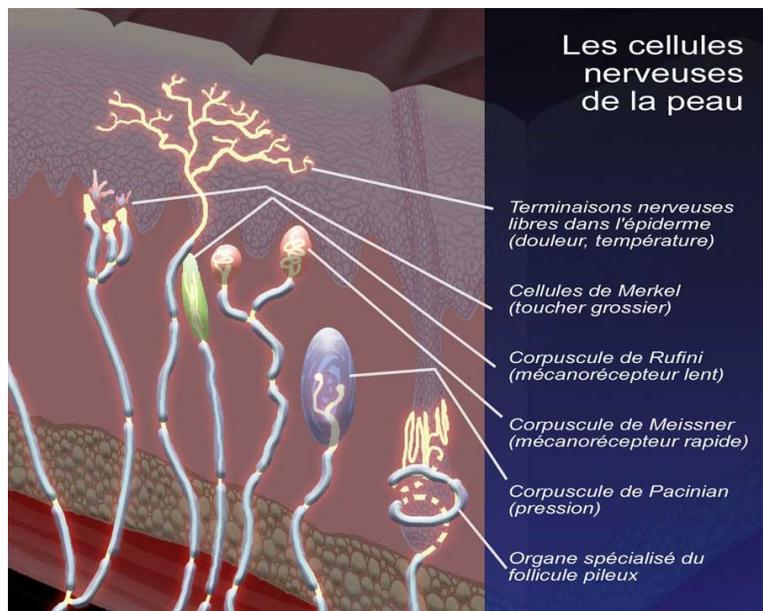


Figure 12 Illustration de quelques terminaisons de fibres nerveuses sensitives de la peau.

[http://dermato-info.fr/article/Un\\_organe\\_multifonction](http://dermato-info.fr/article/Un_organe_multifonction)

Les terminaisons nerveuses libres sont les plus simples et les plus nombreuses des terminaisons cutanées. Elles sont universellement distribuées dans l'organisme. La sensibilité thermique, la sensibilité à la douleur et une partie de la sensibilité mécanique sont médiées par ce type de récepteurs. Les récepteurs au froid sont superficiels et localisés dans l'épiderme, alors que les récepteurs au chaud – moins nombreux – sont situés plus profond dans le derme. Certains mécanorécepteurs peuvent arriver jusqu'à l'épiderme et parfois même y pénétrer, et être aussi intimement associés aux cellules de Merkel de la couche basale épidermique pour former un complexe de Merkel capable de détecter toute modification de l'architecture épidermique.

Les terminaisons nerveuses encapsulées ne détectent qu'une partie de la sensibilité mécanique cutanée et sont minoritaires. Elles sont localisées dans des zones cutanées où la sensibilité est particulièrement vive. Ce sont des terminaisons nerveuses enveloppées dans une capsule de tissu conjonctif dotée d'une structure microscopique distinctive. On trouve ainsi les *corpuscules de Meissner* au niveau de la peau glabre, des paumes et des plantes, des extrémités des doigts, des lèvres et des organes génitaux. Ils ont une structure ovale de 100 µm de long et 70 µm de diamètre, dans laquelle la terminaison nerveuse prend la forme d'une spirale ramifiée. Ils logent au niveau des papilles dermiques et sont sensibles aux stimulations mécaniques légères. Les *corpuscules de Pacini* sont quant à eux stimulés par les fortes pressions ou vibrations. Ce sont les plus gros corpuscules cutanés et ils peuvent atteindre 1 cm de diamètre, mais pour la plupart font entre 1 et 4 mm de long et 0,5 à 1 mm de large. Ils présentent en coupe l'aspect d'un bulbe d'oignon et siègent dans le derme profond. Communément associés aux vaisseaux, ils peuvent être connectés aux anastomoses artério-veineuses. Ils sont particulièrement nombreux sur les doigts, le pénis et le clitoris. Il y a aussi les *corpuscules de Krause*, également appelés corpuscules cutanéomuqueux, et qui sont sensibles aux déformations. Ils ressemblent aux corpuscules de Meissner, et ne sont parfois que partiellement encapsulés formant ainsi une masse irrégulière, grossièrement ovale. Ils mesurent de 25 à 100 µm et on les trouve dans le derme sous-papillaire des zones de transition entre la peau et les muqueuses (paupières, joues, lèvres, langue, région périnéale, gland et clitoris). Enfin, les *corpuscules de Ruffini* sont sensibles aux vibrations et à l'étirement du derme et des tendons. Ces mécanorécepteurs font environ 1 mm de diamètre et sont localisés dans le derme moyen et les capsules articulaires. On les rencontre principalement au niveau de la plante des pieds.

Les terminaisons nerveuses périfolliculaires sont en contact avec les cellules de la gaine épithéliale externe. Il y en a plusieurs enroulées autour de la base et de la tige de chaque follicule pileux, et avec les cellules de Merkel que l'on retrouve également dans les gaines folliculaires, elles forment un mécanorécepteur appelé récepteur lancéolé car les terminaisons nerveuses ont la forme de pointes de lance, aplaties ou ovoïdes. Ces récepteurs sont à l'origine de sensations tactiles et de déplacement. Ils sont d'une très grande sensibilité, le mouvement du poil étant suffisant pour les stimuler.

## 2. Voies efférentes du système nerveux cutané (système nerveux autonome)

Dans la peau, on ne trouve que des fibres efférentes appartenant au système nerveux autonome qui régissent les réponses motrices involontaires. Elles sont minoritaires au sein des fibres nerveuses cutanées, et sont localisées dans le derme où elles se mêlent de manière inextricable aux fibres sensibles du plexus dermique. Les fibres motrices cutanées sont de type B et de type C (**Tableau 2**). Elles innervent et régulent essentiellement les muscles horripilateurs, les glandes sudoripares, les vaisseaux sanguins, mais également les vaisseaux lymphatiques, les glandes eccrines et sébacées, les anastomoses artério-veineuses et les follicules pileux.

	<b>Fibres B</b>	<b>Fibres C</b>
<b><i>Diamètre</i></b>	2-3 µm	0,2-1,5 µm
<b><i>Vitesse de conduction</i></b>	15 m/s	0,5-2 m/s
<b><i>Myélinisation</i></b>	oui	non

Tableau 2 Classification et propriétés des différentes fibres nerveuses motrices cutanées.

*Introduction sur*

---

# **LE CARCINOME BASOCELLULAIRE**

---

Chez l'Homme, les cancers cutanés sont les plus fréquents et représentent à l'échelle mondiale un tiers des cancers diagnostiqués. On distingue les cancers de la peau d'origine mélanocytaire (les mélanomes) des cancers de la peau d'origine non mélanocytaire (NMSC pour Non Melanoma Skin Cancer en anglais). Ces derniers sont moins dangereux mais beaucoup plus nombreux. En effet, on enregistre chaque année dans le monde environ 132 000 mélanomes contre 2 à 3 millions de NMSC (8).

Le groupe des NMSC est représenté à 95 % par des carcinomes (ou épithéliomas) kératinocytaires : les carcinomes baso-cellulaires (CBC) et les carcinomes spino-cellulaires dits aussi épidermoïdes (CSC). Ces tumeurs d'origine épithéliale sont les cancers cutanés les plus couramment rencontrés (8). Ceci s'explique par le renouvellement rapide et constant de l'épiderme et son exposition directe et quotidien aux ultraviolets, qui favorisent le développement de ces tumeurs lors du vieillissement (4). Les CBC ont précisément pour cellules initiales les kératinocytes de la couche basale épidermique, alors que les CSC sont issus des kératinocytes de la couche épineuse (9). On les rencontre principalement après 50 ans chez des individus à peau claire au niveau des zones cutanées exposées au soleil (tête, cou, extrémités). Typiquement, les CBC apparaissent *de novo* et ont l'aspect d'une lésion perlée en relief de couleur rouge ou rosée souvent télangiectasique. Moins souvent, ils prennent la forme d'une tâche rouge ou blanche avec une bordure surélevée. Les CSC se présentent, quant à eux, sous la forme d'une croûte qui bourgeonne et peut saigner (**Figure 13**). Il surviennent souvent sur une lésion pré-existante dite précancéreuse (kératose actinique ou maladie de Bowen) et parfois sur des cicatrices de brûlure ou de plaies chroniques (10). D'une manière générale, toute plaie qui ne cicatrise pas, tout bouton ou croûte qui persiste et se modifie est susceptible d'être un carcinome kératinocytaire, et doit conduire à une orientation vers le dermatologue (9).

Cependant, dans ce groupe des NMSC, le CBC est largement majoritaire. En effet, quatre carcinomes kératinocytaires sur cinq se révèlent être des CBC. Il s'agit donc du cancer humain le plus fréquent et bien qu'il ne soit pas le plus agressif, cette forte incidence fait de lui un problème de santé publique majeur (11).



Figure 13 Aspect typique d'un CBC et d'un CSC.

## I- DEFINITION ET SOUS-TYPES

La première description du CBC est attribuée à Jacob en 1827 (12) mais les critères de reconnaissance histologique ont été définis en 1903 par Krompecher qui lui a donné le nom de « carcinome basocellulaire » (13) (14). D'une manière générale, cette lésion est définie comme une tumeur épithéliale qui se développe aux dépens de l'épiderme et qui survient généralement *de novo*. Elle est localisée uniquement sur la peau (jamais sur les muqueuses) et présente une malignité essentiellement locale qui engage rarement le pronostic vital mais possède un potentiel de destruction tissulaire important (14).

Il en existe plusieurs types d'aspect varié, et cette diversité est source d'équivoque. En effet dans les ouvrages de référence de dermatologie, de nombreuses formes cliniques et histologiques de CBC sont décrites, mais rarement de façon similaire, essentiellement à cause de problèmes de terminologie. Ainsi, on trouve souvent plusieurs dénominations pour décrire une même forme, et à l'inverse il arrive qu'une même dénomination soit employée pour décrire des formes différentes. En France, la Haute Autorité de Santé recommande la distinction de 3 sous-types cliniques, communément retenus dans la quasi-totalité des ouvrages, afin de simplifier et d'homogénéiser la classification : le CBC nodulaire, le CBC superficiel et le CBC sclérodermiforme (14) (**Figure 14**).

Le **CBC nodulaire** est le sous-type le plus courant (~ 79 % des CBC). Il est localisé le plus souvent sur la tête et le cou. Cliniquement, il a l'aspect d'une papule ou d'un nodule lisse télangiectasique, de couleur grisâtre et translucide, constituant la lésion élémentaire ou perle. Il peut atteindre une taille variable avec une périphérie faite de succession de perles. Sa croissance est progressive. Histologiquement, on voit dans le derme un ou plusieurs massifs ou lobules de grande taille et bien définis. Ces massifs sont constitués de cellules basaloïdes disposées aléatoirement au centre mais avec un arrangement palissadique en périphérie. On trouve habituellement une délimitation nette entre la tumeur et le stroma sous la forme d'un croissant clair. Cette observation est due à la rétractation des cellules tumorales. On parle d'« artefact de rétractation » (14).

Le **CBC superficiel** représente environ 15 % des cas. Il se rencontre généralement sur le tronc et les membres, et survient chez des sujets relativement plus jeunes que ceux développant un CBC nodulaire. Cliniquement, il s'agit d'une plaque rouge plane bien délimitée. En règle générale, aucune perle caractéristique n'est visible à l'œil nu. Ce type de CBC a une évolution centrifuge lente et peut atteindre 5 à 10 cm de diamètre. Il est défini histologiquement par la présence d'un nid tumoral intradermique, qui est appendu à l'épiderme et/ou aux follicules pileux. Tout comme dans le cas du CBC nodulaire, le foyer tumoral est également constitué de cellules basaloïdes dont les noyaux sont agencés en palissade en périphérie, et des artefacts de rétractation sont visibles. Le plus souvent, les foyers tumoraux sont multiples, séparés par des intervalles de peau normale. Ils auraient néanmoins une origine unicentrique et seraient tous connectés entre eux et à l'épiderme (14).

Le **CBC sclérodermique**, aussi qualifié de « sclérosant » ou « morphéiforme », est une variété plus rare (~ 6 % des CBC), rencontrée la plupart du temps près des orifices de la face. Il correspond cliniquement à une plaque dure, brillante et déprimée qui ressemble à une cicatrice blanche. Mal délimitée, cette lésion est très difficile à voir en l'absence d'ulcération. Elle évolue lentement et de manière centrifuge. Le CBC sclérodermique peut rester longtemps méconnu et finir par être très étendu et s'ulcérer. D'un point de vue histologique, son infiltration est très particulière puisque les foyers tumoraux prennent l'aspect de cordons effilés, représentés parfois par une unique assise cellulaire. Ils occupent habituellement toute la hauteur du derme et peuvent

s'étendre à l'hypoderme. Les cellules tumorales sont peu différenciées et on n'observe pas d'agencement palissadique en périphérie. Le stroma tumoral est très scléreux (14).



Figure 14 Aspect typique des principaux sous-types de CBC (avec la permission du Pr. Bernard, Reims).

Notons qu'à ces 3 sous-types de CBC pouvant être définis cliniquement et histologiquement, la Haute Autorité de Santé ajoute le **CBC infiltrant** qui regroupe le CBC trabéculaire et le CBC micronodulaire. Cependant leur description reposant uniquement sur des termes histologiques, ils ne peuvent être introduits dans une classification clinique. Ainsi, le CBC infiltrant trabéculaire est défini histologiquement par de petits foyers tumoraux, peu cellulaires et mal limités avec un agencement palissadique des cellules en périphérie discret voire absent. Les foyers sont organisés en îlots irréguliers ou en travées, et sont localisés dans le derme, parfois aussi dans l'hypoderme. Les limites de la prolifération tumorale sont floues. Dans sa forme micronodulaire, le CBC infiltrant présente une multitude de foyers tumoraux sous forme de lobules de petite taille et bien limités, avec un agencement palissadique en périphérie qui peut parfois être discret (14).

Les trois sous-types cliniques de CBC peuvent être le siège d'une pigmentation mélanique très variable en intensité, ainsi que d'une érosion ou d'une ulcération à un moment donné de leur évolution. Les différents sous-types histologiques peuvent s'associer, de même qu'il existe des carcinomes dits mixtes ou composites qui correspondent à l'association d'un CBC et d'un CSC, chaque composante étant clairement identifiable. Ils peuvent également présenter en plus des caractéristiques histologiques particulières au niveau de la composante épithéliale et/ou stromale.

Ainsi par exemple, la composante épithéliale peut adopter une forme adénoïde où les cellules tumorales sont organisées en cordons anastomosés réalisant parfois des structures glandulaires. On peut également citer les formes kératinisantes et kystiques dans lesquelles certains foyers tumoraux contiennent respectivement des amas de kératine ou de mucine. Quant à la composante stromale, elle peut être inflammatoire ou mucineuse, et peut comporter des dépôts amyloïdes ou des calcifications (14).

## II- DONNEES EPIDEMIOLOGIQUES

### 1. Facteurs de risque

Les principaux facteurs favorisant la survenue des CBC peuvent être liés à l'environnement ou au patient lui-même (patrimoine génétique, état immunitaire, ...).

#### *Facteurs environnementaux*

L'exposition aux *rayonnements ultraviolets* (UV) représente le facteur de risque le plus important. Et effectivement lors d'un CBC, on observe une fréquence élevée de mutation au niveau du gène suppresseur de tumeur p53, dont le type (dimère de pyrimidine) et le site sont caractéristiques de mutations UV-induites (14). Les rayonnements UV peuvent être soit d'origine naturelle (soleil), soit d'origine artificielle (exposition à visée thérapeutique ou esthétique). L'exposition solaire étant la source d'UV principale, cela explique que les CBC se développent principalement au niveau des zones cutanées le plus souvent découvertes. En outre, plus l'on se rapproche de l'équateur, plus le risque est élevé (population caucasienne) (4). Ce risque vient en fait surtout de l'accumulation des expositions aux UV tout au long de la vie. En effet, les CBC ne se développent généralement qu'après 50 ans, et il y a 4 à 5 fois plus de risque d'en développer à 75 ans qu'à 50 ans (4). D'après certaines études épidémiologiques, les CBC seraient fréquemment associés à des expositions solaires courtes mais répétées à l'occasion de vacances ou d'activités sportives par exemple (15).

L'exposition à des *radiations ionisantes* augmente aussi le risque de développer un CBC. Par exemple, des études montrent ainsi que les radiations ionisantes reçues au cours de thérapie de

l'acné ou du traitement contre *tinea capitis* (la teigne du cuir chevelu) entraînent respectivement trois et six fois plus de risque de développer par la suite ce type de lésion. Les patients traités aux rayons X pendant l'enfance seraient également plus susceptibles d'en développer. Enfin, il a été noté un risque accru de CBC chez les travailleurs en mines d'uranium ou de radon, ainsi que chez les survivants de Hiroshima et Nagasaki. D'une manière générale, le risque reste confiné au niveau des zones cutanées irradiées et il est plus élevé lorsque l'exposition s'est déroulée à un âge précoce. Il a été estimé que la dose totale d'irradiation nécessaire pour le développement de NMSC est de 30 grays. La période de latence serait approximativement de 20 ans (11).

Certaines substances chimiques sont également associées au développement de CBC. C'est le cas de l'arsenic, en particulier inorganique. La première source d'exposition à l'arsenic semblerait être par ingestion, notamment par l'eau potable comme le suggère une étude réalisée à Taiwan où l'eau de puit présente de forte concentration en arsenic. Certains médicaments comme la solution de Fowler ou des remèdes à base de plantes en contiennent. Une autre forme d'exposition est la fumée de cigarette. On peut citer comme secteur professionnel exposant à l'arsenic, les métiers au contact des pesticides, du charbon et les activités de fonte (11) (15). D'autres substances chimiques sont suspectées d'augmenter les risques de CBC telles que le psoralène et les moutardes azotées (utilisations thérapeutiques), ainsi que les poussières de fibres de verre ou les produits de nettoyage à sec (15) (16).

### Facteurs individuels

Certaines maladies génétiques prédisposent au développement de CBC. C'est le cas par exemple pour *Xeroderma Pigmentosum* qui est un syndrome se transmettant sur un mode autosomique récessif. Les patients atteints sont appelés les « enfants de la lune » car ils présentent une hypersensibilité à la lumière UV qui les oblige à ne pas s'exposer au soleil, au risque d'un vieillissement cutané prématuré et du développement de nombreux cancers de la peau réduisant considérablement leur espérance de vie. Ce syndrome est associé à des mutations au niveau des gènes « carekeepers » impliqués dans la réparation par excision de nucléotides qui est le principal mode de réparation des lésions d'ADN UV-induites (4) (17). Le syndrome de Gorlin en est un autre exemple. Egalement appelé naevomatose basocellulaire, il se caractérise par le développement

rapide de nombreux CBC, le plus souvent chez des adultes jeunes. On peut observer dans la plupart des cas des mutations au niveau du gène « patched » qui est un gène suppresseur de tumeur. Ces mutations se transmettent à la génération suivante selon un mode autosomique dominant. Dans un tiers des cas, elles apparaissent *de novo* (11).

L'immunodépression est un facteur de risque important. Cet état immunitaire peut être d'origine médicamenteuse ou pathologique. Chez les individus greffés, qui sont traités par immunosuppresseurs pour prévenir le rejet de greffe, il a été observé un risque de CBC supérieur à la normale. Une étude hollandaise chez des patients greffés rénaux a observé un risque de développer un CBC 10 fois plus élevé dans cette population. Ce risque augmente avec la durée de survie post-greffe, ainsi qu'avec la dose prescrite. Les transplantés cardiaques qui reçoivent de plus fortes doses d'immunosuppresseurs seraient les plus à risque. Chez les individus atteints du syndrome d'immunodéficience acquise, les CBC seraient 3 à 5 fois plus fréquents que la normale (11) (14).

L'état de la peau a un impact non négligeable dans la survenue de CBC. Il a été en effet plusieurs fois observé un développement de ces lésions au niveau de cicatrices cutanées, comme celles laissées par les anciens vaccins ou encore celles résultant de brûlure thermique (15).

Le phénotype, qui est sous la dépendance de facteurs génétiques complexes, joue un rôle dans l'épidémiologie des CBC. Les individus d'origine caucasienne ont un risque plus important de développer des CBC, en particulier ceux de phototypes I et II qui présentent une peau claire et ne bronzant pas, ou alors difficilement (4) (14) (15).

Des antécédents de CBC augmentent également le risque de développer un CBC. Une étude écossaise a estimé que le risque de développer un deuxième CBC dans les trois ans après la survenue du premier serait environ de 44 % (18).

Enfin, le risque de développer un CBC varie selon l'âge, le sexe et le pays de résidence. En effet, ce risque varie selon les régions du globe, augmente avec l'âge et est plus important chez les hommes que chez les femmes, comme nous le verrons ci-après.

## 2. Incidence

A ce jour, en France, seuls les départements du Haut-Rhin, du Doubs et plus récemment du Calvados tiennent des registres comptabilisant les CBC. Le défaut d'enregistrement automatique de ce cancer s'observe presque partout à travers le monde ce qui fait que les données épidémiologiques le concernant sont fragmentaires et incomplètes (14). D'autant plus que lorsque des registres existent, les cas de CBC multiples ou récurrents ne sont parfois comptés qu'une seule fois (18). Par conséquent, les chiffres disponibles actuellement sur la morbidité des CBC sont très certainement significativement sous-estimés et doivent être interprétés avec précaution. Cette situation est probablement due au fait que l'importance de ces cancers est sous-évaluée car ils sont de bon pronostic et rarement fatals. De plus, leur forte incidence dépasse très largement celle des autres types de cancer, et peut laisser craindre une saturation des réseaux de surveillance des cancers (11) (18). En effet, une étude concernant la population américaine réalisée sur l'année 2007 estime que le nombre de nouveaux cas de NMSC pendant cette période devait s'élever à environ 1 million. A titre de comparaison, cette même année, le cancer ayant eu le plus fort taux d'incidence aux USA était le cancer de la prostate avec 218 890 cas, et en tout 1,4 millions de cancers (NMSC exclus) ont été enregistrés (11).

Le taux d'incidence des CBC diffère selon l'âge et le sexe des populations étudiées. En effet, 90 % de ces lésions se développent chez des individus de plus de 50 ans et on constate que le taux d'incidence est environ 10 fois plus élevé si on ne considère que les personnes de plus de 85 ans. Néanmoins, il devient plus fréquent maintenant d'en observer chez des patients plus jeunes, sûrement à cause de l'augmentation du temps d'exposition solaire au cours de la vie. Concernant l'influence du sexe, on observe une incidence de 1,1 à 1,9 fois plus élevée chez les hommes que chez les femmes. Cependant, cette différence aurait également tendance à diminuer ces dernières années. Cela pourrait peut-être s'expliquer par des différences de conditions de travail plus marquées pour les générations plus anciennes, les hommes s'occupant plus généralement des activités en extérieur ; mais également par les changements de style de vie et de style vestimentaire des femmes ces dernières décennies, qui ont amené à une égalisation des temps d'exposition solaire entre les deux sexes (11) (14) (15).

L'incidence des CBC varie aussi selon les régions du globe, principalement en fonction de l'impact de l'exposition solaire sur la peau. Le plus faible taux d'incidence se trouve en Finlande avec 49 cas pour 100 000 hommes et 45 cas pour 100 000 femmes et le plus haut taux d'incidence se trouve en Australie avec 788 cas par an pour 100 000 habitants. En France, le registre du département du Haut-Rhin a fait état d'un taux d'incidence de 60,5 CBC pour 100 000 femmes et de 75,4 CBC pour 100 000 hommes (11) (14).

Les cas de CBC sont en forte augmentation. On estime que ces dernières décennies le taux d'incidence des CBC a augmenté de 20 à 80 % selon les populations étudiées (15). Cette tendance a également été retrouvée en France (registre du Haut-Rhin) (14). Plusieurs explications sont possibles : l'augmentation de l'exposition solaire (mode de la peau bronzée, vacances dans des pays plus ensoleillés, allongement de l'espérance de vie), la disponibilité des cabines de bronzage, la diminution de la couche d'ozone et aussi un meilleur dépistage (15) (19). De plus, même en cas de changement d'attitude de la population concernant l'exposition et la protection solaire, il est fort probable que cette incidence continue à augmenter avec l'augmentation du nombre de personnes âgées prévue jusqu'en 2030 avec la génération baby-boom (18).

### 3. Facteurs et groupes pronostiques

#### Taux de mortalité et métastases

La plupart des morts par cancer de la peau sont due aux métastases. Les CBC métastasent très rarement, ils sont rarement fatals. En conséquence, leur mortalité a été peu étudiée, mais les études réalisées montrent qu'elle reste faible, et qu'elle a de plus grandement chuté entre 1980 et 2000. Il est estimé aujourd'hui que les CBC métastasent seulement dans 0,0028 à 0,1 % des cas (15). Ce faible potentiel métastatique des CBC s'expliquerait par leur dépendance stromale. En effet, les expériences de transplantation de CBC sont des échecs si ces derniers sont greffés sans leur stroma. De même *in vitro*, contrairement aux kératinocytes de CSC, les kératinocytes isolés de CBC sont incapables de survivre en dehors de leur environnement tumoral (4). Cependant le faible taux métastatique actuel s'explique aussi par l'amélioration des prises en charge thérapeutique car le risque de métastase est également grandement corrélé à la taille et à la profondeur de la lésion. Il

est devenu peu courant d'en rencontrer en France mais un CBC de diamètre supérieure à 3 cm augmente à 1 ou 2 % le risque de métastase. Ce risque augmente à 20-25 % pour une tumeur de plus de 5 cm, et jusqu'à 50 % pour une tumeur de plus de 10 cm. On parle alors de CBC géant (20). Notons que lorsqu'il y a effectivement développement métastatique, les cellules tumorales empruntent les vaisseaux lymphatiques pour atteindre les nodules lymphatiques, ou les vaisseaux sanguins pour atteindre les os longs et les poumons. D'autres sites, incluant la peau et le foie, peuvent être affectés. L'implantation dans les poumons peut également se produire à la suite d'aspiration de fragments de tumeurs (15) (16).

### *Agressivité locale*

Bien que rarement mortels, les CBC sont très invasifs localement et peuvent entraîner des destructions tissulaires importantes s'ils ne sont pas pris en charge rapidement. On parle de tumeur à malignité essentiellement locale. En effet, bien que les CBC soient considérés cliniquement comme des tumeurs à vitesse de croissance lente, des études statistiques montrent que la taille d'un CBC peut doubler rapidement. Cette contradiction peut s'expliquer par le fait que la plupart des CBC alterne des phases de croissance et des phases de régression. La vitesse de croissance de la tumeur dépend de la phase prédominante. L'évolution peut se faire en surface ou bien en profondeur ; et selon l'avancée et la localisation de la tumeur, l'exérèse n'est pas toujours facile à mener sans préjudice esthétique (au visage notamment). L'agressivité locale des CBC nodulaires est considérée comme inférieure à celle des CBC sclérodermiforme mais supérieure à celle des CBC superficiels (14) (15).

### *Récidive*

Plusieurs facteurs conditionnent le taux de récidive des CBC (14), notamment :

- si l'excision est complète ou pas : La fréquence des récidives après exérèse incomplète est proche de 50 %.
- le sous-type histologique : Une étude comparant les taux de récidive en fonction du sous-type histologique rapporte 37 % de récidive parmi les CBC sclérodermiformes, 15 % parmi les CBC nodulaires et 6 % parmi les CBC superficiels (21).

- la localisation : Trois zones topographiques sont distinguées : à bas risque de récurrence (tronc, membres), à risque intermédiaire (front, joue, menton, cou, cuir chevelu) et à risque élevé (nez et autour des orifices de la tête). Les taux de récurrence les plus élevés sont en effet enregistrés au niveau des oreilles et du sillon nasolabial (respectivement 42,9 % et 20,2 %).

- la taille : Dans l'étude de Rigel et al. (42), le taux de récurrence à 5 ans augmente avec la taille. Il est de 1,4 % pour les CBC inférieurs à 1 cm et passe à 2,4 % si le CBC mesure 1 à 2 cm. Pour les CBC de taille comprise entre 3 et 4 cm, il est de 3,2 %. Au-delà de 5 cm, le taux de récurrence monte à 7,8 % (22).

- la modalité thérapeutique : Le taux de récurrence sur cinq ans change en fonction du choix thérapeutique. Il est de 1 % pour les chirurgies avec examen extemporané, 10,1 % pour l'excision chirurgicale standard, 8,7 % à la suite d'une radiothérapie, 7,7 % après curettage-électrocoagulation et 7,5 % pour la cryochirurgie. Le taux de récurrence est indéterminé pour la chirurgie en deux temps. L'interféron, le laser, la photothérapie dynamique doivent être considérés comme des traitements expérimentaux (14) (23).

- si la tumeur est primaire ou récidivante : Le taux de récurrence des tumeurs récidivantes est supérieur à celui des tumeurs primaires (15,4 % vs 10,6 %) (24). Cela pourrait être lié en partie à la taille des tumeurs récidivantes qui sont généralement plus grandes que les tumeurs primaires (par exemple 1,56 cm vs 1,04 cm en moyenne pour une étude incluant plusieurs centaines de CBC de la tête et du cou (25)).

- la durée du suivi : Le taux de récurrence peut être calculé au terme d'une période de suivi plus ou moins longue et augmente avec la durée du suivi. A la suite de leur étude sur l'influence de la durée de suivi, Rowe *et al.* obtiennent un taux moyen de récurrence pour les thérapies autres que la chirurgie de Mohs de 4,2 % à court terme (moins de 5 ans), 8,7 % à 5 ans et à 10,6 % à 10 ans. Les récurrences après traitement surviennent donc parfois après la fin des périodes de suivi (23).

### Groupes pronostiques

Le CBC étant une tumeur rarement mortelle, les critères classiques utilisés en cancérologie (survie, survie sans métastases) ne sont pas pertinents. Le risque de récurrence est retenu comme le principal critère objectif d'évaluation du pronostic, et doit être complété par l'évaluation du risque d'envahissement local et la difficulté de prise en charge thérapeutique (14).

En pratique, on peut distinguer trois groupes pronostiques. Le groupe de bon pronostic comprend les CBC superficiels ainsi que les CBC nodulaires primaires bien limités inférieurs à un centimètre sur les zones cutanées à risque intermédiaire de récurrence et inférieurs à deux centimètres sur les zones à bas risque de récurrence. Le groupe de pronostic intermédiaire comprend les CBC superficiels récidivés et les CBC nodulaires de moins d'un centimètre au niveau des zones à haut risque de récurrence, de plus d'un centimètre pour les zones à risque intermédiaire ou deux centimètres en cas de risque faible. Enfin, le groupe de mauvais pronostic inclut les CBC sclérodermiformes ou cliniquement mal limités, les formes histologiques agressives, ainsi que les formes récidivées (autres que CBC superficiels) et les CBC nodulaires de la zone à risque élevé de récurrence de taille supérieure à un centimètre (14).

Le classement d'un CBC dans un de ces groupes pronostiques n'est pas anodin puisqu'il permet de choisir la thérapie la plus adaptée. Hors ce classement dépend du diagnostic, d'où l'importance de ce dernier (14).

## III- METHODES DIAGNOSTIQUES

### 1. Evaluation d'une méthode diagnostique

L'efficacité de toute méthode diagnostique est évaluée par rapport à une méthode standard de référence (« gold standard ») choisie pour représenter la réalité, et considérée comme seule aboutissant avec certitude au diagnostic correct. Pour les cancers cutanés, c'est le diagnostic histopathologique réalisé par les anatomopathologistes, et possible à la suite d'un prélèvement (excision

chirurgicale, biopsie, incision ou curettage) qui prévaut. Pour évaluer l’efficacité de toute autre méthode diagnostique de cancers cutanés, il est nécessaire dans un premier temps de chiffrer le nombre d’occurrences des quatre cas de figure présentés dans le **Tableau 3**. Les diagnostics obtenus – positifs et négatifs – sont étiquetés respectivement « Vrais Positifs » et « Vrais Négatifs » lorsqu’ils sont en accord avec le diagnostic histo-pathologique, ou respectivement « Faux Positifs » et « Faux Négatifs » lorsqu’ils sont différents.

		Méthode diagnostique de référence	
		+	-
Méthode diagnostique à évaluer	+	Vrai Positif (VP)	Faux Positif (FP)
	-	Faux Négatif (FN)	Vrai Négatif (VN)

*Tableau 3 Les 4 cas de figures possibles obtenus lors de l’évaluation d’une méthode de diagnostic. Le signe + désigne un diagnostic positif: échantillon tumoral. Le signe - correspond à un diagnostic négatif : échantillon sain.*

A partir de là, plusieurs notions peuvent être définies, notamment la sensibilité et la spécificité qui sont couramment utilisées dans le milieu médical. La sensibilité est obtenue en divisant le nombre de cas VP par la somme VP+FN ce qui rend compte du pourcentage de cas tumoraux bien diagnostiqués. La spécificité est obtenue en divisant le nombre de cas VN par la somme VN+FP, ce qui correspond au pourcentage de cas sains détectés par la méthode diagnostique à évaluer.

## 2. Examen clinique

La prise en charge médicale d’une lésion cutanée est toujours initiée par sa détection au cours d’un examen physique. Cela suppose que la lésion soit suffisamment développée pour être soit visible à l’œil nu, soit palpable. Cet examen amène à une suspicion clinique voire à un tout premier diagnostic. Ce diagnostic clinique repose essentiellement sur l’expérience du praticien, et s’il est effectué par un médecin généraliste, le patient sera redirigé vers un dermatologue qui réalisera un nouvel examen physique et décidera de la suite de la prise en charge en cas de confirmation de l’inquiétude médicale.

Bien que ce soit le diagnostic le plus facilement accessible, sa spécificité et sa sensibilité ne sont pas bien connues. Ceci est d'autant plus vrai pour les NMSC comme ces derniers sont généralement exclus des registres médicaux comme nous l'avons expliqué précédemment. Concernant la reconnaissance des CBC, la Haute Autorité de Santé ne dispose pas de chiffre concernant la performance diagnostique des dermatologues français, et se réfère à une étude américaine faisant état d'une performance diagnostique de 70 % pour les dermatologues de centre universitaire, de 65 % pour les dermatologues libéraux et de 64 % pour les internes de spécialité (26). Une récente étude publiée en 2015 et réalisée en Iran fait état de 75,6 % de diagnostic clinique correct pour les dermatologistes (27).

### 3. Dermoscopie

Le diagnostic clinique du dermatologue peut être affiné grâce à la dermoscopie, aussi appelée dermatoscopie. Cette technique de diagnostic non invasive nécessite l'usage d'un dermoscope ou dermatoscope, et est très largement utilisée pour le diagnostic des cancers cutanés pigmentés tels que les mélanomes, mais aussi parfois pour le diagnostic des NMSC. Ce système optique simple permet d'examiner *in vivo* les couches superficielles de la peau à travers une lentille de grossissement, soit en la plaçant directement sur la peau, soit après y avoir déposé au préalable un film liquide. Ce film d'immersion peut être de l'eau, de l'huile minérale, de l'alcool ou du gel, et permet de rendre la couche cornée transparente, en réduisant les phénomènes de réflexion de la lumière causés par la différence des indices de réfraction entre l'air et la peau, et par l'irrégularité de la surface cutanée. Les dermoscopes les plus couramment utilisés sont les dermoscopes à main qui sont relativement bon marché et faciles d'utilisation. Il s'agit d'un instrument optique monoculaire de facteur de grossissement x10 avec une lampe halogène ou une LED comme source de lumière incidente. L'image observée est une projection des structures de l'épiderme, de la jonction dermo-épidermique et du derme papillaire, permettant de caractériser la lésion selon différents critères tels que sa symétrie, sa forme, la régularité de sa bordure, la distribution des couleurs, son réseau vasculaire, etc. Il existe aujourd'hui également des dermoscopes plus sophistiqués tels que les stéréomicroscopes qui sont des instruments binoculaires de grossissement allant de x6 à x40, ou encore les vidéomicroscopes équipés d'une caméra et de grossissement pouvant aller jusque x1000 (3) (28). Avec la dermoscopie, certains dermatologues ont pu atteindre

jusqu'à 96 % de sensibilité et 92 % de spécificité pour le diagnostic des CBC (11). Cependant, cet outil diagnostique présente un inconvénient majeur : il nécessite une formation solide et beaucoup de pratique pour atteindre une bonne performance diagnostique.

#### **4. Evaluation histopathologique**

L'évaluation histopathologique est la méthode standard de référence pour le diagnostic des CBC. Pour les CBC de bon pronostic, le traitement le plus habituel étant le traitement chirurgical, celui-ci permet en même temps une confirmation histologique du diagnostic. L'exérèse d'emblée n'est par contre pas recommandée lorsque la lésion semble de mauvais pronostic, que le diagnostic clinique est incertain, lorsque le traitement envisagé n'est pas chirurgical, et que l'excision nécessite une reconstruction chirurgicale importante. Dans ces cas-là, il est nécessaire de réaliser le diagnostic histopathologique au préalable à partir d'une biopsie (14). Les biopsies ont cependant l'inconvénient d'être des techniques invasives, parfois mutilantes et douloureuses, et pouvant être à l'origine de complications (infections cicatricielles) (11).

L'examen anatomopathologique est considéré comme le diagnostic de certitude pour les CBC. Il existe néanmoins une part de subjectivité dans cet examen, renforcée par l'existence de plusieurs systèmes de classification des NMSC à travers le monde. Le taux de différence de diagnostic entre anatomopathologistes concernant les lésions cutanées a été évalué entre 1,2 et 7 % (11).

#### **5. Autres méthodes de diagnostic**

Le « gold-standard » actuel pour le diagnostic des CBC est l'examen clinique, suivi d'un examen anatomopathologique sur biopsie ou sur pièce d'exérèse. La dermoscopie est la technique d'imagerie optique la plus largement utilisée pour le diagnostic cutané. L'imagerie par ultrasons est également bien acceptée. D'autres techniques telles que l'imagerie par résonance magnétique, la tomographie par émission de positon peuvent être également utilisées. Enfin, il se développe aujourd'hui de nouvelles technologies montrant un potentiel intéressant pour

le diagnostic des NMSC, comme par exemple la microscopie multiphotonique, la microscopie confocale, la tomographie par cohérence optique ou encore différents types de spectroscopies (11).

## IV- PRISE EN CHARGE THERAPEUTIQUE

### 1. Excision chirurgicale

Pour les CBC, l'excision chirurgicale est toujours le traitement de première intention. Il en existe plusieurs types, notamment :

1°/ L'exérèse chirurgicale classique définit des marges d'exérèse en fonction de la classification pronostique du CBC. Ces marges visent à obtenir l'exérèse complète de la tumeur en un seul acte chirurgical, mais ne la garantissent pas. C'est l'examen anatomopathologique, après inclusion en paraffine de la pièce excisée puis réalisation de coupes fines et coloration, qui permet d'apprécier le caractère complet ou pas d'une exérèse. Une exérèse incomplète est définie par la présence de cellules tumorales sur les marges de résection latérales ou en profondeur. Mais compte tenu de l'épaisseur des coupes histopathologiques, il est difficile d'examiner la totalité des berges. A titre illustratif, 250 coupes de 4 microns sont nécessaires pour explorer en totalité 1 millimètre de tissu prélevé. La prise en charge macroscopique des prélèvements résulte donc d'un compromis assurant une fiabilité acceptable dans des limites de faisabilité et de coût raisonnables (14). En pratique, les coupes sériées longitudinales classiques ne permettent de visualiser que 1 % des berges et laissent donc de vastes intervalles non examinés (29).

2°/ L'exérèse chirurgicale avec contrôle extemporané des marges consiste à réaliser en cours d'intervention un examen rapide des marges d'exérèse de façon à guider le geste chirurgical. Le contrôle extemporané commence toujours par un examen macroscopique soigneux de la pièce excisée qui permet de décider de la nécessité de coupes tissulaires et dans ce cas, de choisir la zone à prélever. Le durcissement des tissus ne pouvant être obtenu rapidement que par une technique de

congélation, le contrôle microscopique des marges se fait sur coupes fines congelées. Dans tous les cas, le résultat devra être confirmé après l'intervention selon les techniques d'anatomie pathologique habituelles (inclusion en paraffine) (30). Dans la prise en charge du CBC, l'examen extemporané peut trouver sa place lors d'une exérèse chirurgicale classique ou lors d'une chirurgie micrographique de Mohs (CMM).

Contrairement à l'exérèse chirurgicale classique, la CMM permet l'étude de 100 % des berges et minimise les marges d'excision. La tumeur est d'abord enlevée avec de très faibles marges (étape de « dénoyautage »), puis l'exérèse est complétée par une mince recoupe horizontale. Cette strate cutanée prélevée, aussi appelée « galette », contient la totalité des marges d'excision. Elle sera aplatie en vue de l'examen histologique : sa partie périphérique correspondra alors aux marges latérales d'excision et sa partie centrale aux marges profondes. Si cette recoupe contient des foyers tumoraux, ils sont localisés afin d'orienter la reprise. La CMM montre les taux de récurrence les plus bas pour le traitement des CBC. Cependant elle nécessite une équipe spécialisée et bien coordonnée, et est de ce fait très rarement réalisée en France (14) (29).

3°/ L'exérèse chirurgicale en deux temps constitue une alternative entre la chirurgie classique et celle avec examen extemporané. Après excision chirurgicale, un pansement transitoire est appliqué le temps que les marges d'exérèse soient contrôlées sur coupes paraffinées, qui permettent une meilleure conservation de la morphologie tissulaire par rapport aux coupes congelées. L'examen histologique sera là aussi orienté par le chirurgien sur une ou plusieurs zones. En fonction de la réponse anatomopathologique, le patient est revu quelques jours plus tard pour reprise ou fermeture. La réalisation d'une exérèse en deux temps est particulièrement indiquée en cas de fermeture nécessitant une greffe ou un lambeau, et dont la reprise chirurgicale serait difficile en cas d'exérèse incomplète (14).

Il est recommandé pour traiter les CBC de bon pronostic d'effectuer en première intention une excision chirurgicale classique avec une marge latérale de 3 à 4 mm. Pour les CBC de pronostic intermédiaire, cette marge devra être strictement supérieure à 4 mm. Pour les CBC de mauvais pronostic, la marge latérale pourra varier de 5 mm pour les lésions bien délimitées, à 10 mm ou plus dans certains cas de récurrence ou certains CBC sclérodermiformes. Si ces conditions ne peuvent être respectées, il est préférable d'effectuer une chirurgie en deux temps ou une chirurgie avec

contrôle extemporané des marges. Concernant les marges profondes, il est recommandé qu'elles soient situées dans le tissu graisseux sous-cutané, et qu'elles atteignent en les respectant (sauf s'ils sont envahis) l'aponévrose (front), le périchondre (oreille, nez), ou le périoste (cuir chevelu). Pour les CBC superficiels, elles peuvent être moins profondes (14).

## 2. Autres traitements

Lorsque l'excision chirurgicale ne peut pas être réalisée, dans le cas de contre-indications (*e.g.* traitement anticoagulant), de difficultés de réalisation (*e.g.* manque de moyens techniques) ou simplement de refus du malade, le traitement de deuxième intention est la radiothérapie ou la cryochirurgie pour les CBC de bon pronostic ou de pronostic intermédiaire. En troisième intention, les CBC de bon pronostic peuvent également être traités par curetage-électrocoagulation. Pour les CBC de mauvais pronostic, seule la radiothérapie peut être proposée au patient en deuxième intention, les autres techniques citées ci-dessus étant contre-indiquées (14).

*Introduction sur*

---

**LES SPECTROSCOPIES OPTIQUES  
VIBRATIONNELLES**

---

## I- INTRODUCTION

Références : (31) (32) (33)

### 1. Rayonnement, champ et spectre électromagnétiques

Le rayonnement électromagnétique correspond à la propagation d'énergie grâce aux variations périodiques, de fréquence  $\nu$ , d'un champ électrique et d'un champ magnétique (**Figure 15**). Ces deux champs sont interdépendants et constituent le champ électromagnétique. Le rayonnement électromagnétique est dit monochromatique s'il correspond à une radiation de fréquence  $\nu$  donnée précisément définie, ou polychromatique s'il est composé de radiations de fréquences diverses.

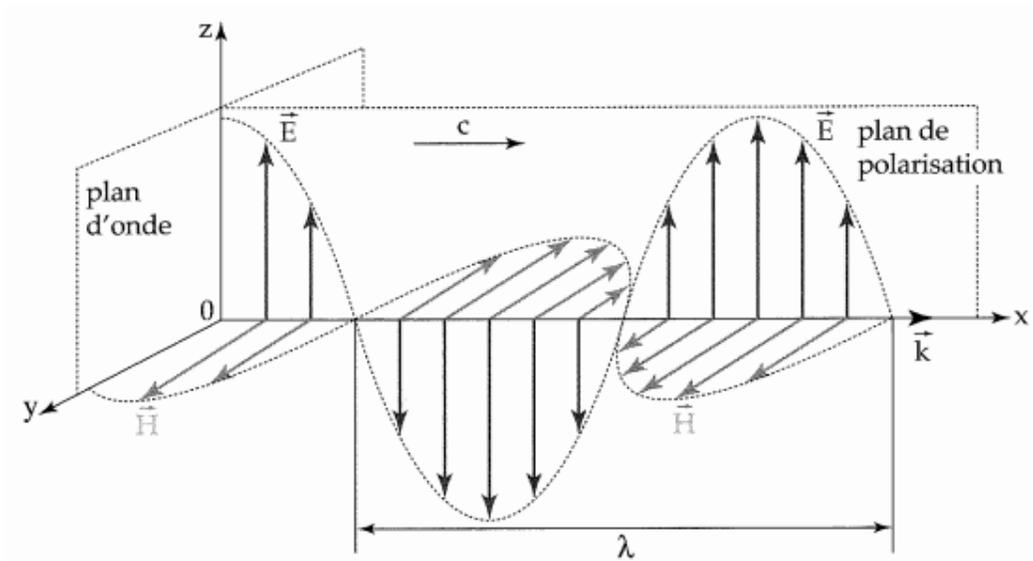


Figure 15 Champs électrique et magnétique de l'onde électromagnétique.

$\vec{E}$  : champ électrique.  $\vec{H}$  : champ magnétique.  $c$  : sens de propagation de l'onde électromagnétique.  $\lambda$  : longueur d'onde. (34)

Selon la mécanique quantique, le rayonnement électromagnétique présente une double nature : ondulatoire et corpusculaire. Il peut ainsi être considéré comme une onde (l'onde électromagnétique) ou un flux de particules de masse nulle (les photons). Ainsi, de manière générale, une onde peut être indifféremment caractérisée par sa périodicité spatiale (période ou longueur d'onde  $\lambda$ , inversement proportionnelle au nombre d'onde), sa périodicité temporelle (période  $T$ , inversement proportionnelle à la fréquence  $\nu$ ) ou par l'énergie des photons qui lui sont associés :  $E = h \nu$ ,  $h$  étant la constante de Planck ( $6,63 \cdot 10^{-34}$  J.s).

Le spectre électromagnétique représente la répartition dans différents domaines des ondes électromagnétiques, en fonction de l'énergie transportée (**Figure 16**). Le domaine infrarouge (IR) se décompose lui-même en proche IR, IR moyen et IR lointain ou thermique.

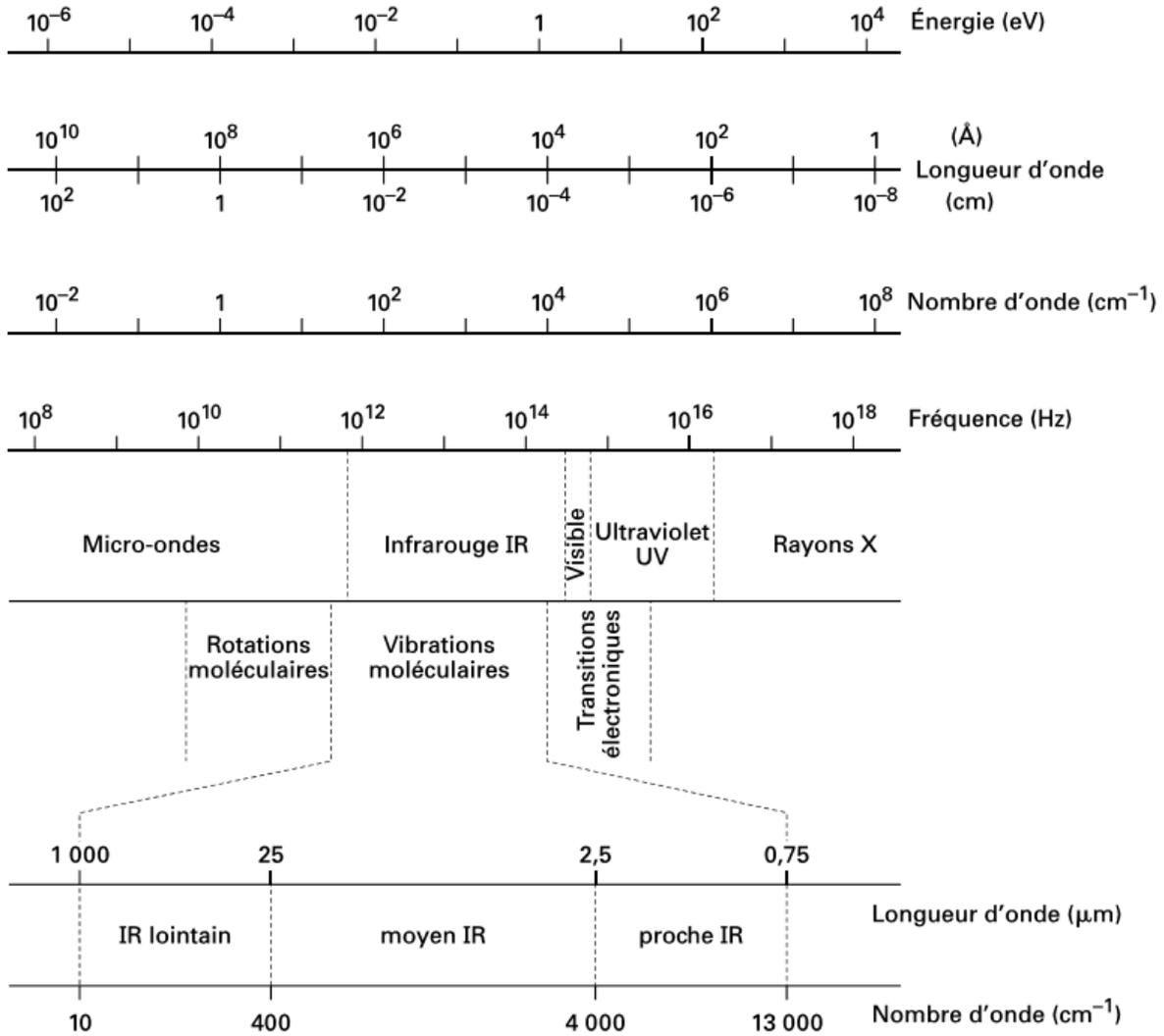


Figure 16 Les divers domaines spectraux du rayonnement électromagnétique. (31)

## 2. Niveaux d'énergie moléculaire

D'après la mécanique quantique, l'énergie d'une molécule  $E_m$ , à l'exception de son énergie cinétique, est quantifiée : elle dépend de nombres entiers que l'on nomme nombres quantiques. Elle correspond à la somme de l'énergie des électrons  $E_e$  (liée à leur nombre, la forme de la molécule et leur état d'excitation), de l'énergie vibrationnelle des liaisons interatomiques  $E_v$  (liée à la masse et à l'arrangement des atomes), et de l'énergie  $E_r$  due à la rotation de la molécule :  $E_m = E_e + E_v + E_r$ , avec  $E_e > E_v > E_r$  (Figure 17). Notons que les rotations libres ne sont possibles que dans le cas des gaz.

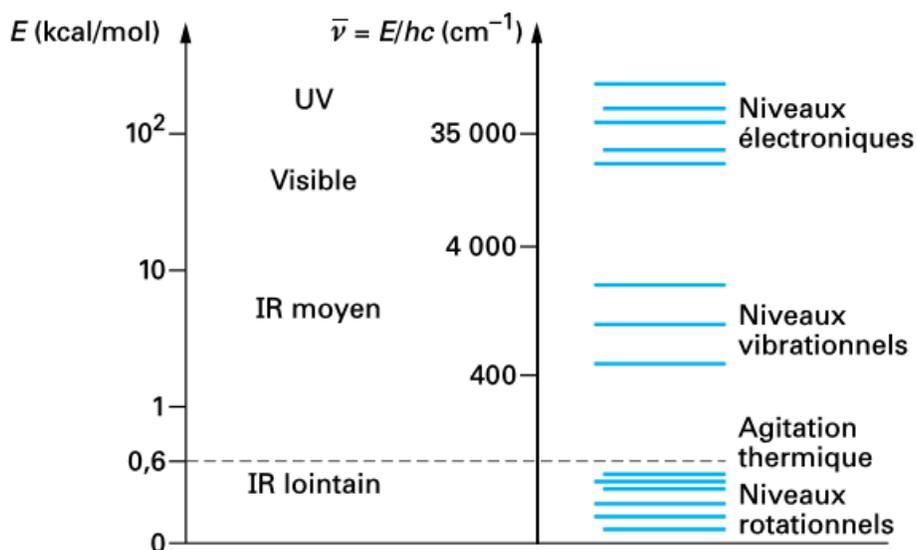


Figure 17 Valeurs respectives des contributions électroniques, vibrationnelles et rotationnelles d'une molécule.  
Rappel : 1 cal = 4,18 J. (31)

## 3. Modes de vibration moléculaire

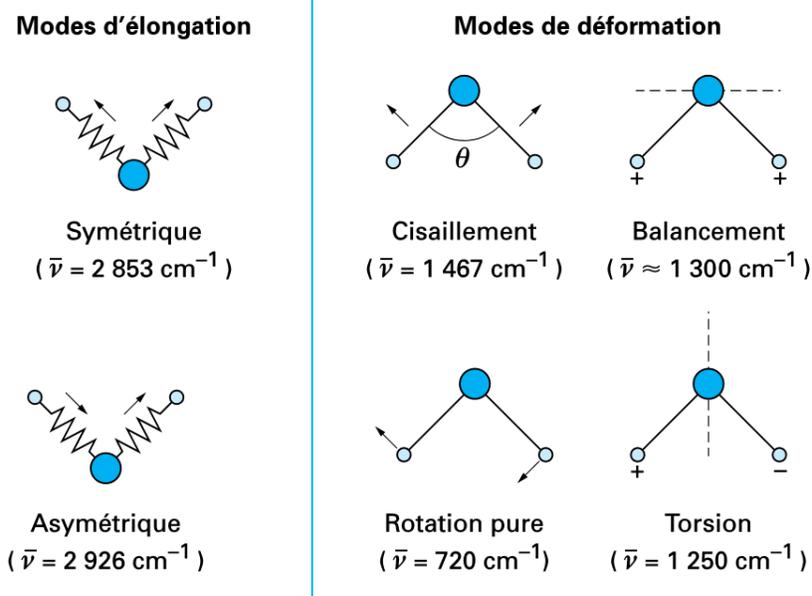
Une molécule formée de  $N$  atomes possède  $3N$  degrés de liberté, soit  $3N$  mouvements possibles dans l'espace, dont 3 correspondent aux mouvements de translation d'ensemble de la molécule le long des trois axes du repère  $x, y, z$  et 3 correspondent aux mouvements de rotation d'ensemble de la molécule autour de ces axes. Les autres  $3N-6$  (ou 5 si la molécule est linéaire) possibilités de mouvements, indépendants les uns des autres, se combinent et donnent naissance à des

mouvements internes qui déforment la molécule sans que celle-ci ne translate ou ne tourne. Il s'agit des mouvements de vibrations internes.

L'analyse des vibrations d'une molécule peut être simplifiée si l'on tient compte de ses propriétés de symétrie. De plus, l'expérience et les calculs montrent que l'ensemble des vibrations d'une molécule peuvent être fragmentées en groupements vibrationnels et on peut observer dans un spectre des fréquences caractéristiques de groupements chimiques donnés.

On distingue deux modes principaux de vibrations moléculaires (**Figure 18**) :

- Les modes d'élongation (symétriques ou antisymétriques) qui entraînent une variation des longueurs des liaisons interatomiques, sans modification des angles formés par ces liaisons. On parle de vibrations de valence ou d'élongation.
- Les modes de déformation, qui à l'inverse, entraînent une modification des angles formés par les liaisons sans modification des longueurs de ces liaisons.



*Figure 18 Modes de vibration moléculaire.  
Exemple des vibrations localisées du groupement CH<sub>2</sub> d'une molécule. (31)*

#### 4. Interaction matière-rayonnement

L'interaction d'une molécule avec une onde électromagnétique – véhiculant une énergie liée à sa fréquence – peut la faire passer à un état d'énergie supérieur. Schématiquement, trois phénomènes principaux peuvent être observés à la suite d'une telle interaction :

- Une absorption du photon incident si celui-ci est porteur d'une énergie correspondant à la différence d'énergie de deux niveaux énergétiques. La molécule sera alors portée à un état excité.
- Une diffusion c'est-à-dire un changement de direction de propagation de l'onde électromagnétique. Elle peut se faire avec ou sans changement de longueur d'onde (diffusion inélastique ou élastique, respectivement).
- Une émission d'un rayonnement thermique (condition d'équilibre thermique)

#### 5. Spectroscopies optiques vibrationnelles

La spectroscopie est l'ensemble des méthodes d'analyse spectrale renseignant sur la composition et la structure de la matière. La spectroscopie optique utilise les rayonnements électromagnétiques, dont l'énergie est modifiée suite à leur interaction avec la matière, et inclut la spectroscopie par émission de fluorescence, la spectroscopie par absorption infrarouge et la spectroscopie de diffusion Raman :

- La spectroscopie de fluorescence utilise des rayonnements électromagnétiques porteurs d'une énergie suffisante pour permettre aux électrons de passer de l'état électronique fondamental à un état électronique excité (rayonnement de longueurs d'onde dans les domaines du visible et de l'ultraviolet). Elle repose donc sur l'analyse des variations de niveaux énergétiques électroniques.
- La spectroscopie IR et la spectroscopie Raman utilisent des rayonnements électromagnétiques porteurs d'une énergie moindre qui permettent aux électrons de changer d'état vibrationnel (rayonnements des domaines de l'infrarouge). Elles reposent sur l'analyse des variations de niveaux énergétiques vibrationnels et sont appelées spectroscopies optiques vibrationnelles.

## II- PRINCIPE

Références : (32) (34)

### 1. Approche classique

Un rayonnement électromagnétique peut se coupler avec tout mouvement moléculaire faisant intervenir une variation de l'état de polarisation électrique de cette molécule.

#### Spectroscopie infrarouge

Ainsi certains mouvements de vibration des noyaux d'une molécule peuvent être mis en résonance par une onde électromagnétique de même fréquence (domaine IR) et donner lieu à un phénomène d'absorption de ce rayonnement. Pour que ce phénomène ait lieu, il faut que cette absorption induise une variation du moment dipolaire  $\vec{\mu}$  de la molécule. En d'autres termes, une vibration de coordonnées normales  $Q$  peut absorber un rayonnement infrarouge si la dérivée  $\partial\mu/\partial Q$  est non nulle. On dit de cette vibration qu'elle est polaire. Inversement, une vibration polaire (engendrant l'oscillation du moment dipolaire d'une molécule) peut émettre une onde électromagnétique de même fréquence. C'est le phénomène d'émission. On comprend que les liaisons moléculaires concernées par les phénomènes d'absorption et d'émission infrarouges sont celles présentant un moment dipolaire à l'équilibre et qui sont animées d'un mouvement périodique (vibration polaire).

#### Spectroscopie Raman

Lorsque la fréquence de l'onde électromagnétique est suffisamment éloignée de toute fréquence de vibration moléculaire, c'est le phénomène de diffusion qui est prépondérant. Ce phénomène est lié à la polarisabilité moléculaire, c'est-à-dire à l'aptitude de la molécule à acquérir un moment dipolaire induit  $\vec{P}$  sous l'effet d'un champ électrique  $\vec{E}$ , ce qui s'écrit :  $\vec{P} = [\alpha]\vec{E}$  avec  $[\alpha]$  tenseur de polarisabilité. En effet, pour une molécule placée dans un champ électrique d'orientation et d'intensité données, ses électrons et ses noyaux tendront à se déplacer dans des sens opposés sous l'effet du champ, induisant ainsi un moment dipolaire additionnel.

Si on tient compte du caractère oscillant du champ  $\vec{E}$  de l'onde électromagnétique :  $\vec{E} = \vec{E}_0 \cos 2\pi\nu_0 t$ . Le tenseur de polarisabilité est lui aussi modulé dans le temps à cause des mouvements de vibration de la molécule, de fréquence  $\nu_v$ , on a :  $[\alpha] = [\alpha]_0 + [\alpha'] \vec{E}_0 \cos 2\pi\nu_v t$ , où  $[\alpha]_0$  correspond à la polarisabilité de la molécule au repos et  $[\alpha']$  est l'amplitude de la partie du tenseur de polarisabilité qui varie avec le temps. En prenant en compte cette double modulation du moment dipolaire induit, on obtient :  $\vec{P} = \vec{E}_0 ([\alpha]_0 + [\alpha'] \cos 2\pi\nu_v t) \cos 2\pi\nu_0 t$ . L'expression du champ électrique diffusé  $\vec{E}_{\text{diff}}$  est proportionnelle au moment dipolaire induit  $\vec{P}$ . En remaniant l'expression de  $\vec{P}$ , on obtient :

$$\vec{E}_{\text{diff}} \sim \vec{P} = \underbrace{\vec{E}_0 [\alpha]_0 \cos 2\pi\nu_0 t}_{\substack{\text{Diffusion} \\ \text{Rayleigh}}} + \underbrace{(1/2) \vec{E}_0 [\alpha'] \cos 2\pi(\nu_0 + \nu_v) t}_{\substack{\text{Diffusion} \\ \text{Raman anti-Stokes}}} + \underbrace{(1/2) \vec{E}_0 [\alpha'] \cos 2\pi(\nu_0 - \nu_v) t}_{\substack{\text{Diffusion} \\ \text{Raman Stokes}}}$$

L'expression du champ électrique diffusé  $\vec{E}_{\text{diff}}$  comporte donc un terme correspondant à une diffusion sans changement de fréquence (élastique) appelée *diffusion Rayleigh*, et deux termes indiquant des diffusions inélastiques aux fréquences  $\nu_0 + \nu_v$  et  $\nu_0 - \nu_v$ , correspondant respectivement aux *diffusions Raman anti-Stokes et Stokes*. Ces phénomènes n'ont lieu que pour les mouvements donnant lieu à une variation de la polarisabilité de la molécule.

## 2. Approche quantique

Dans cette approche, l'énergie de vibration moléculaire est quantifiée en niveaux discrets  $\nu$ . En cas d'interaction entre un photon et une molécule, différents phénomènes peuvent être engendrés, avec une probabilité qui dépend de l'énergie  $h\nu$  apportée par le photon (**Figure 19**).

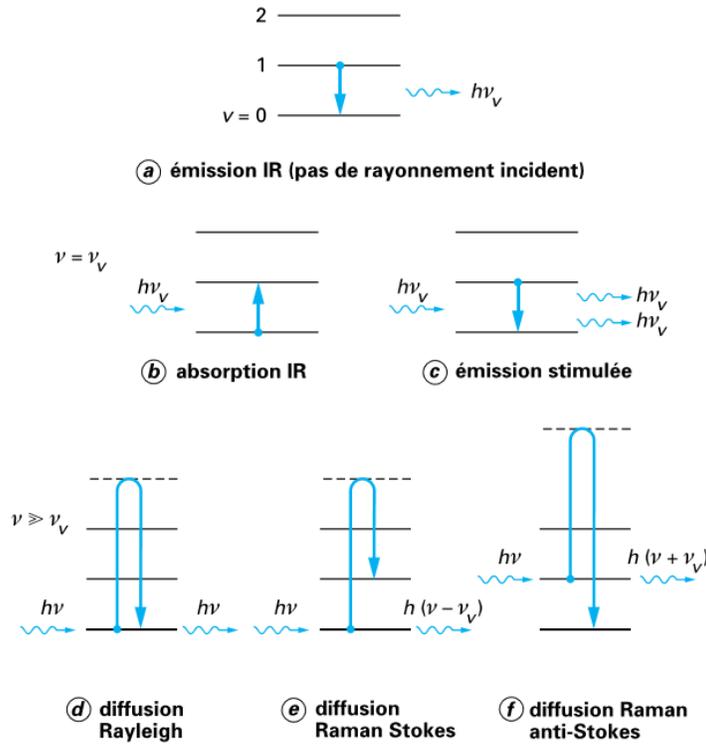


Figure 19 Interaction entre un photon et la matière caractérisée par des niveaux d'énergie vibrationnelle. (32)

### Spectroscopie infrarouge

Si la fréquence de l'onde électromagnétique incidente  $\nu$  est de l'ordre de grandeur des fréquences de vibrations moléculaires  $\nu_v$ , la transition la plus probable est  $\nu \rightarrow \nu + 1$ . C'est le phénomène d'absorption infrarouge (illustration (b) de la Figure 19). On peut noter également la possibilité  $\nu \rightarrow \nu - 1$ , correspondant au phénomène d'émission stimulée, qui est à la base du rayonnement laser.

### Spectroscopie Raman

Si la fréquence de l'onde électromagnétique incidente  $\nu$  est très grande par rapport aux fréquences de vibrations moléculaires  $\nu_v$ , alors le phénomène de diffusion est le plus probable.

De manière très schématique, lors de la collision d'un photon d'énergie  $h\nu$  telle que  $\nu \gg \nu_v$  avec une molécule, celle-ci absorbe l'énergie du photon et de ce fait voit son énergie augmenter à un niveau intermédiaire entre les niveaux énergétiques vibrationnels et électroniques. Ce niveau énergétique virtuel n'est pas stable, et pour retrouver son niveau énergétique de départ, la molécule émet un photon d'énergie  $h\nu_a$ .

Dans la grande majorité des cas, la molécule retrouve effectivement son niveau énergétique initial et le photon diffusé transporte la même quantité d'énergie que celle apportée par le photon incident :  $h\nu = h\nu_a$  (diffusion élastique). Il s'agit du phénomène de *diffusion Rayleigh* (illustration © de la **Figure 19**). Pour 1000 photons incidents, un seul sera à l'origine d'une diffusion Rayleigh.

Il arrive cependant dans 1 cas sur 1 000 000 que la molécule redescende à un niveau énergétique vibrationnel qui ne soit pas celui d'origine, et dans ce cas le photon diffusé sera porteur d'une énergie différente de celle apportée par le photon incident :  $h\nu \neq h\nu_a$  (diffusion inélastique). Il s'agit du phénomène de *diffusion Raman*. Deux cas peuvent se présenter :

- Le photon diffusé est moins énergétique que le photon incident :  $h\nu > h\nu_a$ . A la suite de la collision avec le photon, la molécule a augmenté son niveau énergétique vibrationnel (transition  $\nu \rightarrow \nu + 1$ ). L'énergie gagnée par la molécule correspond à la perte énergétique du photon diffusé par rapport au photon incident. Il s'agit de la diffusion Raman *Stokes* (illustration © de la **Figure 19**).

- Le photon diffusé est plus énergétique que le photon incident :  $h\nu < h\nu_a$ . A la suite de la collision avec le photon, la molécule a diminué son niveau énergétique vibrationnel (transition  $\nu \rightarrow \nu - 1$ ). L'énergie perdue par la molécule correspond au gain énergétique du photon diffusé par rapport au photon incident. Il s'agit de la diffusion Raman *anti-Stokes* (illustration ① de la **Figure 19**). Pour qu'une diffusion anti-Stokes ait lieu, il faut que la molécule se trouve déjà dans un état vibrationnel excité, ce qui n'est pas le plus probable à température ambiante d'après la distribution de Maxwell-Boltzmann qui représente la répartition en niveau d'énergie d'un ensemble de molécules à une température donnée. Cela explique que les raies anti-Stokes soient moins intenses que les raies Stokes à température ambiante.

### III-COMPARATIF DES SPECTROSCOPIES RAMAN ET INFRAROUGE

Nous avons vu que l'absorption d'un rayonnement infrarouge ne peut avoir lieu que si le mouvement de vibration considéré induit une variation du moment dipolaire électrique de la molécule, alors que la diffusion Raman ne s'observe que lorsqu'il entraîne une variation de la polarisabilité moléculaire. Ces deux types de spectroscopie prennent donc en compte des mécanismes différents et apportent bien souvent des informations complémentaires permettant une caractérisation vibrationnelle complète. Schématiquement, les liaisons polaires ayant un fort moment dipolaire présenteront des absorptions importantes dans l'infrarouge, alors que les liaisons covalentes, *a priori* plus polarisables donneront un spectre Raman plus significatif. Une conséquence directe de ces règles de sélection est que les analyses d'échantillons aqueux ne peuvent pas être réalisées en spectroscopie infrarouge, l'eau présentant une trop forte absorption. La spectroscopie Raman est par contre possible, mais elle est relativement moins sensible et peut amener des problèmes de fluorescence de l'échantillon, qui ne se rencontrent pas en spectroscopie infrarouge.

## IV- INSTRUMENTATION

### 1. Microspectromètre Raman LabRAM

Pour les analyses Raman *ex vivo* et *in vitro*, nous avons utilisé le microspectromètre confocal LabRAM de Horiba Jobin Yvon, France (**Figure 20**).

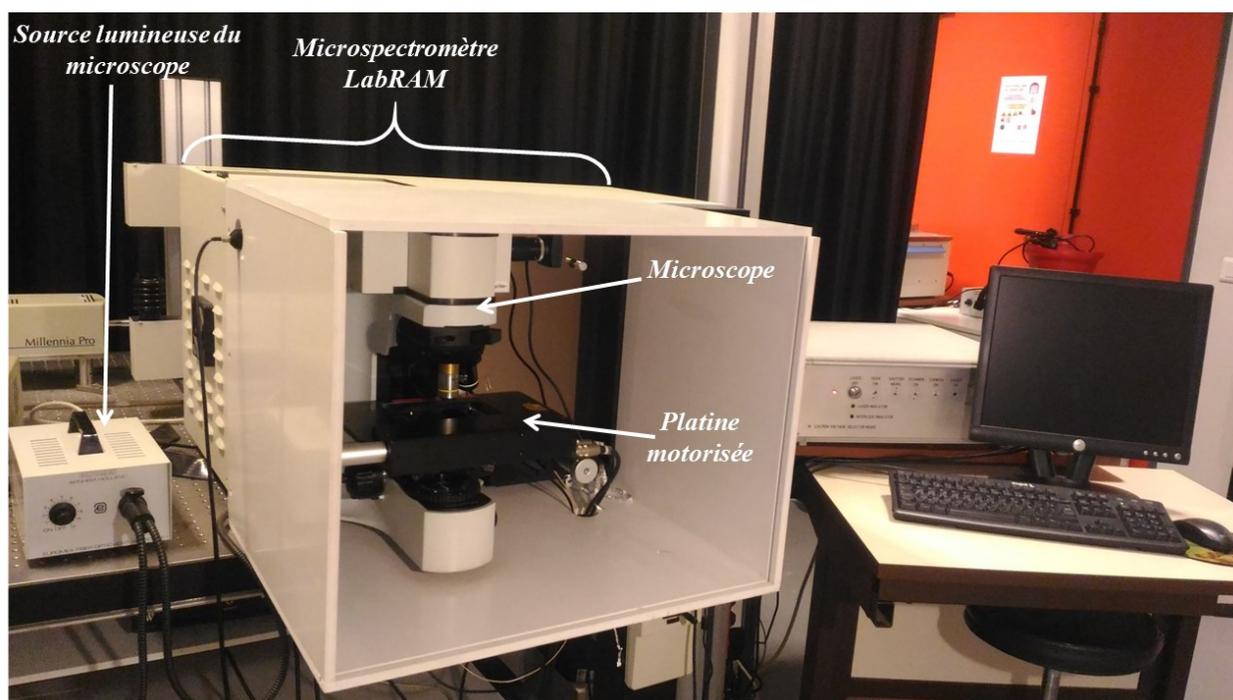
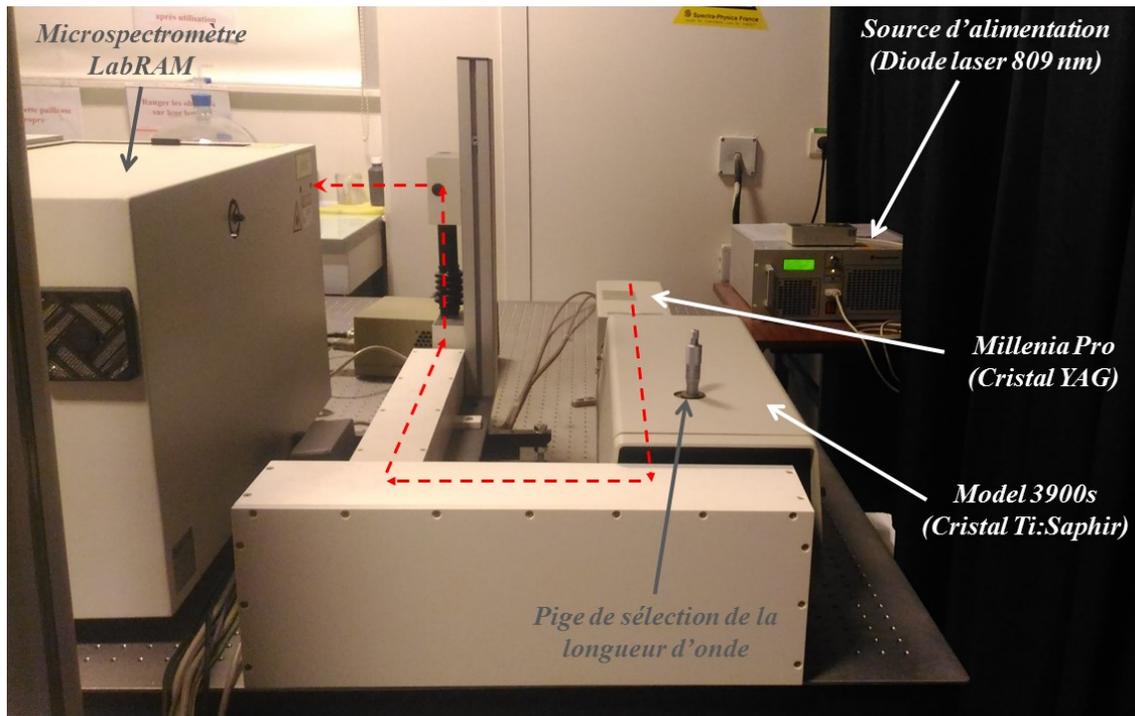


Figure 20 Microspectromètre Raman LabRAM (HORIBA Jobin Yvon).

#### Composition

Il s'agit d'un spectromètre confocal Raman associé à un microscope Olympus BX 41. Il est équipé d'un réseau dispersif holographique de 950 traits/mm et d'un détecteur CCD (Charge-Coupled Device) de 1024x256 pixels. La résolution spectrale de ce spectromètre est de  $2 \text{ cm}^{-1}$ . Ce système est contrôlé par le logiciel LabSpec fourni par HORIBA Jobin Yvon.

Le rayonnement incident est un laser émettant dans le proche IR (785 nm) (**Figure 21**). Il est obtenu à partir de l'émission d'un laser Titane Saphir alimenté par une pompe YAG. La source est une diode laser qui est un type de diode capable d'émettre un laser à partir du courant électrique. Il s'agit ici d'une diode laser Spectra-Physics émettant à 809 nm. Ce laser va être dirigé grâce à des fibres optiques vers le cristal YAG (Grenat d'Aluminium et d'Yttrium) situé dans le boîtier Millenia Pro (Spectra-Physics). Le faisceau sortant sera un laser 532 nm qui va à son tour aller exciter un cristal Titane Saphir  $Ti:Al_2O_3$  (Model 3900s de Spectra-Physics). Celui-ci émettra alors un spectre de fluorescence très intense sur une large fenêtre spectrale du domaine proche IR. On peut ensuite manuellement sélectionner les longueurs d'onde électromagnétique avec lesquelles on souhaite travailler. Le choix de la longueur d'onde résulte d'un compromis entre l'intensité du signal diffusé et celle de la fluorescence parasite. Le réglage actuel du dispositif entraîne la sélection des ondes électromagnétiques de longueurs d'onde 785 nm. Les cristaux YAG et  $Ti:Al_2O_3$  sont refroidis pendant leur utilisation par un circuit hydraulique.



*Figure 21* Système d'obtention du laser incident proche infrarouge (Spectra-Physics). Le trajet des ondes électromagnétiques est indiqué par les flèches pointillées rouges.

### Fonctionnement

Avant utilisation, il est nécessaire de prévoir un temps de montée en puissance du laser et de refroidissement du détecteur par effet Pelletier (15-20 minutes). A l'arrivée dans le spectromètre LabRAM, le laser 785 nm traverse un filtre interférentiel éliminant d'éventuelles ondes électromagnétiques parasites ( $\lambda \neq 785$  nm). Il est ensuite dirigé vers le microscope pour interagir avec l'échantillon déposé sur la platine motorisée. Si l'échantillon est fragile, il est possible d'utiliser un filtre atténuateur diminuant l'intensité laser. La puissance de travail en sortie d'objectif pour cette étude était comprise entre 35 et 50 mW.

Après interaction entre l'échantillon et le laser incident, des ondes électromagnétiques sont diffusées dans toutes les directions avec ou sans modification de longueur d'onde. Certaines passent dans l'objectif du microscope et retournent vers le spectromètre, où elles traversent un filtre Notch. Ce filtre stoppera les ondes électromagnétiques de longueur d'onde 785 nm correspondant aux raies de diffusion Rayleigh et aux raies du laser incident réfléchies par l'échantillon. A la sortie du filtre Notch, seules subsistent donc les raies de diffusion Raman, dont l'écart de longueur d'onde avec le laser incident correspondra à des échanges énergétiques avec l'échantillon (niveaux énergétiques vibrationnels) et renseignera donc sur sa composition moléculaire.

Les ondes électromagnétiques vont ensuite passer par un trou confocal ne laissant passer que celles diffusées à partir d'un volume précis de l'échantillon situé au niveau de focalisation du laser, puis être dirigées vers le réseau qui sépare spatialement les ondes électromagnétiques en fonction de leur longueur d'onde. Elles vont ainsi pouvoir arriver sur des pixels distincts du détecteur, grâce auquel le signal lumineux va être converti en signal électrique, de manière proportionnelle. Le signal électrique va ensuite être numérisé pour être traité informatiquement.

Dans nos expérimentations, seule la diffusion Stokes, plus intense, est analysée. Les spectres Raman représentent pour chaque écart (shift) d'énergie avec le rayonnement incident (ou avec la raie Rayleigh), la quantité de photons diffusés. L'écart énergétique est exprimé en  $\text{cm}^{-1}$  (shift Raman). La quantité de photons mesurée est proportionnelle à l'intensité du signal électromagnétique détectée par le détecteur. Elle est donnée en unité arbitraire.

### Calibration

1°/ Vérification de la position zéro du réseau. Le réseau n'est pas fixe au sein du spectromètre, il s'oriente en fonction de la fenêtre spectrale d'acquisition choisie. Ce mouvement mécanique du réseau est contrôlé avant toute utilisation du spectromètre par vérification de la position zéro. Il s'agit de la position du réseau qui ne disperse pas les ondes électromagnétiques. Celles-ci vont par conséquent toutes arriver en un même point de la surface du détecteur. On obtiendra un spectre du signal diffusé constitué d'un seul pic qui doit être centré à 0 nm. Cette vérification peut être réalisée avec n'importe quel échantillon. Nous utilisons généralement un même échantillon de silicium pour les trois premières étapes de la calibration.

2°/ Vérification de la longueur d'onde du laser incident. Cette longueur d'onde servant de référence pour le calcul des shifts Raman, il est important d'en donner au logiciel une mesure précise. Pour ce faire, la fenêtre spectrale d'acquisition est centrée autour de 785 nm, où doit être positionnée la raie Rayleigh obtenue après interaction du laser incident avec le silicium. Ce pic est diffusé sans échange énergétique avec l'échantillon et a donc la même longueur d'onde que le laser incident. Notons que cette vérification se fait sur un résidu de la raie Rayleigh qui subsiste malgré le filtre Notch, en raison de sa très forte intensité de départ. Une fois le spectre de la raie Rayleigh affiché, il est possible de le modéliser par une fonction de type gaussienne / lorentzienne dont on recherche ensuite le centre avec une précision au dixième de nm. La valeur obtenue est ensuite entrée manuellement dans le logiciel pour enregistrement.

3°/ Vérification de spectres de référence. La dispersion des ondes électromagnétiques en fonction de leur longueur d'onde dépend du type de réseau ainsi que de la longueur d'onde de la source excitatrice. Elle peut donc légèrement différer d'un spectromètre à l'autre. En vue d'une comparaison de shifts Raman obtenus avec différents appareils, il est recommandé de vérifier la conformité des spectres de produits de référence dont les pics sont connus avec précision. Il est d'usage au laboratoire de vérifier le spectre Raman du silicium et d'un autre échantillon (cyclohexane par exemple), ainsi que le spectre d'émission d'une lampe Néon.

De plus, après acquisition des spectres Raman, ceux-ci doivent subir quelques corrections pour isoler l'information propre à l'échantillon.

*Correction de la réponse du détecteur.* En théorie, un détecteur doit traduire une intensité identique pour un même nombre de photons quelle que soit leur longueur d'onde. Il s'agit d'un cas idéal. En pratique, l'intensité peut varier sensiblement. Cette variation de mesure propre au détecteur sera évaluée à l'aide d'un matériel spécifique mimant un corps noir dans le proche IR (absorbant et émettant la même quantité d'onde électromagnétique quelle que soit la longueur d'onde). Il s'agit du Matériel de Référence Standard (SRM) 2241 du NIST (National Institute of Standards and Technology). Les spectres d'un échantillon seront donc divisés par le spectre de référence, obtenu avec le SRM.

*Soustraction du courant noir.* Le courant noir correspond au signal mesuré par le détecteur, résiduel en l'absence de toute stimulation électromagnétique. Il est dû au bruit de fond du détecteur lui-même, au bruit de l'électronique ainsi qu'aux éventuels rayonnements cosmiques. Il est mesuré dans l'obscurité totale, avec les mêmes temps d'acquisition que ceux utilisés pour les spectres de l'échantillon, auxquels il sera soustrait.

*Soustraction du signal du support de l'échantillon.* Pour les échantillons peu épais comme les coupes congelées, il arrive que les spectres Raman enregistrés contiennent également du signal du support, même si ce signal est peu intense comme dans le cas des fenêtres de fluorure de calcium  $\text{CaF}_2$ . Le signal du support seul sera enregistré avec les mêmes temps d'acquisition puis soustrait des spectres de l'échantillon.

## 2. Spectromètre Raman HE / Sonde RamanProbe

Pour les analyses Raman *in vivo* et *ex vivo*, nous avons utilisé le spectromètre transportable Raman HE (High Efficiency) de HORIBA Jobin Yvon, France, associé à la sonde RamanProbe de InPhotonics (**Figure 22**).

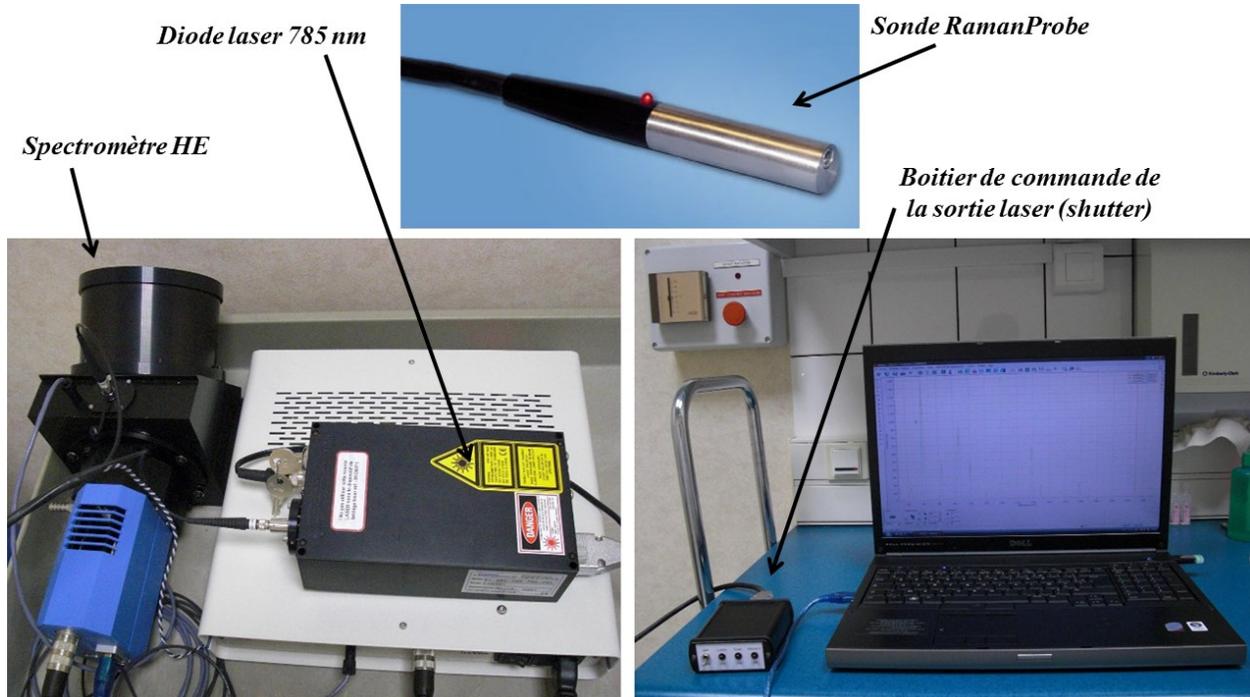


Figure 22 Spectromètre Raman fibré.

### Composition

Le spectromètre Raman HE est composé d'un réseau holographique dispersif de 685 traits/mm et d'un détecteur CCD. Optimisé pour des acquisitions en temps réel, cet appareil est capable d'acquérir en une seule mesure la fenêtre spectrale  $90\text{-}3350\text{ cm}^{-1}$ . Il est couplé via un câble optique de 5 m à la tête d'échantillonnage portable RamanProbe en acier inoxydable, dont la taille (7,6 cm de long et de 12,7 mm de diamètre) et la forme mimant un stylo permettent une manipulation aisée (**Figure 23**). La source incidente est une diode laser de longueur d'onde 785 nm. Le spectromètre HE est également couplé au logiciel LabSpec distribué par HORIBA Jobin Yvon.

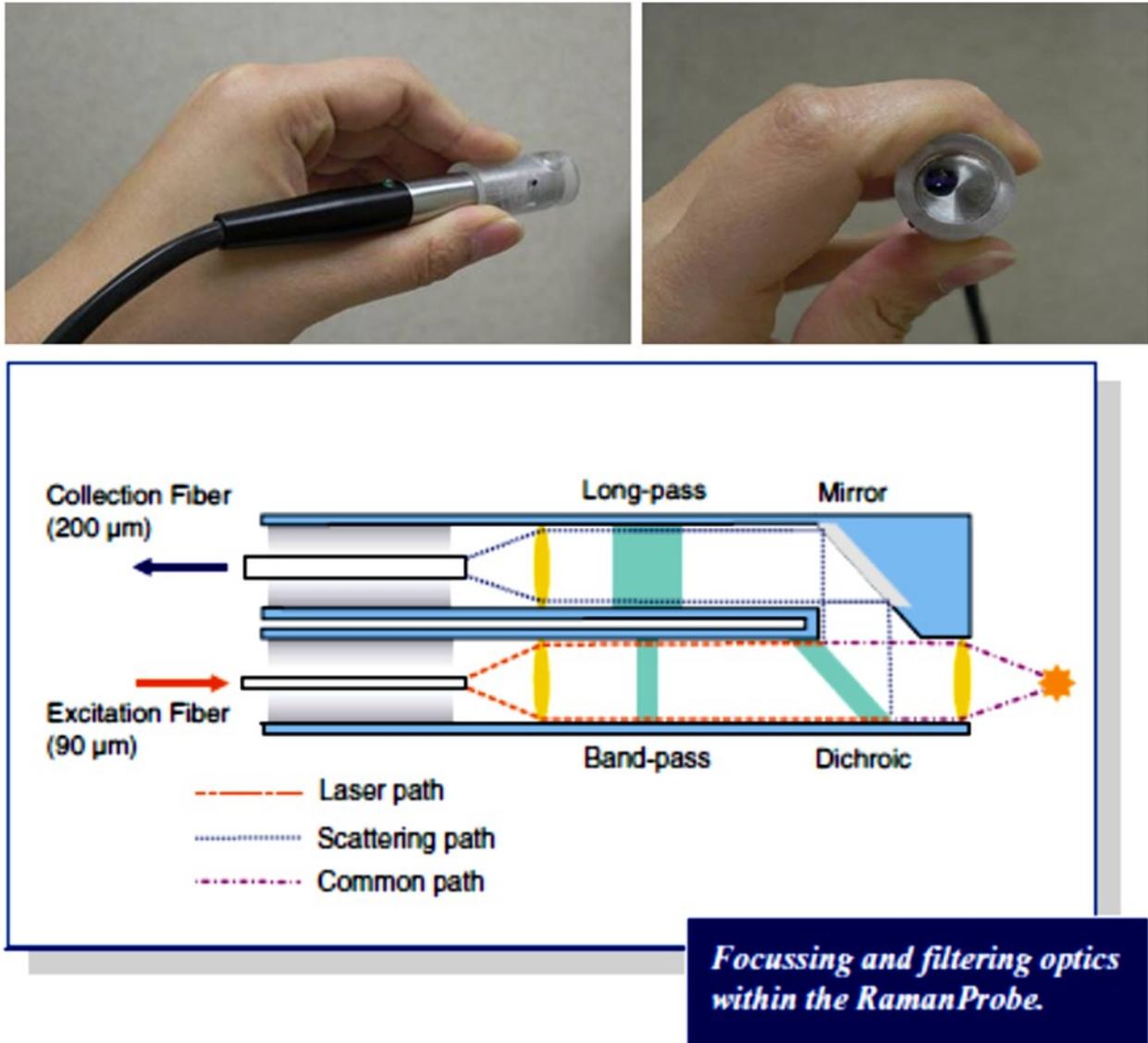


Figure 23 Photographie et schéma interne de la sonde RamanProbe.

Pour les acquisitions sur peau *in vivo*, un embout plastique transparent a été adapté sur la sonde. Il permet de fixer la distance de focalisation tout en stabilisant les acquisitions. Une distance de focalisation optimale de 5 mm a été définie, après évaluation préalable sur 20 volontaires. Seul cet embout plastique est en contact avec l'échantillon. Il est nettoyé à l'eau distillée puis à l'alcool.

### Fonctionnement

La sonde RamanProbe est constituée d'une fibre de 90  $\mu\text{m}$  de diamètre pour véhiculer le laser exciteur. Le rayonnement traverse une première lentille de collimation permettant de rendre à nouveau les ondes électromagnétiques parallèles, puis un filtre passe-bande filtrant le signal Raman

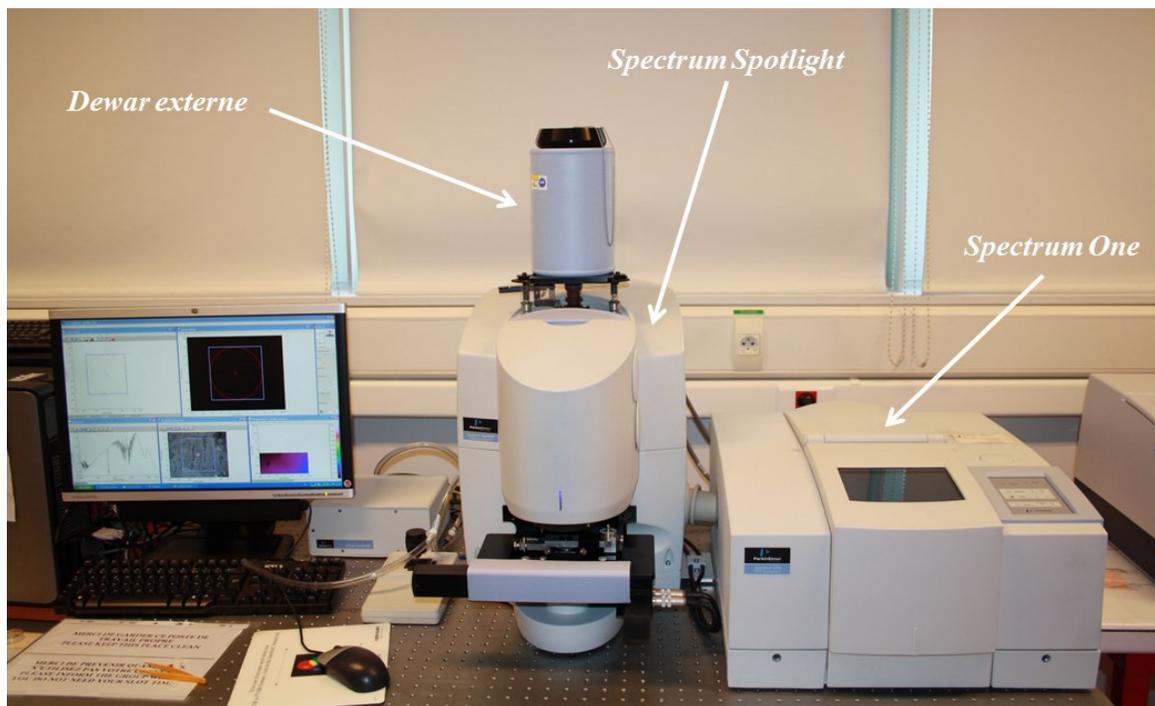
parasite de la silice, composant principal de la fibre optique. Le laser incident sort de la tête d'échantillonnage par une lentille de focalisation de diamètre 2 mm, permettant de diriger les ondes électromagnétiques en un point précis de l'échantillon. Après interaction avec la matière, les ondes électromagnétiques rétrodiffusées de 180° pourront être collectées par la tête d'échantillonnage et réfléchies par le filtre dichroïque en direction de la fibre de collection. Avant d'emprunter le câble optique, les ondes collectées traverseront un assemblage de filtres passe-haut ne permettant le passage que des ondes de diffusion Stokes provenant de l'échantillon. Une dernière lentille de focalisation dirigera ces ondes vers la fibre de collection de 200  $\mu\text{m}$  de diamètre (**Figure 23**). De retour au niveau du spectromètre HE, les ondes électromagnétiques seront envoyées vers le réseau dispersif puis le détecteur.

### *Calibration*

Les diodes laser étant moins sensibles à la température environnante et le spectromètre HE étant équipé d'un réseau fixe, le système est beaucoup moins sujet aux dérèglements. Les spectres des produits de référence sont néanmoins vérifiés avant chaque séance d'acquisition.

### 3. Microspectromètre infrarouge Spotlight

Le microspectromètre infrarouge utilisé pour les analyses infrarouges de coupes congelées est le système Spectrum Spotlight 300 commercialisé par Perkin Elmer, France (**Figure 24**).



*Figure 24 Microspectromètre infrarouge Spectrum Spotlight 300 (Perkin Elmer).*

#### Composition

Ce système est composé d'un spectromètre InfraRouge à Transformée de Fourier (FT-IR) Spectrum One associé à un système d'imagerie FT-IR Spectrum Spotlight. Ce système est associé au logiciel Spectrum IMAGE de Perkin Elmer. Un vase Dewar externe, caractérisé par une très bonne isolation thermique et permettant de stocker efficacement l'azote liquide, a été rajouté pour augmenter le temps d'acquisition des images spectrales (jusque 24 h).

Les acquisitions d'images infrarouges se font avec l'unité Spotlight. Cette unité est composée d'un microscope muni d'une source lumineuse LED, d'une platine motorisée et d'une caméra. La source de rayonnement infrarouge polychromatique est issue de l'unité Spectrum One. Le Spotlight peut être utilisé en mode image ou en mode point, pour l'acquisition d'images spectrales ou de spectres points respectivement. Le système de détection du mode point comprend un détecteur MCT (Mercury Cadmium Telluride HgCdTe) de  $100\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m}$ . Le système de détection du mode image est constitué de 16 éléments MCT de  $6,25\ \mu\text{m} \times 6,25\ \mu\text{m}$  disposés en 2 barrettes de 8 éléments. Les détecteurs MCT sont des détecteurs quantiques (comptage de photons) mettant en jeu un effet photoconducteur : les signaux électriques résultent directement de l'excitation du matériau par les photons. Les détecteurs MCT devant être refroidis à l'azote liquide, le système de détection se trouve à l'intérieur du Dewar interne (**Figure 25**).

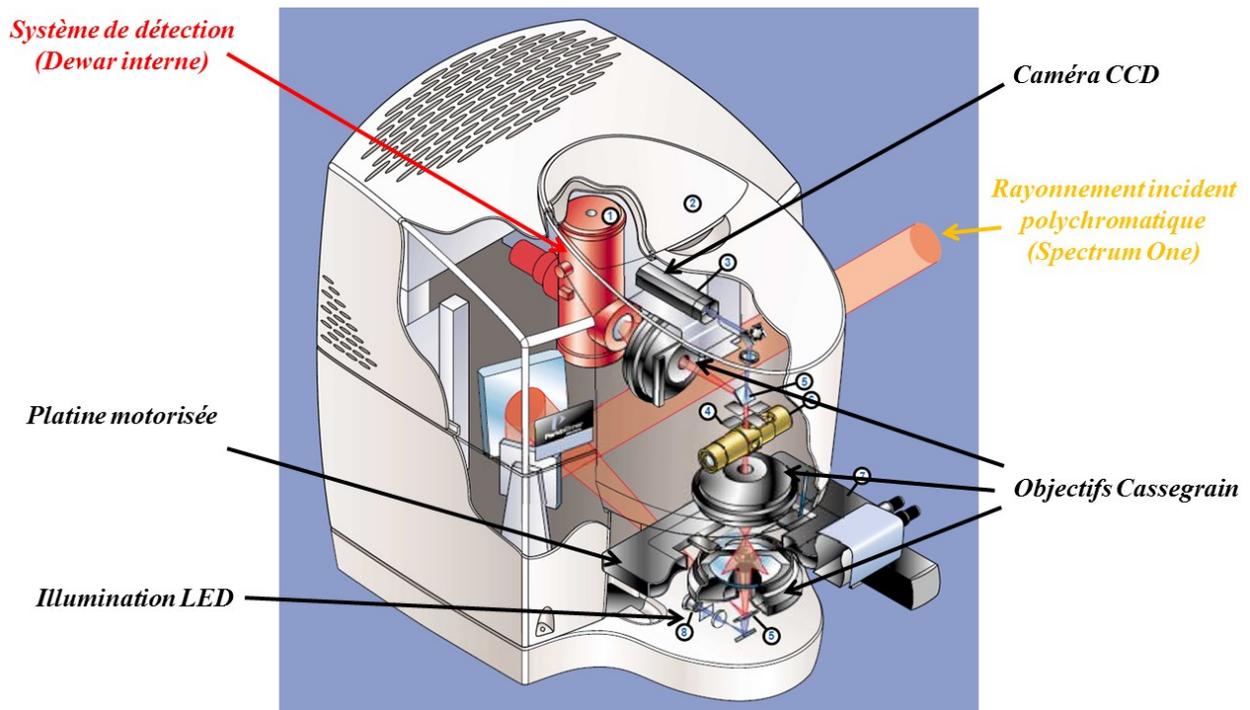


Figure 25 Composants internes du système d'imagerie Spectrum Spotlight.

Contrairement aux spectromètres Raman utilisant des systèmes optiques dispersifs (prismes, réseaux) pour analyser le spectre d'un rayonnement, les spectromètres FT-IR permettent une lecture de toutes les fréquences du rayonnement simultanément, par détection interférométrique. Ce signal est obtenu grâce à un interféromètre de Michelson (**Figure 26**). Le rayonnement incident est divisé en deux faisceaux par une séparatrice, dont le premier est réfléchi par un miroir fixe et le second par un miroir mobile. Le déplacement du miroir mobile génère un décalage temporel entre les deux faisceaux, qui entraînent des interférences constructives et destructives en se recombinaut (au niveau de la même séparatrice). Le signal recombinaut résultant est appelé interférogramme et correspond à l'enregistrement des variations d'intensité dues aux interférences, en fonction de la distance de déplacement du miroir (ou à une constante près, en fonction du temps puisque la vitesse de déplacement du miroir est constante). L'obtention de l'interférogramme d'un rayonnement est très rapide (de l'ordre de la seconde), et à un spectre de rayonnement donné correspond un unique interférogramme (et inversement). Grâce à un traitement mathématique appelé Transformée de Fourier, l'interférogramme sera ensuite aisément converti par l'ordinateur en intensité en fonction de la fréquence, c'est-à-dire en spectre IR. La résolution spectrale du Spotlight est ajustable et dépend de l'amplitude de déplacement du miroir mobile. Elle est fixée à  $4 \text{ cm}^{-1}$  pour nos expérimentations.

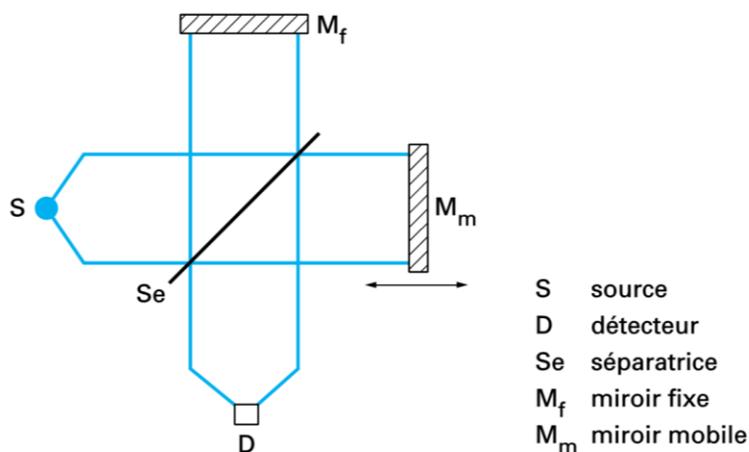


Figure 26 Schéma d'un interféromètre de Michelson. (31)

### Fonctionnement

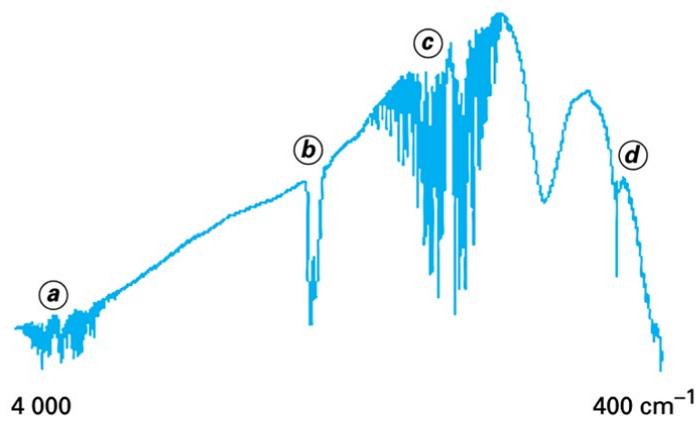
En mode transmission, le rayonnement polychromatique incident (interférogramme) arrive sous la platine motorisée à l'aide d'un jeu de miroirs et de condenseurs Cassegrain, puis traverse l'échantillon et son support (CaF<sub>2</sub>, transparent aux IR). A ce niveau, des absorptions énergétiques interviennent révélant la présence de certaines liaisons moléculaires au sein de l'échantillon. Le faisceau sortant est ensuite dirigé vers le détecteur grâce à des objectifs Cassegrain.

Pour chaque fréquence du rayonnement polychromatique, c'est la transmittance **T** qui est mesurée au niveau du détecteur, c'est-à-dire le rapport d'intensité entre le rayonnement ayant traversé l'échantillon et le rayonnement de référence (background) :  $T = I / I_0$ , généralement exprimée en pourcentage. Le rayonnement de référence est mesuré sur une zone du support vide d'échantillon.

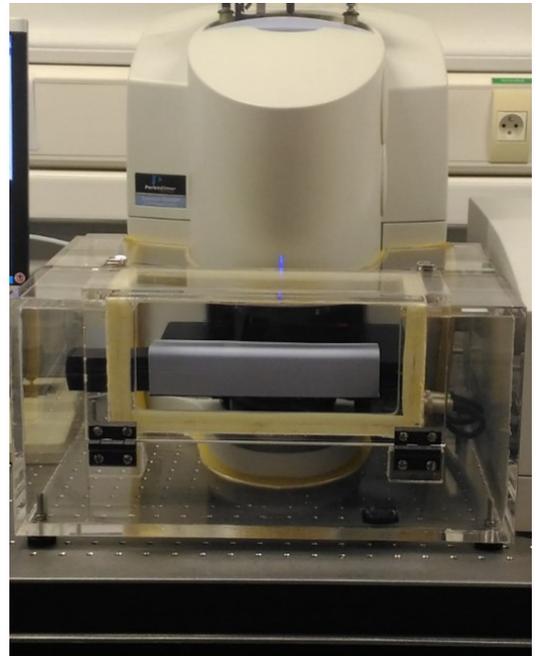
Une fois les enregistrements réalisés, les spectres infrarouges peuvent ensuite être facilement convertis en absorbance **A** en fonction de la fréquence :  $A = \log(1/T)$ . Il est ensuite possible de remonter à une information quantitative puisque l'absorbance est directement proportionnelle à la concentration moléculaire (loi de Beer-Lambert). L'utilisation des nombres d'onde en cm<sup>-1</sup> (inverse des longueurs d'onde) est généralement préférée à celle des fréquences, ce qui présente l'avantage de permettre une comparaison directe des spectres infrarouges et Raman.

### Calibration

Les spectromètres IR sont généralement très simples d'utilisation et les calibrations nécessaires se font automatiquement au démarrage. Sur le Spectrum Spotlight, seule la *correction atmosphérique* doit être assurée par l'utilisateur. Cette étape permet de minimiser les phénomènes d'absorption IR dus aux vapeurs d'eau et au CO<sub>2</sub> de l'atmosphère. Pour ce faire, le spectre IR de l'atmosphère (**Figure 27**) est soustrait des spectres enregistrés. En fonction de l'équipement du spectromètre, il peut être également possible de réaliser avant acquisition une *purge en eau et en CO<sub>2</sub> de l'atmosphère* par envoi d'air sec sans CO<sub>2</sub> autour du système d'échantillonnage (**Figure 27**).



- (a) mode de valence de l'eau**
- (b) mode de valence du dioxyde de carbone**
- (c) mode de déformation de l'eau**
- (d) mode de déformation du dioxyde de carbone**



*Figure 27 Spectre infrarouge de l'atmosphère (31) et système d'isolation atmosphérique installé sur le Spectrum Spotlight permettant la purge en vapeurs d' eau et en dioxyde de carbone autour de l'échantillon.*

## V- PRETRAITEMENTS DES SPECTRES VIBRATIONNELS

Afin de s'affranchir des interférences parasites au sein des spectres bruts, dues principalement à des variations au cours des acquisitions liées à des facteurs physiques et environnementaux, les données doivent être prétraitées. Nous présentons ci-après les différentes méthodes et étapes de prétraitement appliquées sur nos spectres.

### 1. Correction de ligne de base

La ligne de base est une ligne virtuelle délimitant la partie informative du spectre par rapport à son fond (background). L'objectif des méthodes de correction de ligne de base est de s'affranchir du fond spectral ; généralement en le modélisant puis en le soustrayant des spectres bruts. En pratique, les spectres bruts peuvent afficher des lignes de base de forme et d'intensité variables, et il est souvent difficile de modéliser uniformément le fond spectral.

La méthode la plus simple est la *correction d'offset* qui s'utilise pour corriger un shift d'intensité de la ligne de base. Il s'agit d'une remise à 0 de l'intensité minimale du spectre sans modification de son profil. La *correction de ligne de base par morceaux* consiste à choisir manuellement un certain nombre de points de base, puis à les relier par des segments. La ligne de base ainsi définie sera ensuite soustraite du spectre brut. La *correction de ligne de base polynomiale* cherche dans un premier temps à modéliser la ligne de base par un polynôme dont l'ordre est à déterminer selon la forme du fond spectral. Des points de base, par lesquels le polynôme doit obligatoirement passer, peuvent être imposés par l'utilisateur. Une fois défini, le polynôme est soustrait du spectre brut.

### 2. Lissage

L'étape de lissage permet de diminuer le bruit de fond spectral, qui correspond aux variations aléatoires de l'intensité mesurée. Le bruit en spectroscopie optique vibrationnelle a différentes origines et dépend principalement du type de détecteur utilisé. On peut rencontrer le *bruit photonique* qui est dû à la nature quantique des rayonnements électromagnétiques. Les photons ne

sont pas observés individuellement mais sous forme d'une densité de probabilité. Ainsi pour une lumière incidente constante, le nombre de photons frappant deux photosites d'un détecteur est différent. Le *bruit thermique appelé aussi courant noir ou d'obscurité* est dû au fait que certains déplacements d'électrons mesurés sont issus de l'agitation thermique existant au niveau du détecteur et non pas de la collision d'un photon. Certains détecteurs sont refroidis afin de limiter cette contribution. Le *bruit électronique ou bruit de transfert de lecture* concerne l'étape de déplacement des électrons d'un photosite à l'autre existant dans un détecteur multidimensionnel (CCD par exemple) avant la lecture finale du signal. La perte de certains électrons lors de ce déplacement en est à l'origine. Enfin, le *bruit de quantification* provient de la précision du convertisseur du signal analogique en signal numérique : par exemple deux nombres proches d'électrons comptés peuvent être convertis en une même valeur numérique (35).

Il existe également différentes méthodes de lissage. La *méthode des moyennes glissantes* est largement utilisée pour la correction de spectres optiques vibrationnels. Cette méthode consiste à moyennner les intensités incluses dans une petite fenêtre spectrale dont la largeur est à définir par l'utilisateur (quelques pixels). Cette fenêtre va être déplacée (« glissée ») de manière régulière le long du spectre jusqu'à ce que les intensités de la totalité de la fenêtre spectrale aient été moyennées. La *méthode de Savitzky-Golay* est également basée sur ce principe sauf qu'au lieu de calculer la moyenne, on cherche le polynôme s'ajustant au mieux à la courbe incluse dans la fenêtre spectrale glissante. Le degré de ce polynôme est choisi par l'utilisateur. Puis, la fonction polynomiale minimisant l'erreur est estimée par la méthode des moindres carrés. Pour chaque pas de glissement de la fenêtre, on ne conserve que le point du polynôme situé au centre de cette fenêtre. L'ampleur du lissage augmente avec la largeur de la fenêtre glissante et diminue avec le degré du polynôme.

### 3. Normalisation

Cette étape de prétraitement permet de ramener tous les spectres d'un ensemble de données à une même échelle d'intensité afin de pouvoir les comparer entre eux. La normalisation donne accès à une quantification relative (interspectrale) mais élimine l'information quantitative absolue contenue initialement dans les spectres bruts.

En pratique, ce prétraitement entraîne une intensité exprimée en unité arbitraire, pouvant être fixée par différents calculs. La *normalisation mix-max* débute par une correction de l'offset (intensité minimale = 0) puis par l'attribution de la valeur 1 à l'intensité maximale du spectre. Les intensités intermédiaires sont recalculées par rapport à ces deux valeurs extrêmes. D'autres types de normalisation couramment utilisés commencent par un centrage des spectres sur la moyenne, c'est-à-dire l'affectation de la valeur 0 à l'intensité moyenne du spectre. C'est le cas de la *normalisation 1-norm* dont les valeurs d'intensité du spectre sont ensuite redéfinies de façon à ce que la somme des valeurs absolues de toutes les intensités soit égale à 1. C'est aussi le cas pour la *normalisation 2-norm (dite vectorielle)*, pour laquelle c'est la somme des valeurs d'intensité au carré qui doit être égale à 1. Enfin avec la *normalisation SNV (Standard Normal Variate)*, les valeurs d'intensité du spectre centré sur la moyenne sont définies de façon à ce que l'écart-type du spectre soit égal à 1 (36).

#### 4. EMSC

D'après la loi de Beer-Lambert, le phénomène d'absorption n'est pas seulement directement lié à la composition moléculaire de l'échantillon mais aussi à son épaisseur. De plus, il existe des phénomènes de diffusion (diffusion Mie) affectant la ligne de base des spectres. Ces différentes contributions parasitent le spectre d'absorption IR. L'EMSC (Extended Multiplicative Signal Correction) permet de minimiser l'influence de ces facteurs. Nous avons utilisé cette méthode pour le prétraitement des images spectrales IR, dont chaque spectre  $s_i$  peut être modélisé par un vecteur (**Figure 28**).

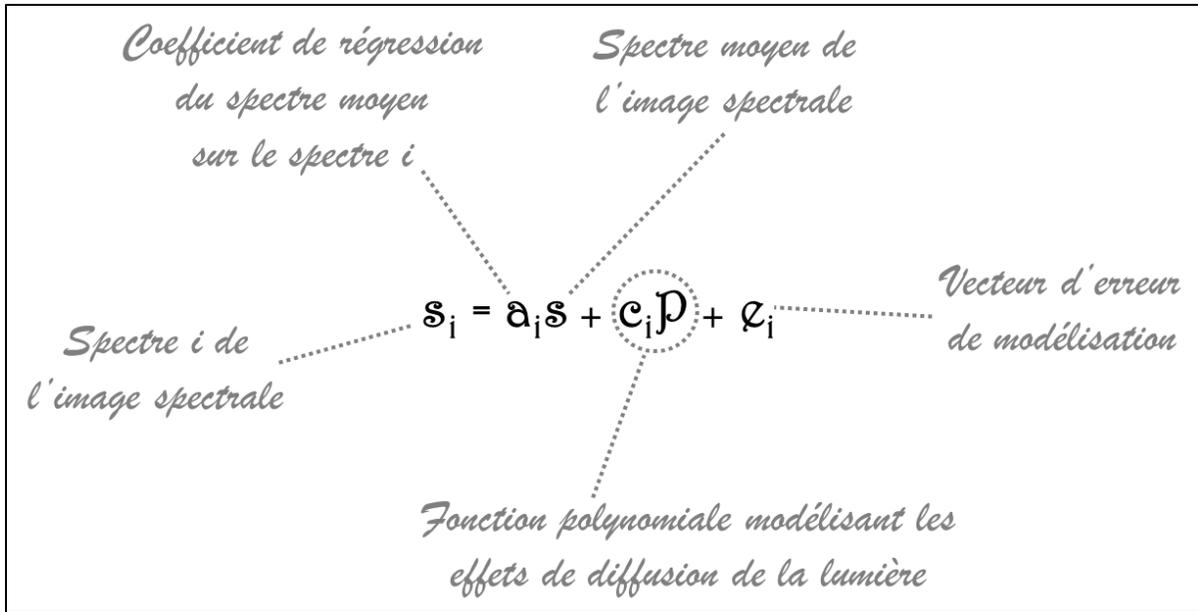


Figure 28 Modélisation linéaire d'un spectre  $s_i$  d'une image spectrale par EMSC.

Les coefficients  $a_i$  et  $c_i$  sont estimés par la méthode des moindres carrés de façon à minimiser la somme des carrés des erreurs de modélisation. Les spectres sont corrigés des effets de diffusion de la lumière en soustrayant le terme  $c_i P$  :  $s_i^{corr} = a_i s + e_i$ . On remarque à ce stade que chaque spectre corrigé correspond à une approximation de ce spectre par le spectre moyen, et que la différence entre le spectre considéré et le spectre moyen correspond à l'erreur  $e_i$  qui représente donc la partie informative (différences biomoléculaires). Ensuite, une normalisation est appliquée sur  $s_i^{corr}$  afin de corriger les spectres des effets liés à l'épaisseur de l'échantillon :  $s_i^{corr}/a_i = s + e_i/a_i$ . A la fin de l'EMSC, toutes les lignes de base sont harmonisées et tous les spectres sont normalisés sur le spectre moyen.

## VI- TRAITEMENTS DES SPECTRES VIBRATIONNELS

Une fois l'information propre à l'échantillon isolée par prétraitement des spectres, l'analyse du signal d'intérêt peut débuter. L'étape de traitement des données permet de faciliter l'interprétation des résultats obtenus, en particulier lorsque ces résultats sont riches en information et de forme complexe ce qui est le cas en spectroscopie vibrationnelle. De nombreuses méthodes d'analyses statistiques multivariées existent. Nous présentons ci-dessous celles utilisées dans le cadre de ces travaux de thèse.

### 1. Méthodes de classification de données

En vue d'une exploitation statistique, les mesures de spectroscopies vibrationnelles sont souvent regroupées dans des matrices dont les lignes représentent les éléments (les spectres) et dont les colonnes correspondent aux variables (les nombres d'onde). Les méthodes de classification de données ont pour objectif d'affecter des classes ou clusters aux éléments.

Il existe deux grands types de classification de données : les classifications supervisées et non supervisées. Les classifications non supervisées concernent les cas où l'on dispose d'un ensemble d'objets non labellisés (dont on ne connaît pas la classe d'appartenance) que l'on veut séparer en classes (ou clusters en anglais). Les classifications supervisées (prédiction) s'appliquent lorsque l'on dispose de données labellisées (qualifiées de jeu d'entraînement dont on connaît la classe d'appartenance), donc déjà séparées en classes, permettant d'estimer un modèle prédictif de la classe d'appartenance d'objets inconnus (nouveaux).

#### *Classifications non supervisées*

Il existe deux grands types de classifications non supervisées :

- Les *classifications par partitionnement* partagent un ensemble d'objets en un système de classes non vides. Ces méthodes vont chercher la partition des données en K classes qui minimise localement une fonction objectif dépendante de K. Les méthodes les plus connues sont les méthodes d'agrégation autour des centres mobiles, qui sont apparentées à la méthode des nuées

dynamiques ou k-means. Citons également la technique de fuzzy-c-means qui en est dérivée.

- Les *classifications hiérarchiques* sont des méthodes récursives divisées en deux groupes : les méthodes ascendantes et les méthodes descendantes. En partant d'une situation où chaque objet est une classe, les *méthodes ascendantes ou agglomératives* vont regrouper à chaque itération les deux classes les plus similaires. Donc à chaque itération, une classe disparaît. La dernière itération regroupera donc tous les objets dans une classe unique. Les *méthodes descendantes, ou divisives*, travaillent dans le sens opposé, c'est-à-dire qu'au départ tous les objets sont dans une classe unique. Puis à chaque itération, chaque classe est scindée en deux classes composées des éléments les plus dissimilaires entre les deux classes. A la dernière itération, chaque classe sera composée d'un objet unique. La classification hiérarchique ascendante est cependant largement préférée à la classification hiérarchique descendante car cette dernière requiert des calculs prohibitifs (37) (38).

➤ *Classification Hiérarchique Ascendante (CHA)*

Le principe de l'algorithme de CHA consiste à créer une partition, à chaque étape, en agrégeant deux à deux les éléments ou groupes d'éléments les plus proches. Au départ, chaque élément est considéré comme une classe initiale. Il y a donc autant de classes que d'objets. Puis, la matrice d'hétérogénéité mesurant la dissimilarité entre les paires de classes est calculée. Cette dissimilarité est quantifiée par la distance spectrale entre chaque couple possible de classes. Différentes mesures de distance spectrale existent : la distance euclidienne (la plus utilisée), la distance de Mahalanobis, la distance de Manhattan, etc. (39). Il y a ensuite trois étapes successives. 1°/ On recherche la plus petite valeur dans la matrice d'hétérogénéité entre les n classes. 2°/ Les deux classes les plus proches ainsi identifiées sont alors regroupées dans une nouvelle classe. 3°/ On calcule une nouvelle matrice d'hétérogénéité entre les n-1 classes restantes. Ces trois étapes sont ensuite répétées jusqu'à l'obtention d'une classe unique. L'algorithme fournit une hiérarchie de n partitions, se représentant sous la forme d'un arbre, appelé dendrogramme, construit à partir des itérations successives. Une partition en K classes peut alors être obtenue en sélectionnant la n-K+1<sup>ème</sup> décomposition sur le dendrogramme. La CHA est une méthode de classification qui a l'avantage d'être particulièrement pertinente lorsqu'il existe une information hiérarchique

inhérente aux éléments. De plus, elle ne nécessite aucune initialisation. Cependant le temps de calcul prohibitif rend cette méthode difficilement applicable aux grosses bases de données.

Notons que pour la troisième étape de l'algorithme, il est nécessaire de choisir ce que l'on appelle le critère d'agrégation des classes, c'est-à-dire les règles de mise à jour des distances entre une classe nouvellement agrégée et les autres classes. Plusieurs critères existent : le critère du saut ou lien minimum, le critère du saut ou lien maximum appelé aussi critère du diamètre, le critère de la distance moyenne et le critère de Ward qui est le plus couramment utilisé pour les données de spectroscopie vibrationnelle (37) (38) (40).

➤ *K-means (KM)*

La méthode des KM est une méthode de partitionnement direct qui nécessite classiquement de connaître le nombre de classes *a priori*. L'étape d'initialisation consistera donc à entrer le nombre de classes désiré, et à définir les centres de classes initiaux. Ces derniers sont choisis selon différentes méthodes parmi tous les éléments de l'ensemble de données que l'on souhaite classer. On peut par exemple choisir pour centres de classes les éléments les plus éloignés les uns des autres, ou tout simplement les choisir aléatoirement. Ensuite, deux étapes se succèdent. 1°/ On répartit les éléments dans les différentes classes en les affectant chacun au centre de classe le plus proche. 2°/ On calcule le centre de gravité de chacune des classes obtenues. Ces nouveaux centres de classes ne seront donc plus des éléments de l'ensemble, mais des points fictifs. Ces deux étapes sont répétées jusqu'à ce que l'algorithme converge : invariabilité de la composition des classes et centres de gravité fixes. Les classes définitives sont alors construites. C'est un algorithme simple et rapide pouvant être lancé avec un grand nombre d'éléments, mais qui a un inconvénient majeur : d'une initialisation à l'autre, la partition finale pourra être très différente. En effet, elle dépend du choix des centres de classes initiaux. Il sera alors nécessaire de relancer plusieurs fois l'algorithme pour s'assurer de la pertinence de la partition obtenue (41).

➤ *Fuzzy-c-means (FCM)*

Le FCM est une technique de classification floue, par opposition aux classifications dures que sont la HCA et le KM qui attribuent chaque spectre à un seul et unique cluster. La notion de flou

correspond à l'idée de pouvoir attribuer un spectre à plusieurs clusters. Il peut être en effet intéressant de pouvoir nuancer les affectations, par exemple pour visualiser les hétérogénéités tumorales ou les transitions progressives entre les différentes structures tissulaires. Ainsi dans une classification FCM, chaque spectre appartient à tous les clusters avec des degrés d'appartenance variant entre 0 et 1, correspondant respectivement à une absence d'appartenance ou une appartenance exclusive au cluster considéré. La somme des appartenances d'un spectre à tous les clusters est égale à 1. Le degré d'appartenance d'un élément à un cluster considéré est basé sur sa distance spectrale avec le centre de classe.

Le FCM est dérivé de la méthode des KM avec un paramètre supplémentaire à définir : le paramètre de flou  $m$  dit aussi paramètre Fuzzy qui est strictement supérieur à 1. Comme son nom l'indique, ce paramètre contrôle le degré de flou, c'est-à-dire le degré d'appartenance de chaque spectre aux clusters. Si  $m = 1$ , la classification FCM est comparable à la classification KM. Quand  $m$  augmente, les degrés d'appartenance aux clusters deviennent de plus en plus flous : les objets se partagent entre les classes. Si  $m$  est trop élevé, les spectres ont des degrés d'appartenance uniformément répartis sur toutes les classes, ce qui entraîne des clusters redondants et donc inutiles.

### *Classifications supervisées*

L'objectif d'une classification supervisée est de définir des règles permettant d'affecter un élément dans des classes prédéfinies, dans le but de construire un modèle de prédiction. On dispose donc au départ d'un ensemble d'éléments dont le classement est connu, et qui constitue l'échantillon d'apprentissage qui - comme son nom l'indique - va être utilisé pour la recherche et la calibration des règles de classement. Ces règles prennent la forme de fonctions  $Y=f(X,\Omega)$  avec  $X$  représentant l'élément à classer,  $Y$  la classe à laquelle il est associé, et  $\Omega$  les paramètres de la méthode de classification supervisée utilisée. Ces fonctions doivent permettre de séparer de façon optimale les observations de classes différentes, et sont dites discriminantes ou diagnostiques.

Dans une deuxième étape, on teste la fiabilité et la robustesse de ces règles d'affectation à l'aide d'un jeu de validation composé d'éléments dont les classes sont également connues mais qui n'ont pas été initialement utilisés pour l'étape d'apprentissage. Le découpage standard des données de départ est généralement de 2/3 d'éléments pour l'apprentissage et 1/3 d'éléments pour l'étape

de validation interne. A l'issue de cette étape, les paramètres optimaux de la méthode de classification supervisée utilisée peuvent être déterminés. En utilisant ces paramètres optimaux, l'apprentissage de la règle est alors relancé sur l'ensemble des données.

Cependant, l'apprentissage doit être réalisé sur un nombre suffisant d'objets. Pour les petits jeux de données, il n'est donc pas pertinent de les diviser en un jeu d'entraînement et un jeu de validation. Dans ce cas, des techniques de rééchantillonnage telles que les validations croisées sont préférées. On peut citer par exemple le leave-one-out cross-validation (LOOCV) et le leave-M-out cross-validation (LMOCV) qui consistent à répéter plusieurs fois l'étape d'apprentissage en écartant à chaque fois respectivement 1 ou M éléments différents, afin de s'en servir ensuite pour le test de validation interne. Dans les deux cas, on obtient au final une moyenne des résultats de validation obtenus avec les différentes boucles d'apprentissage. Là encore, une fois les règles d'affectation validées, l'étape d'apprentissage est à nouveau relancée avec la totalité des éléments.

Une fois les étapes d'apprentissage et de validation des fonctions discriminantes terminées, il est alors possible de s'en servir à des fins prédictives pour attribuer une classe à un élément nouveau, de groupe indéterminé.

### ➤ *Analyse Linéaire Discriminante (ALD)*

Largement utilisée en spectroscopie, l'ALD est une technique linéaire de classification supervisée reposant sur une hypothèse de multi-normalité des distributions des objets de chaque classe et sur une hypothèse d'homoscédasticité (les matrices de variance-covariance sont identiques pour toutes les classes). Elle estime une fonction linéaire de séparation entre classes. D'un point de vue géométrique, l'ALD consiste à relier les barycentres de chaque classe par un segment, puis à chercher la normale qui séparera de manière optimale les deux nuages de points. L'approche statistique de l'ALD repose sur la recherche d'un ensemble d'axes qui serviront à former un nouveau repère dans lequel la variance intergroupe (l'éloignement des deux barycentres) sera maximisée, et la variance intragroupe (l'éloignement moyen du barycentre) sera minimisée. Pour séparer K groupes, l'ALD estimera K-1 axes discriminants, appelés fonctions linéaires discriminantes. Un objet inconnu sera projeté dans ce nouveau repère, et sa position par rapport aux fonctions linéaires discriminantes déterminera sa classe prédite.

## 2. Méthode de réduction de données

### ➤ *Analyse en Composantes Principales (ACP)*

L'étude d'échantillon par spectroscopie optique vibrationnelle entraîne l'acquisition d'un nombre  $n$  de spectres, pouvant être conséquent (jusqu'à plusieurs centaines de milliers de spectres dans le cas de l'acquisition d'une image spectrale). Chaque spectre est décomposé en chacune de ces  $p$  variables ou descripteurs (fréquences du rayonnement électromagnétique). Les analyses de ces données supposent donc de travailler avec des matrices de  $n$  lignes x  $p$  colonnes de très grande taille et contenant une information riche et complexe.

Une représentation graphique des données selon les variables est intéressante pour étudier les ressemblances et différences entre les  $n$  éléments d'une matrice. Chaque élément de la matrice est alors représenté par un point dans un espace à  $p$  dimensions (défini par les  $p$  variables). Dans le cas de spectres optiques vibrationnels, cela suppose de travailler dans un espace à plusieurs centaines de dimensions. Outre l'impossibilité d'une telle représentation, elle n'est sans doute pas utile car il existe généralement des corrélations entre les variables, d'autant plus lorsque l'on travaille avec des spectres complexes d'échantillons biologiques. En effet, en fonction des différences chimiques entre les différents échantillons analysés (ou points d'acquisition au sein même d'un échantillon), les intensités et les positions des nombreux pics des spectres varient. Mais ces pics peuvent varier de façon dépendante les uns des autres d'autant plus que chaque composant chimique de l'échantillon donne un spectre très riche en vibrations, et que de nombreux éléments chimiques varient en tandem au sein d'un échantillon biologique (42).

L'ACP est une méthode qui consiste dans un premier temps à détecter et analyser ces corrélations entre les variables originelles, puis à calculer de nouvelles variables appelées variables synthétiques ou composantes principales (CP), exprimant le plus de variance. D'un point de vue géométrique, cela permet de projeter le nuage de points qui décrit l'ensemble des spectres sur de nouveaux axes, en recherchant une dispersion optimale du nuage de points. Une nouvelle matrice de données sera ainsi créée de  $n$  lignes et  $p'$  colonnes, avec  $n$  le nombre de spectres (inchangé) et

$p'$  le nombre de CP. Les CP sont ordonnées selon un pourcentage d'expression de variance décroissant. Les  $p'$  colonnes contiennent les scores (valeurs d'appartenance à chaque CP calculées pour chaque spectre). En choisissant  $p' = 2$  ou  $3$ , il devient alors possible de travailler dans des espaces à 2 ou 3 dimensions. L'ACP facilite ainsi la représentation et l'interprétation en transformant un jeu complexe de données en un ensemble simplifié comprenant moins de variables (par élimination de l'information redondante) mais en conservant la majeure partie de la variance. Il est possible de remonter à la contribution de chaque variable originelle (longueur d'onde) dans la variance exprimée par chaque variable synthétique (CP) grâce à l'analyse de leur loading.

# RESULTATS DISCUSSION

Ces travaux de recherche ont été réalisés avec la collaboration du service de Dermatologie de l'Hôpital Robert Debré de Reims, du laboratoire de Pathologie Pol Bouin de l'Hôpital Maison Blanche de Reims, ainsi que du laboratoire pharmaceutique Galderma. Entre janvier 2009 et mai 2010, 32 patients devant subir l'exérèse chirurgicale d'une lésion cutanée - suspectée d'être un carcinome baso-cellulaire - ont participé à cette étude, après consentement éclairé. Le spectromètre Raman fibré HE a été transporté au sein du bloc opératoire, et pour chaque patient, des spectres *in vivo* avant chirurgie ont été enregistrés, puis après chirurgie, directement sur la pièce d'exérèse fraîche. Lorsque nous disposions de suffisamment de temps, la pièce d'exérèse a ensuite été amenée au sein de notre laboratoire pour une analyse complémentaire rapide avec le microspectromètre Raman LabRAM, plus sensible. Pour finir, les pièces d'exérèse ont été apportées au laboratoire d'anatomopathologie pour réalisation de coupes tissulaires paraffinées et coloration à l'hématoxyline et l'éosine en vue du diagnostic histopathologique. En parallèle, des coupes congelées ont été réalisées en vue de la réalisation ultérieure d'images spectrales tissulaires en microspectroscopies Raman et infrarouge (**Figure 29**).

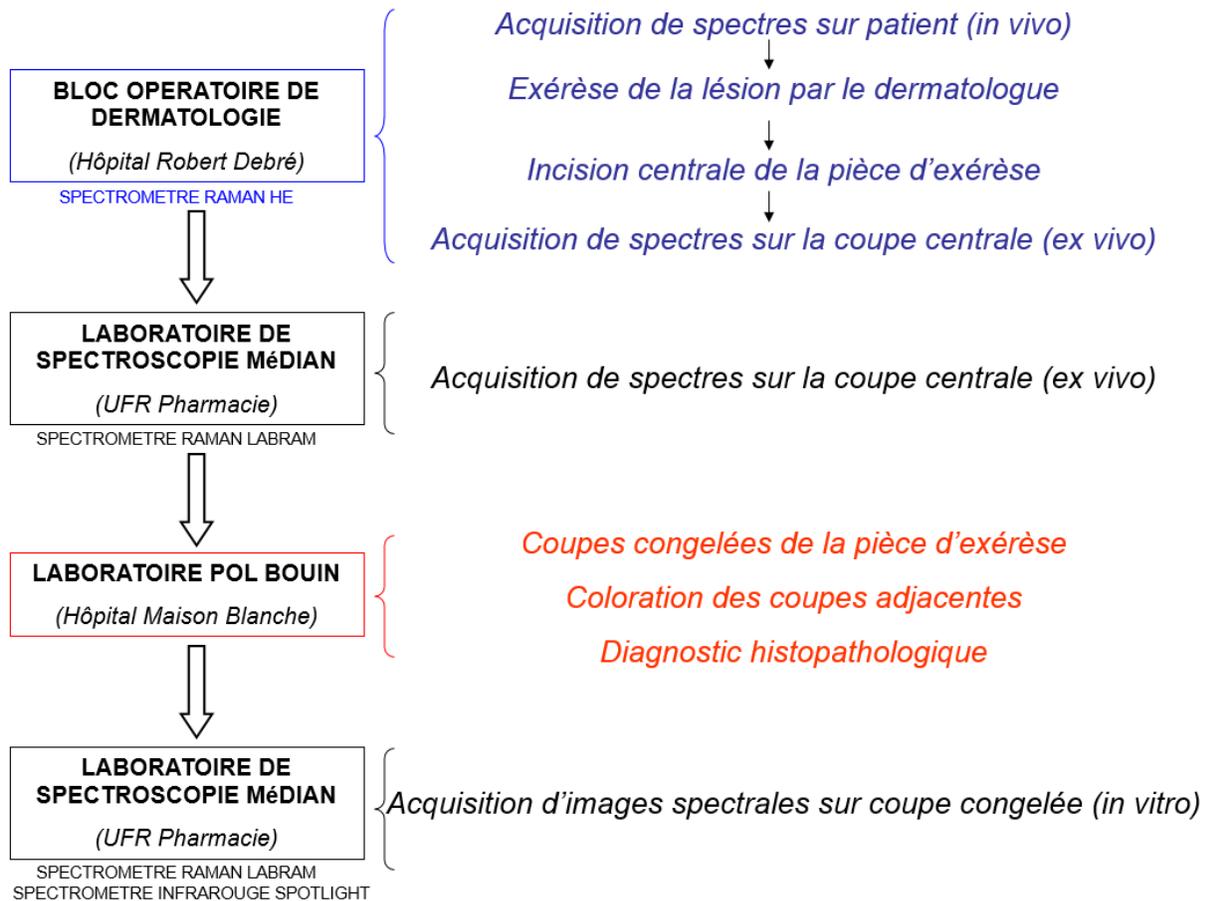


Figure 29 Protocole expérimental global.

Une « fiche-patient » remplie par le chirurgien dermatologue, fournit les renseignements médicaux relatifs à chaque patient notamment l'âge, le type de peau, les antécédents médicaux ainsi que les traitements actuels et passés. Le **Tableau 4** regroupe les données renseignant sur la lésion et l'état cutané du patient. L'ensemble des lésions analysées est résumé dans le **Tableau 5**. La répartition des âges des patients peut être visualisée sur la **Figure 30**. On en déduit que la moyenne d'âge des patients ayant participé à l'étude est de 73,25 ans, avec un écart-type de 12,62 ans.

	PATIENT			LESION	
	Age	Type de peau	Phototype	Localisation	Diagnostic histopathologique
Patient 1	85	Sèche	II	Front	CBC nodulaire
Patient 2	65	Sèche	II	Front	CBC nodulaire
Patient 3	70	Sèche	II	Tronc	CBC superficiel
Patient 4	88	Grasse	II	Front	CBC nodulaire
Patient 5 - Lésion 1	51	Sèche	III	Tempe	CBC superficiel
Patient 5 - Lésion 2				Cou	CBC superficiel
Patient 6 - Lésion 1	83	Sèche	III	Tempe	CBC nodulaire (ulcéré)
Patient 6 - Lésion 2				Joue	CBC nodulaire (ulcéré)
Patient 7	63	Sèche	II	Joue	CBC nodulaire
Patient 8	77	Sèche	II	Tempe	CBC nodulaire (ulcéré)
Patient 9	92	Grasse	III	Joue	CBC superficiel
Patient 10	69	Grasse	II	Nez	Granulome inflammatoire aspécifique
Patient 11	90	Grasse	II	?	Non diagnostiquée (pas d'exérèse)
Patient 12	77	Grasse	III	Paupière	CBC nodulaire (ulcéré)
Patient 13	47	Grasse	II	Tempe	CBC nodulaire
Patient 14	62	Sèche	III	Membres	CBC superficiel (tatoué)
Patient 15 - Lésion 1	70	Grasse	III	Front	Kératose actinique
Patient 15 - Lésion 2				Tempe	Bowen
Patient 15 - Lésion 3				Tempe	CBC nodulaire (tatoué)
Patient 16	74	Grasse	III	Front	CBC nodulaire (tatoué)
Patient 17	84	Sèche	II	Front	CBC nodulaire et superficiel
Patient 18	77	Sèche	II	Membres	CBC nodulaire et superficiel
Patient 19	43	Grasse	II	Joue	CBC nodulaire (pigmenté)
Patient 20	81	Sèche	III	Cou	Angiome
Patient 21	84	Sèche	II	Cou	CBC nodulaire
Patient 22	72	Sèche	II	Tempe	CBC nodulaire (tatoué)
Patient 23	79	Sèche	III	Tempe	Trichofolliculome
Patient 24	82	Sèche	III	Joue	CBC nodulaire
Patient 25	52	Grasse	II	Front	CBC nodulaire
Patient 26	77	Sèche	II	Tempe	CBC nodulaire
Patient 27	69	Sèche	II	Tempe	CBC nodulaire
Patient 28	66	Sèche	III	Front	CBC nodulaire
Patient 29	77	Sèche	II	Nez	CBC nodulaire
Patient 30	67	Grasse	II	Nez	CBC nodulaire
Patient 31	79	Grasse	II	Tempe	CBC nodulaire
Patient 32	92	Grasse	II	Nez	CBC nodulaire

Tableau 4 Informations relatives aux patients et lésions de l'étude, extraites des « fiches-patients ».

32 PATIENTS		
<b>Sexe</b> 18 hommes 14 femmes	<b>Type de peau</b> 13 peaux grasses 19 peaux sèches	<b>Phototype</b> 21 phototypes II 11 phototypes III
36 LÉSIONS		
<b>Localisation</b>		<b>Diagnostic histopathologique</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ tempes (x11 lésions)</li> <li>➤ front (x8 lésions)</li> <li>➤ joues (x5 lésions)</li> <li>➤ nez (x4 lésions)</li> <li>➤ cou (x3 lésions)</li> <li>➤ membres (x2 lésions)</li> <li>➤ paupière (x1 lésion)</li> <li>➤ tronc (x1 lésion)</li> <li>➤ inconnue (x 1 lésion)</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ 23 CBC nodulaires</li> <li>➤ 5 CBC superficiels</li> <li>➤ 2 CBC nodulaires et superficiels</li> <li>➤ 5 lésions non CBC                             <ul style="list-style-type: none"> <li>Bowen</li> <li>Kératose actinique</li> <li>Trichofolliculome</li> <li>Hémangiome</li> <li>Granulome inflammatoire aspécifique</li> </ul> </li> <li>➤ 1 lésion non diagnostiquée                             <ul style="list-style-type: none"> <li>Pas d'exérèse car patiente sous Préviscan (risque d'hémorragie)</li> </ul> </li> </ul>

Tableau 5 Bilan des patients et des lésions de l'étude.

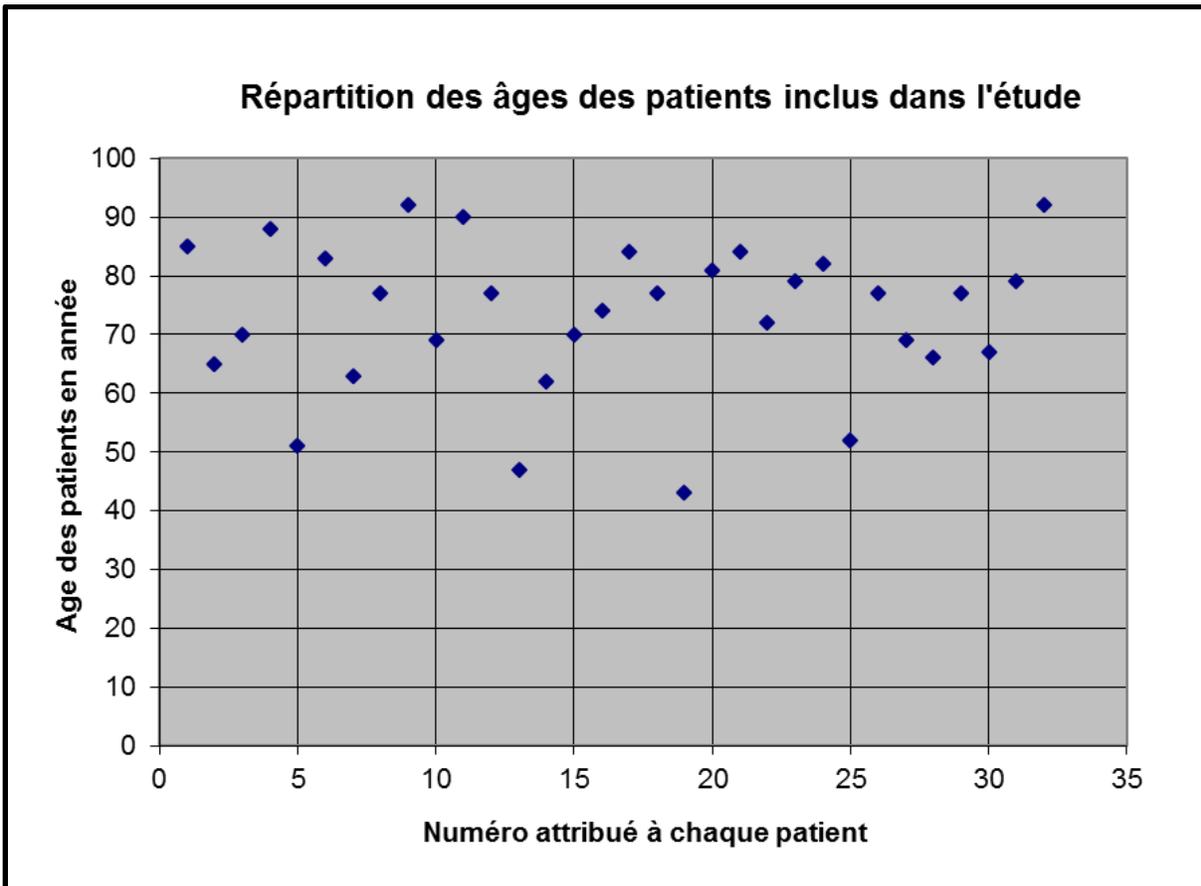


Figure 30 Graphe affichant la répartition des âges des patients ayant participé à l'étude.

*Résultats obtenus avec les spectres in vivo*

---

**DISCRIMINATION DES  
CARCINOMES BASO-CELLULAIRES  
ET DE LA PEAU SAINES**

*et*

**EVALUATION DE LA  
MARGE LATÉRALE D'EXERCISE DES  
CARCINOMES BASO-CELLULAIRES**

*par spectroscopie Raman fibrée*

---

## I- INTRODUCTION

### 1. Niveaux d'amélioration possibles de la prise en charge des CBC

#### *Incertitude du diagnostic*

Le diagnostic des cancers cutanés peut être difficile à établir. En effet, des lésions malignes peuvent être confondues avec des lésions non-cancéreuses, et inversement. De même, parmi les lésions malignes, certaines ont un potentiel plus agressif que d'autres, et il est parfois problématique de les distinguer. Par exemple, le mélanome nodulaire peut mimer d'autres types de lésions nodulaires, mélanocytaires et non mélanocytaires - CBC nodulaire inclus (43). La performance diagnostique d'un praticien dépend largement de son expérience, et il n'est pas rare que les médecins généralistes qui arrivent souvent en première ligne du parcours de soin, préfèrent orienter vers les dermatologues des patients présentant des lésions bénignes, plutôt que de prendre le risque de passer à côté d'une lésion potentiellement dangereuse. Quant aux médecins dermatologues, ils leur arrivent aussi parfois de faire des erreurs de diagnostic malgré leur compétence. Actuellement, le seul diagnostic définitif est obtenu après biopsie et analyse anatomopathologique. Le retrait préventif de toutes les lésions suspectes chez un patient peut sembler une solution simple, mais entraîne des inconvénients tels que des douleurs per et post opératoires et des cicatrices pour le patient parfois inutiles et associés à un coût non négligeable. Et cette solution est d'autant plus irréaliste que certains patients, en particulier les personnes âgées, peuvent présenter de nombreuses lésions suspectes. Le praticien a alors la responsabilité du choix et du nombre de lésions à biopsier et dans ces conditions, il est possible de passer à côté d'une tumeur d'évolution agressive. Ce contexte encourage le développement de méthodes non invasives de diagnostic *in vivo* fiable, pouvant être utilisées à la fois par les généralistes et les spécialistes (44).

### *Détection non invasive en temps réel*

Disposer d'une méthode diagnostique non invasive permettrait de supprimer la réalisation de biopsies préalables aux analyses anatomopathologiques. De plus, cela permettrait d'éviter d'éventuelles complications infectieuses et diminuerait également le coût global de prise en charge des CBC. L'analyse en temps réel constituerait également une aide chirurgicale à la détermination des marges d'exérèse latérales et profondes. En effet il faut que celles-ci soient suffisamment grandes pour retirer la totalité de la tumeur, du stroma et du derme remanié afin d'éviter tout risque de récurrence du CBC. Ces tumeurs se localisant souvent au niveau du visage, la détermination de marges minimales représente un enjeu important. Dans le cas d'une excision chirurgicale standard, les marges recommandées sont principalement définies par des facteurs de nature pronostique (taille, topographie, récurrence, etc.) et peuvent aller de 3 à 15 mm selon qu'il s'agisse de CBC de pronostic global favorable ou défavorable (14). Dans le cas de la chirurgie de Mohs, qui est le traitement permettant le plus faible taux de récurrence, la technique pourrait encore être améliorée (en termes d'efficacité, de temps, de risque et de coût) en remplaçant les contrôles anatomopathologiques successifs par un test diagnostique en temps réel.

### *Détection précoce*

Diagnostiquer précocement une tumeur permet d'en diminuer la mortalité et la morbidité. Dans le cas du CBC, l'évolution tumorale est lente, et la durée d'évolution ne constitue pas un facteur pronostique pour ces lésions (14). Cependant chez 10 % des patients présentant un CBC, le traitement n'est pas simple. En effet, il arrive que la tumeur montre un fort comportement destructif local (latéral et en profondeur), un haut taux de récurrence, et même des métastases (45). En outre, le diagnostic de toute lésion cutanée n'est actuellement envisageable que si celle-ci est visible ou palpable, et le développement de méthodes capables de les détecter précocement avant l'apparition des signes morphologiques visibles constitue aussi une perspective intéressante (46).

## 2. Intérêt de la spectroscopie Raman fibrée

La spectroscopie Raman est une méthode de caractérisation moléculaire et structurale qui a fortement gagné en sensibilité ces dernières décennies grâce aux avancées technologiques en ingénierie optique (développement du laser et augmentation du rendement des détecteurs en particulier). La dernière génération de spectromètre Raman permet également un couplage à des fibres optiques adaptées, et donc d'envisager des analyses en conditions expérimentales cliniques. Méthode d'analyse moléculaire non invasive, fiable et reproductible, la spectroscopie Raman fibrée est un outil potentiellement intéressant pour une amélioration du diagnostic actuel des CBC. Pour notre étude, nous avons décidé de nous limiter à la discrimination des CBC de leur environnement cutané puis à l'évaluation des marges d'exérèse latérale et profonde, avant d'envisager ultérieurement un diagnostic différentiel des CBC par rapport à d'autres types de lésions cutanées. La **Figure 31** localise sur un spectre Raman cutané les marqueurs discriminant les CBC de la peau non lésionnelle (NL) identifiés *in vivo* chez l'Homme par spectroscopie Raman dans la littérature. Le **Tableau 6** précise les travaux des équipes de recherche les ayant identifiés.

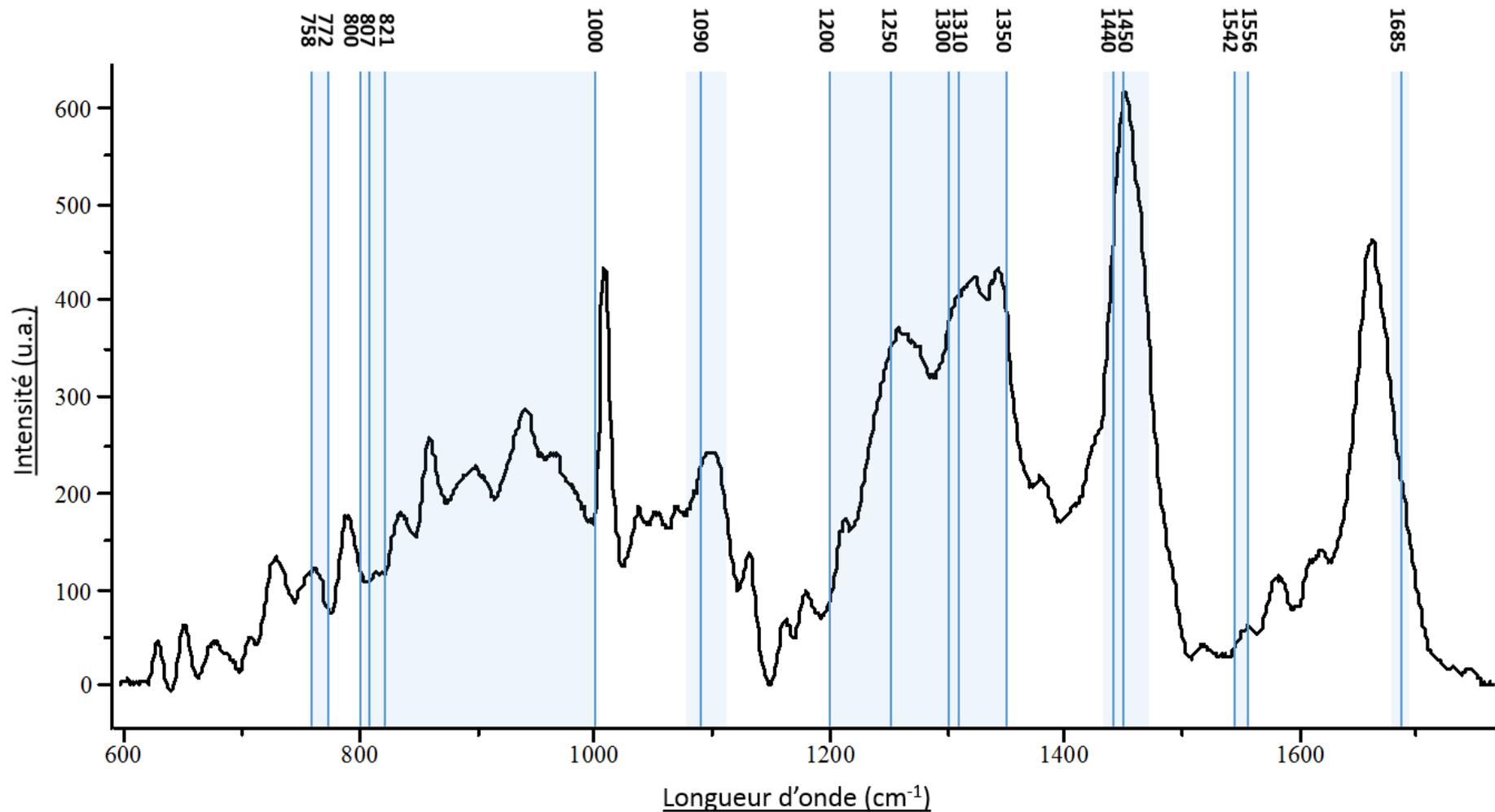


Figure 31 Bilan bibliographique des vibrations discriminant *in vivo* les CBC de la peau normale dans la région « fingerprint ». Le spectre Raman affiché a été obtenu à partir d'une coupe congelée de peau humaine, avec un microspectromètre Raman LabRAM, après excitation par une source laser incidente de longueur d'onde 785 nm. Le spectre a été corrigé de la ligne de base. Abréviation utilisée : u.a. pour unité arbitraire.

<b>Tfayli – SPIE Newsroom – 2006</b>		
<b><i>In vivo Raman analysis of human skin lesions</i></b>		
<b>MATERIELS ET METHODES</b>		
<b><i>Système optique</i></b>	<b><i>Echantillons</i></b>	<b><i>Paramètres expérimentaux</i></b>
Spectromètre Raman (830 nm) avec sonde	CBC <i>in vivo</i> versus peau adjacente NL	Puissance laser : 110 mW Temps d'acquisition : 30s
<b>SIGNAUX RAMAN DISCRIMINANT MISES EN EVIDENCE</b>		
<b><i>Longueurs d'onde</i></b>	<b><i>Tentative d'attribution</i></b>	<b><i>Observation</i></b>
1200-1250 cm <sup>-1</sup>	Amide III et phospholipdes	Non spécifié
~ 1450 cm <sup>-1</sup>	C-H deformation mode	Léger épaulement (CBC)
1685 cm <sup>-1</sup>	Amide I (protéines)	Petit décalage de fréquence
<b>Lieber – Laser Surg Med – 2008</b>		
<b><i>In vivo melanoma skin cancer diagnosis using Raman microspectroscopy</i></b>		
<b>MATERIELS ET METHODES</b>		
<b><i>Système optique</i></b>	<b><i>Echantillons</i></b>	<b><i>Paramètres expérimentaux</i></b>
Microspectromètre Raman (825 nm) Sonde associée avec objectif (20x, 0,35 NA)	CBC <i>in vivo</i> versus peau adjacente NL	Puissance laser : 110 mW Temps d'acquisition : 30 s Profondeur d'acquisition : 40 µm
<b>SIGNAUX RAMAN DISCRIMINANT MISES EN EVIDENCE</b>		
<b><i>Longueurs d'onde</i></b>	<b><i>Tentative d'attribution</i></b>	<b><i>Observation</i></b>
758-772 cm <sup>-1</sup>	Tryptophane	Moins intense (CBC)
807-821 cm <sup>-1</sup>	Non assigné	Plus intense (CBC)
1542-1556 cm <sup>-1</sup>	Tryptophane	Moins intense (CBC)
<b>Patil – Laser Surg Med – 2011</b>		
<b><i>A clinical instrument for combined Raman spectroscopy – Optical Coherence tomography of skin cancers</i></b>		
<b>MATERIELS ET METHODES</b>		
<b><i>Système optique</i></b>	<b><i>Echantillons</i></b>	<b><i>Paramètres expérimentaux</i></b>
Système combinant spectroscopie Raman (785 nm) et OCT (1310 nm) avec sonde	CBC <i>in vivo</i> versus peau adjacente NL	Puissance laser : 40 mW Temps d'acquisition : 30 s
<b>SIGNAUX RAMAN DISCRIMINANT MISES EN EVIDENCE</b>		
<b><i>Longueurs d'onde</i></b>	<b><i>Tentative d'attribution</i></b>	<b><i>Observation</i></b>
Pic centré vers 1090 cm <sup>-1</sup>	Etirement symétrique de PO2 des squelettes d'acides nucléiques	Moins intense (CBC)
Pic centré vers 1300 cm <sup>-1</sup>	Amide III, protéines	Plus intense (CBC)
Pic centré vers 1440 cm <sup>-1</sup>	Protéines	Plus intense (CBC)
<b>Silveira – Proc. of SPIE – 2012</b>		
<b><i>Diagnosing basal cell carcinoma in vivo by near-infrared Raman spectroscopy: a principal components analysis discrimination algorithm</i></b>		
<b>MATERIELS ET METHODES</b>		
<b><i>Système optique</i></b>	<b><i>Echantillons</i></b>	<b><i>Paramètres expérimentaux</i></b>
Spectromètre Raman (830 nm) avec sonde	CBC <i>in vivo</i> versus peau adjacente NL	Puissance laser : 200 mW Temps d'acquisition : 10 x 2 s
<b>SIGNAUX RAMAN DISCRIMINANT MISES EN EVIDENCE</b>		
<b><i>Longueurs d'onde</i></b>	<b><i>Tentative d'attribution</i></b>	<b><i>Observation</i></b>
800-1000 cm <sup>-1</sup>	C-C du squelette des protéines Proline/ hydroxyproline/tyrosine	Plus intense (CBC)
1250-1350 cm <sup>-1</sup>	C-N and N-H amide III	Plus intense (CBC)
<b>Philipsen – Photochem Photobiol Sci – 2013</b>		
<b><i>Diagnosis of malignant melanoma and basal cell carcinoma by in vivo NIR-FT Raman spectroscopy is independent of skin pigmentation</i></b>		
<b>MATERIELS ET METHODES</b>		
<b><i>Système optique</i></b>	<b><i>Echantillons</i></b>	<b><i>Paramètres expérimentaux</i></b>
Spectromètre Raman à TF (1064 nm) avec sonde	CBC <i>in vivo</i> versus peau NL de patients sains	Puissance laser : 120 mW Temps d'acquisition : 8 min
<b>SIGNAUX RAMAN DISCRIMINANT MISES EN EVIDENCE</b>		
<b><i>Longueurs d'onde</i></b>	<b><i>Tentative d'attribution</i></b>	<b><i>Observation</i></b>
Pic centré à 1250 cm <sup>-1</sup>	Amide III	Moins intense (CBC)
Ratio 1250 cm <sup>-1</sup> / 1350 cm <sup>-1</sup>	Amide III / Lipides	Moins intense (CBC)
Pic centré à 3250 cm <sup>-1</sup>	Eau	Plus intense (CBC)

Tableau 6 Publications ayant identifié des pics Raman discriminant *in vivo* les CBC de la peau NL.

## II- MATERIELS ET METHODES

### 1. Mise au point et évolution du protocole expérimental

#### Premier protocole

Le tout premier protocole expérimental avait pour objectifs principaux d'étudier la faisabilité de l'utilisation de la spectroscopie Raman fibrée pour la discrimination des CBC nodulaires de la peau saine, ainsi que l'adaptabilité de la technique aux contraintes cliniques. Dans ce but, nous disposons d'un temps maximum de 5 minutes par patient pour l'analyse Raman *in vivo*, incluant l'installation du patient dans la pièce attenante à la salle d'opération, qui nous a été dédiée pour les acquisitions spectrales, le tracé de la limite d'exérèse par le chirurgien, la photographie de la lésion avant et après acquisition, l'explication de notre étude au patient. En raison du temps d'acquisition spectrale effectif réduit, nous avons fixé le nombre de spectres collectés à 6 avec un temps d'acquisition de 5 secondes et 4 itérations quel que soit leur rapport signal sur bruit (**Figure 32**). Au niveau de la lésion, trois spectres Raman seront enregistrés : un au centre de la tumeur (point d'acquisition C) et deux autres de part et d'autre du premier (points C'). A l'intérieur de la marge d'exérèse, deux spectres Raman seront collectés à des distances différentes de la lésion (points N') selon le grand axe et le petit axe de l'ellipse délimitant l'exérèse. Un dernier spectre Raman sera également collecté hors zone excisée, à 1 ou 3 cm de la marge d'exérèse tracée par le chirurgien (point N). Ce premier protocole a été appliqué pour les 21 premiers patients (25 lésions).

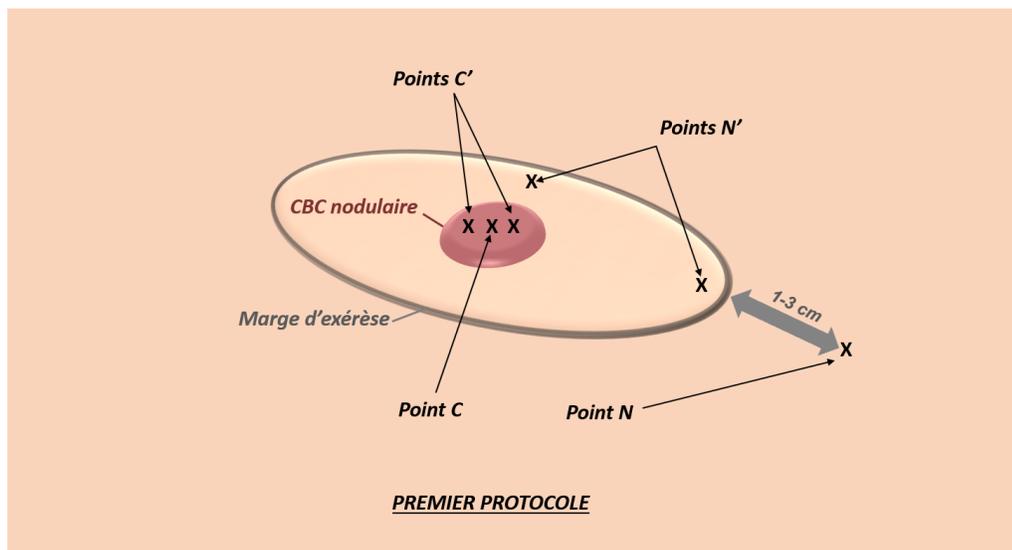


Figure 32 Points d'acquisition des spectres Raman issus du premier protocole.

Deuxième protocole

Les résultats encourageants obtenus avec le premier protocole nous ont amenés à envisager le développement d'un algorithme permettant une discrimination automatique des lésions de CBC nodulaires par rapport à des zones cutanées saines. Pour ce faire, et afin d'identifier des marqueurs spectraux discriminants nécessaires à la construction d'un modèle robuste, il a été décidé en accord avec les chirurgiens, d'augmenter le temps qui nous était imparti au bloc opératoire pour les analyses spectrales. Ainsi, les temps d'acquisition des spectres Raman ont été augmentés pour les 11 derniers patients (22 à 32) - correspondant à 11 lésions, en les adaptant en fonction de la fluorescence des régions cutanées analysées propre à chaque patient. Ainsi nous avons pu obtenir des spectres avec des temps d'intégration de 30 secondes pour les zones peu fluorescentes. Pour ce second protocole, le nombre d'itérations a été fixé à 3, et seuls des spectres au niveau des points d'acquisition C et N, nécessaires à la construction du modèle, ont été enregistrés (**Figure 33**). L'objectif fixé était d'obtenir au minimum 3 spectres C et 3 spectres N pour chaque patient.

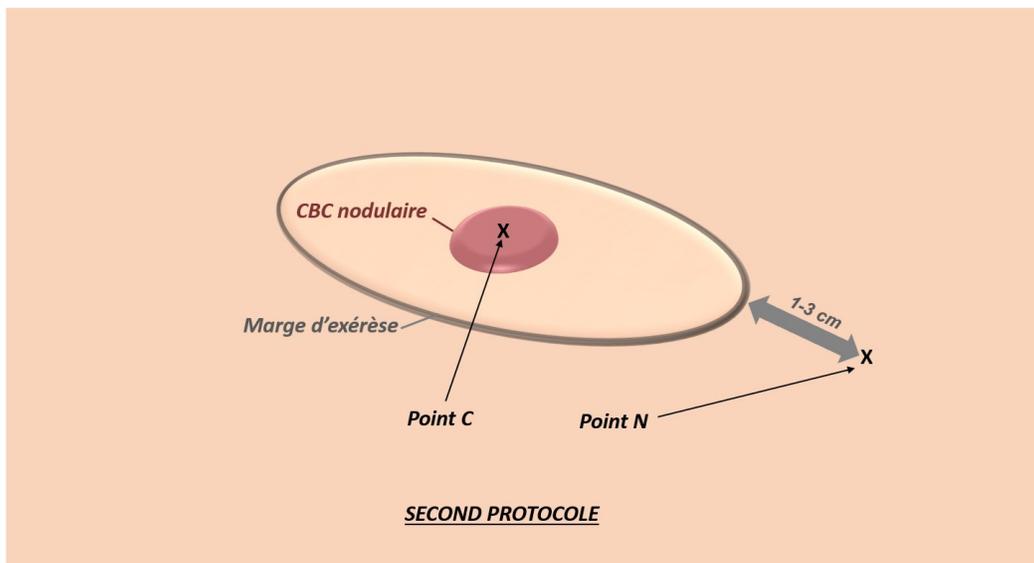


Figure 33 Points d'acquisition des spectres Raman issus du deuxième protocole.

2. Patients, lésions et spectres bruts sélectionnés

Sélection des données

➤ 1/ Sélection des patients

Sur les 32 patients ayant participé à l'étude, 9 ont dû être exclus d'emblée pour diverses raisons (voir **Tableau 7**), et donc seules les données *in vivo* de 23 patients - soit 23 CBC, 1 trichofolliculome et 1 angiome - étaient effectivement exploitables.

PROTOCOLE N°1	<i>Patient 1</i>	CBC nodulaire
	<i>Patient 2</i>	CBC nodulaire
	<i>Patient 3</i>	<i>Pilosité thoracique importante</i>
	<i>Patient 4</i>	CBC nodulaire
	<i>Patient 5 - Lésion 1</i>	CBC superficiel
	<i>Patient 5 - Lésion 2</i>	CBC superficiel
	<i>Patient 6 - Lésion 1</i>	CBC nodulaire
	<i>Patient 6 - Lésion 2</i>	CBC nodulaire
	<i>Patient 7</i>	CBC nodulaire
	<i>Patient 8</i>	CBC nodulaire
	<i>Patient 9</i>	CBC superficiel
	<i>Patient 10</i>	<i>Bétadine appliquée sur la lésion</i>
	<i>Patient 11</i>	<i>Absence de contrôle histopathologique car pas d'exérèse chirurgicale</i>
	<i>Patient 12</i>	CBC nodulaire
	<i>Patient 13</i>	CBC nodulaire
	<i>Patient 14</i>	CBC superficiel
	<i>Patient 15 - Lésion 1</i>	<i>Problème d'archivage informatique des données</i>
	<i>Patient 15 - Lésion 2</i>	<i>Problème d'archivage informatique des données</i>
	<i>Patient 15 - Lésion 3</i>	<i>Problème d'archivage informatique des données</i>
	<i>Patient 16</i>	<i>Problème d'archivage informatique des données</i>
	<i>Patient 17</i>	<i>Problème d'archivage informatique des données</i>
<i>Patient 18</i>	<i>Réaction cutanée au soleil suite à l'application d'une pommade</i>	
<i>Patient 19</i>	CBC nodulaire	
<i>Patient 20</i>	Angiome	
<i>Patient 21</i>	CBC nodulaire	
PROTOCOLE N°2	<i>Patient 22</i>	CBC nodulaire
	<i>Patient 23</i>	Trichofolliculome
	<i>Patient 24</i>	CBC nodulaire
	<i>Patient 25</i>	CBC nodulaire
	<i>Patient 26</i>	CBC nodulaire
	<i>Patient 27</i>	CBC nodulaire
	<i>Patient 28</i>	<i>Début du cuir chevelu</i>
	<i>Patient 29</i>	CBC nodulaire
	<i>Patient 30</i>	CBC nodulaire
	<i>Patient 31</i>	CBC nodulaire
	<i>Patient 32</i>	<i>Ulcération trop importante</i>

Tableau 7 Diagnostic histopathologique des patients éligibles à l'étude *in vivo* et motifs d'exclusion des patients non éligibles (zones grisées).

➤ 2/ Sélection des lésions et spectres associés

Nous avons décidé de nous focaliser sur un seul sous-type de CBC : le CBC nodulaire, lésion la plus représentée de notre étude. On en compte en effet 19 parmi les patients sélectionnés ci-dessus : 11 appartenant au premier protocole d'acquisition spectrale (1 spectre C, 2 spectres C') et 8 au second protocole (3 spectres C).

Par contre pour les zones non lésionnelles, nous avons considéré l'ensemble des spectres acquis autour des 25 lésions sélectionnées du **Tableau 7**, quel que soit leur diagnostic histopathologique : 16 appartenant au premier protocole d'acquisition spectrale (1 spectre N, 2 spectres N'), et 9 au second protocole d'acquisition spectrale (3 spectres N).

Théoriquement, nous disposons donc de 78 spectres pour la construction de notre algorithme de discrimination (43 spectres N et 35 spectres C), de 32 spectres N' pour l'évaluation des marges latérales de sécurité et de 22 spectres C' pour l'évaluation de l'hétérogénéité tumorale.

➤ 3/ Tri des spectres

Dans l'objectif du développement d'un algorithme robuste, un tri des spectres a été effectué selon la qualité du signal (profil aberrant ou atypique, saturation partielle, présence de spike, rapport signal sur bruit) ou bien du fait d'une difficulté ou particularité expérimentale (suspicion de déplacement de la sonde pendant l'acquisition dû à l'opérateur ou au patient, croute gênant le bon positionnement du point d'acquisition, espace d'acquisition disponible étroit pour les C' et les N' se retrouvant trop à proximité de la limite tumorale ou du tracé au feutre de la limite d'exérèse, etc.).

Le seuil du rapport signal sur bruit a été fixé à 3,75 en calculant le signal (à partir du pic Raman centré à  $1440\text{ cm}^{-1}$  correspondant aux déformations des groupements  $-\text{CH}_2$  et  $-\text{CH}_3$ ) et le bruit (à partir de la zone non informative  $2150\text{-}2250\text{ cm}^{-1}$ ).

➤ 4/ Bilan des spectres retenus

Au final, nous avons retenu 60 spectres pour l’algorithme de discrimination, dont 49 spectres de rapport signal sur bruit supérieur à 3,75 utilisés pour sa construction, et 11 spectres de rapport signal sur bruit inférieur à 3,75 destinés à tester le modèle en conditions expérimentales difficiles. Ces derniers correspondent soit à un temps d’acquisition trop court (1<sup>er</sup> protocole) ou bien à une peau particulièrement fluorescente (1<sup>er</sup> ou 2<sup>nd</sup> protocole).

Nous avons également retenu 16 spectres N’, 8 spectres C’ pour l’évaluation respective des marges latérales d’exérèse et de l’hétérogénéité tumorale des CBC nodulaires ; ainsi que 7 spectres de CBC superficiels pour analyse comparative. Ces derniers spectres appartenant tous au premier protocole avec des temps d’acquisition réduits, beaucoup ont été exclus du fait du rapport signal sur bruit inférieur à 3,75.

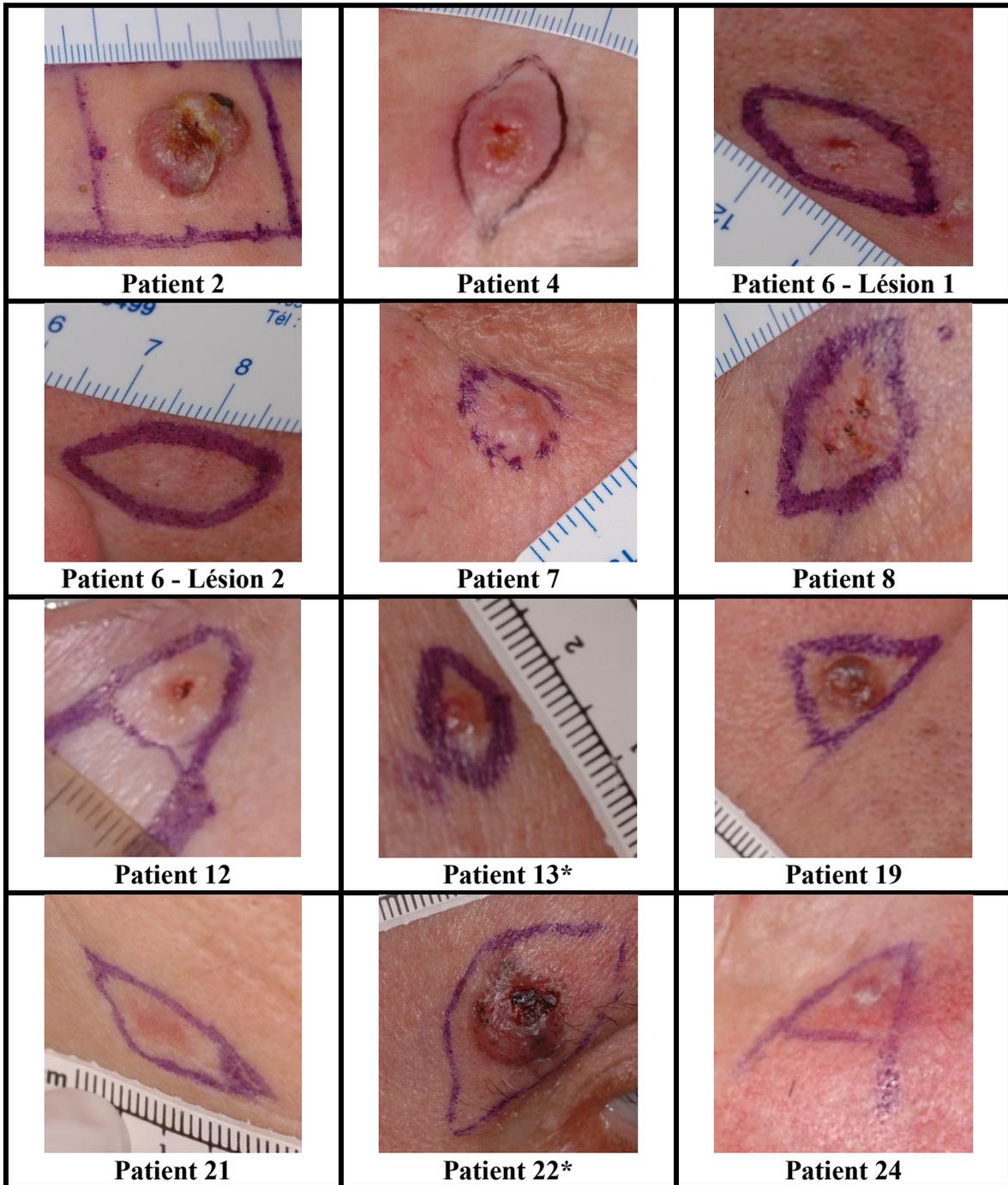
➤ 5/ Remarque

Il est à noter qu’aucun spectre des patients 20 et 23 (seuls patients éligibles à l’étude *in vivo* à diagnostic histopathologique autre que CBC) n’ont passé les différentes étapes de sélection de spectres bruts, et que par conséquent ces 2 patients ne sont pas représentés dans cette étude. Au final, seuls 21 patients (représentant 19 CBC nodulaires et 4 CBC superficiels) ont contribué aux résultats obtenus.

*Photographies des lésions sélectionnées*

Les photographies des lésions sélectionnées pour notre étude ont été regroupées ci-dessous (sauf lésion 1 : photographie indisponible). Les lésions pour lesquelles seuls les spectres acquis sur la peau environnante (N et/ou N’) ont été retenus, sont indiquées par un astérisque (**Figure 34** et **Figure 35**).

➤ CBC nodulaires



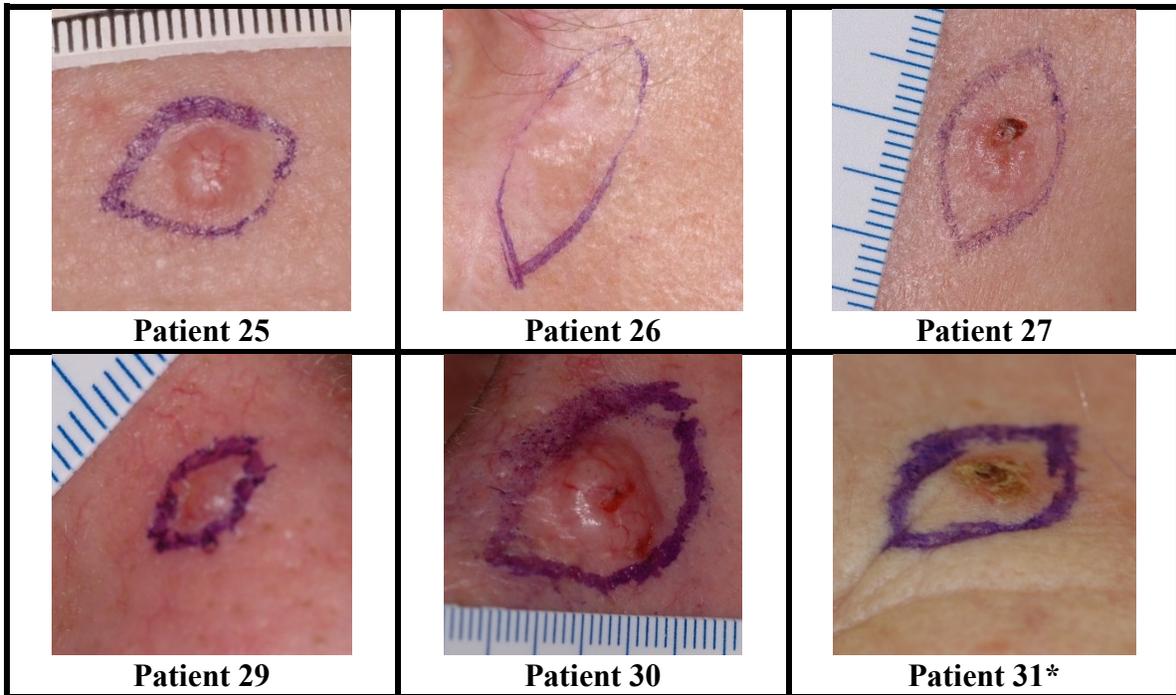


Figure 34 Photographies des 18 CBC nodulaires sélectionnés.

➤ CBC superficiels

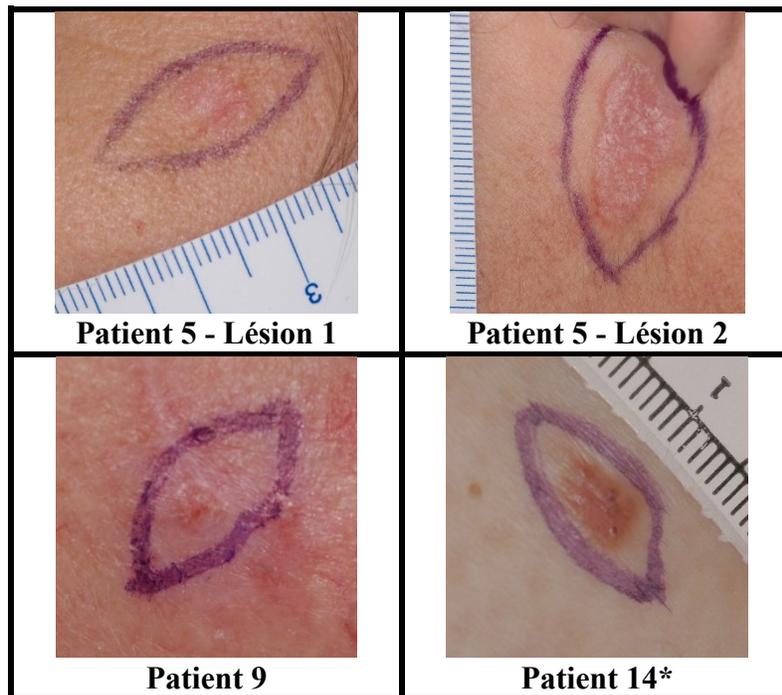


Figure 35 Photographies des 4 CBC superficiels sélectionnés.

### III- RESULTATS ET DISCUSSION

#### 1. Le fond spectral : avantage ou inconvénient ?

##### Généralités sur le phénomène d'autofluorescence tissulaire

Les ondes électromagnétiques suffisamment énergétiques (UV, visible et PIR proche du rouge) peuvent permettre à une molécule de passer à un niveau d'énergie électronique supérieur. La fluorescence est un des processus de relaxation permettant à la molécule de retrouver un état énergétiquement stable.

La fluorescence concerne certains minéraux, des matériaux organiques et tous les types de tissus biologiques (végétaux et animaux), puisque la cellule – plus petite unité manifestant les propriétés du vivant – contient des molécules intrinsèques fluorescentes. Ces molécules sont appelées fluorophores endogènes et la fluorescence résultante est appelée autofluorescence, par opposition à celle obtenue grâce aux marqueurs exogènes de fluorescence (47)(48).

Les fluorophores endogènes cellulaires principaux sont des molécules très largement distribuées au sein de l'organisme comme les coenzymes pyridiniques et flaviniques, les porphyrines, les protéines contenant des acides aminés aromatiques, les lipo-pigments. Ainsi la majorité de l'autofluorescence cellulaire a pour origine les mitochondries et les lysosomes (47). Au niveau de la peau, s'ajoutent la kératine et la mélanine qui présentent également des propriétés intrinsèques de fluorescence (49).

Au niveau tissulaire, la matrice extracellulaire contribue souvent plus à l'émission d'autofluorescence que les composants cellulaires. En effet, l'élastine et le collagène donnent les plus hauts rendements quantiques de fluorescence (47), principalement en raison de la présence de certains types de liaisons transversales au sein de ces molécules (50) (51).

Ainsi les travaux d'une équipe canadienne portant sur l'autofluorescence de la peau *in vivo* révèlent que bien que la densité de fluorophores endogènes cutanés soit plus importante dans la couche cornée que dans le derme (négligeable dans la couche épidermique intermédiaire), les photons d'autofluorescence émis par cette dernière couche contribue à environ 85 % au signal d'autofluorescence mesuré sur la peau *in vivo* (contre environ 15 % pour ceux de la couche cornée). En effet bien qu'il soit localisé plus en profondeur, le derme est très épais relativement à la couche

cornée et les fluorophores endogènes qu'il contient ont un rendement quantique de fluorescence plus élevé. Ces résultats ont été obtenus à l'aide d'un système d'analyse spectral d'autofluorescence et de réflexion diffuse associé à une source incidente laser de longueur d'onde visible (442 nm) (48). Des résultats similaires ont été obtenus dans le domaine du proche infrarouge avec une source laser de longueur d'onde 785 nm (52).

Le phénomène de fluorescence a été observé pour la première fois par Stokes en 1852. Le potentiel diagnostique de l'autofluorescence tissulaire a été reconnu dès 1911 par Stubel mais en raison de la faible intensité du phénomène, il a fallu attendre les années 1980 avec le développement de détecteurs de haute sensibilité pour que se multiplient les études portant sur le sujet. Aujourd'hui, les capacités discriminatives de l'autofluorescence tissulaire ont été maintes fois démontrées et ouvrent des perspectives intéressantes pour le développement de nouvelles techniques diagnostiques (47) (53).

### *Contribution de l'autofluorescence tissulaire au fond spectral*

#### ➤ *En microspectroscopie Raman*

La microspectroscopie Raman permet d'analyser facilement des échantillons sans préparation particulière, et autorise donc l'étude de fragments biologiques très variés : cellules, coupes tissulaires congelées ou paraffinées, pièces d'exérèse fraîches, tissus *in vivo*. Néanmoins, on a pu constater que l'autofluorescence parasite de certaines molécules peut être particulièrement gênante pour les études Raman. Avec une excitation proche infrarouge de 785nm, la mélanine par exemple, présente une fluorescence de forte intensité, à tel point qu'aucun pic Raman de cette molécule n'a pu être clairement enregistré. D'autres composés sont partiellement fluorescents (élastine, collagène, ADN, ARN, glycogène...) alors que certains ne montrent aucune fluorescence particulière (sérine, lysine acétylée, arginine acétylée, créatine, créatinine, ...) (**Figure 36**).

Les échantillons biologiques, de composition et d'architecture moléculaires complexes, présentent une fluorescence partielle en microspectroscopie Raman à 785 nm, quel que soit leur état : *in vitro* (cellules vivantes, coupes congelées ou paraffinées), *ex vivo* (pièces d'exérèse) ou *in vivo*. Cette fluorescence varie d'un point d'acquisition à l'autre, selon la zone analysée et sa composition en fluorophores endogènes.

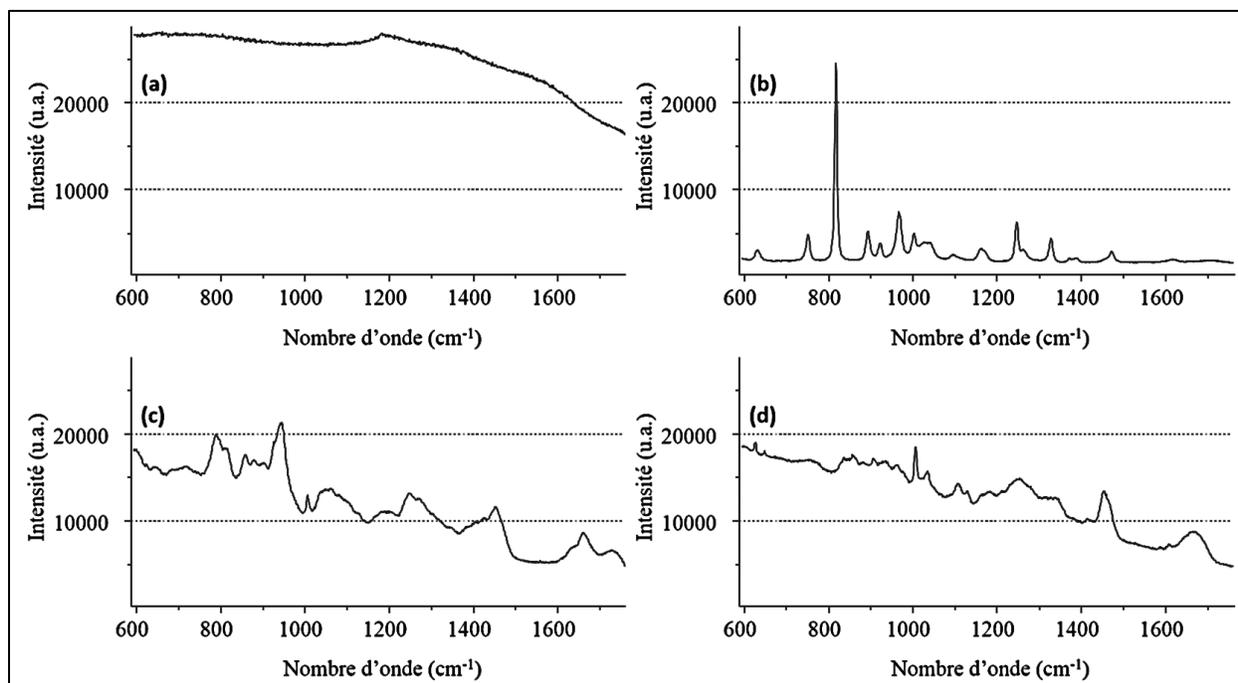


Figure 36 Spectres Raman bruts de produits purifiés et commercialisés par Sigma. (a) mélanine, (b) sérine, (c) collagène et (d) élastine. Ces spectres ont été obtenus avec une longueur d'onde excitatrice de 785 nm et des temps d'acquisition adaptés au degré de fluorescence de chaque molécule : 50 secondes (avec un filtre de densité optique), 5 secondes, 30 secondes et 30 secondes respectivement. (a) La mélanine est très fluorescente et a tendance à brûler avec le laser incident. L'utilisation d'un filtre de densité optique pour atténuer la puissance du laser incident ( $P_0 / 10^3$ ) a donc été nécessaire pour l'obtention de son spectre Raman. Augmenter le temps d'acquisition n'augmente pas le signal Raman mais la fluorescence (ligne de base) et augmente les risques de brûlure de l'échantillon. (b) La sérine n'est pas fluorescente : la ligne de base est parfaitement horizontale. Augmenter le temps d'acquisition permet d'améliorer le rapport signal sur bruit. (c) (d) L'élastine et le collagène sont deux molécules partiellement fluorescentes. Le degré de fluorescence de ces deux molécules apparaît similaire (ligne de base proche pour un même temps d'acquisition). Dans ce cas, augmenter le temps d'acquisition permet d'améliorer le rapport signal sur bruit mais également la fluorescence, la limite étant la saturation du détecteur (vers 60 000 u.a.).

### ➤ En spectroscopie Raman fibrée

Suite à l'enregistrement d'un grand nombre de spectres cutanés *in vivo* (zones saines ou tumorales) avec le spectroscope Raman transportable Horiba HE (785 nm) associé à la sonde RamanProbe, nous avons pu constater un fond spectral de profil particulier. Ce profil a vraisemblablement pour origine les fluorophores endogènes cutanés et montre au premier abord un potentiel discriminant entre peau tumorale et peau normale. En effet, dès l'acquisition des spectres bruts, une différence significative d'intensité absolue a été observée entre les spectres des carcinomes baso-cellulaires par rapport aux spectres de la zone saine. Ainsi pour un même temps d'acquisition, les signaux de la peau tumorale sont moins intenses que ceux de la peau normale (**Figure 37**). Ce phénomène a déjà pu être observé à de nombreuses reprises en spectroscopie de fluorescence pour la peau (46) (54), mais aussi pour d'autres types tissulaires tels que le colon, l'utérus, les bronches, la vessie, le cerveau (55).

Dans le cas des tumeurs cutanées, il est supposé que la sécrétion d'enzymes de dégradation des protéines matricielles, induite par le développement tumoral, est à l'origine de cette différence de fluorescence. En effet, cette dégradation entraîne la perte des principaux fluorophores dermiques : les fibres de collagène et d'élastine, et en particulier leur liaisons transversales (50) (51) (56) (57) (58). L'importance de la diminution de fluorescence observée semble être relative au degré d'invasion tumorale (56) (59). Comme le suggère des expériences de dégradation enzymatique *in vitro* du derme (58), cette observation devrait pouvoir être vérifiée pour toute lésion entraînant une désorganisation du derme, ce qui a été le cas avec les tumeurs malignes incluses dans cette étude (CBC nodulaires et superficiels), les deux tumeurs précancéreuses (kératose actinique et Bowen), ainsi que pour un cas de tumeur maligne vasculaire (hémangiome lobulaire).

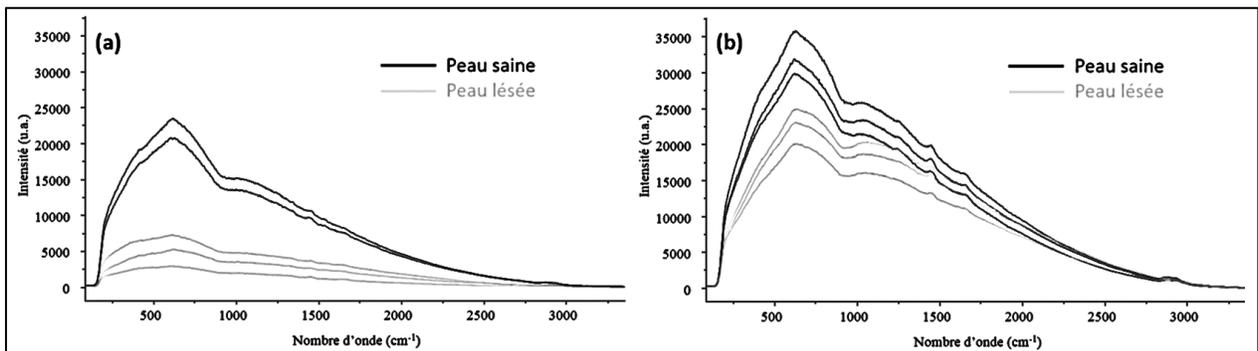


Figure 37 Spectres Raman bruts *in vivo* de deux types de lésions cutanées différentes. (a) hémangiome. (b) carcinome basocellulaire superficiel. Ces spectres ont été obtenus avec des paramètres d'acquisition identiques : source laser incidente de 785 nm de longueur d'onde, distance sonde-surface cutanée de 5 mm, temps d'acquisition de 5 x 4 secondes. Les spectres ont été corrigés de l'offset.

Bien que reproductible, cette observation est difficile à utiliser en l'état. En effet, le niveau d'intensité de fluorescence – et donc l'intensité seuil entre peau saine et peau lésée – étant propre à une région cutanée pour un individu donné, elle ne se vérifie qu'en prenant les spectres de chaque patient isolément. Lorsque l'on prend ensemble les spectres de la totalité des patients, cela se traduit par un chevauchement important des spectres dû à l'importante variabilité des signaux bruts. Ceci compromet le développement d'un algorithme de discrimination peau saine - peau lésée basé uniquement sur le niveau d'autofluorescence, comme il l'a déjà été également constaté dans la bibliographie (60). Par contre, l'association de l'information fournie par l'autofluorescence

tissulaire et de l'information Raman dans le but de délimiter ou de discriminer une lésion cutanée donne des résultats intéressants (61) (62).

### *Contribution du système optique au fond spectral*

Cependant il faut rester prudent dans l'interprétation des fonds spectraux obtenus *in vivo*, puisque en spectroscopie Raman fibrée, les fonds dits « de fluorescence » (« fluorescence-like » en anglais) obtenus à 785 nm ne sont pas seulement dus à l'autofluorescence tissulaire. En effet l'appareil de mesure peut générer un fond additionnel créé par le dispositif d'excitation et de collection du signal notamment les lentilles, les filtres, mais aussi les fibres optiques (type, longueur, ouverture numérique) dont l'utilisation est nécessaire dans le cas de mesures déportées. En particulier les fibres à verre de silice, comme la sonde RamanProbe, entraînent un fond spectral causé principalement par les impuretés et les dopants utilisés pour sa production, le signal des différents matériaux de gainage, ainsi que le signal Raman du cœur en verre de silice. Malgré cet inconvénient, le verre de silice reste largement utilisé car c'est le composant qui permet la transmission la plus efficace des ondes électromagnétiques PIR. Pour les échantillons biologiques, ce fond est généralement plus important que le signal Raman d'intérêt, qu'il masque et déforme. Il est possible d'utiliser des filtres optiques pour le limiter, mais de manière restant insuffisante (63) (64). De nouvelles générations de fibres creuses actuellement en cours de développement pourraient représenter une solution technologique à ce problème (65).

Dans la **Figure 38**, nous avons comparé les spectres Raman d'un échantillon partiellement fluorescent à 785 nm (peau *in vivo* ou fraîchement excisée), obtenus à partir de spectromètres utilisant des dispositifs d'excitation et de collection différents. En utilisant un spectromètre fibré confocal et une source laser incidente de 660 nm, on observe une diminution significative de la fluorescence générant un spectre dont la ligne de base est quasiment horizontale. Un échantillon similaire sondé à 785 nm à l'aide d'un spectromètre Raman non fibré entraîne une ligne de base plus intense et inclinée, due majoritairement à l'autofluorescence tissulaire. Le même échantillon sondé à 785 nm avec un spectromètre associé à la sonde RamanProbe entraîne un fond spectral d'allure particulière, dont l'intensité varie considérablement. On observe en effet un maximum d'intensité vers  $630\text{ cm}^{-1}$  (826 nm) et une cassure très prononcée vers  $900\text{ cm}^{-1}$  (845 nm) (trait pointillé dans la **Figure 38**). Cette cassure pourrait correspondre à la juxtaposition d'au moins deux fonds spectraux distincts (**Figure 39**).

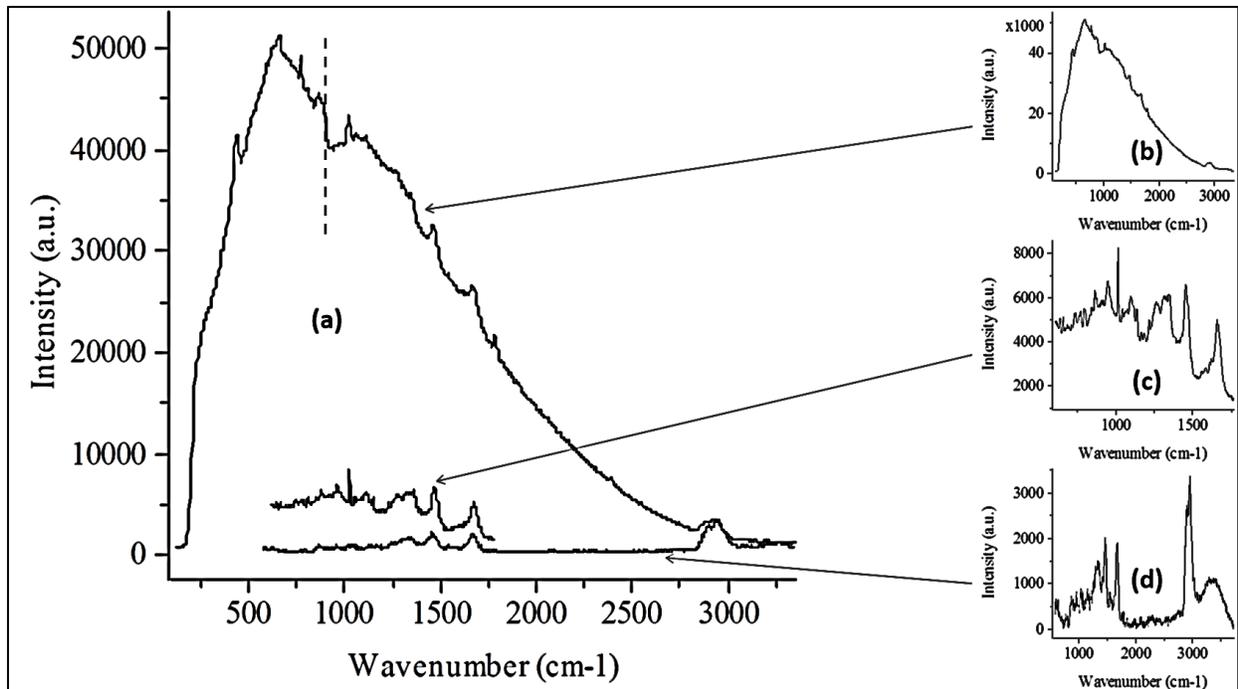


Figure 38 Spectres bruts obtenus en fonction de l'appareil de mesure utilisé. (a) Spectres bruts de peau *in vivo* ou *ex vivo* obtenus à l'aide de différents types de système Raman (b) Spectre de peau fraîchement excisée, obtenu avec le spectroscopie HE de Horiba Jobin-Yvon associé à la sonde RamanProbe de InPhotonics et une source laser incidente de longueur d'onde 785 nm (c) Spectre du même échantillon, obtenu avec le spectromètre Raman LabRAM de Horiba Jobin-Yvon associé à un microscope confocal avec objectif à longue frontale x100 et une source laser incidente de longueur d'onde 785 nm (d) Spectre de peau *in vivo*, obtenu à une profondeur d'acquisition de 6  $\mu\text{m}$  avec une microsonde confocale associée au spectromètre Raman Sincerity de Horiba Jobin-Yvon et une source laser incidente de longueur d'onde 660 nm. Les différences de fenêtre spectrale sont liées aux différences de réseaux entre les trois systèmes optiques, et les différences d'intensité sont liées aux différences d'échelle d'intensité d'un système à l'autre et au choix des paramètres d'acquisition optimisé pour chaque appareil (volume sondé, temps d'acquisition, puissance laser, etc.).

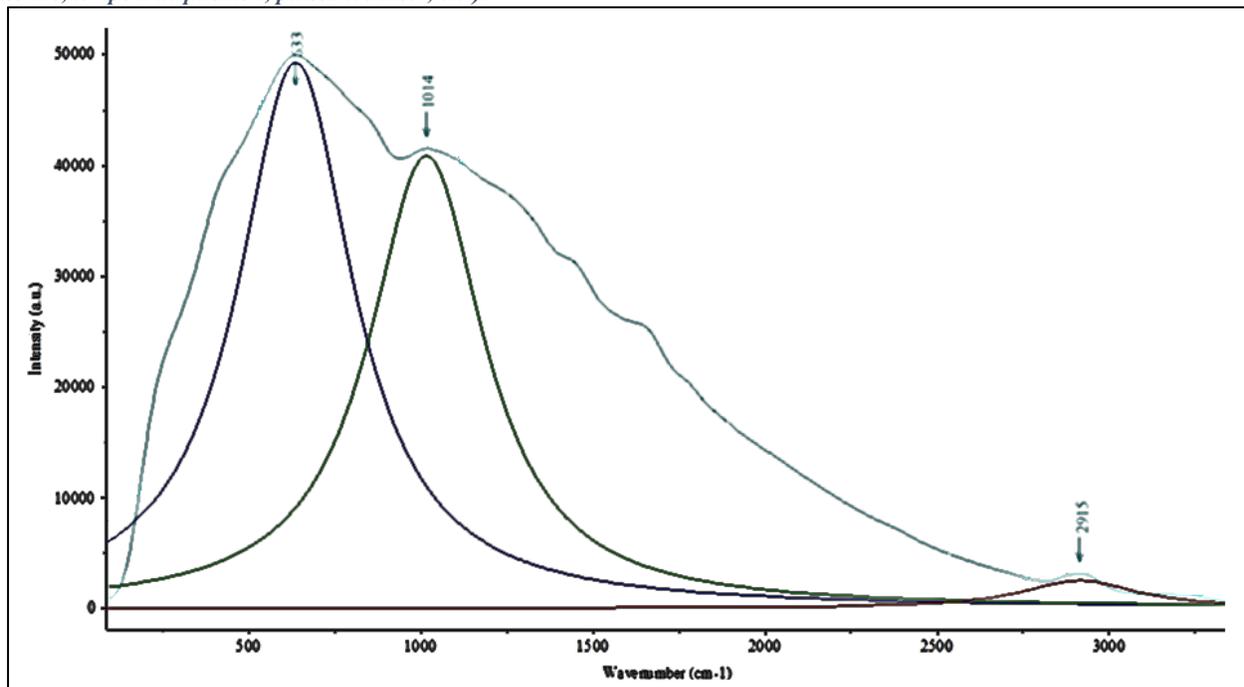
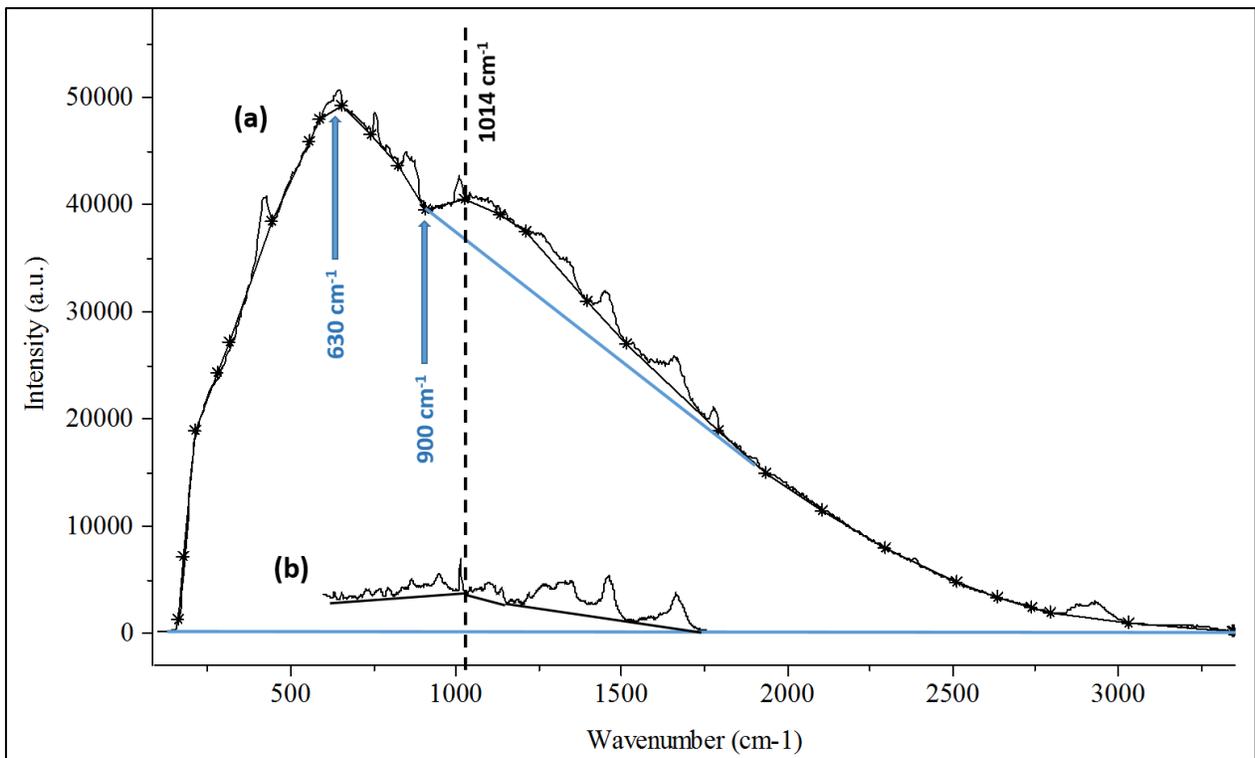


Figure 39 Principaux signaux de fluorescence modélisés, après filtration par moyennage (logiciel LabSpec) du spectre brut de peau *in vivo* obtenu avec le système spectromètre HE / sonde RamanProbe.

Pour évaluer la part réelle de fond due à notre système optique et la fluorescence due à l'échantillon, nous avons comparé le spectre de peau à un spectre de poudre de terbinafine - produit pur très peu fluorescent à 785 nm (**Figure 40** et **Figure 41**). Il apparaît alors que la cassure du profil spectral à  $900\text{ cm}^{-1}$  est d'autant plus prononcée que l'échantillon est fluorescent. De même, si l'on observe un spectre d'échantillon très fluorescent tel que la mélanine, on observe toujours le maximum d'intensité vers  $630\text{ cm}^{-1}$ , la cassure vers  $900\text{ cm}^{-1}$ , et au-delà une fluorescence très prononcée dominant la totalité du spectre (**Figure 42**). Ainsi on peut conclure que le fond spectral en-dessous de  $900\text{ cm}^{-1}$  est majoritairement dû au système optique, alors que la partie supérieure est conjointement due au système optique ainsi qu'à la fluorescence propre à l'échantillon.



*Figure 40 Spectres Raman bruts d'une pièce d'exérèse cutanée obtenus avec une excitation laser de même longueur d'onde 785 nm mais avec des systèmes optiques différents. (a) Spectromètre Raman fibré. (b) Microspectromètre Raman (objectif x100). La fluorescence due à l'échantillon se retrouve quel que soit le type de spectromètre utilisé. Dans le cas du spectromètre Raman fibré, cette fluorescence cutanée s'additionne au fond dû à l'appareillage et accentue la cassure du profil spectral à  $900\text{ cm}^{-1}$ . Le maximum de fluorescence ( $\sim 1014\text{ cm}^{-1}$ ) de l'échantillon de peau obtenu avec le microspectromètre se retrouve sur le profil spectral obtenu avec le système fibré.*

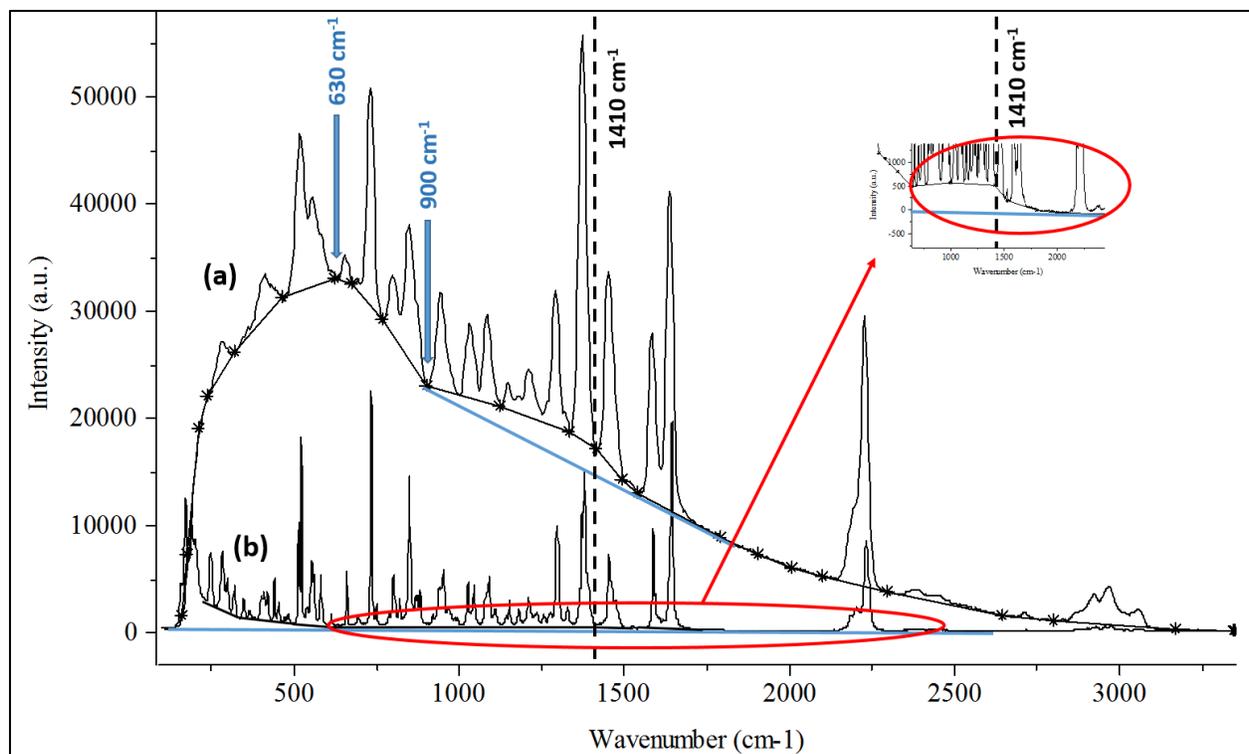


Figure 41 Spectres Raman bruts d'un produit pur (terbinafine) obtenus avec une excitation laser de même longueur d'onde 785 nm mais avec des systèmes optiques différents. (a) Spectromètre Raman fibré. (b) Microspectromètre Raman (objectif x100). L'échantillon étant peu fluorescent, le rapport signal sur bruit est très bon et la cassure de profil spectral à 900  $\text{cm}^{-1}$  obtenue avec le système Raman fibré est peu visible. Elle peut néanmoins être mise en évidence en traçant la ligne de base. La faible fluorescence du produit pur (faible maximum à 1410  $\text{cm}^{-1}$ ) s'additionne tout de même au fond du système optique fibré.

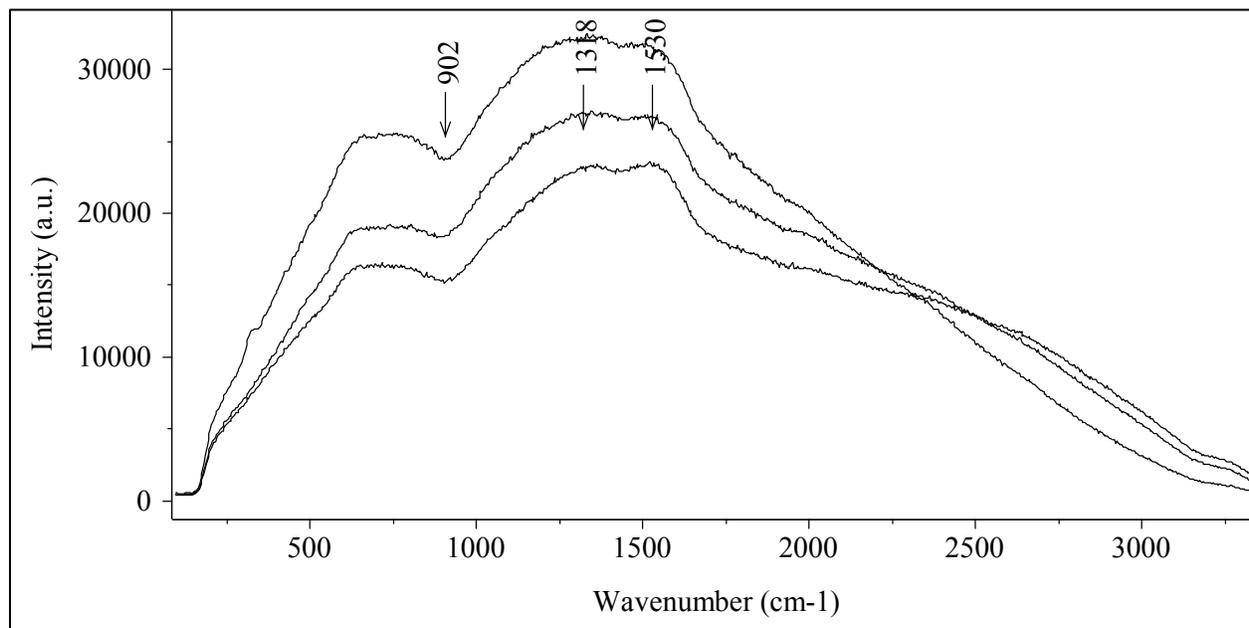


Figure 42 Spectres de la mélanine obtenus avec le système optique spectromètre HE - sonde RamanProbe. La fluorescence importante de la mélanine à 785 nm, ainsi que les épaulements aux alentours de 1318  $\text{cm}^{-1}$  et 1530  $\text{cm}^{-1}$  se retrouvent dans le spectre de la mélanine obtenus avec le microspectromètre Raman LabRAM (cf. Figure 36).

Dans la bibliographie, de nombreuses autres équipes de recherche ayant expérimenté différents systèmes Raman fibrés font état d'un signal très intense vers les plus faibles nombres d'onde, en général attribué au fond de la fibre, avec un maximum d'intensité compris entre 500 et 650  $\text{cm}^{-1}$ . Cette variation de maximum d'intensité d'une étude à l'autre semble s'expliquer par les différentes configurations de sondes utilisées (63) (64) (66) (67) (68). La fluorescence de la sonde est plus importante de plusieurs ordres de magnitude par rapport à la fluorescence tissulaire, qui est elle-même plus intense que les signaux Raman (63) (64).

### *Bilan des contributions : contradictions et hypothèses*

En conclusion, on peut dire que le profil spectral particulier obtenu à 785 nm avec le spectromètre HE associé à la sonde RamanProbe a pour sources principales le système optique, et également l'autofluorescence tissulaire pour les longueurs d'onde supérieures à 900  $\text{cm}^{-1}$ .

Cependant, comment expliquer alors que les spectres bruts enregistrés sur une peau saine ont globalement une intensité supérieure à ceux enregistrés sur une peau tumorale (cf. **Figure 37**), si la majorité du fond spectral a pour origine le système optique et non pas l'échantillon sondé, notamment pour les longueurs d'onde inférieures à 900  $\text{cm}^{-1}$  ?

Cette observation pourrait s'expliquer par des phénomènes de réflexion en surface cutanée. En effet on peut émettre l'hypothèse que la peau saine agirait comme une barrière optique réfléchissante, et que la perte des propriétés cutanées causées par le développement d'une tumeur, entrainerait la diminution des phénomènes de réflexion en surface cutanée. Ainsi, une peau saine réfléchirait plus de rayons lumineux dans la fibre qu'une peau altérée, ce qui pourrait aussi expliquer l'augmentation de la contribution du système optique au fond spectral observé lors de mesures sur une peau tumorale par rapport à une peau saine.

Au final, la différence d'intensité des fonds spectraux observée sur la **Figure 37** s'expliquerait à la fois par des différences de propriétés biologiques (autofluorescence) ainsi que par des différences de propriétés physiques (réflexion) entre peau saine et peau tumorale.

### Méthodes de correction du fond spectral

#### ➤ Post-acquisition

Traditionnellement, la correction de la ligne de base des spectres vibrationnels se fait à l'étape de prétraitement des spectres, après leur acquisition (cf. chapitre « Correction de ligne de base » dans les prétraitements des spectres optiques vibrationnels).

#### ➤ Pré-acquisition

Aucune des méthodes numériques auxquelles fait référence le chapitre précédent n'aboutit à une correction de ligne de base parfaite, étant donné la complexité du phénomène sous-jacent. Aussi pour faciliter ce prétraitement, il est recommandé d'anticiper le problème de fond, et en particulier la fluorescence parasite, avant l'acquisition des spectres en choisissant des conditions d'acquisition optimales (laser incident PIR par exemple).

#### ➤ En cours d'acquisition (perspectives)

Les méthodes suivantes, intervenant au moment même de l'acquisition, sont intéressantes par leur facilité d'application. En perspectives, il serait intéressant de tester leur adaptabilité en conditions expérimentales cliniques et leur efficacité.

#### Utilisation du phénomène de photobleaching

Dans leur papier intitulé « Improving skin Raman spectral quality by fluorescence photobleaching », l'équipe de Wang au Canada présente une méthode d'amélioration du rapport signal sur bruit de spectres Raman de peau humaine *in vivo*, basée sur le phénomène de photobleaching. En effet, il constate qu'une pré-exposition continue de la zone à analyser par le laser incident, réduit significativement le phénomène d'autofluorescence tissulaire, et permet ensuite une acquisition d'un spectre de bon rapport signal sur bruit en un temps d'acquisition réduit. Ainsi, avec un temps d'exposition au laser 785 nm de l'ordre de 200 secondes, suivi d'un temps d'acquisition du spectre Raman de 1 à 2 secondes, la fluorescence diminue d'environ 25 %, mais le signal Raman reste quasi-constant. Il serait possible d'obtenir un phénomène de photobleaching

similaire avec une source lumière LED haute puissance, évitant ainsi l'utilisation pendant une période d'exposition prolongée d'une source laser, plus invasive. Les limites de cette méthode sont des temps d'acquisition fortement augmentés, et dans le cadre de la correction de ligne de base, le fait qu'elle n'agit pas sur toutes les sources de fond spectral, mais seulement sur l'autofluorescence tissulaire. D'autre part, il serait important de vérifier que le photobleaching ne modifie pas temporairement le signal Raman cutané.

#### Modélisation rapide du fond spectral

Prendre les spectres de référence obtenus avec de l'aluminium, du KBr, du BaSO<sub>4</sub> (69), ou pendant une simple émission du laser permet de modéliser le signal de la fibre utilisée en spectroscopie Raman. Il est ensuite possible de prendre en compte certains composants de la fibre (*e.g.* époxy, saphir, ...) en incluant leur spectre au modèle obtenu (63). Cependant comme nous l'avons vu dans ce chapitre, le fond spectral a d'autres origines, qu'il faut prendre en compte dans la modélisation si l'on veut s'en servir dans le cadre d'une correction de ligne de base. On sait que la fluorescence est un phénomène beaucoup plus intense que la diffusion Raman, et qu'un temps d'acquisition trop court donne un spectre avec peu de rapport signal sur bruit. Par conséquent, l'acquisition volontaire d'un spectre de temps d'acquisition très court – juste avant le spectre d'échantillonnage, permettrait l'obtention rapide d'un modèle du fond spectral, qui pourra être lissé si nécessaire avant d'être soustrait du spectre d'intérêt (à l'instar du signal du support de coupes tissulaires devant être enregistré au préalable, pour ensuite être soustrait des spectres bruts, afin d'isoler le signal de l'échantillon en microspectroscopie Raman). Le fond spectral variant avec l'échantillon et le point d'acquisition, ce spectre devrait être acquis avant chaque spectre d'échantillonnage. Dans le cadre de notre étude clinique, un spectre de quelques secondes serait suffisant.

## 2. Résultats soumis

L'objectif de la publication présentée ci-après était de démontrer que la spectroscopie Raman fibrée pouvait être utilisée en milieu clinique pour aider à l'identification des marges nécessaires à l'excision de CBC. D'abord une classification non supervisée a permis de confirmer la présence au sein des spectres Raman *in vivo* d'une information intrinsèque permettant la discrimination des spectres de peau saine et de CBC. Puis un algorithme de classification, basé sur la PCA/ALD, a montré la possibilité de distinguer ces types de peau avec une sensibilité de 100 % et une spécificité de 96,77 %. L'évaluation des marges d'excision a été réalisée en projetant des spectres collectés en périphérie de la lésion et localisés au sein de la marge d'exérèse définie par le chirurgien. Enfin, les nombres d'onde les plus discriminants de la région "fingerprint" ont pu être identifiés au moyen d'une analyse statistique multivariée.

Journal of Investigative Dermatology



***In vivo* tumoral discrimination with fibered Raman spectroscopy and assessment of the lateral excision margin in BCC surgery**

Journal:	<i>Journal of Investigative Dermatology</i>
Manuscript ID	JID-2016-0987
Article Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	02-Nov-2016
Complete List of Authors:	Mainreck, Nathalie; Universite de Reims Champagne-Ardenne, MÉDIAN, CNRS UMR 7369 - MEDyC, UFR de Pharmacie Gobinet, Cyril; Universite de Reims Champagne-Ardenne, MÉDIAN, CNRS UMR 7369 - MEDyC, UFR de Pharmacie DURLACH, Anne; Centre Hospitalier Universitaire de Reims, Laboratoire de Biopathologie, Hôpital Maison Blanche Goedel, Anne-Laure; Centre Hospitalier Universitaire de Reims, Service de Dermatologie, Hôpital Robert Debré; Centre Hospitalier Universitaire de Reims, Laboratoire de Biopathologie, Hôpital Maison Blanche Reguai, Ziad; Centre Hospitalier Universitaire de Reims, Service de Dermatologie, Hôpital Robert Debré Angiboust, Jean-François; Universite de Reims Champagne-Ardenne, MÉDIAN, CNRS UMR 7369 - MEDyC, UFR de Pharmacie Manfait, Michel; Universite de Reims Champagne-Ardenne, MÉDIAN, CNRS UMR 7369 - MEDyC, UFR de Pharmacie Bernard, Philippe; Centre Hospitalier Universitaire de Reims, Service de Dermatologie, Hôpital Robert Debré Piot, Olivier; Universite de Reims Champagne-Ardenne, MÉDIAN, CNRS UMR 7369 - MEDyC, UFR de Pharmacie
Key Words:	Raman spectroscopy, Skin cancer, <i>In vivo</i> analysis, Clinical applicability, Spectroscopic markers

SCHOLARONE™  
Manuscripts

***IN VIVO* TUMORAL DISCRIMINATION WITH FIBERED RAMAN SPECTROSCOPY  
AND ASSESSMENT OF THE LATERAL EXCISION MARGIN IN BCC SURGERY****ABSTRACT**

The objective of the study was to demonstrate the clinical applicability of Raman spectroscopy in the context of the identification of excision margin during basal cell carcinoma surgery. For this purpose, *in vivo* spectra were acquired using a commercial fiber-based Raman set-up from 18 patients just before the excision of their skin carcinoma. A classification multivariate model based on principal component analysis - linear discriminant analysis processing was implemented to distinguish lesional from normal skin spectra. Then, spectra acquired in the excision margin areas were projected on this model. For four lesions, on the basis of the Raman data, the margin appeared insufficient. In particular, one of these lesions has later required a further surgical intervention. In addition, the discriminant spectral vibrations were identified using a statistical multivariate method. We found that the wavenumbers with the highest discriminatory values correspond in rank (most discriminant to least) to nucleotides and proteins vibrations (1322-1331  $\text{cm}^{-1}$  and 1342-1345  $\text{cm}^{-1}$ ), polysaccharides vibrations (1116-1120  $\text{cm}^{-1}$  and 1148-1149  $\text{cm}^{-1}$ ), peptide bond vibrations of the amide I (1640  $\text{cm}^{-1}$ , 1645-1647  $\text{cm}^{-1}$  and 1697  $\text{cm}^{-1}$ ), and further polysaccharides vibrations (1020-1022  $\text{cm}^{-1}$ ). Unsupervised classification using the most discriminatory wavenumbers permitted to maximize the sensitivity and specificity performances. Additionally, we have noticed a difference of background intensity between Raman spectra registered on basal cell carcinoma and on normal skin. Such a feature could be useful, as an exploration modality, to speed up the Raman investigation of tumor margin delineation.

## INTRODUCTION

Currently, one third of cancers diagnosed worldwide is a skin cancer. These cancers comprise two main types: non-melanoma skin cancers (NMSC) and melanoma skin cancers (MSC). It occurs between 2 and 3 million NMSC and 132,000 MSC worldwide each year (70). NMSC is the most common cancer affecting white-skinned population. Because its incidence is continuously globally raising, NMSC is an increasing problem and cost for healthcare services worldwide (71).

NMSC includes 2 main subtypes of lesions: Basal Cell Carcinoma (BCC) and Squamous Cell Carcinoma (SCC). BCC is the most common and accounts for 80 % of NMSC. BCC is rarely lethal and metastasize only in a very small number of cases (18), but in case of inadequate treatment or late diagnosis, BCC can destroy important anatomical structure (nose, eye, ear, lip...) and become very challenging to treat with a good cosmetic result and can even become inoperable (18). Surgical treatment is often disfiguring and painful (70).

Diagnosing skin cancer is not easy, in particular for general practitioner, and often requires to wait few weeks for expert judgment of dermatologist. In addition, the diagnosis remains subjective and it's not rare to excise false-positive or to miss the lesion. In United Kingdom for example, a study shows that about 88 % of 2-week wait urgent referrals for suspected aggressive skin cancer turn out to be non-malignant (18). As diagnosis according to clinical examination relies essentially on physician experiment, it gives an overall sensitivity for NMSC of 56-90 % and an overall specificity of 75-90 %, with the highest accuracy value for BCC diagnosis. The use of a dermoscope – the most widely accepted and most frequently used non-invasive imaging tool in dermatology – permits to improve these values with a sensitivity for BCC diagnosis from 87 % to 96 % and specificity from 72 % to 92 % (11). But the mastery of dermoscopy is greatly related to time for learning and to the expertise of the physician (28). These facts highlight a need for better

recognition and early diagnosis of skin cancer. Currently, the reference method for skin diagnosis is the histopathological assessment of biopsies, which is time-consuming, expensive, invasive, potentially mutilating, painful and carry a risk of infectious wound complications. Furthermore, histopathology is also a subjective assessment, first because several NMSC classification systems exist worldwide and secondly an inter-observer differences ranging from 1.2 to 7 % has been reported (11).

Besides, during surgical excision of BCC in France, security margins of exeresis are delineated in accordance with the recommendations of health services: from 3 to 10 mm depending on prognosis of the lesion (14). Despite this practice, recurrence rate after 5 years of surgical excision for primary BCC is between 5 and 10 %. In fact, the more effective surgical treatment for BCC is Mohs Micrographic Surgery (MMS) (1 % recurrence rate) which is based on sequentially removing of small layers of skin. The procedures consists in an extemporaneous histopathological assessment of these thin skin flaps. MMS finishes when the samples indicate that cancer cells are completely removed. This treatment allows maximum tissue conservation while assuring to be tumor-free. However, it's a very meticulous methods requiring sufficient human resources to implement an effective coordination between surgeons and histopathologists (72).

In this context, Raman spectroscopy appears as a candidate technique to help the clinicians in the medical care of BCC. This is an analytical method which allows exploration of material composition and structure. With technical development (laser, detector, probe...), Raman spectroscopy is a booming tool usable *in vivo* in real-time examination based on non-destructive interaction between light and matter. This biophotonic technique is able to probe vibrational levels of molecular bonds to access molecules' composition and structures in a label-free manner. Previous *in vitro* studies on thin tissue sections have shown this techniques is able to diagnose cancers from different kind of tissues (esophagus, lung...) (73) (74), and in particular BCC in skin

sections (75) (76), encouraging to test the method directly in patients. Indeed, with the development of Raman probe, *in vivo* measurements are now feasible. A lot of studies have allowed to test these new developed Raman devices, especially on skin which is the more accessible organ (77) (78) (79) (80) (81). In addition, other pathologies have been investigated by *in vivo* Raman spectroscopy (82) (83).

About *in vivo* BCC discrimination from normal skin, to date, few algorithms have already been tested. In 2008, Lieber *et al.* have got to 100 % sensitivity, 91 % specificity and overall accuracy of 95 % for skin abnormalities classification (*versus* normal skin) including 9 BCCs (84). In 2012, Lui *et al.* have tested in almost real-time (2s acquisition time) identification of a consequent number (n=518) of skin lesions including 109 BCCs. Concerning classification of cancerous and precancerous skin conditions *vs* benign skin lesions, they reached a specificity of 41 % for a sensitivity of 95 % (85). In the same year, Silveira *et al.* implemented a principal component analysis discrimination algorithm with patients scheduled to undergo resectional surgery of BCC lesions, which can discriminate BCC from normal skin with 83 % sensitivity and 88 % specificity (86). In 2013, Philipsen *et al.* have realized a BCC classification *versus* normal skin including 25 BCCs. They obtained 88 % sensitivity and 85.5 % specificity (87). In 2015, Schleusener *et al.* used partial least squares discriminant analysis to discriminate normal skin and different type of skin lesions. Thirty-two of whom were BCCs and were discriminated from normal skin with a balanced accuracy of 73 % (68).

About *in vivo* definition of excision margins using Raman spectroscopy, Haka *et al.* have correctly assessed excision margins in 9 patients undergoing partial mastectomy due to breast cancer, using a previously-developed diagnostic algorithm (88). And concerning BCC, Keller *et al.* proved that *in vivo* Raman spectroscopy can detect malignancy-associated molecular changes that can thus be used to assessed excision margins, based on cancer field effect (89).

The aim of the study was to evaluate an *in vivo* handheld Raman spectroscopy device to distinguish BCC *versus* normal skin in a non-invasive way and to control the excision margins. For that, *in vivo* Raman spectra were acquired on patients with suspected BCC and who underwent surgical excision procedure. A reliable *in vivo* discrimination algorithm was developed, and tested with spectra collected in degraded conditions for mimicking real clinical environment. Then, lateral resection margins were assessed using this algorithm and most important molecular changes between BCC and normal skin have been identified.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Patients' recruitment**

Patients with suspected BCC were invited to participate to the study. Subjects were recruited from patients scheduled to undergo surgical excision of their lesion. Informed consent was obtained from each volunteer. A total of 32 people were included in this investigation from 43 to 92 year-old (mean age: 73). Some of them came for surgery of 2 or 3 suspected BCCs, and a total of 36 lesions were examined with the Raman probe spectrometer. Patients were made comfortably lying on the back so as to prevent movement during the data collection. Ambient light was switched off during Raman acquisition times. Spectral data were collected just before the tissue excision.

### **Raman probe spectrometer**

A miniaturized Raman device - high efficiency Raman spectrometer (Horiba Jobin Yvon, Villeneuve d'Ascq, France) coupled with an optic fiber - RamanProbe™ (InPhotonics, Norwood, MA, USA), was used. The set-up was equipped with a laser diode delivering an excitation at 785 nm, and a Charge-Coupled Device (CCD) detector. The RamanProbe™ consisted in permanently-aligned combination of two single fibers (105  $\mu\text{m}$  excitation fiber, 200  $\mu\text{m}$  collection fiber) with filtering and steering micro-optics, N.A. 0.22, in rugged polyurethane jacket. Data acquisition and instrument control were governed by the LabSpec 5 software (Horiba Jobin-Yvon, Villeneuve d'Ascq, France). Before measurements on each patient, calibration of the Raman spectrometer was verified by using signal of neon and Raman response of a Petri dish. Dependency of the detector as function of wavelength was also evaluated by means of a NIST (National Institute of Standards and Technology) material. The incident power was adjusted at 35 mW at the probe exit. Dark current with the laser off was registered after each patient to measure the electronic noise of the

system. Raman probe was equipped with a plastic end piece which allows ensuring stability during spectral measurements, and also to adjust the working distance. The piece was alone in contact with patient skin, and was cleaned with distilled water and alcohol between each patient. Preliminary tests were performed in our laboratory on about 20 volunteers to assess the optimal working distance in terms of efficiency of Raman collection. A distance of 5 mm was thus retained.

### **In vivo spectra acquisition**

For the first 21 patients, we wanted to assess if Raman experiments is compatible with routine conditions of clinics. Acquisition time of spectra was fixed to 5 seconds with 4 iterations whatever the collected signal quality. For the next 11 patients, we acquired optimized spectra with acquisition time adjusted from 5 to 30 seconds with 3 iterations according to the fluorescence of the analyzed skin area. This was possible thanks to the collaborative dermatologist that arranged the patient recruitment to have sufficient time for the Raman acquisitions.

However, we noticed that some spectra with maximized acquisition time have poor signal-to-noise ratio (SNR), particularly when patient presented a high fluorescent skin. On the contrary, some spectra with limited acquisition time (4x5 s) displayed satisfying SNR. Finally, to construct the classification algorithm allowing to distinguish BCC from normal skin, only spectra of SNR superior to 3.75 were selected, whatever acquisition parameters. The remaining spectra were then considered as representative of degraded conditions that can be met in clinical environment.

Four specific acquisition points were defined for the *in vivo* study as displayed in the **Figure 1**. The point C was located in the center of the nodular BCC lesion, and point N outside the excised margin, at a distance of 1 to 3 cm from the lesion, where the skin was identified as clinically normal by the surgeon. When possible, 2 other spectra were recorded inside the excision margin and along the 2 axes of the ellipse defining the excision margin. These 2 spectra were named Nmargin.

### **Anatomopathologists analysis**

After surgical excision and spectral acquisition, histopathological confirmation for the type of the lesion was performed using hematoxylin and eosin staining of tissue sections from formalin-fixed paraffin-embedded excised sample. Finally, 5 lesions out of 36 were proved not to be BCC and were not considered.

### **Spectra pretreatments**

First, raw spectra have been rigorously sorted out following several steps. All experimental difficulties (*e.g.* patient or operator movement, hair presence in skin area) or particular profile of spectra (*e.g.* aberrant, spikes presence) were excluded. Then, only spectra from a particular subtype of BCC - nodular BCC - were kept. Finally, signal-to-noise ratio was evaluated for each spectrum, using the  $1440\text{ cm}^{-1}$  peak as reference, and the  $2150\text{-}2250\text{ cm}^{-1}$  spectral area for noise assessment. In total, data from 19 nodular BCC lesions were effectively exploited.

Selected spectra were cut in order to only keep the fingerprint spectral window from  $950\text{ cm}^{-1}$  to  $1750\text{ cm}^{-1}$ , which contains the main molecular information for biological samples when using dispersive Raman set-up with a  $785\text{ nm}$  excitation wavelength. Afterwards, spectra were smoothed by the Savitzky-Golay (SG) procedure, using a window length 7 and a 2<sup>nd</sup>-order polynomial, next baseline corrected using a 6<sup>th</sup>-order polynomial function and finally vector-normalized. These pretreatments were shown to improve the following classification results.

### **Spectra treatments**

Hierarchical Cluster Analysis (HCA) is an unsupervised clustering method to class data without *a priori* knowledge. This process allows grouping spectra according to their statistical similarity. To perform this processing, we use a customized Matlab software implemented in our laboratory.

HCA algorithm requires to compute metric distances between spectral clusters and to choose a method to aggregate them. Euclidean distances and Ward's criterion for linkage were selected. At the beginning, each spectrum is considered as one cluster. First, the two closest clusters are gathered in a new cluster. Then, the Euclidean distances are afresh computed by taking into account this new cluster. This process is repeated until to end up with one ultimate cluster. The result is displayed in a hierarchical tree called dendrogram.

Principal Component Analysis (PCA) is a multivariate statistical analysis method used to eliminate redundant information in vibrational spectra. Indeed, Raman spectra correspond to a quantitative assessment of electromagnetic wave scattering phenomena for a range of wavenumber called here original variables. PCA creates new synthetic variables called Principal Components (PCs) containing the main signal variance and in the same time, reduces dimensionality, and creates a new representation space. Amongst the calculated PCs, only those expressing the most variance in the data are selected. It is then possible to identify back the original variables contribution by the analysis of PC loadings, that represents the weight of each wavenumber in the variance expressed for each PC.

Linear Discriminant Analysis (LDA) is a supervised classification method which implies to have available a set of spectra already assigned to different classes by means of specific membership values. The spectrum is affected to the class which presents the highest membership value. From this database called training set, LDA algorithm finds in a first step the linear function which best discriminate these defined classes. Then, any new spectrum is positioned relative to the different classes. LDA permits to establish a prediction model.

In this paper, the model implemented is based on the combination of PCA and LDA. First, PCA is performed on spectra of training set mainly in order to suppress the redundant information, then LDA is applied on spectra projected on the computerized PCs. The validity of the model is

assessed by using Leave-One-Out Cross-Validation (LOOCV) at the patient level. This validation process consists in the exclusion of one element (one patient here) before applying PCA/LDA algorithm. Spectra of the patient left aside are then used to test the discriminant function. The result is given in terms of sensibility and specificity, according to the correct classification of spectra acquired from tumoral and normal skins respectively. LOOCV is repeated as many times as the number of patient included in the training set used to construct the prediction model. The final result is an average of the sensibility and specificity values obtained with all the loops of LOOCV.

Randfeatures Matlab function is used to identify the more discriminating wavenumbers between groups of data (90) (91) (92) (93). It run through several steps. A score is attributed to each spectral wavenumbers; before beginning the process, all scores are equal to zero. The first step is a spectral data reducing to 15 randomly selected wavenumbers. Then inside each class of spectra, mean spectrum is calculated and subtracted from each spectrum of the classes. Afterward, a LDA classification is performed at the end of which each spectrum is ascribed with a belonging percentage to the predicted clusters. Classification prediction is considered as correct for a spectrum, when his belonging percentage is superior to 50 % (confidence threshold) for its real cluster. If with the selected 15 wavenumbers, 95 % (performance threshold) of the whole spectra are correctly classified, these wavenumbers are retained and have their score incremented of 1. In other case, scores of the 15 wavenumbers remains unchanged. These steps are repeated 1000 times. Of course, one wavenumber can be randomly chosen several times. At the end of the process, the wavenumbers can be order according to their score value. It can occur several wavenumbers obtain the same score value and fill the same rank. Score value is related to the discriminant power of the wavenumber and determines its relevancy in the classification.

## RESULTS

### **Discriminating normal and lesional skin from baseline intensity of raw spectra**

As first observation, it appeared that raw spectra of normal and lesional skin in each individual differ by their level of fluorescence-like background (**Figure 2**). These spectral backgrounds originate both from optical system used for experiments (Raman probe in particular) and from skin conditions. Interestingly, we observed that – without any pretreatment – spectra of one BCC lesion present a lower fluorescence-like background than neighboring normal skin. This occurs when looking at whole spectra from each patient separately. This could be explained by extracellular matrix degradation during skin tumor development, leading to the loss of the main fluorophore dermal compounds: collagen and elastin crosslinks (50) (51).

But fluorescence-like background level changed considerably amongst patients, and the observation of the spectra of all patients together didn't allow a visual distinction of tumor from normal skin due to this strong interpatient variability. Nevertheless, it could be interesting to make use of this background as a preliminary exploration step by performing a rapid mapping of the skin, in order to roughly localize the limit between normal skin and altered skin before performing Raman measurements.

### **Discriminating nodular BCC and normal skin Raman spectra with unsupervised classification method**

Set of raw Raman spectra (18 C spectra and 31 N spectra) was first preprocessed as mentioned in Material and Method paragraph (950-1750  $\text{cm}^{-1}$  cutting, SG smoothing, polynomial baseline correction and vectorial normalization) in order to correct fluorescence-like background. Resulting tumoral and normal skin mean spectra are displayed in **Figure 3a**, with their respective standard

deviation. At a first sight, it appeared numerous spectral differences which can be possibly discriminative between the two types of spectra. In order to assess the relevancy of these specific spectral signatures, HCA processing was performed to cluster the spectra according their statistical similarity (**Figure 3b**). We were indeed able to see a rather good clustering of *in vivo* spectra acquired from nodular BCC and normal skin. The HCA processing led to a sensitivity of 88.8 % and a specificity of 93.5 %, confirming that Raman spectra contained intrinsic discriminative spectral features.

### **Discriminating Model development for clinical projection**

In order to implement an algorithm able to automatically recognize nodular BCC spectra from normal skin spectra, PCA/LDA algorithm using LOOCV method was employed. Spectra set used for this step is the same than for the HCA previously shown and was pretreated in the same way, plus a final subtraction of mean spectra of the set, allowing to more easily access to the discriminating information between the two clusters. Several numbers of PCs were tested, and we finally retained the eight first PCs, which appeared the best compromise between specificity and sensitivity as the resulting model achieved the values of 96.77 % and 100 % respectively with spectra of good SNR (superior to 3.75). Considering additional PCs didn't improve the discriminating power of the algorithm. In addition, beyond the eighth rank, PCs presented an important noise content. The cumulated variance of these eight first PCs represented 71.11 % of the total variance.

In order to project our approach for possible clinical use, the model was run on an external test of 11 spectra of SNR lower than 3.75, mimicking degraded acquisition conditions. Among them, 3 acquired on normal skin were correctly classified in the normal skin class. For the 8 acquired from nodular BCC, only 3 presented a probability of belonging to tumoral skin higher

than for the normal skin class. However, it appeared that the misclassified spectra of this external set presented the lowest SNR (inferior to 3). This result shows the importance to implement in real-time quality tests during spectra acquisition to ensure the reliability of the spectral diagnosis.

### **Investigation of the data variance by PCA**

Then we investigated the PC loadings of the implemented algorithm to highlight which wavenumbers contribute to the variance. Eight PCs were chosen for constructing the model, but the majority of information were contained in the first three, which explain half of the variance: 20.2 %, 19.78 % and 9.72 % of the variance for PC1, PC2 and PC3 respectively. More precisely, the spectral regions corresponding to 990-1010  $\text{cm}^{-1}$  (polysaccharides, symmetric breathing of phenylalanine cycle), 1082-1096  $\text{cm}^{-1}$  (polysaccharides, hydrocarbon chain of ceramide,  $\text{PO}_2^-$  symmetric vibration of DNA), 1280-1310  $\text{cm}^{-1}$  (amide III,  $-\text{CH}_2$  lipids, saccharides, nucleotides), 1316-1350  $\text{cm}^{-1}$  (proteins, lipids, nucleotides, polysaccharides), 1531-1543  $\text{cm}^{-1}$  (C=C, N-H) and 1631-1653  $\text{cm}^{-1}$  (C=O amide I, C=C lipids) were identified (**Figure 4**) (94).

### **Spectral markers identification**

In addition to the analysis of PC loadings and to focus on the most discriminant wavenumbers between nodular BCC and normal skin, the Randfeatures Matlab function was used to make a variable selection. This algorithm allows to assign a score related to the discriminating power for each of the 801 wavenumbers of the selected spectral windows 950-1750  $\text{cm}^{-1}$ . The identified wavenumbers were classified from the most discriminating to the least. **Figure 5a** depicts the ordering of the wavenumbers. The most discriminating wavenumber with a score of 90 corresponds to 1324  $\text{cm}^{-1}$ . In our approach, we retained the 76<sup>th</sup> first wavenumbers scoring from 90 to 29. This

last point was selected since it corresponded to a particular point with a change in the slope of the curve as visible in **Figure 5a**.

These 76 most discriminant wavenumbers were used to perform a HCA classification on *in vivo* spectra. A performance of 100 % of sensitivity and 100 % of specificity were achieved when discriminating between normal and tumoral spectra (*data not shown*). These wavenumbers have been highlighted with purple vertical lines in **Figure 5b**. It has been noticed that many of them match to wavenumbers contributing to the variance of the first three PCs used in the implemented prediction model (see **Figure 4**). In order to best visualize which wavenumbers have the strongest discriminant power, the 32 wavenumbers filling the 21<sup>st</sup> rank (score above 38) are framed by black vertical lines and ranged from 1 to 4 according to their respective decreasing score as illustrated in **Figure 5a**. Wavenumbers with higher discriminating powers, belonging to the 1322-1331 cm<sup>-1</sup> and 1342-1345 cm<sup>-1</sup> spectral window (circled number 1), are attributed to the nucleotide and protein content of the skin. Secondly, were identified wavenumbers from the 1116-1120 cm<sup>-1</sup> and 1148-1149 cm<sup>-1</sup> spectral windows attributed to polysaccharides (circled number 2), followed by wavenumbers mainly attributed to the Amide I band, precisely 1640 cm<sup>-1</sup>, 1645-1647 cm<sup>-1</sup> and 1697 cm<sup>-1</sup> (circled number 3). In fourth position, the 1020-1022 cm<sup>-1</sup> wavenumbers attributed to polysaccharides, and few wavenumbers belonging the 1728-1746 cm<sup>-1</sup> spectral window (circle number 4), which can be attributed to lipids (94). The discriminant powers of these last wavenumbers is hard to determine due to their positioning at the cutting edge of the spectral range (**Figure 5b**).

### **Assessment of the excision lateral margin**

After having demonstrated the ability of Raman probe to distinguish nodular BCC from normal skin, we compared spectra collected in the neighboring of the lesion, to the spectral signatures of

the two reference classes (tumor and normal skin) previously determined by the LDA prediction model. For that, 16 “Nmargin spectra” surrounding 9 lesions were submitted to the model that gave for each spectrum the membership probabilities to the two reference classes. **Table 1** indicates these membership values for the Nmargin spectra arranged according to the distance of the measurement point from the tumor. Since Nmargin points were acquired near cutting edge of the exeresis, this distance also allowed to know the width of excision margin. Logically, a majority of the Nmargin spectra (12/16) presented a membership to the normal skin class. However, 4 spectra were classified in the tumoral skin class. We noticed these spectra were collected at the shorter distance from tumor edge. The result could reflect malignity features in the *in vivo* probed skin areas, meaning that excision margins would have been too narrow. Interestingly, one of these 4 acquisition points (marked in **Table 1** with asterisks) belongs to the only BCC lesion of the study for which exeresis were not considered as complete after histopathological assessment.

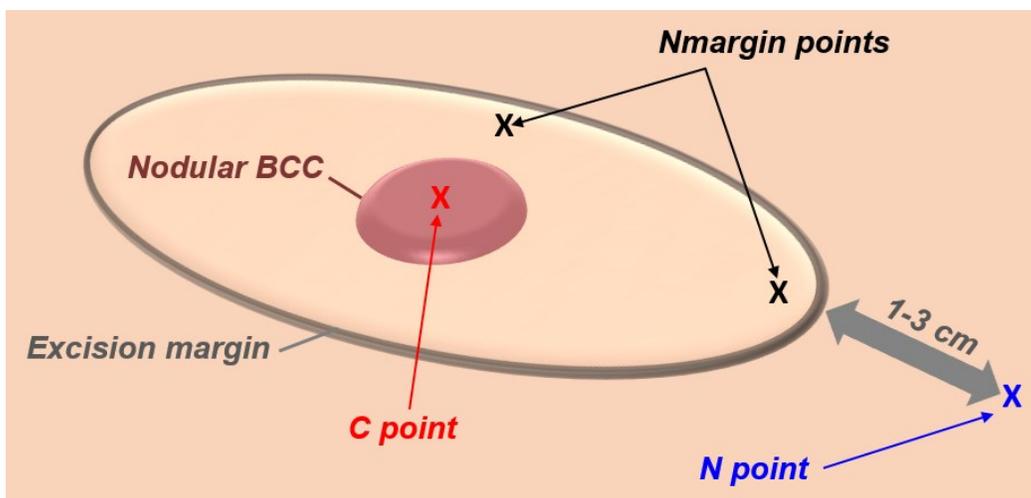
## DISCUSSION

BCC diagnostic performance of dermatologists was estimated at 70 % (26). They can improve their score by using dermoscopy, but only those who are the more experienced with this technique are able to attain 96 % of sensitivity and 92 % of specificity (11). On the contrary, a device of Raman spectroscopy can be implemented with an intuitive software requiring a minimal training period without particular expertise in biophotonics nor in data processing and it could be even used in first line by general practitioner. This biophotonic technique can be a relevant automatic tool to improve dermatologists' performance since it has the potential to discriminate *in vivo* BCC lesions from normal skin as demonstrated in this study. Moreover, we can notice that all C spectra were correctly classified as tumoral skin with our algorithm, and this is an important critical point not to miss out a tumoral skin lesion which has to be removed. Spectral windows 1322-1331  $\text{cm}^{-1}$  and 1342-1345  $\text{cm}^{-1}$ , mainly attributed to nucleotides and proteins, presented the higher discriminating value.

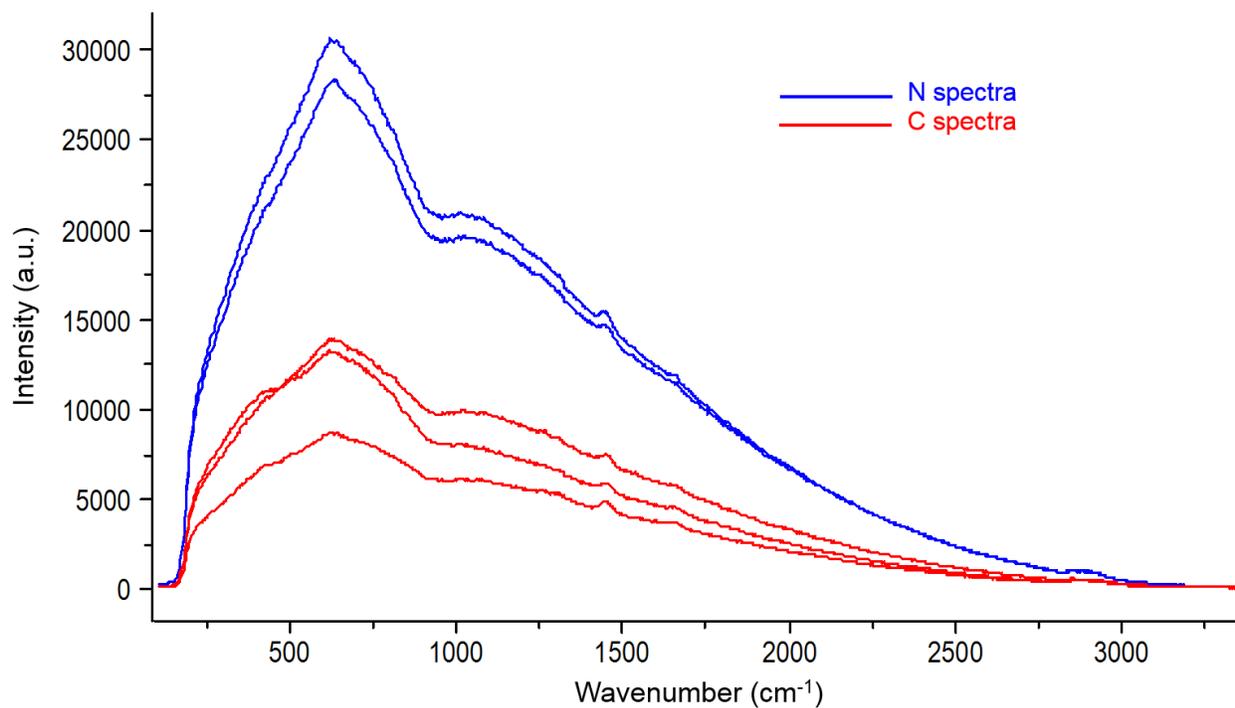
About exeresis margin assessment, we use spectra acquired on “supposed non tumoral” skin located inside the excision margin (Nmargin spectra). It appears that four of these spectra have a high probability of membership to tumoral skin. Interestingly, these spectra corresponded to BCC lesions for which excision margins were narrow. And amongst them, one corresponded to the only BCC lesion for which a new surgery was required.

Moreover, we have found out that fluorescence-like background of *in vivo* Raman spectra are less important when acquired on BCC lesion than on normal skin. This difference at the level of the intensity in spectral background was also observed *in vitro* on skin thin sections (*data not shown*). This is mainly explained by extracellular matrix degradation in BCC. We can propose to use this distinctive feature in order to rapidly map the skin with short acquisition time (less than 1 second). In this way, it would be possible to approximatively delineate the tumor previously to Raman acquisitions which require longer acquisition time especially to ensure data quality.

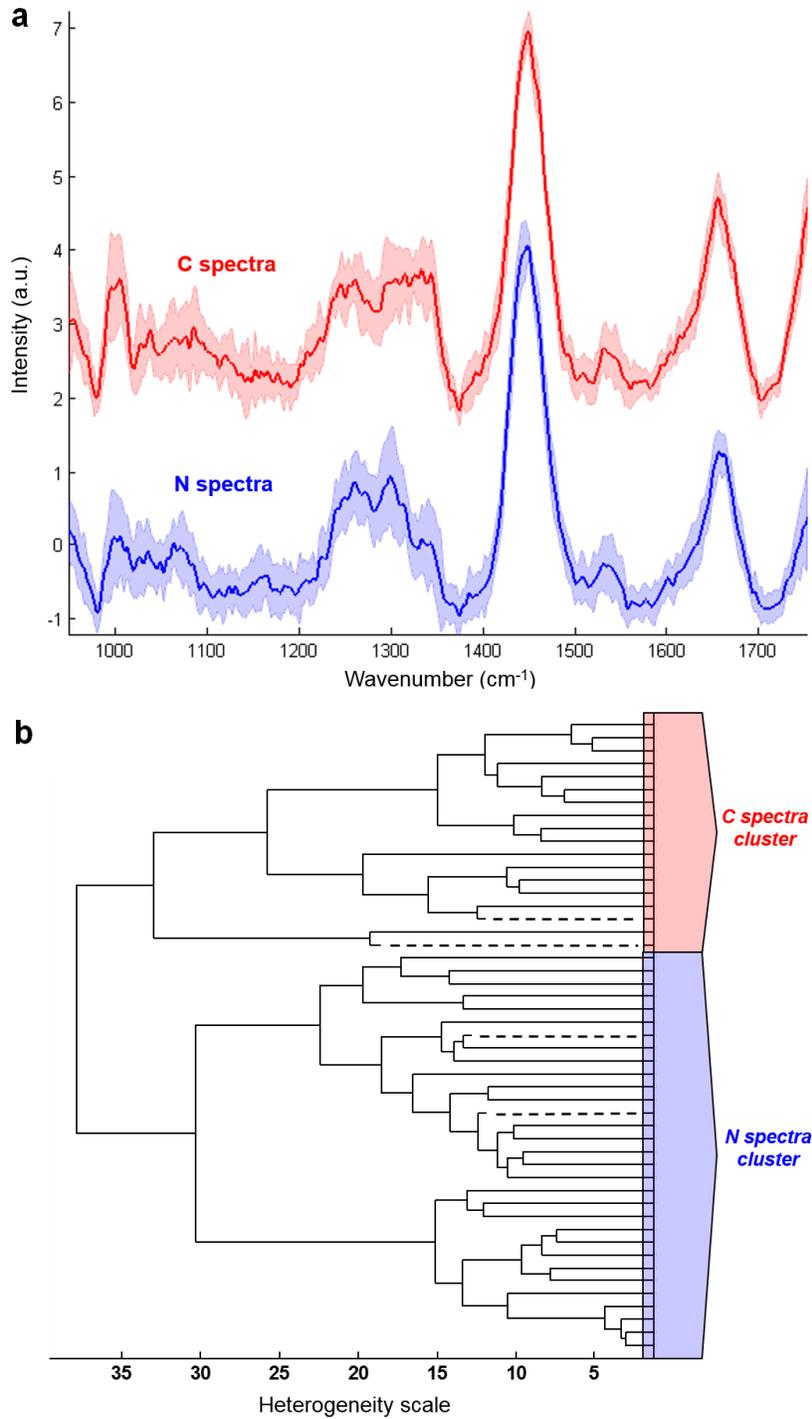
In the future, the prediction model will be reinforced by including a substantial number of supplementary patients, in order to taking into account the spectral variability of the skin. It will also be enriched with Raman signal from lesions often confused with BCC.



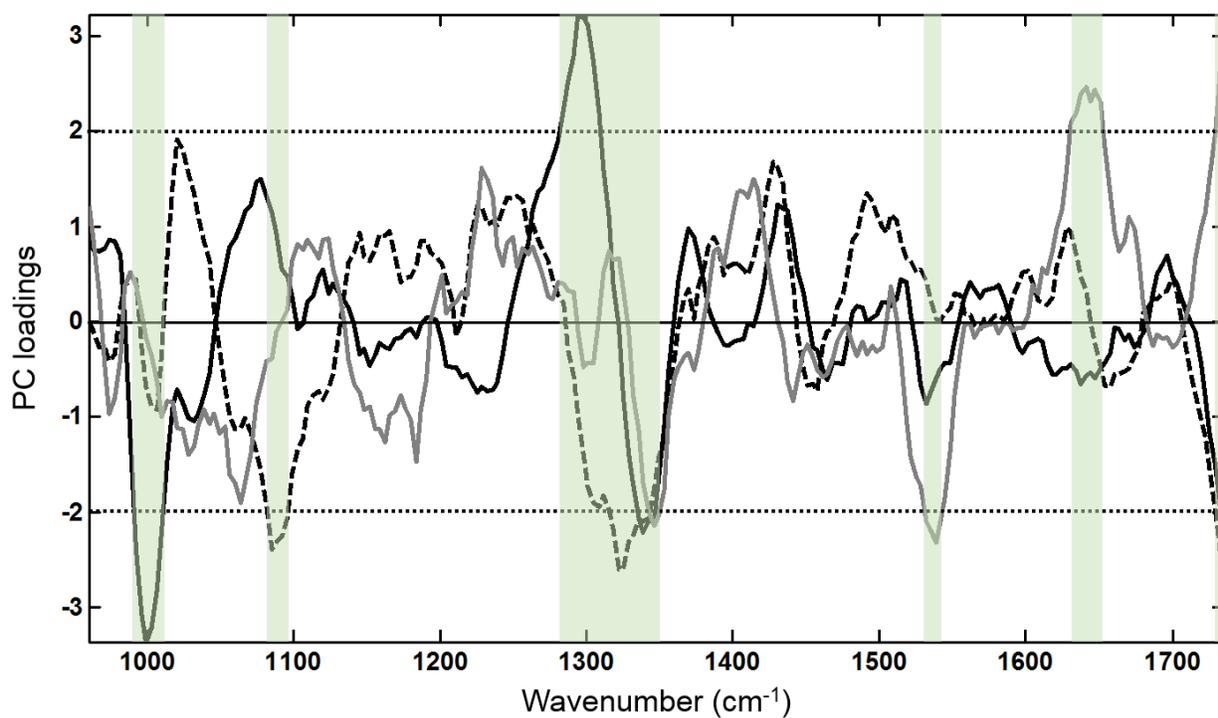
*Figure 1. Schematic view of the 4 acquisition points chosen for the in vivo BCC study. The excision margin defined by the surgeon is materialized. In most cases, excision skin area was ellipse-shaped as drawn, in order to facilitate surgical reconstruction.*



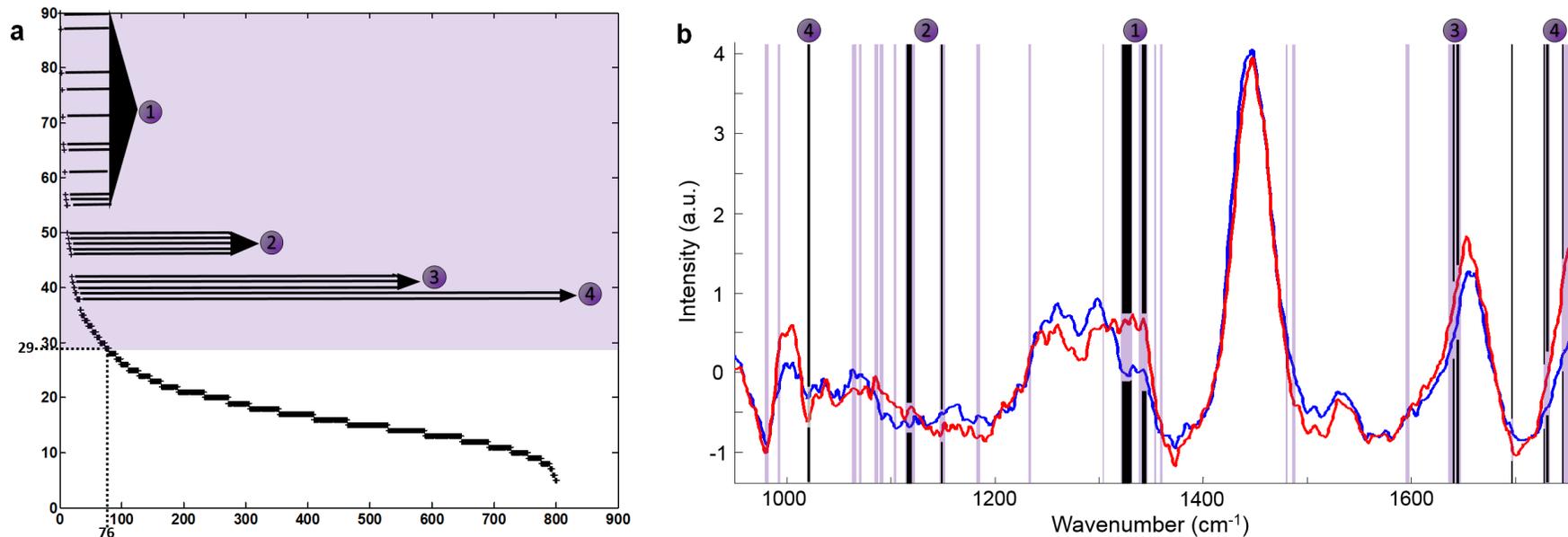
*Figure 2. Raw Raman spectra registered using the in vivo Raman probe spectrometer before BCC exeresis. Red spectra correspond to tumoral spectra and blue one to adjacent skin spectra (C spectra and N spectra, respectively). All spectra were acquired with same acquisition parameters (5x4 s acquisition time). Spectra were only offset-corrected and are representative of overall data obtained.*



**Figure 3.** Pre-processed C and N spectra submitted to HCA. (a) Mean and standard deviation of C (in red) and N (in blue) spectra. (b) Dendrogram obtained after HCA processing of the set of in vivo spectra. Two spectra among the 31 spectra from normal skin, and 2 among 18 from nodular BCC, were misclassified and materialized by dotted lines.



**Figure 4.** Loadings of the 3 first principal components. PC1: black solid line. PC2: dotted line. PC3: gray line. Predominant vibrational bands of the loadings are highlighted within the green frames.



**Figure 5. Identification of discriminating wavenumbers using Randfeatures processing.** (a) Values of the discriminant score assigned to the 801 wavenumbers of the 950-1750 cm<sup>-1</sup> spectral window. The identified wavenumbers are ordered from the most discriminant to the least, with associated scores spreading from 90 to 5. The 76 most discriminant wavenumbers (score ≥ 29) are indicated by the purple frame. The first 32 wavenumbers (score ≥ 38) are materialized with black horizontal lines, they can be grouped in 4 distinct spectral regions. (b) The 76 most discriminant wavenumbers have been reported for visualization on mean in vivo pre-processed spectra of normal (blue spectrum) and tumoral skin (red spectrum). Black lines indicate the 32 most discriminating wavenumbers, and purple lines the following 44 wavenumbers.

**Table 1. Membership probabilities to normal or tumoral skin classes for Nmargin spectra**

<b><u>Probability of membership to normal skin areas</u></b>	<b><u>Probability of membership to tumoral skin areas</u></b>
<b>d<sup>1</sup> &lt; 2 mm</b>	
< 0.001	> 0.999
> 0.999	< 0.001
> 0.999	< 0.001
0.435*	0.565*
0.993	0.007
> 0.999	< 0.001
> 0.999	< 0.001
> 0.999	< 0.001
0.178	0.822
<b>2 mm &lt; d &lt; 3 mm</b>	
0.018	0.982
> 0.999	< 0.001
> 0.999	< 0.001
> 0.999	< 0.001
> 0.999	< 0.001
<b>3 mm &lt; d &lt; 5 mm</b>	
> 0.999	< 0.001
> 0.999	< 0.001

<sup>1</sup> The Nmargin spectra have been collected at different distances d from the edge of the BCC lesion.

\* Spectrum collected at the vicinity of the lesion for which exeresis were not complete.

3. Résultats non concluants

Variabilité intratumorale

Les spectres Raman C' permettent d'étudier l'hétérogénéité tumorale des CBC nodulaires *in vivo*. A l'issue des différentes étapes de tri des données, 8 spectres C' de rapport signal sur bruit supérieur à 3,75 collectés sur 4 lésions et issus de 4 patients différents sont disponibles. Les spectres ont subi le même prétraitement que celui décrit dans le papier soumis ci-dessus, et tout comme les spectres N', leurs probabilités d'appartenance aux deux classes de référence (peau normale et peau tumorale) définies par le modèle de prédiction LDA ont été calculées. De manière surprenante, pour chaque patient, 1 spectre sur 2 a une plus haute probabilité d'appartenir à une zone cutanée non tumorale. Le choix des points d'acquisition des spectres *in vivo* semble expliquer cette observation (**Figure 43**).

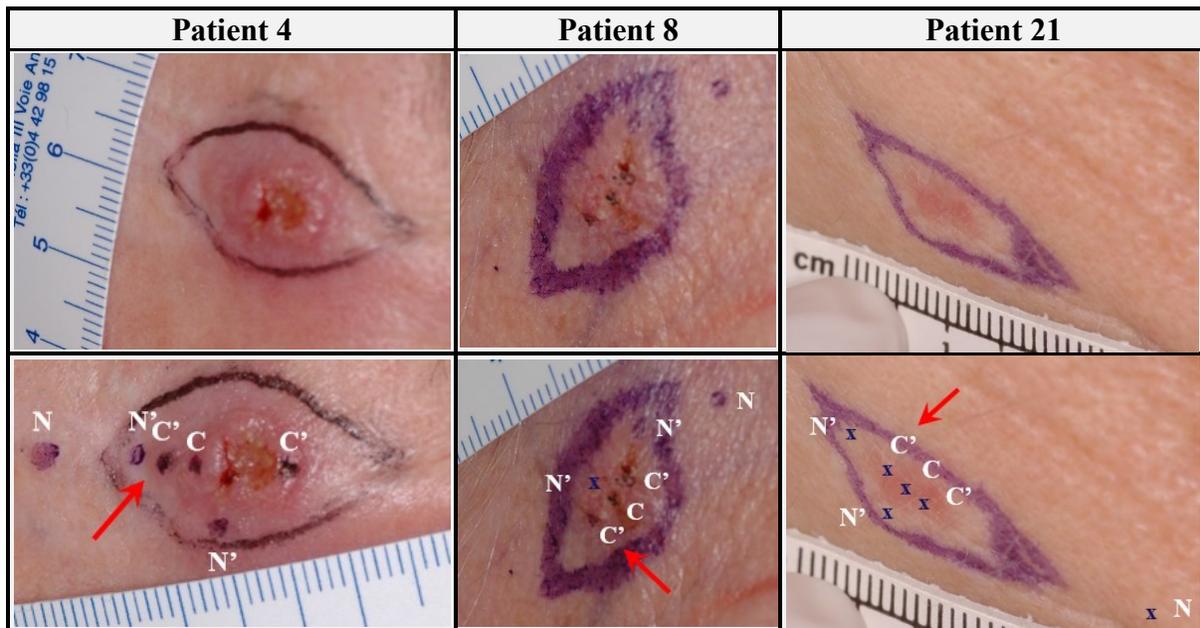


Figure 43 Photographies des lésions utilisées pour l'évaluation de la variabilité intratumorale. Localisation des points d'acquisition des spectres Raman *in vivo*. Les photographies du CBC nodulaire *in vivo* du patient 1 ne sont pas disponibles. Les flèches rouges indiquent les points C enregistrés en limite des zones tumorales.

On remarque en effet sur les photographies des patients 8 et 21 qu'un point C' sur deux se trouve dans une zone plus limite du CBC. Le cas du patient 4 est un peu différent puisque la lésion est surélevée. On remarque qu'un des points C' a été enregistré en dehors de la partie en relief du CBC (spectre enregistré sur la zone cutanée avoisinante particulièrement rouge). La photographie de la lésion du patient 1 n'est pas disponible mais il est fort probable que l'on se retrouve dans un cas de figure similaire.

En résumé, le modèle de prédiction que nous avons développé reconnaît bien comme tumoraux les points C', non acquis au centre de la lésion, mais se situant quand-même avec certitude en zone tumorale. Le modèle semble donc bien prendre en compte l'hétérogénéité tumorale existante en surface cutanée. Par contre, les points C' dont la localisation est plus ambiguë et/ou qui se trouvent à la limite des zones cutanées tumorales et non tumorales, ne sont pas reconnus comme tumoraux. Il doit donc exister dans ces régions cutanées limitrophes une coexistence de caractéristiques de peau tumorale et de peau saine. L'existence d'un gradient de « malignité » est possible. Le faible nombre de spectres C' ne nous permet pas d'analyse plus approfondie.

### Variabilité intra- et inter-patient

La fonction Matlab Randfeatures permet d'identifier les longueurs d'onde discriminantes entre deux groupes de spectres et de les classer selon leur pouvoir discriminant. L'utilisation des 76 premières longueurs d'onde les plus discriminantes - obtenues avec cet algorithme - pour la réalisation d'une CHA permet une discrimination parfaite des spectres C et N, avec 100 % de sensibilité et de spécificité (cf. publication soumise).

Cependant au sein de notre panel de spectres, il existe d'autres sources de variabilité de la peau liées aux caractéristiques physiologiques propres à chaque individu (ex : le sexe, l'âge, le type de peau, le phototype, les variations hormonales, l'indice de masse corporelle, le temps cumulé d'exposition solaire), et aux propriétés tissulaires variant d'une localisation à une autre au sein d'un même individu (ex : l'épaisseur, la pilosité, le relief, l'hydratation, la pigmentation, les dommages liés à l'exposition solaire, les structures subcellulaires, les différences en composition lipidique et protéique) (95).

Par conséquent, nous nous sommes demandé dans quelle mesure la variabilité intracutanée ou interpatient peut-elle influencer les résultats de classification ? Nous avons donc testé des combinaisons différentes de longueurs d'onde pour réaliser la CHA, et nous avons constaté que bien que les résultats de classification obtenus sont moins bons, les spectres de notre étude se regroupent quand-même préférentiellement selon leur caractère C ou N. Par exemple si on sélectionne la totalité de la fenêtre spectrale d'acquisition, on obtient une sensibilité de 93,5 % et une spécificité de 88,8 % (cf. publication soumise). Le caractère « tumoral » ou « sain » est donc reconnu par la méthode de spectroscopie Raman comme la source de variabilité physiologique la plus importante entre les spectres. Et au sein de chacun des deux groupes C et N, on peut observer encore au niveau du dendrogramme des regroupements entre spectres. Ces regroupements sont-ils liés à un paramètre physiologique particulier ?

Pour répondre à cette question, nous nous sommes reportés aux informations disponibles sur les fiches-patients remplies par le chirurgien dermatologue. Le **Tableau 8** rassemble les données relatives à ces sources de variabilité cutanée intrapatient ou interpatient. Cinq critères peuvent être pris en compte : l'âge du patient, le sexe du patient, le type de peau, le phototype et la région cutanée évaluée.

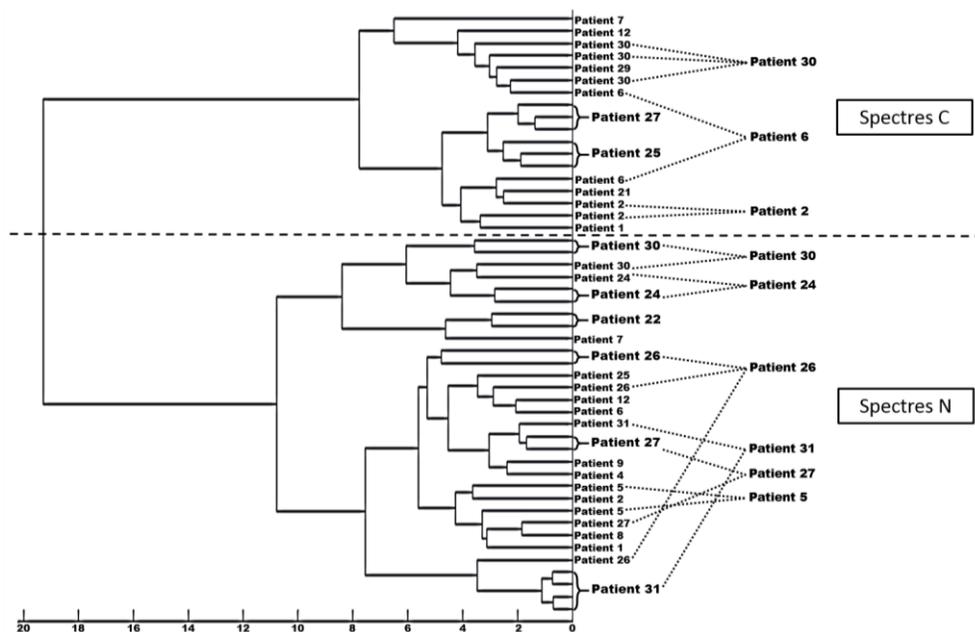
	<i>Sexe</i>	<i>Type de peau</i>	<i>Phototype</i>	<i>Région cutanée</i>	<i>Age</i>
<b>Patient 1</b>	F	Sèche	2	Front	85
<b>Patient 2</b>	H	Sèche	2	Front	65
<b>Patient 4</b>	F	Grasse	2	Front	88
<b>Patient 5</b>	F	Sèche	3	Tempe	51
				Cou	
<b>Patient 6</b>	H	Sèche	3	Tempe	83
				Joue	
<b>Patient 7</b>	H	Sèche	2	Joue	63
<b>Patient 8</b>	F	Sèche	2	Tempe	77
<b>Patient 9</b>	F	Grasse	3	Joue	92
<b>Patient 12</b>	F	Grasse	3	Paupière	77
<b>Patient 21</b>	F	Sèche	2	Cou	84
<b>Patient 22</b>	H	Sèche	2	Tempe	72
<b>Patient 24</b>	H	Sèche	3	Joue	82
<b>Patient 25</b>	H	Grasse	2	Front	52
<b>Patient 26</b>	F	Sèche	2	Tempe	77
<b>Patient 27</b>	H	Sèche	2	Tempe	69
<b>Patient 29</b>	H	Sèche	2	Nez	77
<b>Patient 30</b>	H	Grasse	2	Nez	67
<b>Patient 31</b>	F	Grasse	2	Tempe	79

*Tableau 8* Détail des caractéristiques individuelles et cutanées du panel de patient susceptibles d'entraîner des variations physiologiques de la peau interpatient ou intrapatient, pour les 18 patients et 20 lésions sélectionnés de l'étude *in vivo*.

Une recherche bibliographique montre que l'influence de ces facteurs sur l'état physiologique cutané est variée et complexe. Sommairement, on peut dire que les hommes ont une peau plus épaisse et pigmentée que les femmes, et que l'âge entraîne une évolution importante du relief cutané (déstructuration du réseau microdépressionnaire et développement des rides) et affecte aussi certaines propriétés cutanées telles que son élasticité ou son éclat. Les peaux qualifiées de « grasses » résultent principalement d'une suractivité des glandes sébacées, et les peaux dites « sèches » d'une modification de la cohésion et de la fonctionnalité des cornéocytes. Les phototypes définis par Fitzpatrick sont issus d'une classification des différentes qualités de peaux à partir de la couleur des cheveux et de la carnation des individus, ainsi que de la présence ou l'absence d'éphélides. Cette classification permet de prédire les réactions cutanées vis-à-vis des irradiations UV. Les différences physiologiques entre les sujets de phototypes clairs, et ceux de phototypes foncés sont généralement plutôt quantitatives que qualitatives. En effet, la structure cutanée est similaire, mais l'on peut observer par exemple, pour les phototypes clairs, des mélanosomes de taille plus petite et concentrés au niveau des couches superficielles de l'épiderme,

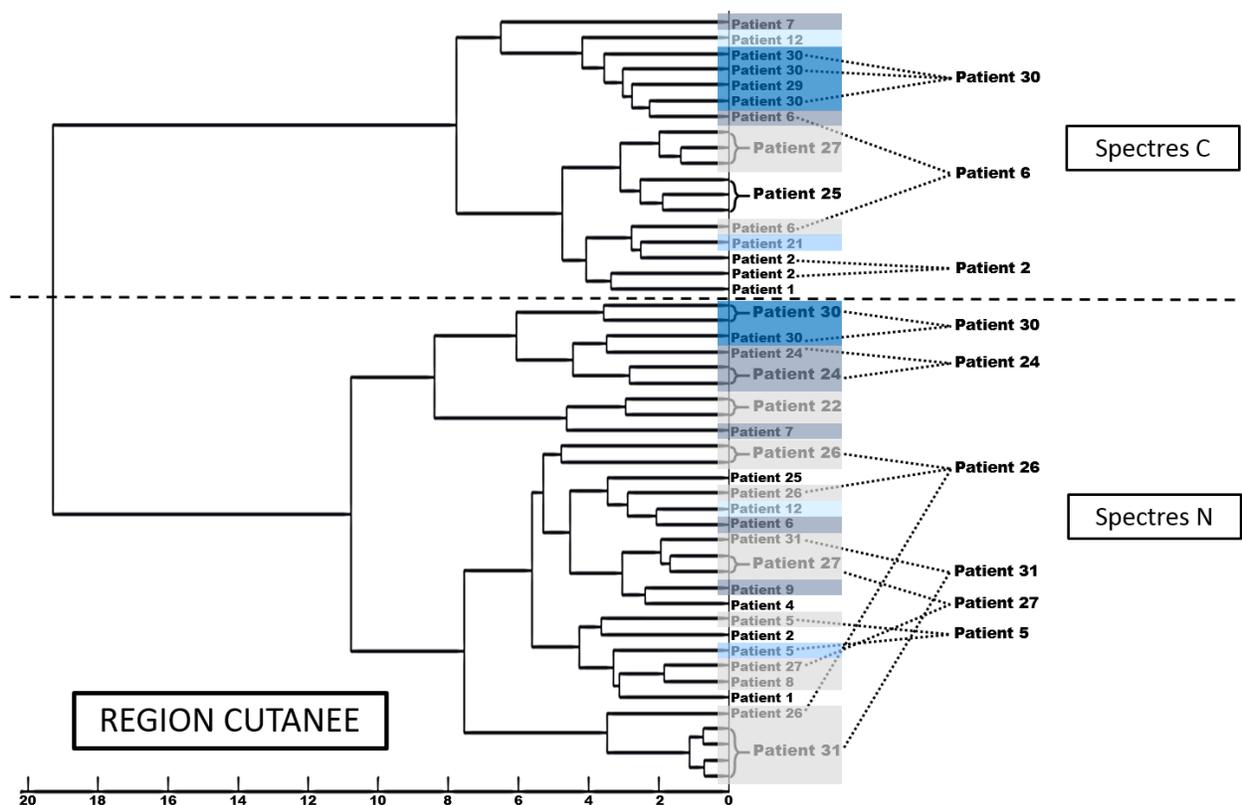
ou encore des cornéocytes moins nombreux dans la couche cornée. De plus comme nous l'avons abordé plus haut, chez un même individu, des différences physiologiques importantes existent aussi selon le site anatomique de mesure, et également à l'intérieur d'un même site anatomique. Ainsi concernant l'épaisseur cutanée par exemple, une étude menée chez une population d'origine caucasienne a montré que cette épaisseur était inférieure au niveau de l'avant-bras par rapport au front, mais l'on peut aussi mesurer des différences d'épaisseur au sein même de l'avant-bras ou du front (96).

La **Figure 44** montre le résultat de CHA obtenu avec les 49 spectres enregistrés *in vivo* éligibles pour la construction d'un algorithme de discrimination, et en utilisant les 76 longueurs d'onde les plus pertinentes identifiées avec la fonction Matlab Randfeatures. On peut voir sur le dendrogramme obtenu que les spectres se séparent en 2 clusters principaux : l'un regroupe la totalité des spectres C (enregistrés sur un CBC) et l'autre la totalité des spectres N (enregistrés sur la peau environnante). En observant isolément chacun de ces clusters principaux, on remarque que les spectres issus d'un même individu ont majoritairement tendance à se regrouper dans des sous-clusters. Il y a donc bien - dans le résultat obtenu - une influence de la variabilité existant entre les patients.



*Figure 44 Dendrogramme résultant de la classification des 49 spectres in vivo pris en zones cutanées tumorales (spectres C) ou avoisinant les tumeurs (spectres N). Les spectres issus d'un même patient sont indiqués par des accolades quand ils sont regroupés en sous-cluster ou par des traits pointillés lorsque ce n'est pas le cas. Remarque : les 2 spectres C du patient 6 proviennent de 2 lésions différentes.*

Afin d'évaluer l'influence de la variabilité intrapatient, les origines anatomiques d'enregistrement des spectres ont été mises en évidence sur la **Figure 45**. Il n'est pas observé clairement sur le dendrogramme de regroupements des spectres enregistrés au niveau d'un même site anatomique. La variabilité intrapatient semblerait donc moins importante que la variabilité interpatient. Mais ce postulat doit être nuancé car tous les spectres *in vivo* utilisés pour la CHA ont été enregistrés au niveau du visage. La variabilité de la peau sur les différentes parties du visage n'est peut-être pas suffisamment importante pour pouvoir agir sur le résultat de classification. En effet, bien qu'il soit rapporté dans la littérature un impact de la variabilité intracutanée sur les résultats obtenus en spectroscopie Raman, cela concerne généralement des mesures sur des sites anatomiquement plus éloignés. D'autre part, les variabilités intrapatient et interpatient ne s'excluent pas l'un l'autre et existent simultanément, ce qui peut expliquer que la variabilité de la peau du visage - qui paraît relativement plus faible - soit masquée par celle existant entre les différents individus ayant participé à l'étude.



*Figure 45* Dendrogramme résultant de la classification des 49 spectres *in vivo* pris en zones cutanées tumorales (spectres C) ou avoisinant les tumeurs (spectres N). Le code couleur permet de différencier les sites anatomiques d'enregistrement des spectres (cf. Tableau 8) : le front (blanc), les tempes (gris clair), les joues (gris foncé), les paupières (bleu clair), le cou (bleu intermédiaire), le nez (bleu foncé).

Regardons à présent plus en détail les différentes sources de variabilité interpatient : l'âge, le sexe, le type de peau et le phototype des patients sont considérés dans les **Figure 46**, **Figure 47**, **Figure 48** et **Figure 49** respectivement. Concernant l'influence du sexe des patients (**Figure 46**), on observe deux groupes distincts dans le cluster des spectres N : le premier ne contenant que des spectres de 4 patients masculins, le second avec une majorité de spectres de patients féminins (8 femmes pour 4 hommes représentés dans ce sous-cluster). Par contre, aucun rassemblement des spectres selon l'âge des patients n'est visible sur le dendrogramme (**Figure 47**), et cela même en considérant seulement deux groupes qui distingueraient les patients « les plus jeunes » (de 51 à 69 ans) des patients « les plus âgés » (de 72 à 92 ans). Concernant l'influence du type de peau sur la classification, on peut observer dans la **Figure 48** un regroupement des spectres N des patients 6 et 9 à peaux grasses. Pour le phototype, on remarque dans la **Figure 49** l'existence d'un sous-cluster regroupant les spectres des patients 6 et 12 de phototype 3. Cependant pour ces deux derniers cas, il s'agit de clusters isolés non représentatifs des tendances du reste du dendrogramme. Il apparaît donc que - parmi les différents critères de variabilité interpatient analysés ici - le sexe des patients est celui qui impacte le plus le résultat de classification. Toutefois, notre panel de patients n'inclut que des individus relativement âgés (plus de 51 ans) et de phototypes proches (2 et 3), ce qui peut expliquer l'absence d'effet visible de ces critères dans le résultat. Et concernant le type de peau (gras ou sec), il existe une part de subjectivité dans cette classification pouvant gêner pour ce type d'étude.

Si l'on s'attarde sur le cluster regroupant les spectres C, il est difficile d'observer une quelconque influence de ces critères dans le rassemblement de ces spectres, même s'agissant du sexe des patients. En effet, les spectres C de notre étude ont été enregistrés sur 7 hommes et 3 femmes, et les spectres issus de ces-dernières sont clairement dispersés dans des sous-clusters différents (**Figure 46**). Cependant on dispose de moins de spectres C que de spectres N, ce qui pourrait expliquer l'absence de retentissement visible de ce critère dans le dendrogramme obtenu. De plus, les spectres C sont enregistrés sur des tumeurs cutanées ; hors, les critères de variabilité interpatient étudiés sont avant tout définis pour la peau saine. En outre, pour un même type de tumeur cutanée, la variabilité de la peau tumorale interpatient (tout comme la variabilité intrapatient) est logiquement moins importante que celle de la peau saine d'architecture complexe.

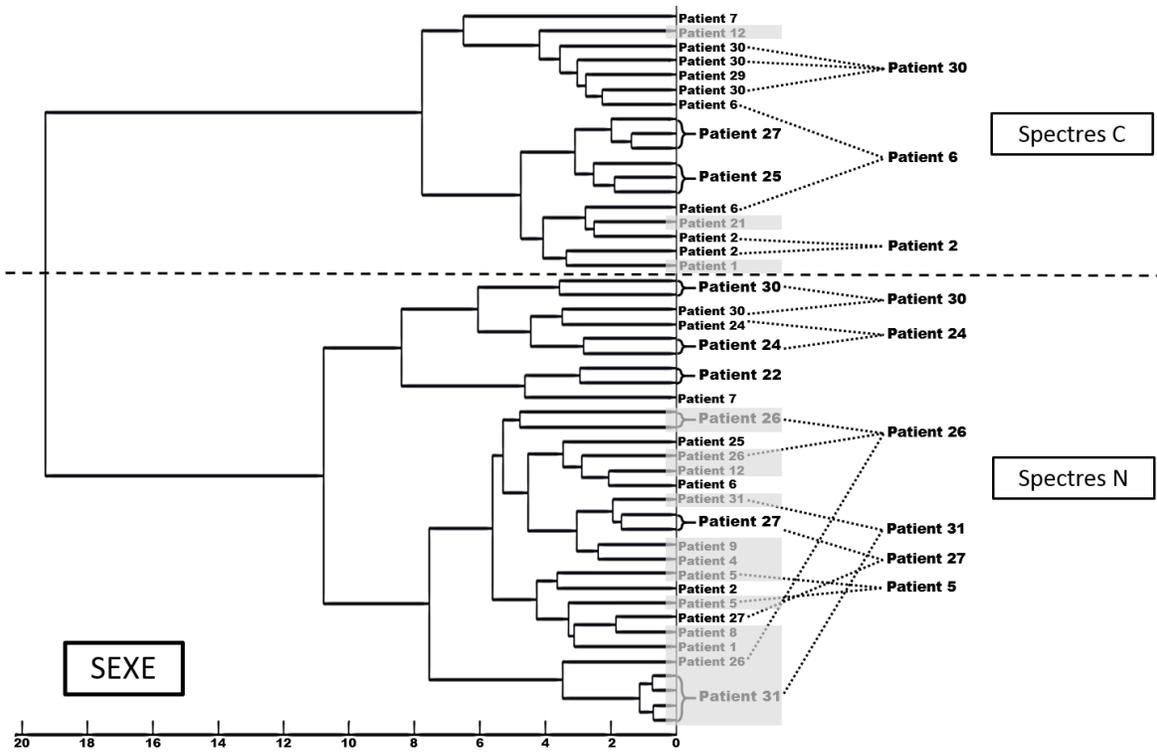


Figure 46 Dendrogramme résultant de la classification des 49 spectres *in vivo* pris en zones cutanées tumorales (spectres C) ou avoisinant les tumeurs (spectres N). Le surlignage gris indique les spectres enregistrés sur des patients de sexe féminin (cf. Tableau 8). Les autres spectres ont été enregistrés sur des hommes.

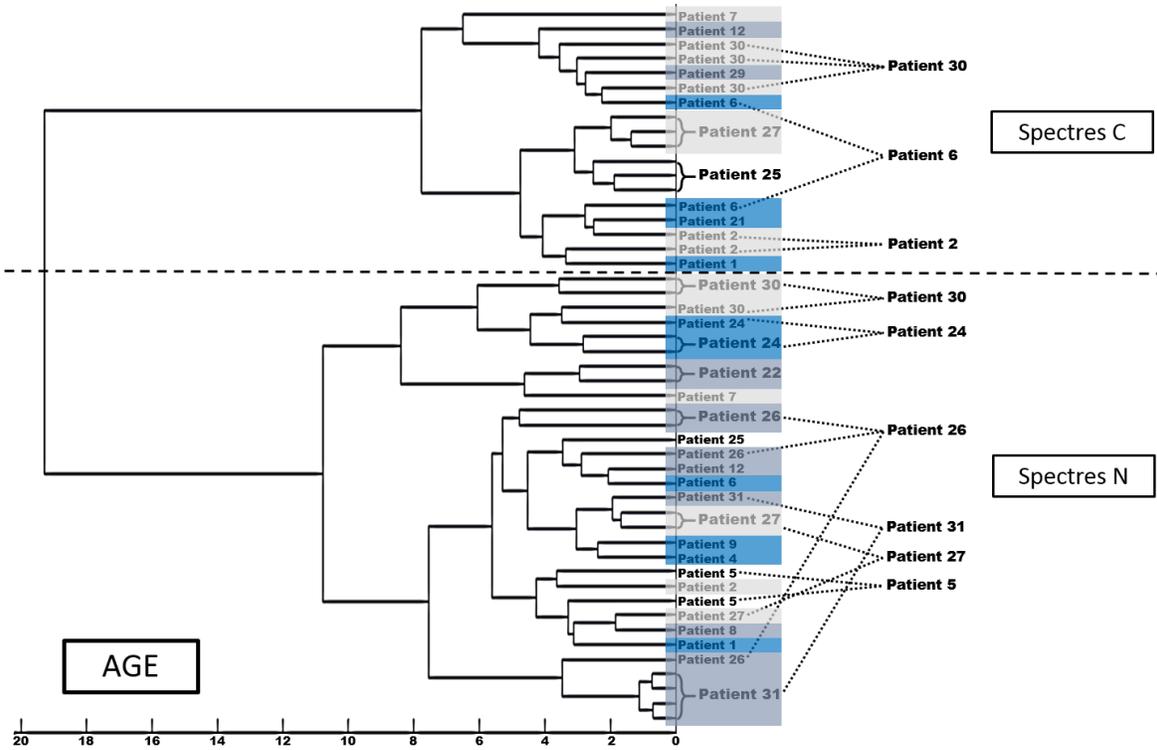


Figure 47 Dendrogramme résultant de la classification des 49 spectres *in vivo* pris en zones cutanées tumorales (spectres C) ou avoisinant les tumeurs (spectres N). Le code couleur permet d'identifier dans quelle tranche d'âge se situe les patients sur lesquels ont été mesurés les spectres (cf. Tableau 8) : 50-60 ans (blanc), 60-70 ans (gris clair), 70-80 ans (gris foncé), 80-90 ans (bleu).

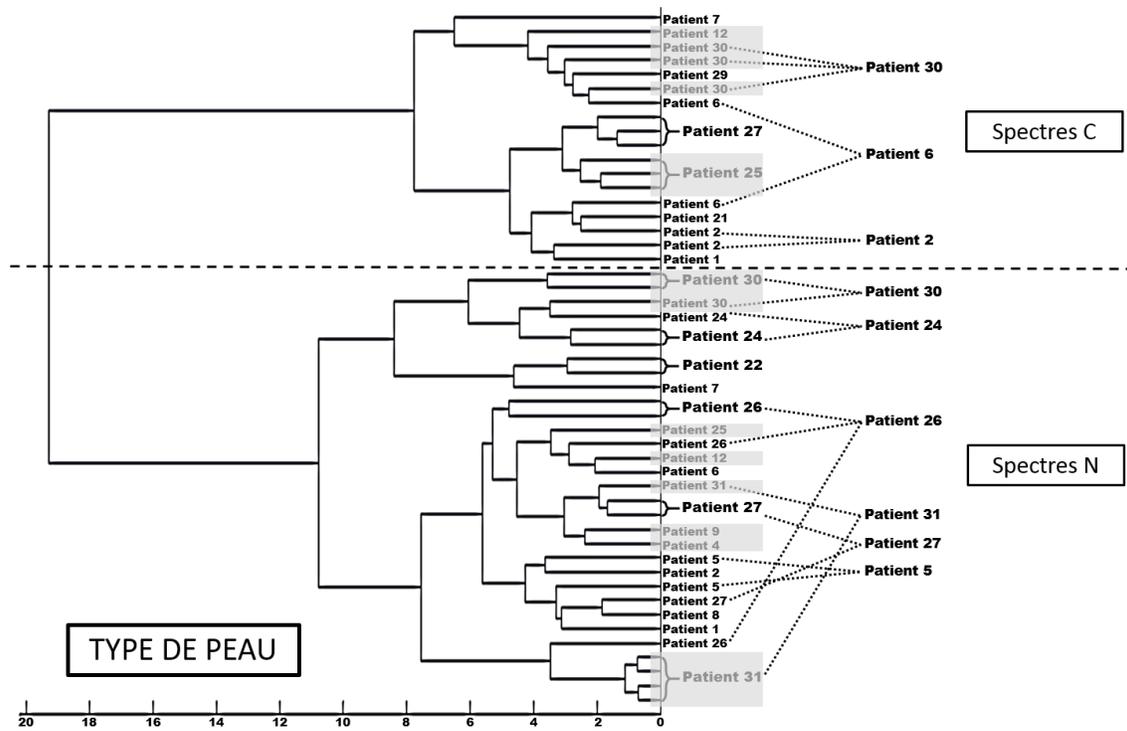


Figure 48 Dendrogramme résultant de la classification des 49 spectres *in vivo* pris en zones cutanées tumorales (spectres C) ou avoisinant les tumeurs (spectres N). Le surlignage gris indique les spectres mesurés sur des peaux identifiées comme « grasses » par le chirurgien-dermatologue (cf. Tableau 8). Les autres spectres ont été enregistrés sur des peaux « sèches ».

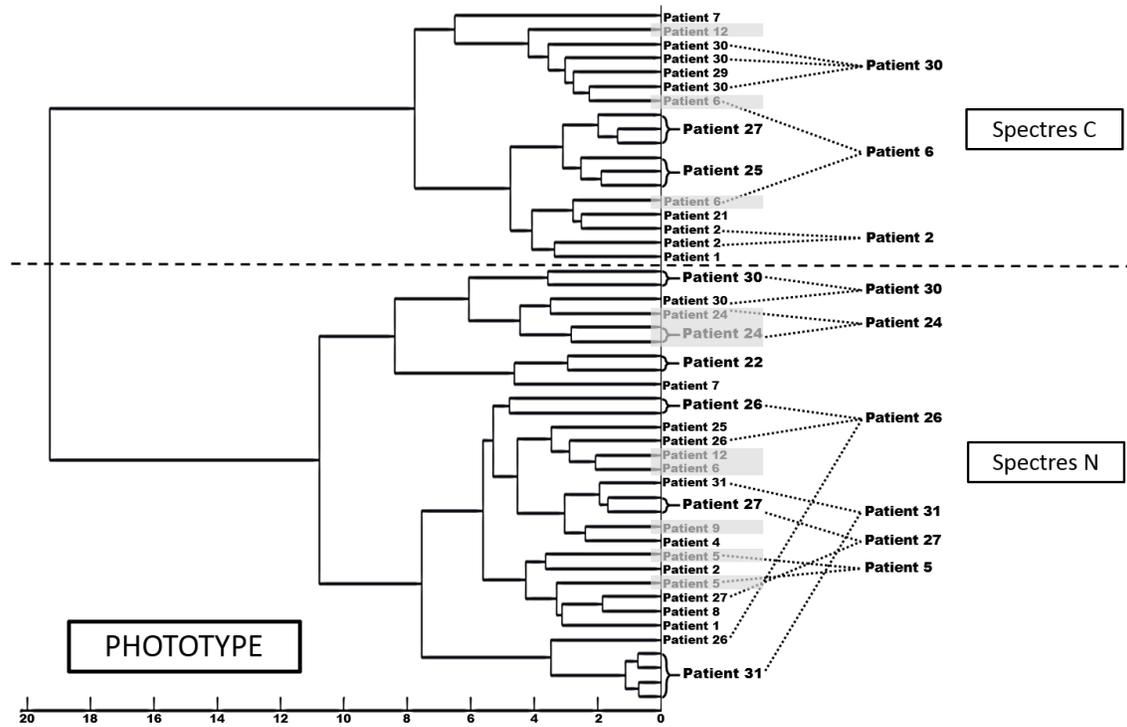


Figure 49 Dendrogramme résultant de la classification des 49 spectres *in vivo* pris en zones cutanées tumorales (spectres C) ou avoisinant les tumeurs (spectres N). Le surlignage gris indique les spectres mesurés sur des peaux de phototype 3 (cf. Tableau 8). Les spectres non surlignés sont enregistrés sur des peaux de phototype 2.

En conclusion, la variabilité interpatient impacte les résultats de classification. L'état physiologique cutané d'un individu est défini collectivement par différents critères et il est donc difficile d'évaluer la part réelle de chacun de ces critères sur la variabilité intrapatient mesurée. Cependant, le sexe des patients semble avoir plus d'influence sur notre résultat de classification que leur type de peau (gras ou sec), en sachant que ce dernier critère est défini de façon relativement subjective. La diversité de notre panel de patients ne nous permet pas d'évaluer clairement l'influence de l'âge et du phototype, ainsi que de la variabilité intracutanée. Bien-sûr ces résultats préliminaires sont à prendre avec précaution étant donné le faible nombre de patient inclus, auquel s'ajoute le nombre réduit de spectres par patient ; et demandent à être confirmés sur un panel plus large.

*Carcinomes Baso-Cellulaires superficiels*

Comme nous l'avons abordé dans le chapitre consacré au CBC (paragraphe « Définition et sous-types »), la diversité clinique et histologique des différents sous-types de cette lésion est source de subjectivité pour leur diagnostic différentiel. D'autant plus que la terminologie servant à leur description n'est parfois pas utilisée de la même façon d'un ouvrage à l'autre : une même dénomination pouvant décrire une même forme et inversement. Ainsi une étude réalisée en 2001 montre une reproductibilité inter-pathologistes de 97,8 % pour le diagnostic de CBC, mais elle chute à 83,4 % pour le diagnostic précis du sous-type histologique (97). Hors, connaître avec certitude le sous-type histologique de CBC permet de prendre des décisions thérapeutiques bien adaptées lors de la prise en charge (14). Contrairement au CBC nodulaire, le CBC superficiel, peut généralement être traité par voie médicamenteuse, évitant ainsi toute excision chirurgicale (18). Enfin, d'un point de vue technique, il est aussi intéressant de savoir si la spectroscopie Raman est une méthode assez sensible pour distinguer différents sous-types d'une même lésion tumorale. Nous disposons de 7 spectres de CBC superficiels (3 C et 4 C') issus de 2 patients différents avec lesquels différents tests ont été réalisés.

La réalisation d'un nouveau modèle de prédiction ACP-LDA par LOOCV avec le jeu de spectres C de CBC nodulaires et les spectres C de CBC superficiels permet une distinction idéale des 2 types de spectres (100 % de bonne classification). Si les spectres C' de CBC superficiels sont projetés dans ce modèle, ils ont une probabilité d'appartenir à la classe de CBC superficiels supérieure à 99,9 %. De même pour les spectres de CBC nodulaires de rapport signal sur bruit inférieur à 3,75 qui obtiennent une probabilité d'appartenance supérieure à 99,9 % d'appartenir à la classe de CBC nodulaires. Les résultats obtenus sont identiques si le modèle est construit en utilisant les spectres C et C' de CBC nodulaires ainsi que les spectres C et C' de CBC superficiels (**Figure 50**).

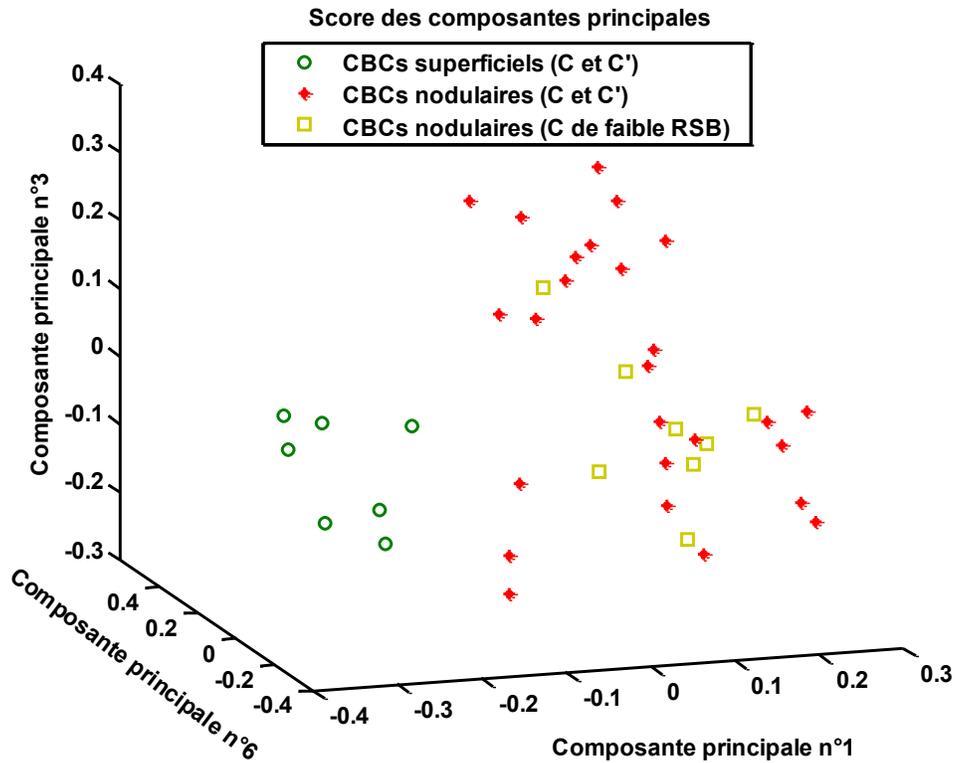


Figure 50 Représentation 3D du modèle de discrimination des CBC superficiels et des CBC nodulaires selon les CP 1, 3 et 6. Ce modèle a été construit à partir de 7 spectres de CBC superficiels (3 spectres C et 4 spectres C') et 26 spectres de CBC nodulaires (18 spectres C et 8 spectres C'), et testé avec 8 spectres C de CBC nodulaires de faible RSB.

Si on réalise un autre modèle de prédiction permettant de distinguer spectres de peau environnante et spectres de CBC superficiels, construit avec les spectres N et les spectres C et C' de CBC superficiels, on obtient 100 % de sensibilité et 93,5 % de spécificité. Les spectres N de rapport signal sur bruit inférieur à 3,75 projetés dans ce modèle ont une probabilité supérieure à 99.9 % d'appartenir à la classe de peau normale environnante (**Figure 51**).

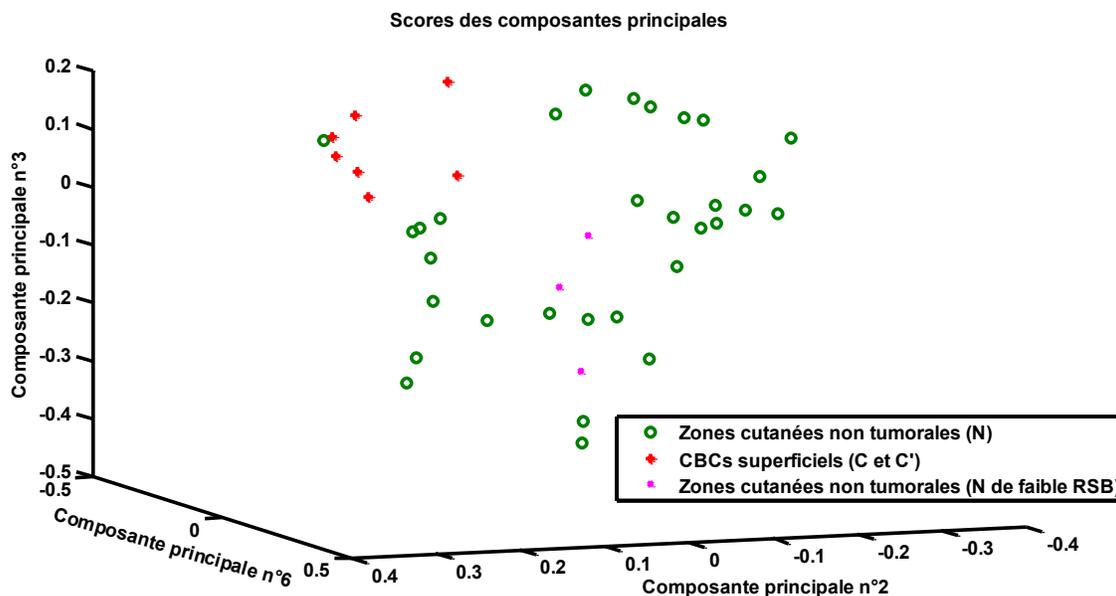


Figure 51 Représentation 3D du modèle de discrimination des CBC superficiels et des régions cutanées non tumorales selon les CP 2, 3 et 6. Ce modèle a été construit à partir de 7 spectres de CBC superficiels (3 spectres C et 4 spectres C') et 31 spectres N enregistrés sur de la peau environnant des lésions de CBC nodulaires ou superficiels. Le modèle a ensuite été testé avec 3 spectres N de faible RSB.

Ces résultats préliminaires sont encourageants par rapport à la possibilité de la spectroscopie Raman de pouvoir distinguer *in vivo* des sous-types de cancers cutanés. Cependant, étant donné le faible nombre de spectres *in vivo* de CBC superficiels disponibles, on ne peut malgré tout pas en tirer de conclusions significatives. Des investigations supplémentaires incluant un nombre de spectres plus important doivent donc être envisagées.

Le développement d'algorithme à 3 classes est également à prévoir. En effet notre programme ne permet le développement que de modèles de prédiction à 2 classes. Comme l'on pouvait s'y attendre, un modèle de prédiction construit avec les spectres N pour la première classe, et les spectres C de CBC des deux sous-types (nodulaires et superficiels) pour la deuxième classe diminue la sensibilité de notre modèle à 90,5 % (par rapport au modèle développé dans le papier soumis qui n'incluait que les spectres N et C de CBC nodulaires). Par contre la spécificité atteint alors les 100 % (*données non montrées*). L'augmentation de la variabilité dans la classe tumorale (due au regroupement des spectres de CBC superficiels avec les spectres de CBC nodulaires) et par conséquent la diminution (relative) de la variabilité de la classe saine pourraient éventuellement expliquer la perte de sensibilité et le gain de spécificité.

Il est également à noter, concernant les CBC superficiels, une observation particulière suite aux travaux d'évaluation des marges d'exérèse latérales inclus dans l'article soumis. La projection des points N' dans la représentation 3D du modèle de prédiction (N vs C de CBC nodulaires) montre le regroupement spatial des points N et N' collectés autour des CBC superficiels. D'autre part, ces points se situent légèrement à l'écart des points N et N' de CBC nodulaires (**Figure 52**). Au sein de chaque groupe de patients, différents âges et différents types de peau étant représentés, le regroupement observé ne peut être lié à ces critères. Ce constat nous amène à nous demander si les peaux permettant le développement de CBC superficiels pourraient présenter des caractéristiques biologiques distinctes des peaux sur lesquelles se développent des CBC nodulaires.

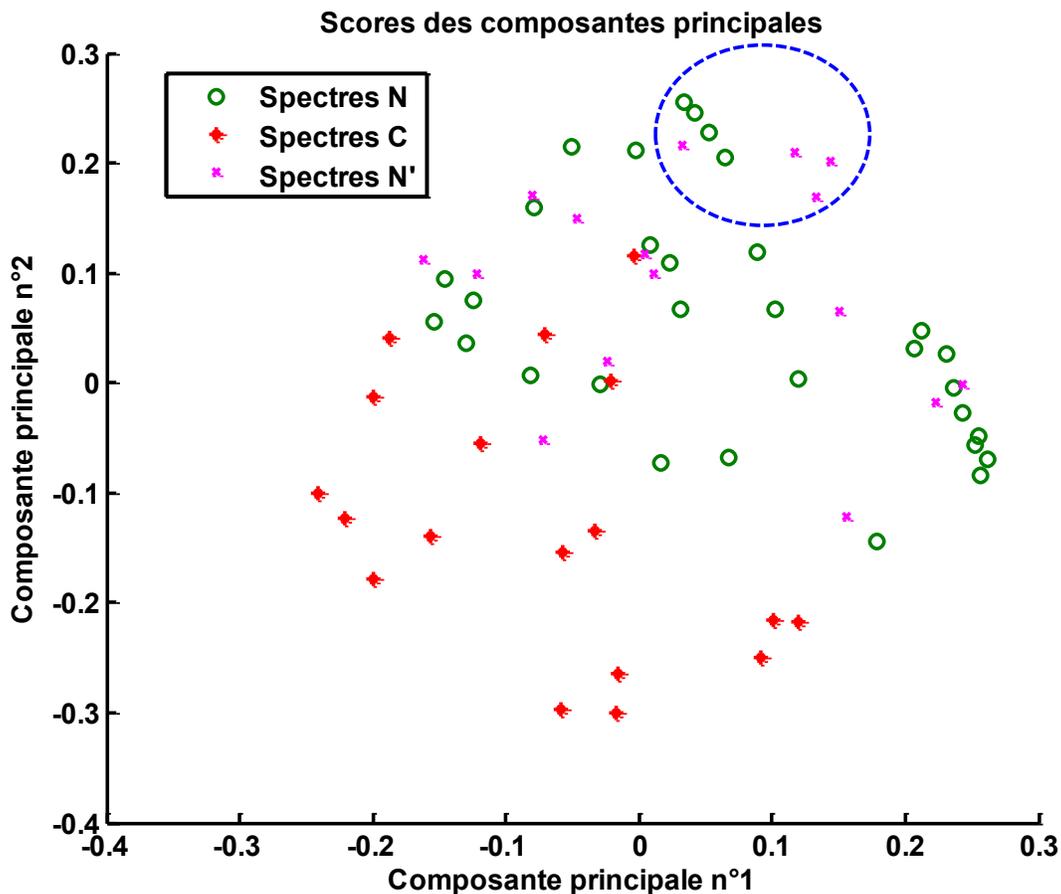


Figure 52 Représentation bidimensionnelle du modèle de prédiction développé à partir des 18 spectres C de CBC nodulaires et des 31 spectres N enregistrés sur zones cutanées non tumorales situées en dehors des marges d'exérèse définies par le chirurgien(cf. papier soumis). Les 16 spectres N' enregistrés sur des zones cutanées non tumorales à l'intérieur des marges d'exérèse ont été projetés dans la représentation 2D. Le cercle en pointillés bleus regroupe 7 des 8 spectres pris en zones cutanées non tumorales au voisinage de CBC superficiels (N et N').

## IV- CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Nous avons développé un modèle permettant de différencier *in vivo* les CBC nodulaires de la peau saine avec une spécificité de 96,77 % et une sensibilité de 100 %. Cet algorithme a permis de repérer avec succès le seul CBC nodulaire de l'étude ayant nécessité une reprise chirurgicale quelques mois plus tard. Les nombres d'onde discriminants ont ensuite été précisément identifiés et classés selon leur pouvoir discriminant. Les fenêtres spectrales 1322-1331  $\text{cm}^{-1}$  et 1342-1345  $\text{cm}^{-1}$  sont les plus discriminantes. Elles correspondent aux vibrations des nucléotides et des protéines. Puis par ordre de pouvoir discriminant, les nombres d'onde 1020-1022  $\text{cm}^{-1}$ , 1116-1120  $\text{cm}^{-1}$ , 1148-1149  $\text{cm}^{-1}$  (polysaccharides) et 1640  $\text{cm}^{-1}$ , 1645-1647  $\text{cm}^{-1}$ , 1697  $\text{cm}^{-1}$  (amide I) ont aussi été identifiés comme hautement discriminants. Il est possible d'obtenir 100 % de sensibilité et 100 % de spécificité en utilisant les 76 nombres d'onde les plus discriminants identifiés par l'algorithme Randfeatures.

Nous avons également mis en évidence que, pour chaque patient, les fonds des spectres bruts *in vivo* enregistrés en zone tumorale sont moins intenses que ceux enregistrés en zone saine. Cette caractéristique pourrait être mise à profit pour une exploration rapide de la zone cutanée à analyser. Une cartographie sur la base du fond spectral permettrait un repérage grossier de l'extension tumorale, et ainsi d'optimiser l'analyse Raman sur des points ciblés.

De plus, nous avons montré la capacité de la spectroscopie Raman de distinguer *in vivo* deux sous-types de CBC (nodulaire et superficiel). Cependant ces résultats demandent à être confirmés étant donné le faible nombre de spectres *in vivo* de CBC superficiels disponibles.

Il semblerait également que le sexe des patients influe de manière minime sur les résultats de classification et qu'il existerait un gradient de malignité du centre vers le bord de la lésion tumorale.

En perspective, nous suggérons quelques points à explorer en vue de la poursuite de ces travaux de recherche :

1°/ D'un point de vue expérimental, nous insistons sur l'importance de l'étape d'acquisition des spectres. Dans une telle étude, incluant un nombre de patients relativement faible, il est primordial que l'enregistrement des spectres soit d'emblée efficace. En condition clinique, il n'y a pas de deuxième essai possible. Cela peut passer en particulier par l'amélioration du matériel d'acquisition avec notamment de nouvelles générations de sondes Raman. Par exemple, des sondes confocales permettent de cibler une profondeur d'acquisition précise en diminuant le phénomène d'autofluorescence. Ou encore, l'association avec d'autres techniques telles que l'OCT permettrait une visualisation précise de la zone cutanée à analyser. D'un point de vue pratique, la nécessité d'éteindre la lumière avant et après chaque acquisition (pour visualiser la zone d'acquisition et vérifier qu'il n'y a pas eu de déplacement durant l'enregistrement) était très contraignante. Certaines sondes actuellement sur le marché pallient ce problème. En outre, garantir l'absence totale de mouvements (du patient et de la sonde) pendant des temps d'acquisition de plus d'une minute et dans l'obscurité est délicat. Equiper la sonde d'un bras articulé avec un système de fixation de la tête de mesure de la peau garantirait sa stabilité.

2°/ La prochaine étape en vue de l'approche Raman pour aider à l'ajustement des limites d'exercice est l'organisation d'une étude clinique incluant un nombre conséquent de patients. Cette étape permettra de renforcer la robustesse du modèle, ce qui est nécessaire pour prendre en compte la variabilité interpatient.

3°/ Pour l'utilisation de l'algorithme à une fin diagnostique, il reste encore à intégrer au modèle la signature Raman d'autres lésions cutanées, en particulier celles qui sont susceptibles d'être confondues avec un CBC.

4/ Il serait intéressant de prendre également en compte la signature spectrale des sous-types de CBC. Dans ce cas, l'utilisation d'un algorithme de classification séquentielle semble la plus appropriée. Cet algorithme permettra d'identifier d'abord le type de lésion cutanée ; puis s'il s'agit d'un CBC, d'identifier de quel sous-type il s'agit.

*Résultats obtenus avec les spectres ex vivo  
(et des spectres in vitro de référence)*

---

**EVALUATION DE LA MARGE  
PROFONDE D'EXERERESE DE  
CARCINOMES BASO-CELLULAIRES**  
*par spectroscopie Raman*

---

## I- INTRODUCTION

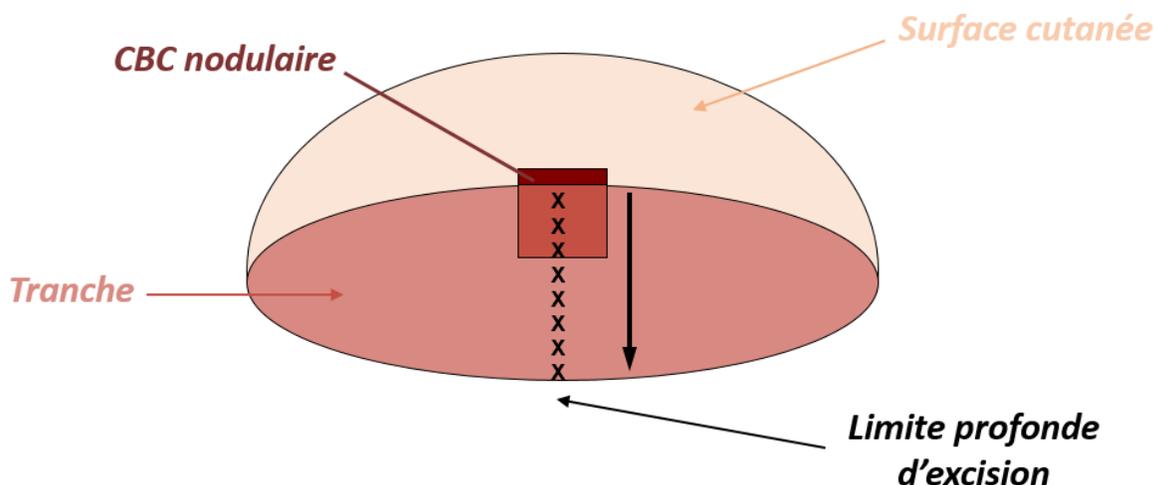
Afin d'étudier la marge profonde d'excision des CBC nodulaires *ex vivo*, les pièces d'exérèse ont été incisées au niveau de la lésion tumorale, puis des spectres points ont été enregistrés de la surface cutanée vers la profondeur. L'objectif premier était d'identifier des marqueurs Raman de la tumeur cutanée potentiellement utilisables pour l'évaluation en temps réel des marges profondes d'exérèse (aide à la prise de décision chirurgicale).

L'idée de la démarche expérimentale était de comparer les spectres *ex vivo* enregistrés à proximité de la surface cutanée et ceux enregistrés à proximité du lit tumoral ; les premiers étant assurément enregistrés en zone tumorale, les derniers étant logiquement localisés au niveau de la marge chirurgicale de sécurité. En pratique cependant, sur la tranche des pièces d'exérèse, l'étendue de la marge profonde de sécurité était difficile à évaluer visuellement. Il a donc été décidé plutôt d'analyser l'évolution des principaux pics Raman cutanés de la région spectrale « fingerprint » de la surface vers la profondeur de la peau. Les images spectrales acquises sur les coupes fines des mêmes pièces d'exérèse ont servi de référence.

De plus, étant donné les observations faites sur les fonds des spectres Raman *in vivo*, nous avons voulu également examiner le comportement des fonds des spectres Raman issus des pièces tumorales excisées (*ex vivo* et *in vitro*). Les résultats sont présentés dans une deuxième partie.

## II- MATERIELS ET METHODES

En vue de l'analyse Raman, le chirurgien procède à la coupe de la pièce d'exérèse en deux ou trois morceaux, en prenant soin de passer par la zone tumorale. Lorsque nous disposons de suffisamment de temps, des spectres ont ensuite été enregistrés à intervalle régulier de la surface vers la profondeur sur une des tranches de la pièce d'exérèse (**Figure 53**), d'abord directement au bloc opératoire avec le spectromètre fibré HE, puis au laboratoire de recherche avec le microspectromètre Raman LabRAM. Ces successions verticales de spectres acquises de la surface vers la profondeur sur la tranche des échantillons fraîchement excisés seront nommées par la suite « lignes ». Les pièces d'exérèse ont ensuite été amenées au laboratoire d'anatomopathologie pour le diagnostic histopathologique et la réalisation de coupes congelées passant par la tumeur.



*Figure 53 Schéma d'une pièce d'exérèse coupée en deux avec illustration des points d'acquisition de spectres Raman. La flèche indique le sens d'acquisition. Le nombre de points d'acquisition est dépendant de l'épaisseur de la pièce d'exérèse.*

Ce protocole expérimental n'a pu être appliqué dans sa totalité qu'à cinq lésions cutanées. Parmi celles-ci, une a finalement été diagnostiquée histologiquement comme trichofolliculome et une autre a donné des résultats quantitativement et qualitativement insuffisants avec le spectromètre HE pour être retenue. Par conséquent, seules les données issues des patients 25, 30 et 32 ont été exploitées dans cette étude. Nous avons regroupé dans le **Tableau 9**, le **Tableau 10** et le **Tableau 11**, les photos des CBC nodulaires correspondants, prises avant excision puis après excision et coupe, ainsi que les données relatives au protocole expérimental adapté à chaque pièce d'exérèse.

**PATIENT 25**

**Photographie du CBC nodulaire *in vivo***



*Localisation cutanée : Front*

*Type de peau : Grasse*

*Phototype : II*

**Photographie du CBC nodulaire *ex vivo***



*Estimation de l'épaisseur de la tranche : 2 mm*

**Acquisition avec le spectromètre Raman fibré HE**

*Nombre de points d'acquisition : 7*

*Temps d'acquisition : 3x30s*

*Estimation de la distance interspectrale moyenne : 290  $\mu$ m*

**Acquisition avec le microspectromètre Raman LabRAM**

*Nombre de points d'acquisition : 8 (1 spectre trop bruité exclu)*

*Temps d'acquisition : 1x30s*

*Estimation de la distance interspectrale moyenne : 250  $\mu$ m*

*Tableau 9 Informations concernant le CBC nodulaire du patient 25 et paramètres d'acquisition des spectres ex vivo.*

**PATIENT 30**

**Photographie du CBC nodulaire *in vivo***

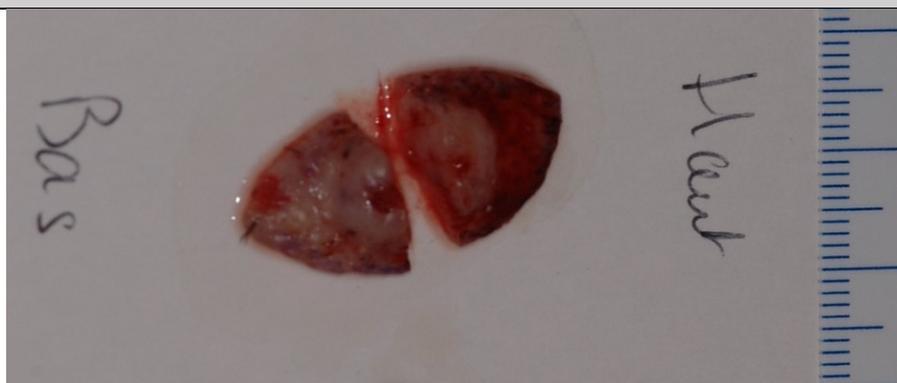


*Localisation cutanée : Nez*

*Type de peau : Grasse*

*Phototype : II*

**Photographie du CBC nodulaire *ex vivo***



*Estimation de l'épaisseur de la tranche : 6 mm*

**Acquisition avec le spectromètre Raman fibré HE**

*Nombre de points d'acquisition : 8*

*Temps d'acquisition : de 1x20s à 1x50s selon l'intensité du fond spectral*

*Estimation de la distance interspectrale moyenne : 750  $\mu$ m*

**Acquisition avec le microspectromètre Raman LabRAM**

*Nombre de points d'acquisition : 15 (1 spectre trop bruité exclu)*

*Temps d'acquisition : 1x60s*

*Estimation de la distance interspectrale moyenne : 400  $\mu$ m*

*Tableau 10 Informations concernant le CBC nodulaire du patient 30 et paramètres d'acquisition des spectres *ex vivo*.*

**PATIENT 32**

**Photographie du CBC nodulaire *in vivo***



*Localisation cutanée : Tempe*

*Type de peau : Grasse*

*Phototype : II*

**Photographie du CBC nodulaire *ex vivo***



*Estimation de l'épaisseur de la tranche : 3 mm*

**Acquisition avec le spectromètre Raman fibré HE**

*Nombre de points d'acquisition : 10*

*Temps d'acquisition : de 1x20s à 1x60s selon l'intensité du fond spectral*

*Estimation de la distance interspectrale moyenne : 300  $\mu$ m*

**Acquisition avec le microspectromètre Raman LabRAM**

*Nombre de points d'acquisition : 9 (2 spectres trop bruités exclus)*

*Temps d'acquisition : 1x60s*

*Estimation de la distance interspectrale moyenne : 330  $\mu$ m*

*Tableau 11 Informations concernant le CBC nodulaire du patient 32 et paramètres d'acquisition des spectres *ex vivo*. Remarque : la croûte de la lésion a été retirée durant l'excision chirurgicale.*

### III- RESULTATS ET DISCUSSION

#### 1. Evaluation de la marge profonde des pièces d'exérèse

##### *Identification des principaux pics tissulaires cutanés*

Dans un premier temps, nous avons voulu identifié *in vitro* les pics Raman caractéristiques du tissu cutané tumoral (nodules de CBC) et ceux caractéristiques du tissu cutané non tumoral. Pour ce faire, nous avons utilisé les coupes fines congelées à notre disposition. Au préalable, les nodules de CBC ont été localisés par l'anatomopathologiste sur des coupes adjacentes aux coupes congelées et colorées à l'hématoxyline et à l'éosine (HE). Nous avons enregistré avec le microspectromètre Raman LabRAM des spectres intra-nodulaires et extra-nodulaires (28 et 32 spectres respectivement) (**Tableau 12**). Nous avons pu distinguer parmi les spectres pris au niveau du derme non tumoral quatre catégories de spectres, de profils visuellement distincts, dont trois sont à composante majoritairement protéique et une à composante majoritairement lipidique (**Figure 54**). Bien que la variabilité au sein des spectres tumoraux s'est avérée moins importante, nous avons pu néanmoins aussi différencier trois profils spectraux, tous à composante majoritairement protéique (**Figure 55**).

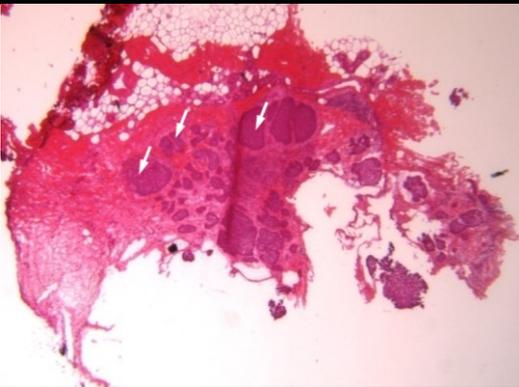
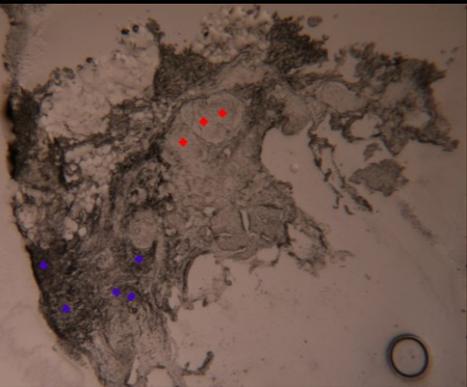
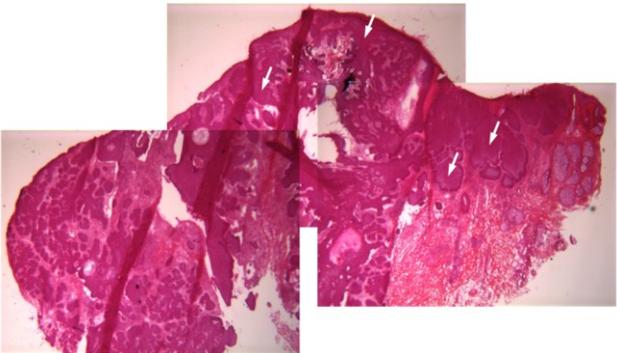
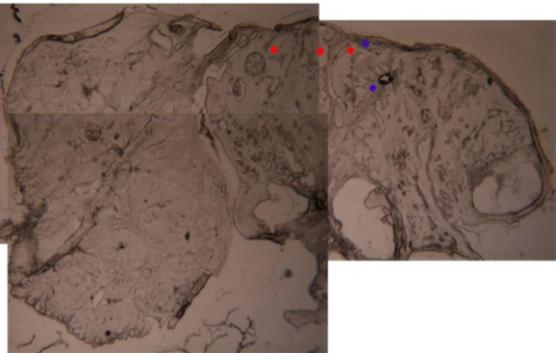
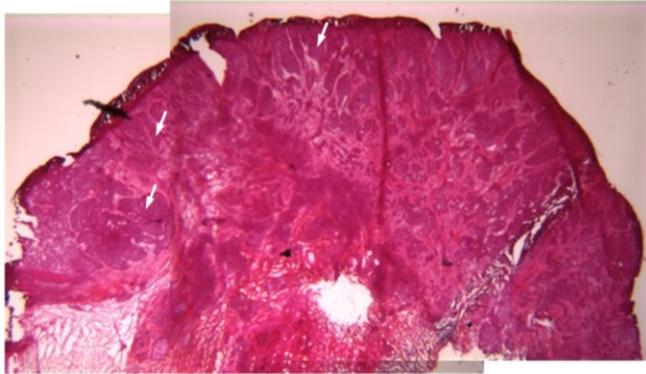
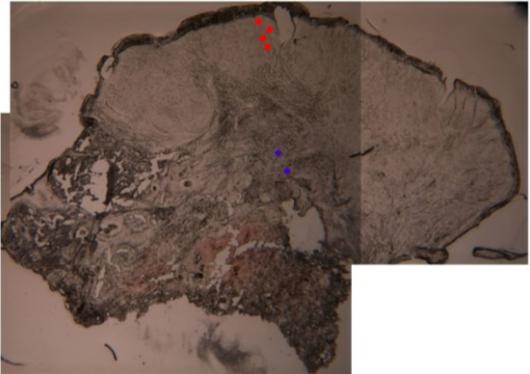
<b>PATIENT 25</b>	
	
<i>12 spectres points tumoraux : 4 par zone</i>	
<i>20 spectres points non tumoraux : 4 par zone</i>	
<i>Temps d'acquisition par spectre : 90x1s</i>	
<b>PATIENT 30</b>	
	
<i>12 spectres points tumoraux : 4 par zone</i>	
<i>8 spectres points non tumoraux : 4 par zone</i>	
<i>Temps d'acquisition par spectre : 1x30s ou 15x2s ou 60x1s selon zone</i>	
<b>PATIENT 32</b>	
	
<i>4 spectres points tumoraux : 1 par zone</i>	
<i>4 spectres points non tumoraux : 2 par zone</i>	
<i>Temps d'acquisition par spectre : 30x1s</i>	

Tableau 12 Photographies des coupes congelées et des coupes colorées HE adjacentes. Les flèches blanches indiquent la localisation de nodules tumoraux sur les coupes colorées. Les zones choisies sur les coupes congelées pour l'enregistrement de spectres tumoraux et non tumoraux ont été marquées respectivement par des carrés rouges et bleus. Plusieurs spectres ont généralement été acquis par zone et les temps d'acquisition ont été adaptés en fonction de l'autofluorescence de chaque zone cutanée.

**SPECTRES NON TUMORAUX**

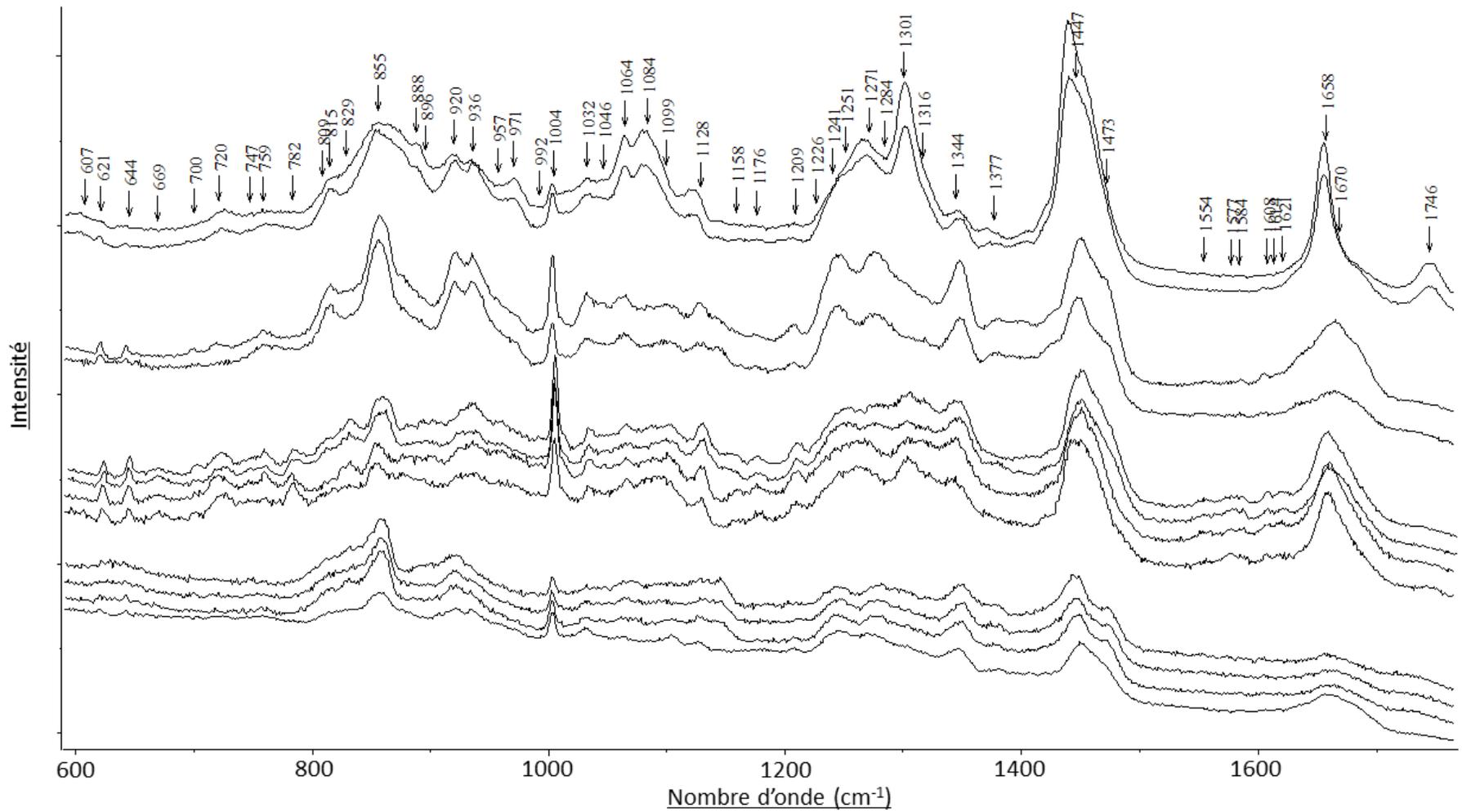


Figure 54 Les différents profils de spectres Raman bruts enregistrés sur les coupes congelées en dehors des nodules tumoraux.

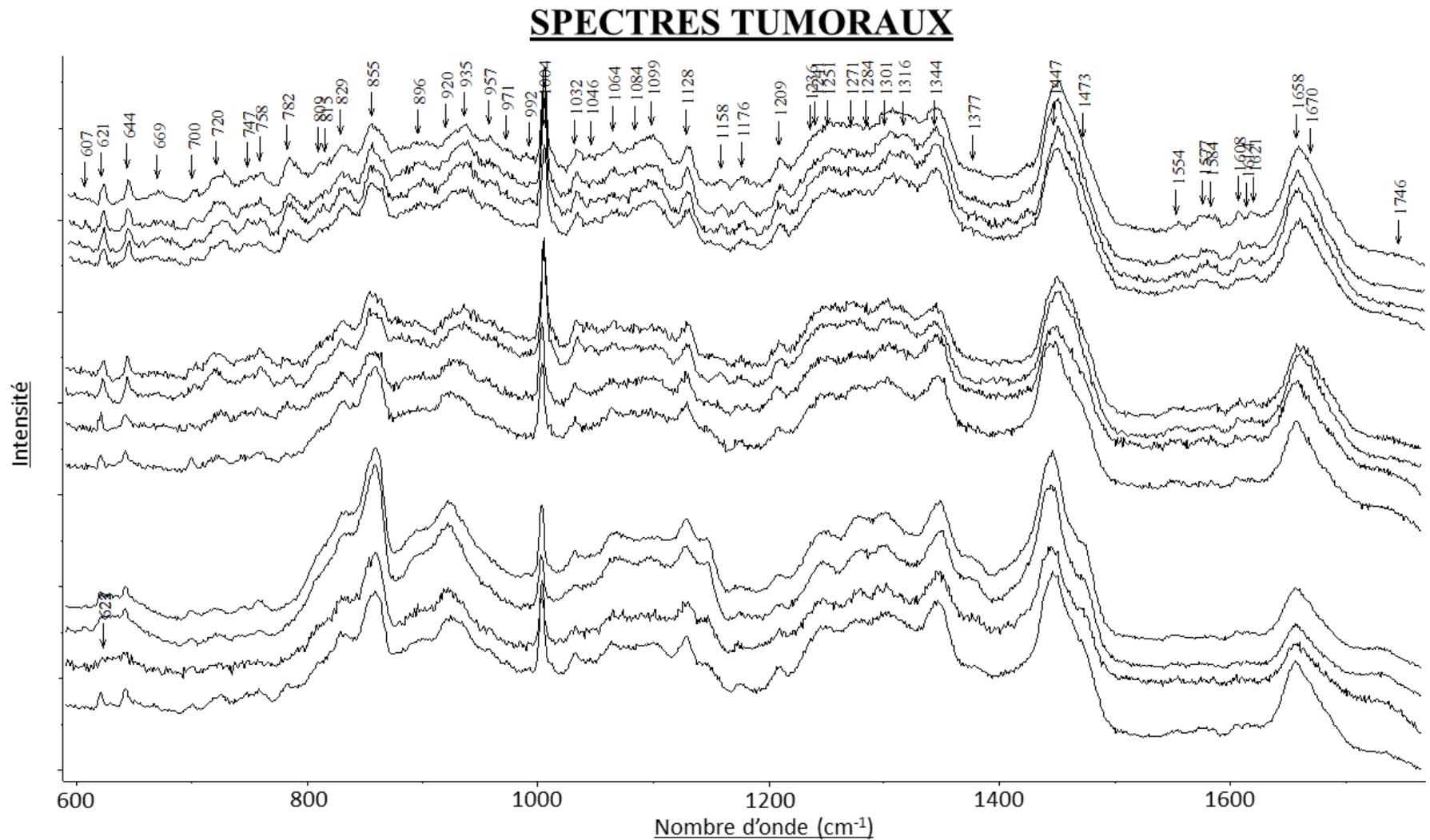


Figure 55 Les différents profils de spectres Raman bruts enregistrés sur les coupes congelées au niveau des nodules tumoraux.

*Recherche de vibrations d'intérêt*

La variabilité des spectres cutanés tumoraux et non tumoraux ne permet pas de mettre en évidence des pics caractéristiques exclusivement de zones tumorales ou de zones non tumorales. Nous avons donc décidé de nous intéresser au comportement en fonction de la profondeur des principaux pics observables au niveau de spectres de la **Figure 54** et de la **Figure 55**. En particulier, nous avons étudié l'évolution de l'intensité de ces pics sur les lignes de spectres acquises sur la tranche des pièces d'exérèse. De la surface vers la profondeur, un pic caractéristique d'une zone saine ou tumorale devrait globalement voir son intensité évoluer significativement, puisque le premier spectre de la ligne pris juste sous la surface cutanée se trouve à l'intérieur du CBC, et que le dernier spectre acquis à proximité de la limite d'exérèse profonde doit se trouver en zone non tumorale, l'exérèse étant supposée complète.

Le microspectromètre Raman LabRAM ayant une meilleure résolution spectrale, nous avons commencé par observer les lignes de spectres *ex vivo* obtenues avec cet appareil (**Figure 56**). Nous avons reporté dans le **Tableau 13** le sens d'évolution de chacun des pics de la surface vers la profondeur pour chacune des trois pièces d'exérèse. Lorsque cela n'était pas possible, c'est-à-dire lorsque les spectres étaient trop bruités au niveau du pic ou lorsque l'intensité du pic ne semblait pas suivre une évolution bien définie, la case a été recouverte de pointillés. Nous ne travaillerons dans la suite de l'étude seulement avec les pics dont il a pu être observée une évolution identique de la surface vers la profondeur dans au moins deux pièces d'exérèse sur trois. Ils sont au nombre de treize (colonnes grisées dans le **Tableau 13** et la **Figure 56**).

Afin de vérifier nos observations, nous avons mesuré l'aire sous chacun de ces pics de la surface vers la profondeur à l'aide du logiciel LabSpec de HORIBA Jobin Yvon. Les courbes obtenues pour chaque pic et chaque pièce d'exérèse sont présentées dans le **Tableau 14**. Le profil des courbes est en accord avec les observations rassemblées dans le **Tableau 13**.

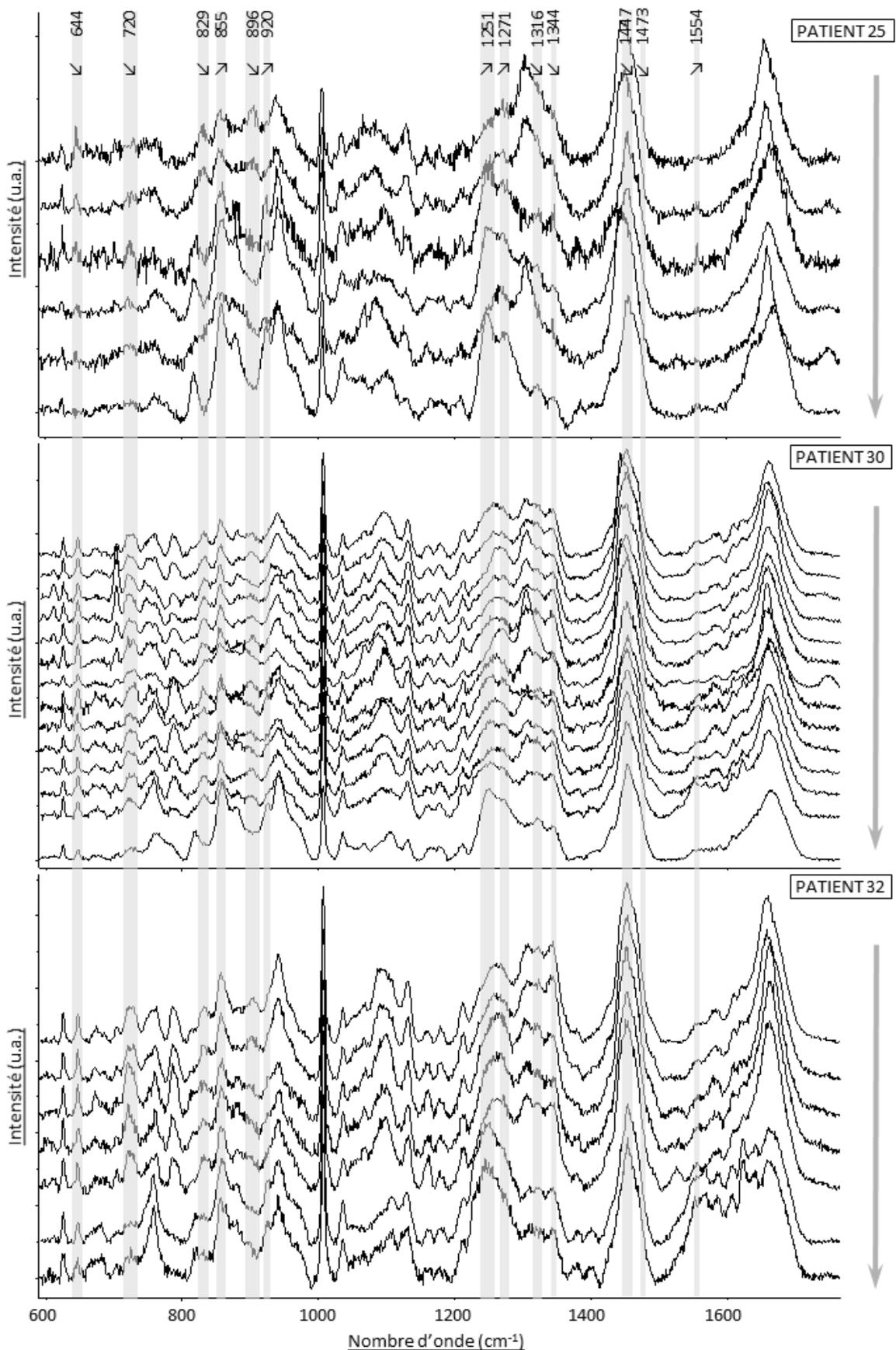


Figure 56 Lignes de spectres acquises avec le microspectromètre LabRAM sur les pièces d'exérèse. Les flèches indiquent le sens d'acquisition de la surface vers la profondeur. Une correction de ligne de base linéaire avec 9 points de base a été appliquée suivie d'une normalisation sur l'aire totale des spectres. Les pics grisés correspondent aux pics sélectionnés dans le Tableau 13.



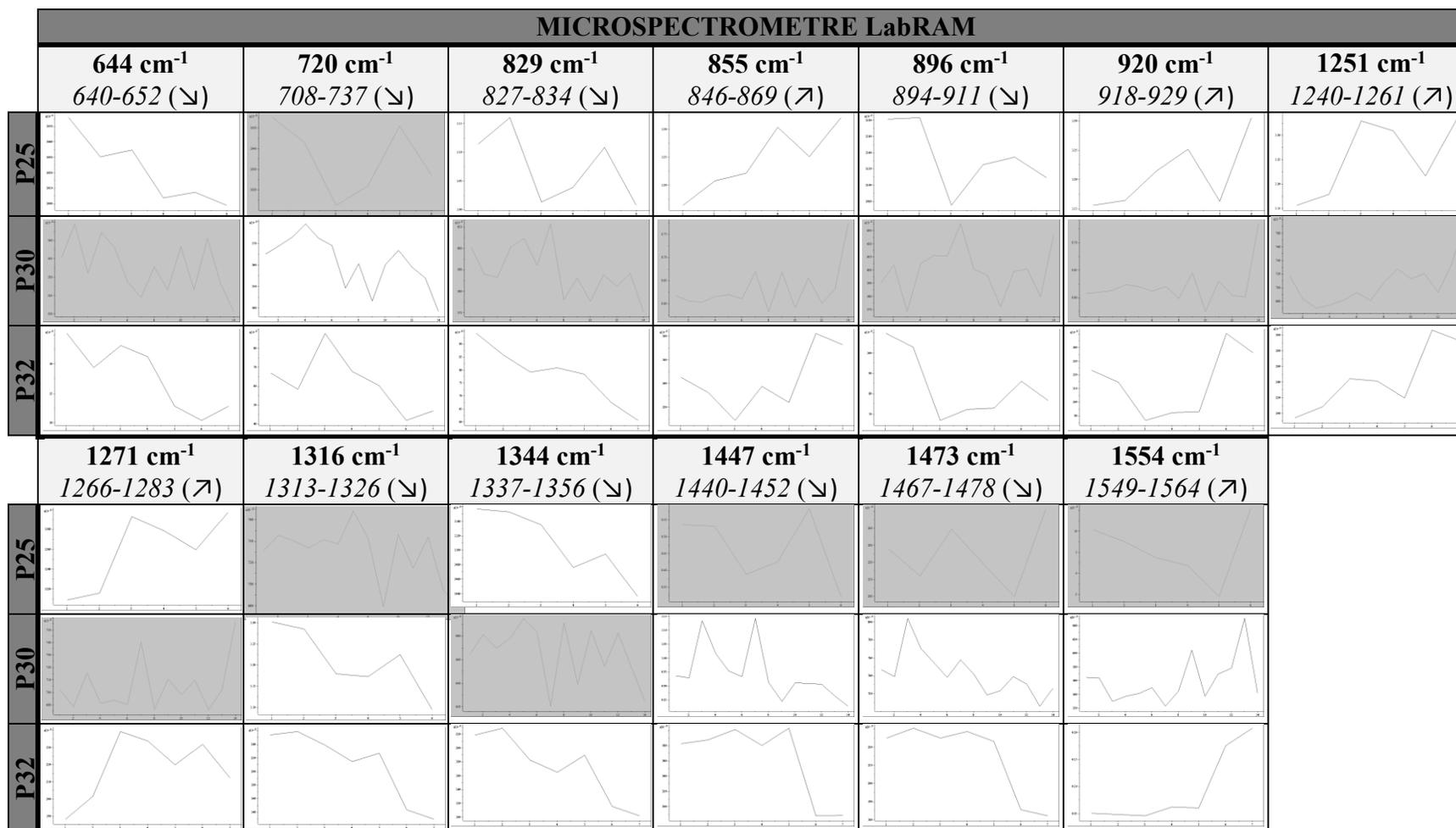


Tableau 14 Courbes représentant l'évolution de l'aire sous les 13 pics retenus du spectre acquis le plus en surface vers le spectre acquis le plus en profondeur pour chaque ligne *ex vivo* mesurée à l'aide du microspectromètre LabRAM (sur les pièces d'exérèse des patients 25,30 et 32, notés respectivement P25, P30 et P32). En italique a été précisée la fenêtre spectrale utilisée pour calculer l'intensité intégrée (unité arbitraire) et entre parenthèses a été reporté le sens d'évolution de l'intensité observé. Les courbes grisées correspondent aux cases pointillées du Tableau 13.

Nous nous sommes ensuite intéressés aux lignes de spectres acquises sur les trois pièces d'exérèse à l'aide du spectromètre Raman fibré HE (**Figure 57**). Les spectres obtenus avec cet appareil sont de rapport signal sur bruit beaucoup plus faible, néanmoins on peut retrouver les principaux pics de diffusion Raman même si ces-derniers sont moins résolus. Les zones spectrales grisées dans la **Figure 57** correspondent aux pics d'intérêt identifiés précédemment avec le microspectromètre Raman. L'intensité intégrée au niveau de chacune de ces zones a été également calculée pour tous les spectres de chaque ligne *ex vivo* acquise avec le spectromètre HE. Les courbes obtenues sont affichées dans le **Tableau 15**.

Tout comme avec le microspectromètre, certaines courbes ne présentent pas de tendance nette, ascendante ou descendante, et les cases correspondantes ont été noircies. On observe que les courbes concernées ne sont pas forcément les mêmes avec les deux appareils, ce qui peut s'expliquer par le fait qu'il est difficile expérimentalement d'acquérir des spectres points *ex vivo* localisés exactement au même endroit d'une acquisition à l'autre. De plus, il faudrait idéalement pour chaque spectre enregistré, un prélèvement pour contrôle anatomopathologique, ce qui est difficile à mettre en place.

Les courbes dont le sens d'évolution est inversé par rapport à celles obtenues avec le microspectromètre Raman ont été écartées également. Les caractéristiques instrumentales différentes entre les deux appareils pourraient éventuellement expliquer ces dernières observations. Nous avons vu en effet dans le chapitre sur les résultats *in vivo* que la fibre émet un signal de fluorescence parasite, qui malgré une correction de ligne de base pourrait influencer sur les valeurs d'intensité mesurée. De plus, les volumes sondés ne sont pas équivalents.

On observe que les pics positionnés à  $896\text{ cm}^{-1}$  et  $1447\text{ cm}^{-1}$  ne sont pas exploitables *ex vivo* avec le spectromètre fibré HE. Et sur les onze pics retenus restants, seuls sept d'entre eux présentent des évolutions similaires aux résultats obtenus avec le microspectromètre. Il s'agit des pics centrés à  $644$ ,  $720$ ,  $829$ ,  $1251$ ,  $1271$ ,  $1316$  et  $1344\text{ cm}^{-1}$ .

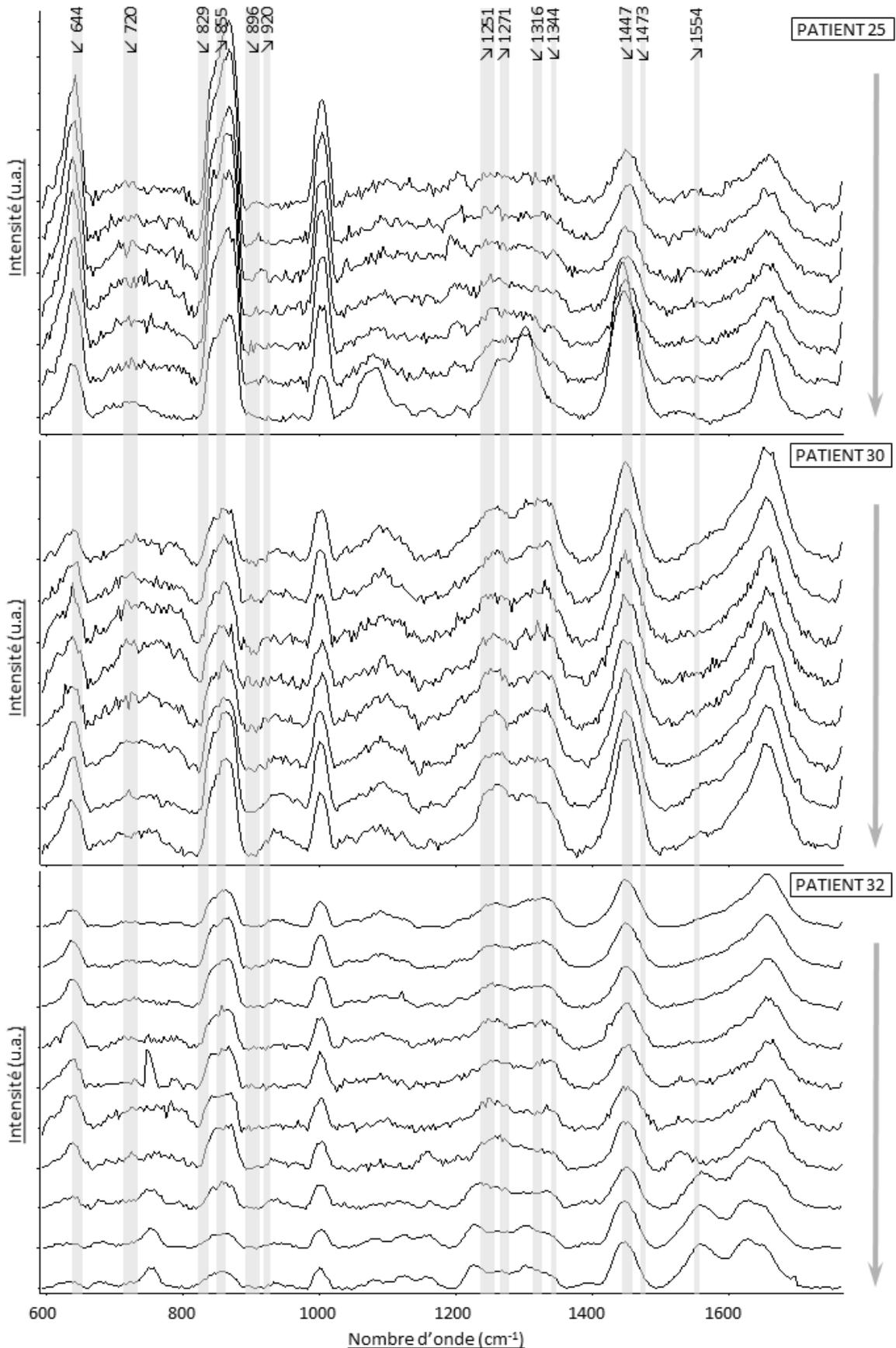


Figure 57 Lignes de spectres acquises avec le spectromètre Raman fibré HE sur les pièces d'exérèse (les flèches indiquent le sens d'acquisition de la surface vers la profondeur). Une correction de ligne de base linéaire avec 9 points de base a été appliquée suivie d'une normalisation sur l'aire totale des spectres. Les pics grisés correspondent aux pics sélectionnés dans le Tableau 13.

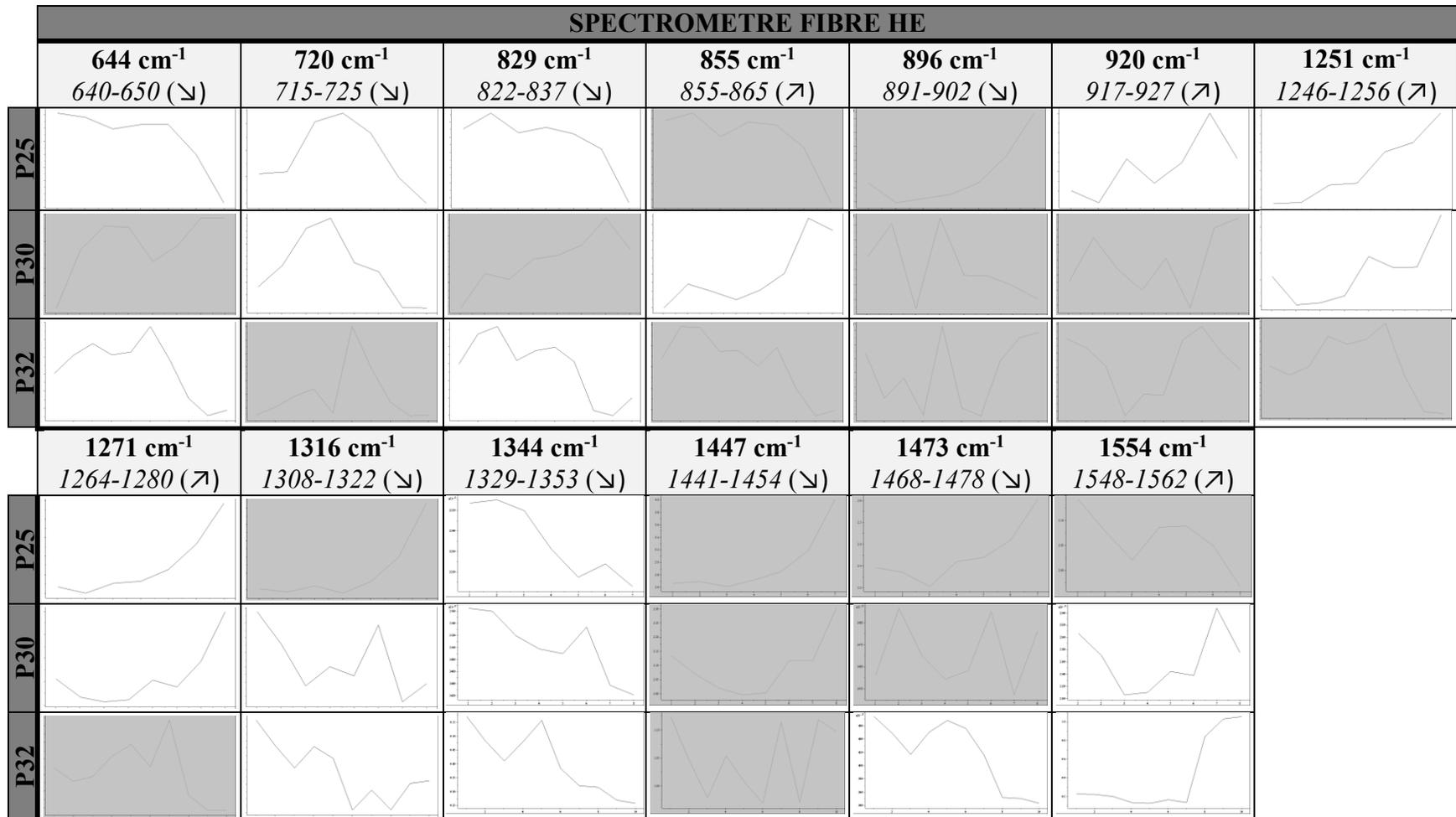


Tableau 15 Courbes représentant l'évolution de l'aire sous les 13 pics retenus du spectre acquis le plus en surface vers le spectre acquis le plus en profondeur pour chaque ligne *ex vivo* mesurée à l'aide du spectromètre fibré HE (sur les pièces d'exérèse des patients 25,30 et 32, notés respectivement P25, P30 et P32). En italique a été précisée la fenêtre spectrale utilisée pour calculer l'intensité intégrée (unité arbitraire) et entre parenthèses a été reporté le sens d'évolution de l'intensité attendu par rapport aux résultats avec le microspectromètre. Les cases noircies correspondent à des courbes non clairement ascendantes ou descendantes, ou d'évolution inversée par rapport aux résultats avec le microspectromètre.

*Pertinence des pics identifiés*

Afin de s'assurer de la pertinence des pics retenus sur les lignes *ex vivo*, nous sommes revenus aux coupes congelées disponibles pour chacune des trois pièces d'exérèse. Une image spectrale de chacune de ces coupes a été enregistrée au microspectromètre Raman LabRAM de résolution spectrale  $4\text{ cm}^{-1}$ . La puissance mesurée en sortie d'objectif était comprise entre 15 mW et 28 mW et la focalisation était automatiquement réajustée par l'appareil avant chaque mesure. La fenêtre spectrale mesurée s'étend de 590 à  $1765\text{ cm}^{-1}$ . Le temps d'acquisition pour chaque spectre a été fixé à 30x1s et la distance interpixels à  $10\text{ }\mu\text{m}$ . Au total, il aura fallu de 24 à 90 heures pour l'enregistrement de chacune de ces images, selon leurs dimensions.

Dans un premier temps, nous avons appliqué une classification k-means à ces trois images. Ce traitement multivarié permet de localiser les zones tumorales et de mettre en évidence les différentes couches cutanées. Avant classification statistique, les spectres sont d'abord prétraités : après correction du signal du détecteur et soustraction du courant noir, les spectres ont ensuite été lissés par la méthode Savitzky-Golay (polynôme d'ordre 3 et largeur de fenêtre de 9) et corrigés de la ligne de base (polynôme d'ordre 4). Puis les spectres aberrants ou de faible rapport signal sur bruit ont été exclus (seuil de rapport signal sur bruit 0,01 avec un signal de référence pris sur la bande  $1440\text{-}1460\text{ cm}^{-1}$ ) et une normalisation vectorielle a été appliquée. Enfin, la classification k-means a été réalisée et l'image spectrale a ensuite été reconstituée en utilisant un code-couleur (une couleur étant attribuée à chaque cluster). Le nombre de clusters a été optimisé pour chaque image de façon à reproduire au mieux les différentes structures cutanées sans trop pixelliser les images k-means. Les résultats obtenus pour chaque image sont présentés dans la **Figure 58**, la **Figure 59** et la **Figure 60**.

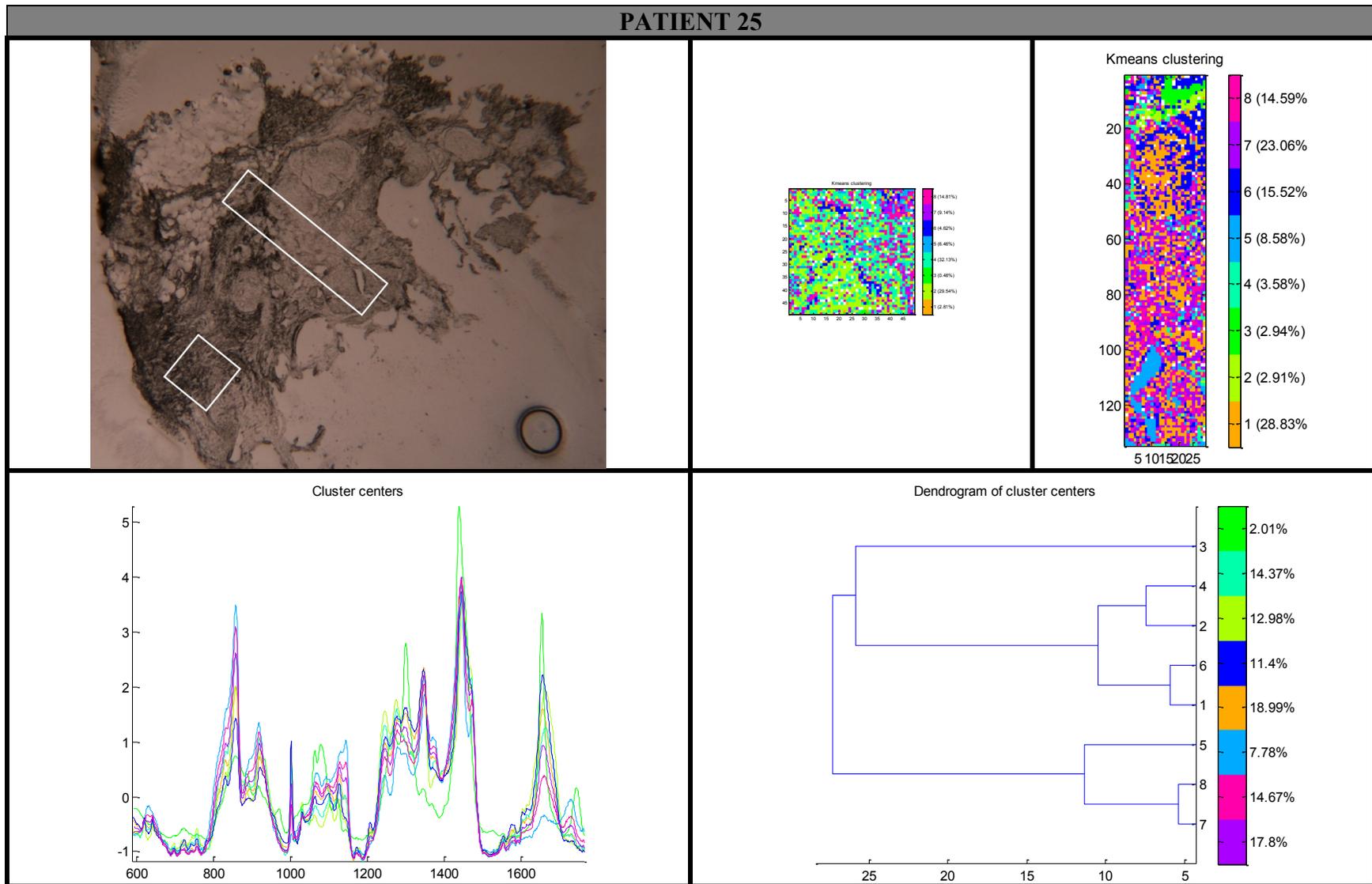


Figure 58 Localisation des images spectrales enregistrées sur la photographie de la coupe congelée du patient 25 (cadres blancs). Les deux images spectrales ont été prétraitées et traitées simultanément. Images spectrales pseudo-colorées après classification k-means, dendrogramme correspondant et centres de classe. Les clusters 1 et 6 sont associés aux zones tumorales (orange et bleu foncé respectivement).

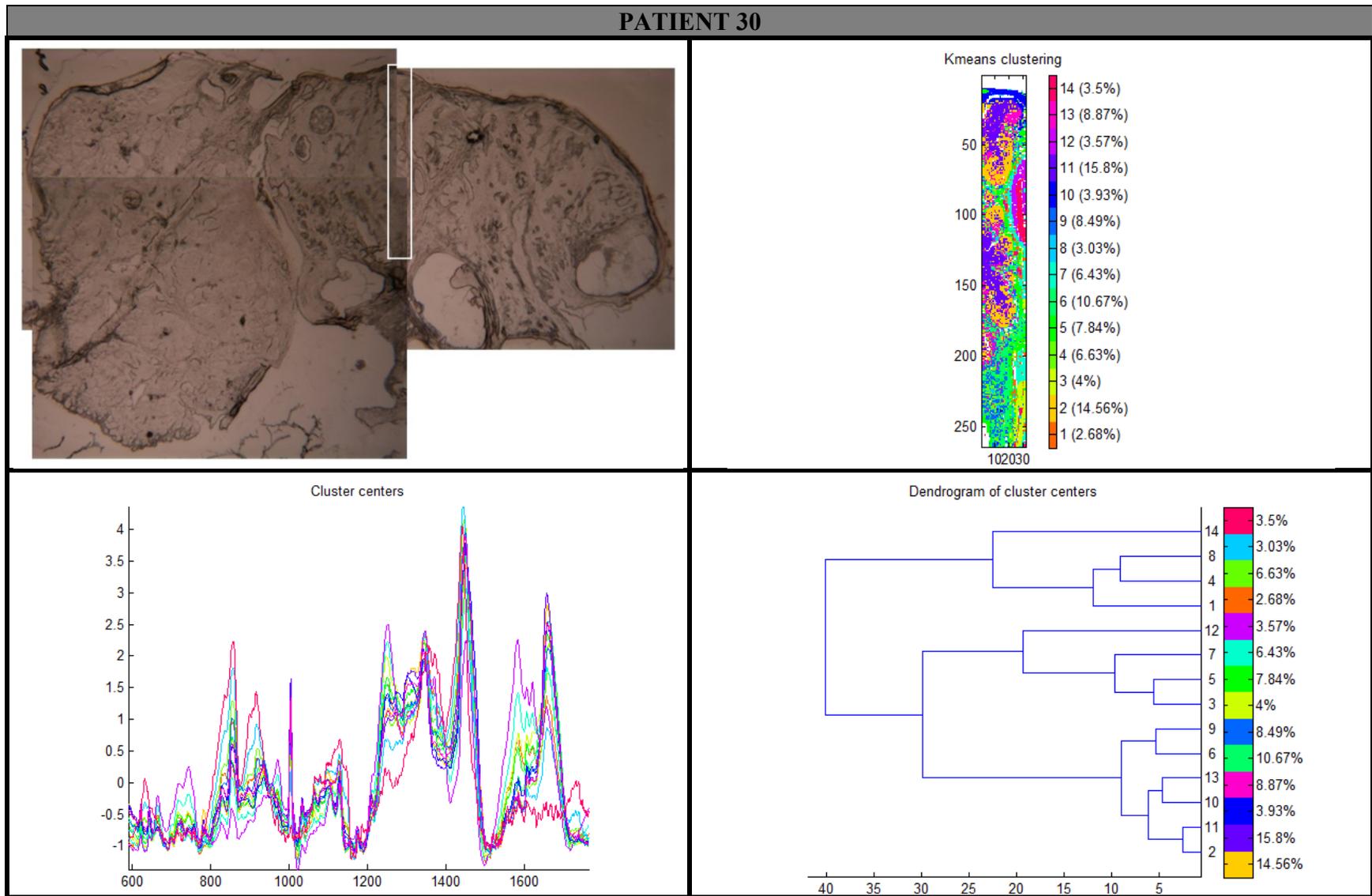


Figure 59 Localisation de l'image spectrale enregistrée sur la photographie de la coupe congelée du patient 30 (cadre blanc). Image spectrale pseudo-colorée après classification *k*-means, dendrogramme correspondant et centres de classe. Les clusters 2 et 11 sont associés aux zones tumorales (orange et violet respectivement).

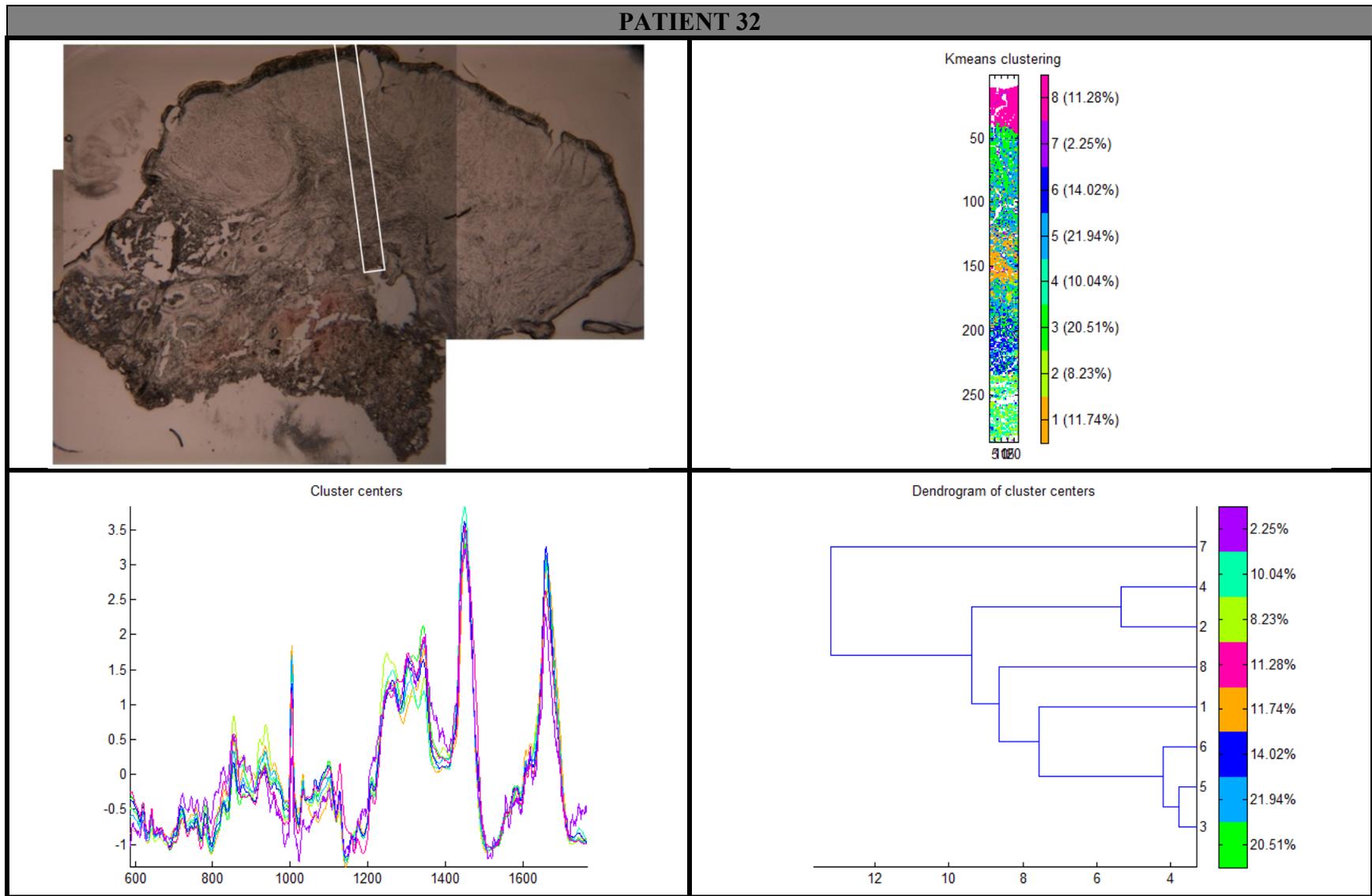


Figure 60 Localisation de l'image spectrale enregistrée sur la photographie de la coupe congelée du patient 32 (cadre blanc). Image spectrale pseudo-colorée après classification *k*-means, dendrogramme correspondant et centres de classe. Les clusters 3, 5 et 6 sont associés aux zones tumorales (vert « foncé », bleu clair et bleu foncé respectivement).

Parallèlement, les trois images spectrales ont été reconstituées pour chaque pic retenu du **Tableau 13** en ne sélectionnant que les fenêtres spectrales correspondantes (traitement univarié). Une correction de ligne de base linéaire de 9 points de base a été appliquée au préalable, suivie d'une remise à zéro des spectres puis d'une normalisation sur l'aire totale de chaque spectre. Afin de faciliter l'analyse des images, nous avons distingué les pics dont l'intensité est supposée diminuer de la zone tumorale superficielle vers la zone tumorale plus profonde (pics centrés à 644, 720, 829, 896, 1316, 1344, 1447 et 1473  $\text{cm}^{-1}$ ), des pics dont l'intensité est censée augmenter (pics centrés à 855, 920, 1251, 1271 et 1554  $\text{cm}^{-1}$ ). Une proposition d'attribution de ces pics est présentée dans le **Tableau 16**.

<i>Nombre d'onde</i>	<i>Tentative d'attribution</i>
644 $\text{cm}^{-1}$ $\searrow$	Tyr, nucléotides (C,A,T), C-S, amide IV,
720 $\text{cm}^{-1}$ $\searrow$	phospholipide, cystine
829 $\text{cm}^{-1}$ $\searrow$	Tyr, ADN, phospholipide
855 $\text{cm}^{-1}$ $\nearrow$	Tyr, Pro, ARN, polysaccharide
896 $\text{cm}^{-1}$ $\searrow$	ADN, protéine
920 $\text{cm}^{-1}$ $\nearrow$	Pro, collagène, glucose, acide lactique, désoxyribose
1251 $\text{cm}^{-1}$ $\nearrow$	amide III, ARN, phospholipide
1271 $\text{cm}^{-1}$ $\nearrow$	amide III, phospholipide
1316 $\text{cm}^{-1}$ $\searrow$	protéine, guanine, C=C
1344 $\text{cm}^{-1}$ $\searrow$	protéine, ARN, guanine, Phe, Trp, C-H, C-C
1447 $\text{cm}^{-1}$ $\searrow$	Pro, protéine, lipide
1473 $\text{cm}^{-1}$ $\searrow$	indéterminé
1554 $\text{cm}^{-1}$ $\nearrow$	Trp

*Tableau 16 Tentative d'attribution des vibrations Raman dont l'intensité augmente ( $\nearrow$ ) ou diminue ( $\searrow$ ) notablement au niveau des spectres ex vivo de la surface vers la profondeur des pièces d'exérèse (94).*

Concernant les images obtenues sur les pics supposés plus intenses en zone tumorale (**Tableau 17** et **Tableau 18**), on observe que les pics positionnés à 1316  $\text{cm}^{-1}$  et à 1344  $\text{cm}^{-1}$  permettent de globalement bien identifier les zones tumorales sur les coupes congelées des trois pièces d'exérèse. Le pic à 1344  $\text{cm}^{-1}$  semble en particulier marquer plutôt la périphérie des nodules. Les pics positionnés à 644, 1447 et 1473  $\text{cm}^{-1}$  permettent de visualiser les régions tumorales sur les coupes congelées des patients 30 et 32 mais pas sur celle du patient 25. Parmi eux, le pic à 1473  $\text{cm}^{-1}$  semble plutôt définir l'interface entre l'épiderme et la zone tumorale. Le pic à 720  $\text{cm}^{-1}$  délimite quant à lui les zones tumorales sur les coupes congelées des patients 25 et 32, mais pas sur la coupe du patient 30. Les pics à 896  $\text{cm}^{-1}$  et 1447  $\text{cm}^{-1}$  ne permettent de

localiser les nodules tumoraux que pour le patient 30, même si cette localisation reste vague à  $896\text{ cm}^{-1}$ . Le pic à  $829\text{ cm}^{-1}$  ne discrimine les zones tumorales chez aucun des trois patients.

Concernant les images obtenues sur les pics supposés plus intenses hors zones tumorales (**Tableau 19**), les pics centrés à  $855$  et  $920\text{ cm}^{-1}$  permettent de visualiser les régions non tumorales des trois coupes congelées même si cette localisation est plus approximative pour les patients 25 et 32. En particulier pour le patient 25 où l'on devine néanmoins le nodule tumoral par la présence de pixels bleus codant des intensités plus faibles par rapport au reste de l'image. Le pic centré à  $1271\text{ cm}^{-1}$  définit les zones non tumorales sur les coupes des patients 30 et 32, alors que les pics à  $1251$  et  $1554\text{ cm}^{-1}$  ne le permettent que sur la coupe congelée du patient 30.

On constate donc que certaines de ces images permettent une bonne visualisation de la propagation tumorale, et il est intéressant de constater qu'un seul pic de diffusion Raman permette la localisation des nodules de CBC. Dans certains cas néanmoins, les nodules tumoraux sont distinguables mais leur limite n'est pas forcément clairement définie (exemple du patient 30 et du pic à  $1447\text{ cm}^{-1}$ ).

Il est à noter que les profils d'intensité de ces images spectrales ne peuvent pas être directement comparés aux courbes d'intensité intégrée des lignes *ex vivo* pour deux raisons principales. D'abord, les images spectrales ne sont pas acquises exactement à l'endroit où les lignes de spectres ont été enregistrées *ex vivo*. Ensuite, étant donné les temps d'acquisition nécessaires particulièrement longs, ces images ne s'étendent pas forcément jusqu'à la limite inférieure de chaque coupe (voir les cadres blancs dans la **Figure 58**, la **Figure 59** et la **Figure 60**), en particulier pour les patients 30 et 32.

Par rapport aux images pseudo-colorées obtenues après classification k-means (**Figure 58**, **Figure 59** et **Figure 60**) qui utilisent l'information contenue dans la totalité de la fenêtre spectrale, les images univariées reconstituées sur l'intensité d'un pic ne permettent pas de caractériser l'architecture globale du tissu, mais elles présentent l'avantage de pouvoir visualiser la répartition d'un composé moléculaire précis.

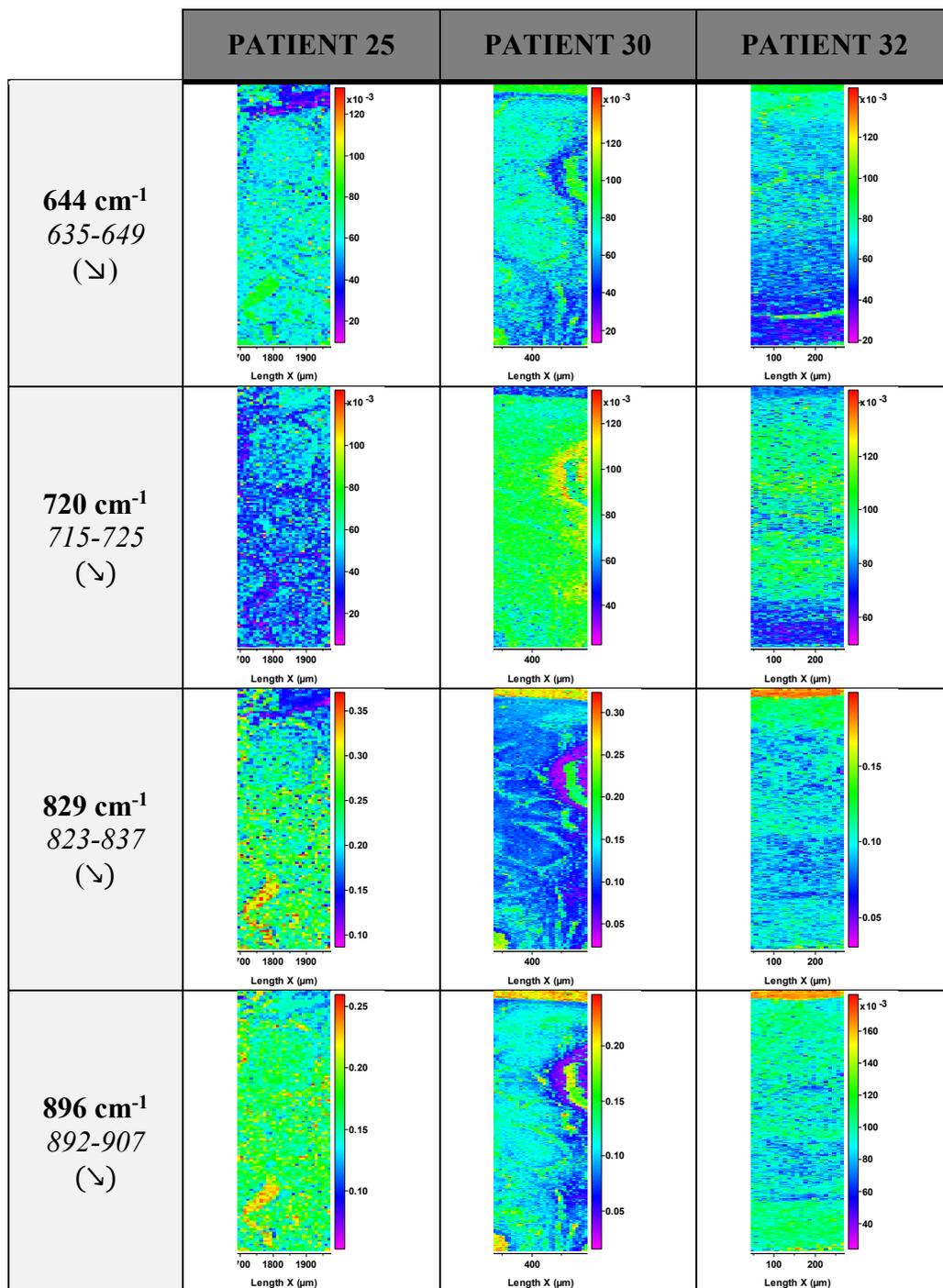


Tableau 17 Reconstitution des images spectrales acquises sur les coupes congelées des patients 25, 30 et 32 (respectivement P25, P30 et P32) à partir des pics à 644, 720, 829 et 896 cm<sup>-1</sup>. Les zones spectrales exactes utilisées pour la reconstitution sont indiquées en italique. Le sens d'évolution de l'intensité attendu d'après le Tableau 13 des zones tumorales vers les zones profondes est rappelé par les flèches ascendantes ou descendantes entre parenthèses.

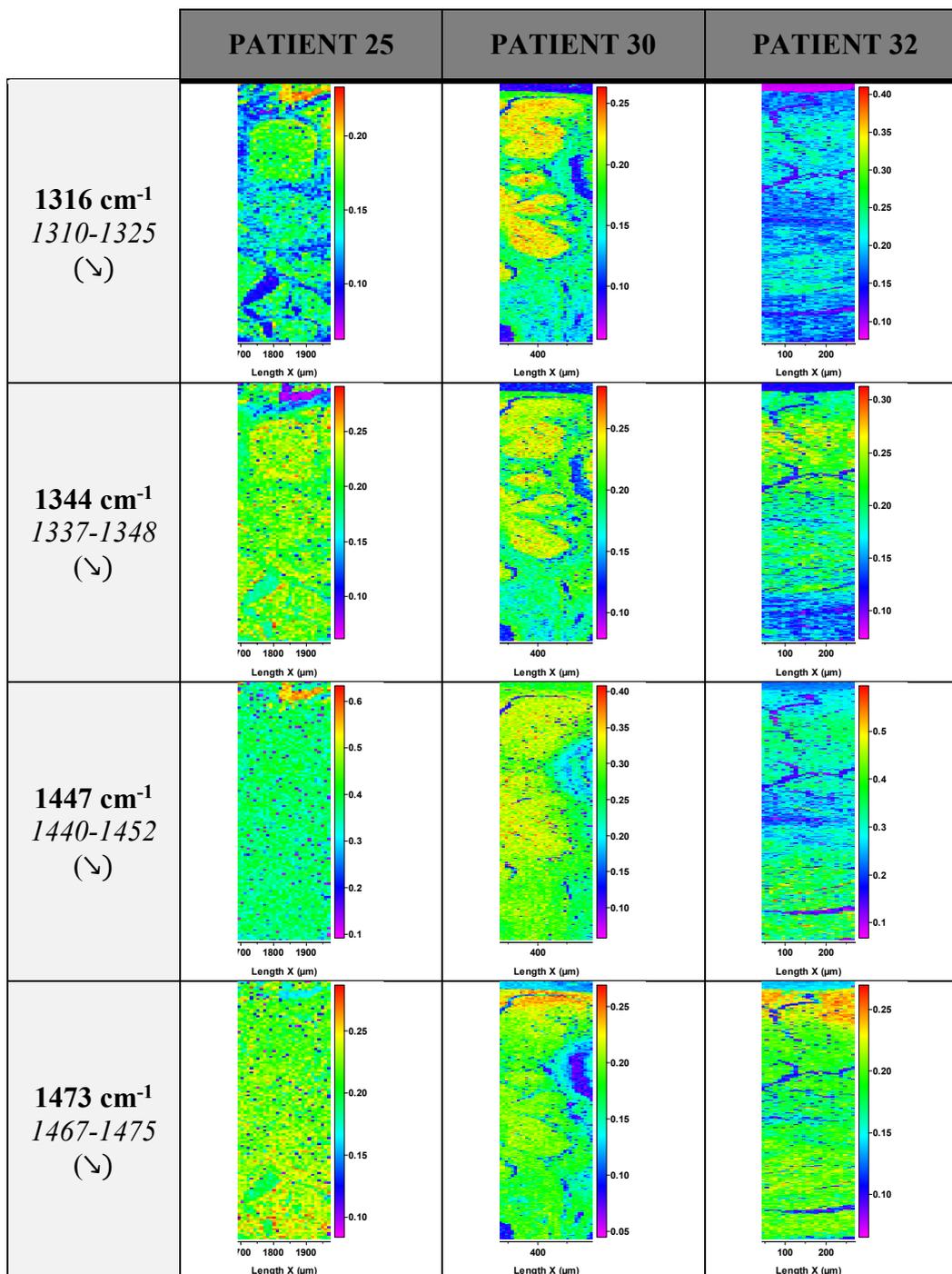


Tableau 18 Reconstitution des images spectrales acquises sur les coupes congelées des patients 25, 30 et 32 (respectivement P25, P30 et P32) à partir des pics à 1316, 1344, 1447 et 1473 cm<sup>-1</sup>. Les zones spectrales exactes utilisées pour la reconstitution sont indiquées en italique. Le sens d'évolution de l'intensité attendu d'après le Tableau 13 des zones tumorales vers les zones profondes est rappelé par les flèches ascendantes ou descendantes entre parenthèses.

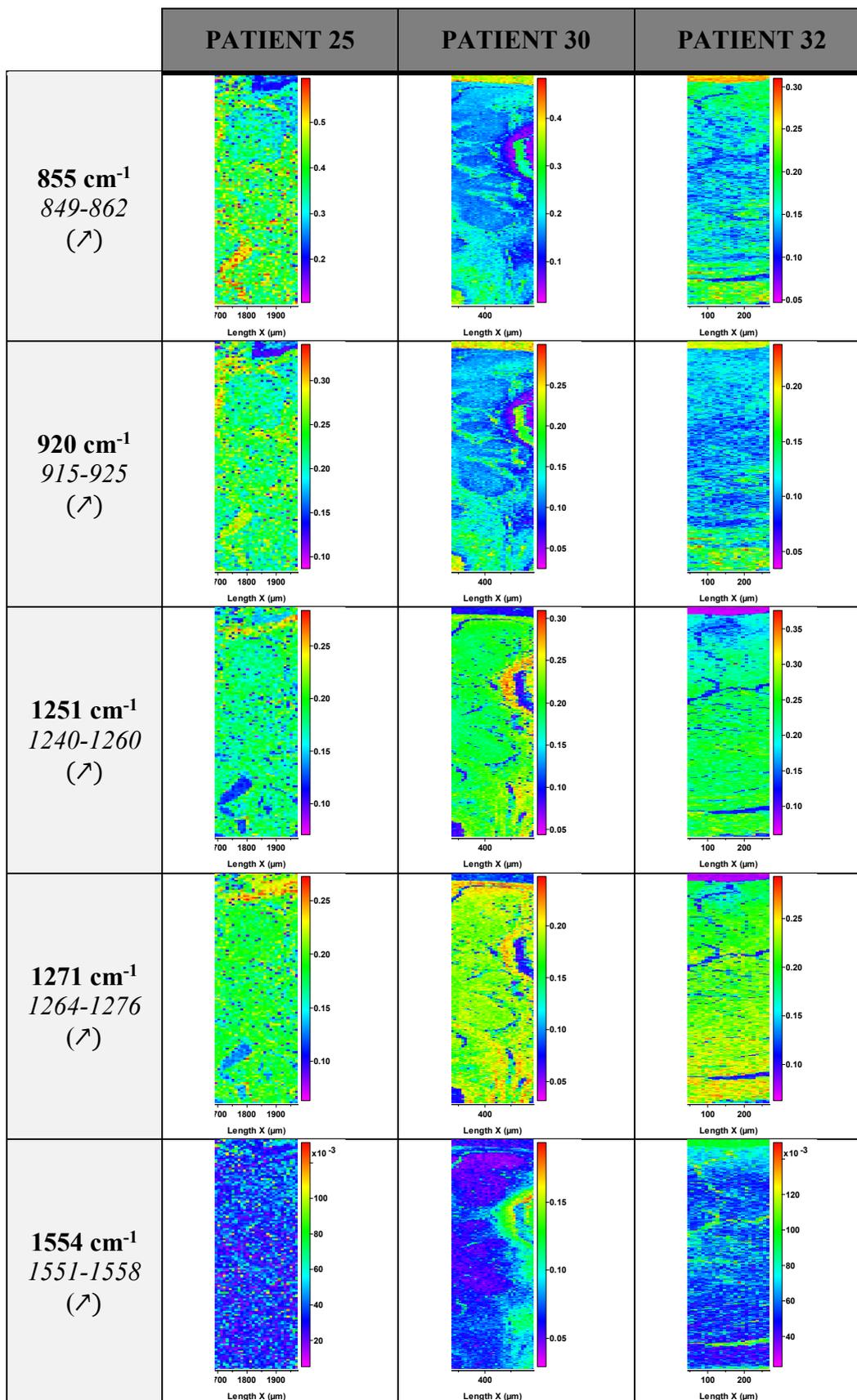


Tableau 19 Reconstitution des images spectrales acquises sur les coupes congelées des patients 25, 30 et 32 (respectivement P25, P30 et P32) à partir des pics à 855, 920, 1251, 1271 et 1554 cm<sup>-1</sup>. Les zones spectrales exactes utilisées pour la reconstitution sont indiquées en italique. Le sens d'évolution de l'intensité attendu d'après le Tableau 13 des zones tumorales vers les zones profondes est rappelé par les flèches ascendantes ou descendantes entre parenthèses.

## 2. Etude des fonds spectraux

Nous avons vu dans le chapitre consacré aux résultats obtenus avec les spectres *in vivo* que les fonds spectraux des spectres bruts étaient porteurs d'une information permettant de distinguer les spectres pris en zone tumorale des spectres pris en zone non tumorale. Dans ce chapitre, nous avons voulu évaluer *ex vivo* et *in vitro* la valeur informative de ces signaux généralement considérés comme parasites des spectres Raman.

### Fonds des spectres *in vitro*

Dans une première étape, des spectres bruts acquis au sein des nodules tumoraux et du tissu environnant ont été extraits des images spectrales des coupes congelées (**Figure 61**). En accord avec les observations faites au niveau des spectres *in vivo*, on remarque que les spectres pris au niveau du tissu sain expriment un fond plus intense que les spectres pris au niveau des nodules tumoraux.

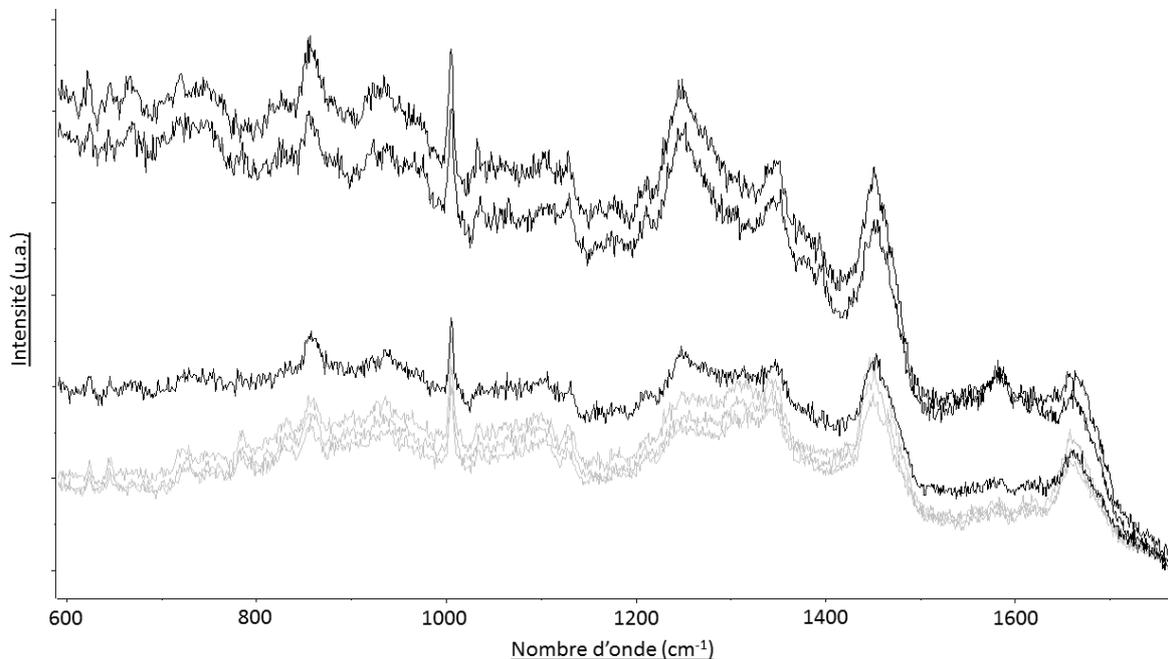
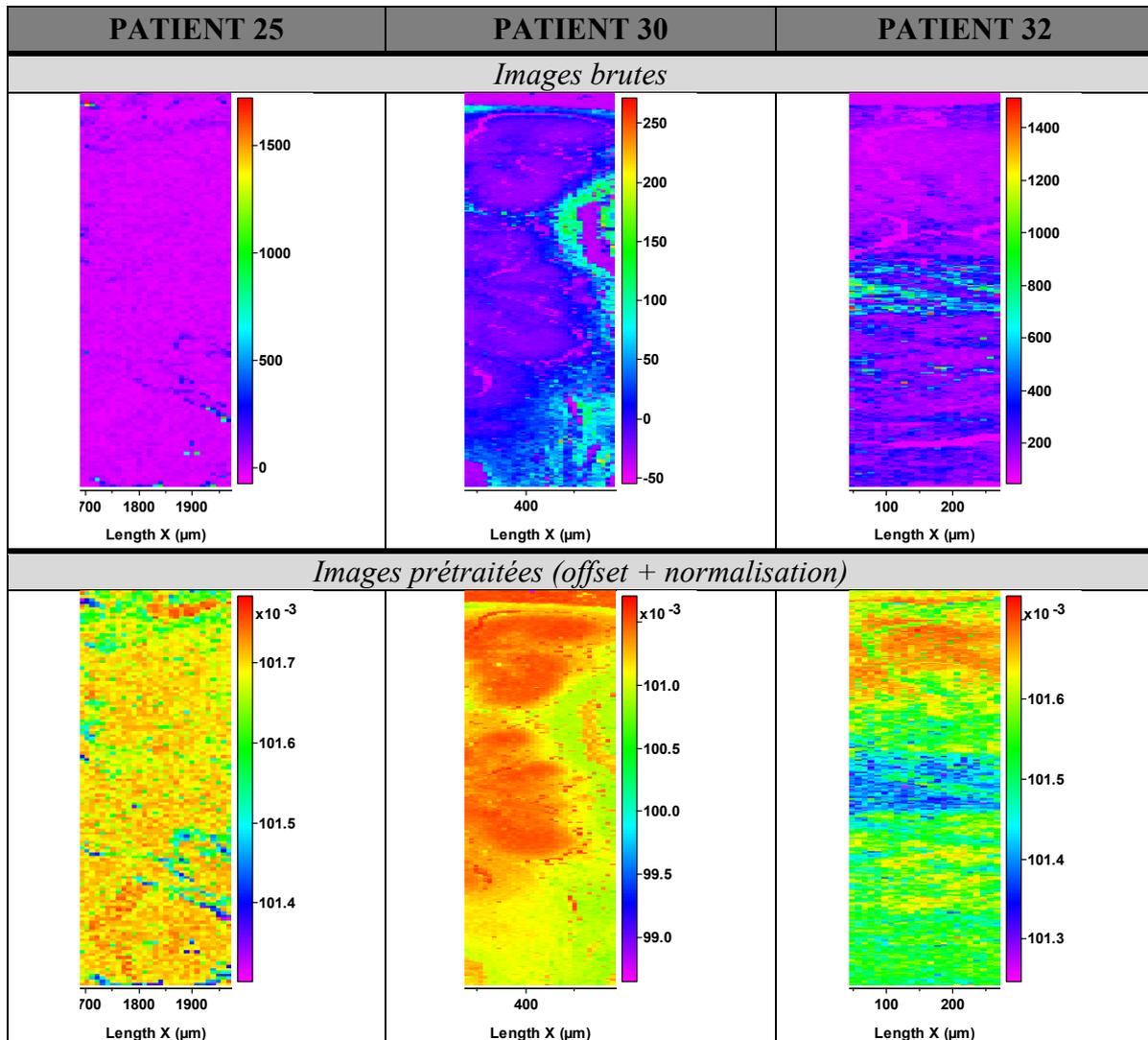


Figure 61 Comparaison de spectres bruts pris au niveau des nodules de CBC (en gris) et de spectres bruts pris au niveau du tissu environnant (en noir).

Dans un deuxième temps, nous avons observé le comportement de l'ensemble des fonds spectraux au sein des images spectrales de coupes congelées. Pour ce faire, les images brutes ont été pseudo-colorées à partir des valeurs d'intensité intégrée sur la totalité de la fenêtre spectrale d'acquisition :  $590-1765\text{ cm}^{-1}$  (**Tableau 20**). On observe que les spectres Raman bruts des zones tumorales présentent des fonds d'intensité inférieure à ceux acquis au niveau du tissu environnant. Cette différence est significative et permet une localisation des zones tumorales sur ces images pseudo-colorées. Un prétraitement de ces images par une correction d'offset suivie d'une normalisation sur l'aire totale accentue la discrimination des zones tumorales. Le résultat obtenu pour chacune des coupes congelées est en accord avec l'identification des zones tumorales réalisée par KM clustering (**Figure 58**, **Figure 59** et **Figure 60**).



*Tableau 20 Images pseudo-colorées des coupes congelées des pièces d'exérèse des patients 25, 30 et 32 obtenues après intégration des valeurs d'intensité sur la fenêtre spectrale  $590-1765\text{ cm}^{-1}$ . En haut : résultats après intégration des valeurs d'intensité des images brutes. En bas : résultats après intégration des valeurs d'intensité des images ayant été corrigées de l'offset puis normalisées sur l'aire totale.*

Enfin, nous avons appliqué aux spectres bruts un filtrage « excessif » dans le but de s'affranchir de l'information Raman. Le nombre d'itérations nécessaire pour ce lissage a été au préalable évalué sur un spectre point isolé de l'image spectrale du patient 30. Un premier lissage par moyennage (taille de fenêtre : 15) a été réalisé sur ce spectre à l'aide du logiciel LabSpec. Puis nous avons appliqué manuellement jusqu'à 499 autres lissages successifs. Le résultat obtenu a été sauvegardé tous les 5 à 50 lissages puis présenté dans la **Figure 62** et la **Figure 63**. A partir de 20 lissages successifs, on remarque la perte des pics de diffusion Raman les moins larges. Au-delà de 300 lissages, les pics Raman les plus larges ont eux-aussi disparu et on peut alors considérer que seul subsiste le fond spectral dû principalement à l'autofluorescence. De plus, l'augmentation du nombre de lissage ne modifie pas d'avantage la forme du fond résiduel.

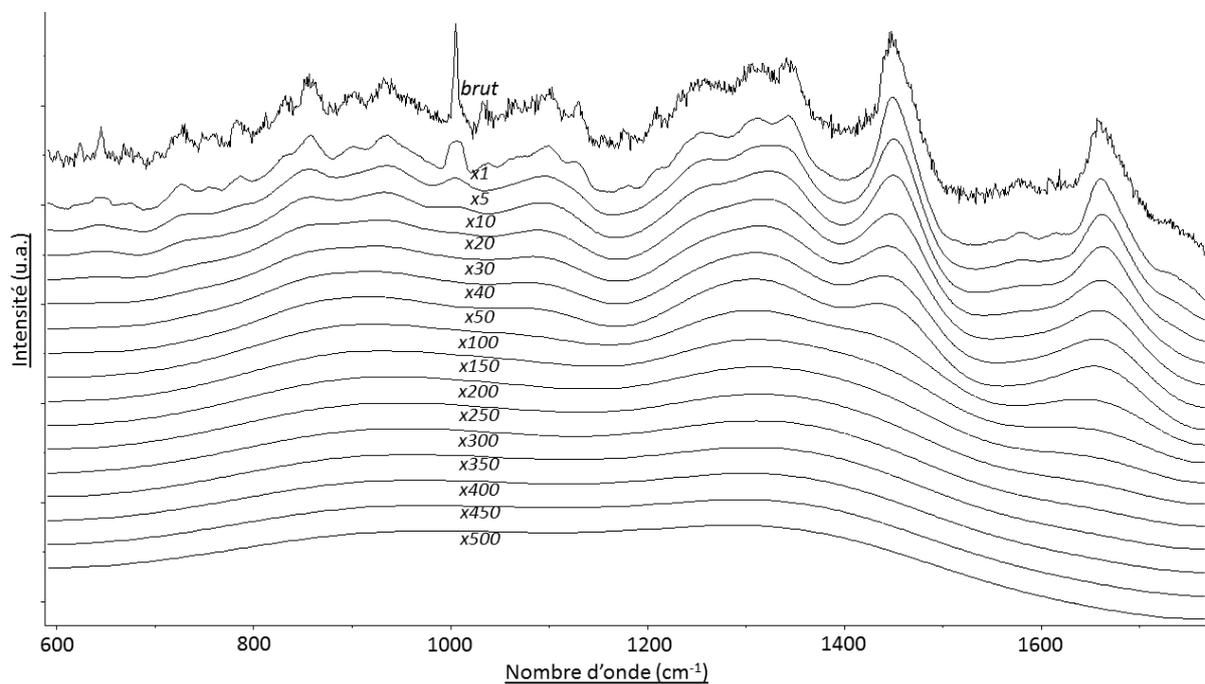


Figure 62 Spectre tumoral *in vitro* brut issu de la coupe congelée du patient 30 après un lissage par moyennage (x1) et après plusieurs itérations de ce lissage (x 5 à x500).

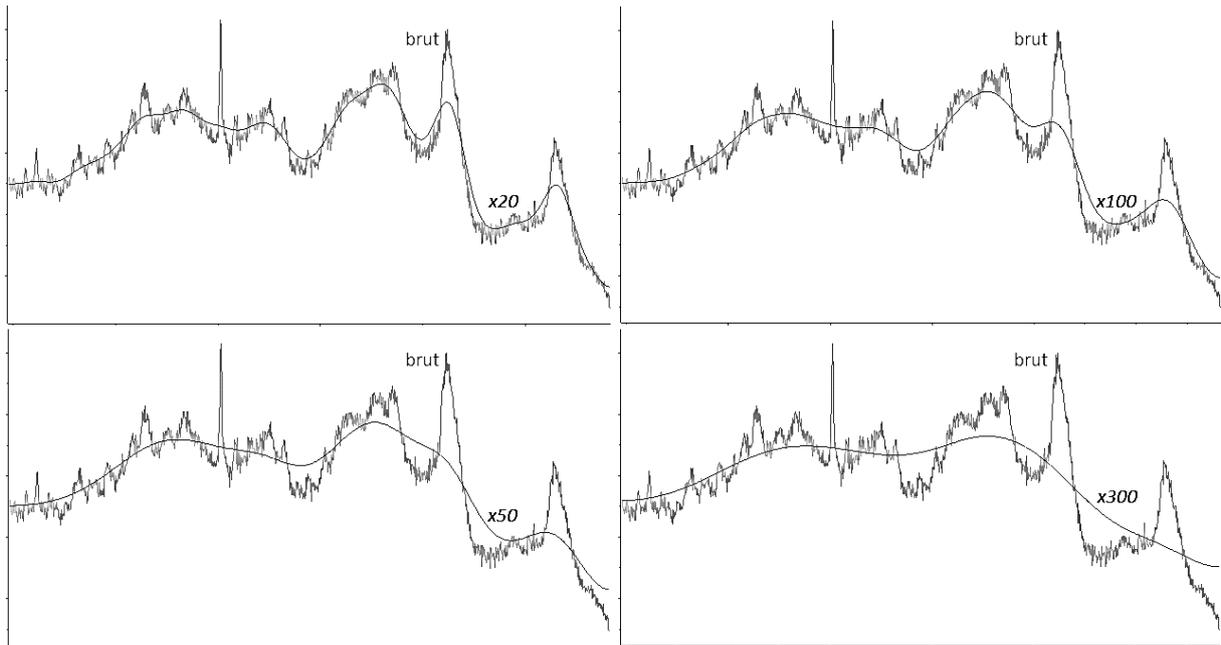


Figure 63 Superposition du spectre brut initial et de ce même spectre prétraité avec respectivement 20, 50, 100 et 300 lissages successifs.

Nous avons ensuite à nouveau reconstitué l'image à partir de l'intensité intégrée des fonds spectraux ainsi isolés. Les résultats obtenus après 300 et 500 lissages sont présentés dans le **Tableau 21** et comparés au résultat obtenu à partir de l'image non lissée. On observe que les zones tumorales sont encore distinguables, ce qui confirme que les fonds spectraux contiennent bien une information discriminante qui leur est propre, superposée aux vibrations Raman.

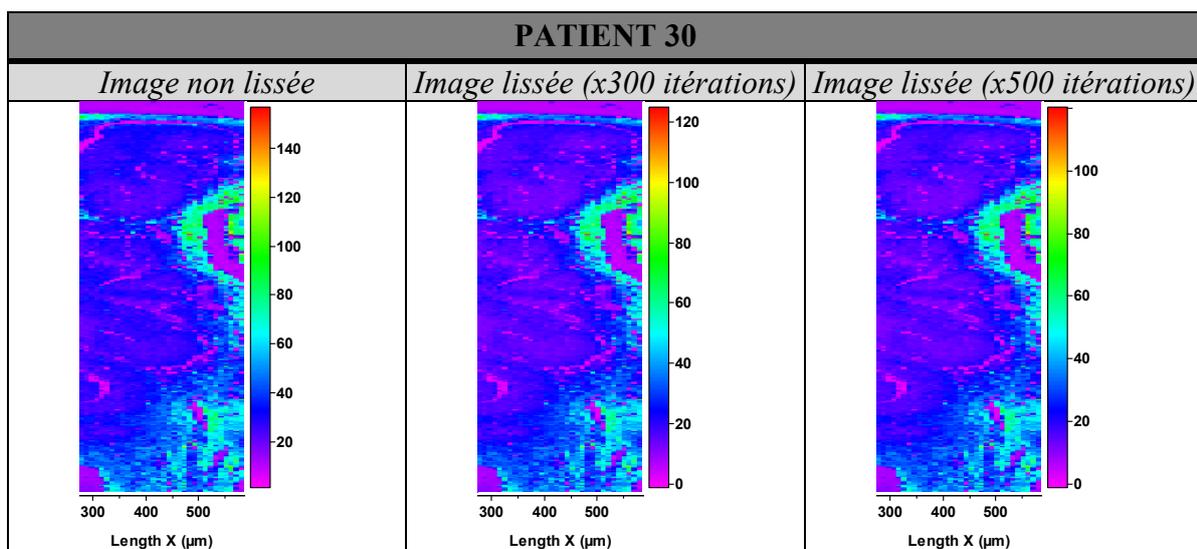
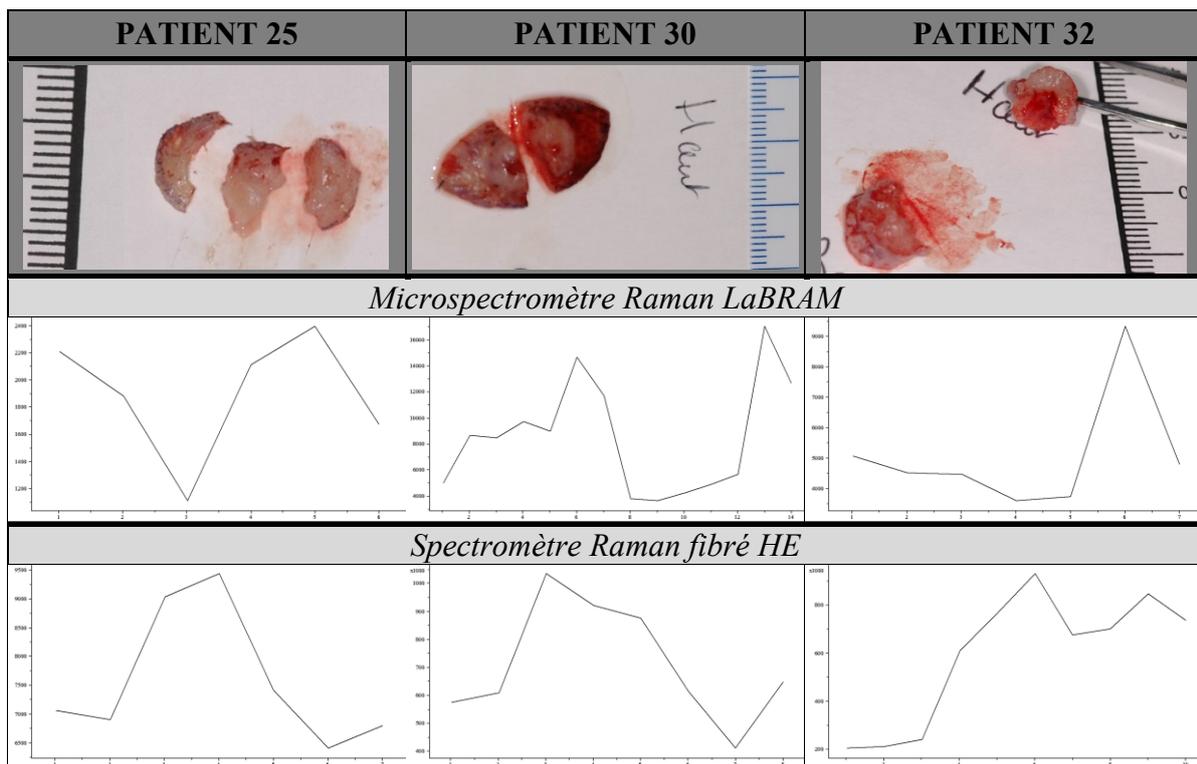


Tableau 21 Images pseudo-colorées selon les valeurs d'intensité intégrée sur la fenêtre spectrale d'acquisition 590-1765  $cm^{-1}$ , obtenues après correction d'offset.

Fonds des spectres *ex vivo*

Concernant les spectres Raman des lignes *ex vivo* acquises à l'aide du microspectromètre LabRAM et du spectromètre fibré HE, les intensités des spectres bruts ont été intégrées sur la totalité de la fenêtre spectrale d'acquisition. L'évolution des valeurs d'intensité intégrée de la surface cutanée vers la profondeur est présentée pour chacune des trois pièces d'exérèse sous forme de profil (**Tableau 22**).



**Tableau 22** Photographies des pièces d'exérèse incisées et profils représentant l'évolution de l'intensité intégrée des spectres Raman bruts de la surface cutanée vers la profondeur. Les valeurs d'intensité ont été intégrées sur toute la fenêtre spectrale d'acquisition ( $590-1765\text{ cm}^{-1}$  pour les lignes acquises avec le microspectromètre LabRAM,  $90-3350\text{ cm}^{-1}$  pour celles acquises avec le spectromètre fibré HE). Diminuer la fenêtre d'intégration à  $590-1765\text{ cm}^{-1}$  pour les lignes acquises avec le spectromètre fibré HE change peu les profils obtenus. Afin de pouvoir comparer les profils collectés avec des temps d'acquisition variables (optimisés par rapport à la fluorescence), les intensités de chaque spectre ont été divisées par le temps d'acquisition correspondant (lignes HE des patients 30 et 32).

On remarque que seuls les profils obtenus à partir des lignes acquises avec le microspectromètre Raman LaBRAM présentent une augmentation d'intensité intégrée pour les spectres proches de la profondeur. Cependant ces valeurs d'intensité varient fortement de la surface vers la profondeur pour les pièces d'exérèse des patients 25 et 30. Seules les lignes acquises sur la pièce d'exérèse du patient 32 montrent pour les deux systèmes d'acquisition, une distinction nette entre les spectres proches de la surface et les spectres proches de la profondeur.

Les fonds spectraux obtenus *in vivo* et *ex vivo* n'ont pas les mêmes origines. En effet, le signal enregistré *in vivo* est enregistré en surface cutanée et provient des différentes couches sous-jacentes (en particulier l'épiderme et le derme) alors que celui enregistré *ex vivo* est acquis sur la tranche de la pièce d'exérèse à différentes profondeurs du derme. Une variation des valeurs d'intensité pourrait s'expliquer par la traversée de nodules successifs de CBC. Cette affirmation reste hypothétique. D'autant plus que les acquisitions Raman sur des pièces d'exérèse fraîches incisées présentent des difficultés expérimentales pouvant influencer sur la forme des fonds spectraux, notamment parce que les surfaces d'acquisition ne sont pas planes, comme il est possible de le visualiser sur les photographies du **Tableau 22**.

#### IV- CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Concernant l'évaluation de la marge profonde d'excision des CBC par approche Raman, on peut dire que parmi les pics de diffusion Raman sélectionnés, les pics centrés autour de 1316  $\text{cm}^{-1}$  et de 1344  $\text{cm}^{-1}$  sont ceux définissant le mieux les CBC nodulaires que ce soit au niveau des pièces d'exérèse ou des coupes congelées. Il est intéressant de constater que ce résultat est en accord avec nos travaux sur les spectres *in vivo* (cf. papier soumis) puisque nous avons trouvé en utilisant le programme Randfeatures que les longueurs d'onde ayant le plus haut pouvoir de discrimination des spectres *in vivo* pris au niveau des CBC nodulaires par rapport aux spectres pris sur la peau saine était comprise entre 1322 et 1331  $\text{cm}^{-1}$  et entre 1342 et 1345  $\text{cm}^{-1}$ . Et bien qu'il soit admis qu'un pic de diffusion Raman isolé contient une information limitée, ces deux pics semblent néanmoins de bons candidats en tant que marqueurs tumoraux potentiellement utilisables *in vivo* et *ex vivo* en temps réel pour une aide chirurgicale à l'évaluation de la limite spatiale de l'excision, éventuellement en association avec d'autres pics de diffusion. La raie Raman localisée aux alentours de 1320  $\text{cm}^{-1}$  peut être attribuée aux vibrations des doubles liaisons C=C, du cycle de la Guanine et des liaisons C-H des protéines. La raie Raman localisée vers 1344  $\text{cm}^{-1}$  peut être associée aux vibrations de la Phénylalanine, du Tryptophane, des liaisons C-H et C-C, ainsi que des polysaccharides, de l'ARN, de l'Adénine et de la Guanine (94).

Concernant l'influence du fond des spectres Raman, l'exploitation des images spectrales issues des coupes congelées montre que les fonds spectraux contiennent une information qui se superpose à l'information Raman, et qui permet de discriminer les zones cutanées tumorales par rapport au tissu environnant. Concernant les fonds spectraux des lignes *ex vivo*, il n'a pas pu être mis en évidence de potentiel discriminant sur la tranche de la pièce fraîchement excisée. Cependant des investigations supplémentaires incluant un plus grand nombre de spectres *ex vivo* sont nécessaires pour pouvoir conclure définitivement. L'existence d'un potentiel discriminant des fonds spectraux *ex vivo* pourrait permettre un contrôle rapide du lit tumoral, permettant de cibler l'analyse Raman sur les points d'intérêt.

*Résultats obtenus avec les spectres in vitro*

---

**EXPLOITATION DES  
INFORMATIONS OBTENUES  
SUR LES COUPES CONGELEES  
DE CARCINOMES BASO-CELLULAIRES**  
*en microspectroscopies Raman et infrarouge*

---

## I- INTRODUCTION

Des images des coupes congelées à notre disposition ont été acquises en microspectroscopies Raman et infrarouge, puis analysées par des méthodes chimiométriques. L'objectif premier de ce travail était de construire une banque d'images spectrales des lésions étudiées précédemment, afin d'aider à l'interprétation des résultats *in vivo* et *ex vivo*. Cependant, certains des résultats obtenus se sont révélés également intéressants, comme nous le présentons dans ce chapitre.

## II- MATERIELS ET METHODES

Les résultats présentés ici sont issus de l'analyse par microspectroscopies Raman et/ou infrarouge des coupes congelées de 3 patients. Les images spectrales de CBC nodulaires sont issues des coupes des patients 12 et 17. L'image du trichofolliculome provient de la coupe de la lésion du patient 23.

Les images Raman ont été acquises avec le microspectromètre LabRAM de longueur d'onde incidente 785 nm. La puissance mesurée en sortie d'objectif est de 50 mW. La fenêtre spectrale d'acquisition est 590-1765  $\text{cm}^{-1}$ . En fonction de la taille de chaque image, le temps d'acquisition de chaque spectre varie entre 5 et 30 s et la distance interpixels entre 6 et 20  $\mu\text{m}$ . Les images ont ensuite subi la même série de prétraitements. D'abord un lissage Savitzky-Golay (ordre de polynôme et largeur de fenêtre usels : 3 et 19 respectivement), suivie d'une correction de ligne de base polynomiale d'ordre 3 ou 4, puis d'une normalisation vectorielle et si besoin d'élimination de spectres aberrants (sélectionnés manuellement ou par classification KM).

Les images infrarouges ont été enregistrées avec le microspectromètre Spotlight. La fenêtre spectrale d'acquisition sélectionnée est 650-4000  $\text{cm}^{-1}$ . Chaque spectre infrarouge correspond à 64 scans d'une zone d'acquisition de taille 6,25 x 6,25  $\mu\text{m}^2$ . Les images obtenues ont ensuite été corrigées atmosphériquement. La fenêtre spectrale a ensuite été réduite à 900-1800  $\text{cm}^{-1}$ , zone généralement la plus informative pour les échantillons biologiques. Les spectres aberrants éventuels ont été retirés (méthode manuelle ou KM). Puis une EMSC a été appliquée : le plus souvent, la valeur du résidu était de 4, le fit coefficient de 1000 et le polynôme d'ordre 3.

### III- RESULTATS ET DISCUSSION

#### 1. Hétérogénéité du CBC nodulaire et du tissu environnant

Des algorithmes de classification appliqués aux images spectrales de CBC nodulaires mettent en évidence l'existence d'une hétérogénéité au sein du nodule, ainsi qu'au niveau du tissu environnant.

La **Figure 64** montre le résultat obtenu après classification KM de l'image Raman d'un nodule isolé de CBC. Les pixels du cluster 4 codés par la couleur bleue se distinguent clairement des autres pixels de l'image. L'analyse d'une zone spectrale plus large autour de ce nodule, s'étendant de l'épiderme à la limite inférieure de l'exérèse, montre qu'à ce niveau, commence une zone dermique inférieure à l'ensemble des nodules de CBC de la coupe (*données non montrées*). De plus, sur la **Figure 64**, on remarque que c'est le seul cluster qui n'est pas directement en contact avec le nodule de CBC. Il est probable qu'il s'agisse plutôt de derme peri-tumoral et que les clusters 5 (bleu foncé) et 3 (turquoise) correspondent au stroma ; ces derniers étant d'ailleurs selon le dendrogramme, plus proches spectralement des clusters tumoraux. Etant donné la zone acquise très étroite autour du nodule, il n'y a vraisemblablement pas de derme sain sur cette image. Concernant les pixels intranodulaires, ils sont divisés en un cluster rose plutôt central et un cluster jaune périphérique (clusters 6 et 1 respectivement). Une classification FCM a été appliquée sur cette même image. Le résultat est présenté dans la **Figure 65**. L'hétérogénéité intratumorale et du tissu environnant est à nouveau constatée. En associant à chaque pixel de l'image des coefficients d'appartenance aux classes, la classification FCM permet de déterminer si les limites entre chaque cluster sont nettes ou progressives. Il apparaît que les clusters tumoraux sont clairement distincts de ceux du tissu environnant ce qui est cohérent puisque les CBC sont des tumeurs très bien délimités. En revanche, la transition entre les 2 clusters intranodulaires (clusters 3 et 5) est progressive, de même que la transition entre les 3 clusters du tissu environnant en contact avec le nodule (attribués au stroma). Il apparaît aussi dans le dendrogramme FCM que la zone tissulaire représentée par le cluster 6 (attribué au derme péri-tumoral) est clairement distincte des autres clusters, d'autant plus que sa frontière est franche.

Une seconde image Raman, contenant plusieurs nodules de CBC, a également été traitée par classifications KM et FCM, ainsi que par HCA. Les résultats sont présentés dans la **Figure 66** et la **Figure 67**. Ces classifications permettent de mettre en évidence l'hétérogénéité existant

au sein du tissu environnant (identifié comme stroma ici), ainsi qu'à l'intérieur des trois nodules présents sur cette image. On distingue également dans les trois cas, un cluster tumoral regroupant des pixels situés plutôt aux centres des nodules (cluster 8 du FCM, clusters orange et rose du KM et de la CHA respectivement). Éparpillés et peu nombreux au centre des deux petits nodules, ces pixels forment par contre une zone tumorale relativement importante au centre du nodule le plus gros. Cette observation pourrait refléter une différence d'oxygénation entre les cellules centrales et périphériques existant au sein d'une masse tumorale, d'autant plus que celle-ci est importante. Le FCM met de plus en évidence l'existence d'une couche cellulaire en limite des nodules tumoraux (cluster 1). Il est probable qu'il s'agisse des cellules épithéliales à arrangement palissadique qui entourent les CBC nodulaires. On peut aussi visualiser cette couche sur l'image CHA avec le cluster jaune, qui se regroupe dans le dendrogramme avec les autres clusters tumoraux. Par contre, elle n'apparaît pas sur l'image KM ce qui peut s'expliquer par le fait que la classification KM dépend des pixels initiaux choisis aléatoirement.

La microspectroscopie infrarouge permet de la même façon de mettre en évidence l'hétérogénéité existant au sein du tissu environnant et du tissu tumoral (cf. **Figure 68** et **Figure 69**). Cependant pour pouvoir observer l'hétérogénéité des nodules de CBC sur les images infrarouges, il faut travailler avec un nombre plus important de clusters (cf. **Figure 74**). Que ce soit en microspectroscopie Raman ou infrarouge, il apparaît que l'hétérogénéité du tissu environnant nécessite peu de clusters pour être mise en évidence. Cela reflète le fait que la variabilité existant dans ce tissu est plus grande que celle existant au sein du tissu tumoral.

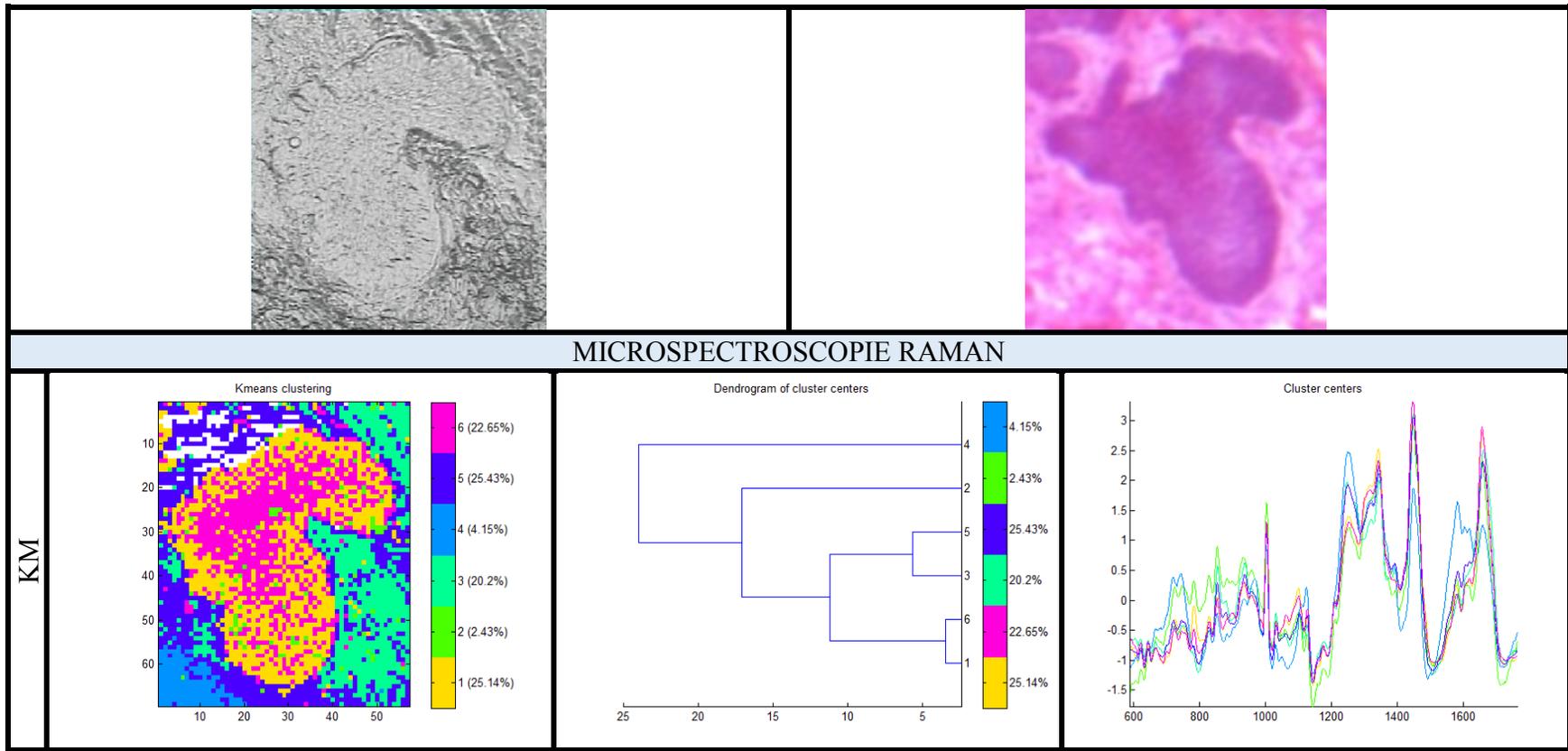


Figure 64 Classification KM. Cadre inférieur : Image pseudo-colorée obtenue après classification KM en 6 clusters d'une image Raman d'un nodule isolé de CBC, avec le dendrogramme et les centroïdes associés. Cadre supérieur : Photographies de la zone analysée sur la coupe congelée et sur la coupe colorée HE adjacente.

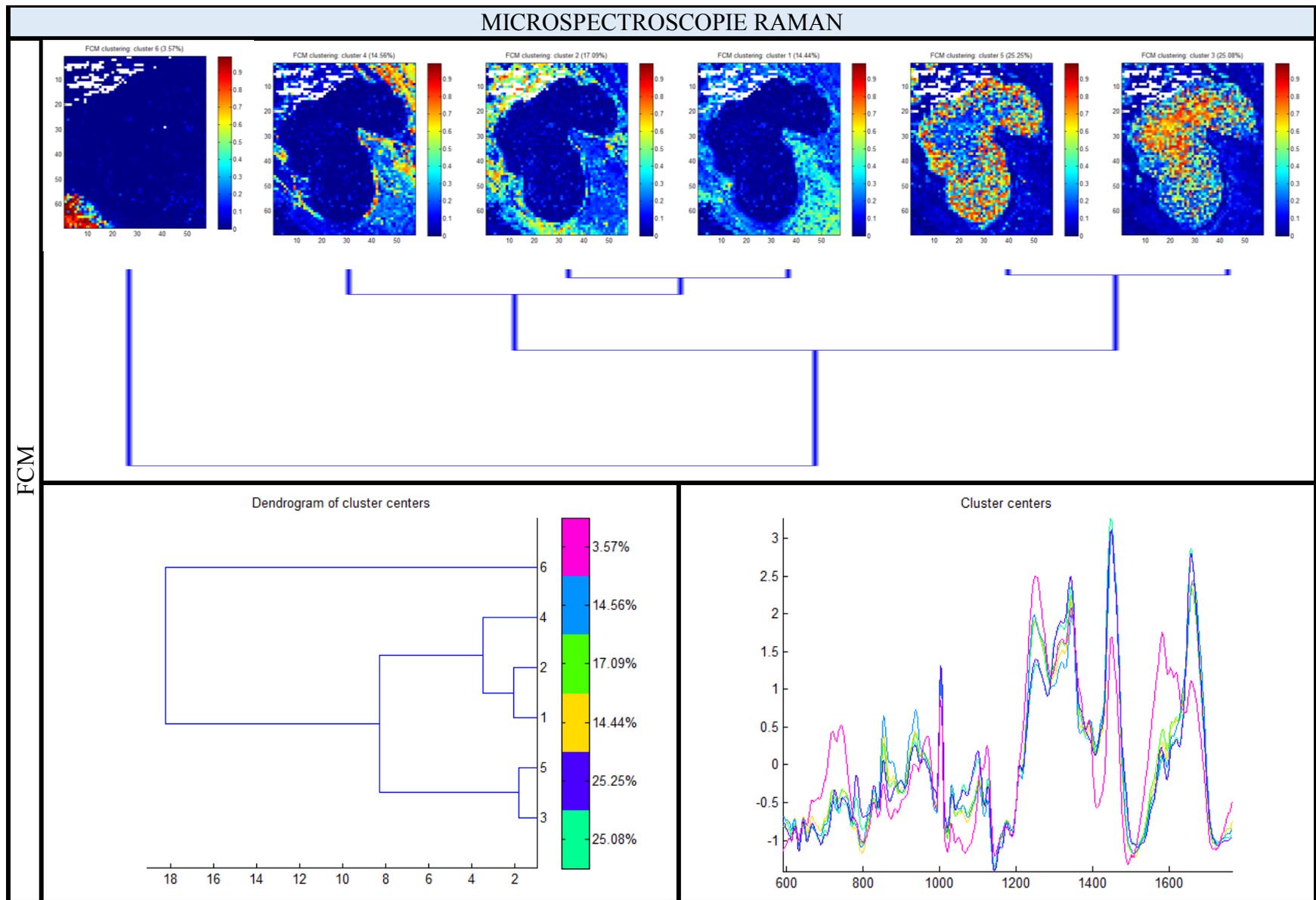


Figure 65 Résultat obtenu après classification FCM en 6 clusters (paramètre Fuzzy = 1,6) de l'image spectrale Raman précédemment analysée par KM dans la Figure 64, avec le dendrogramme et les centroïdes associés.

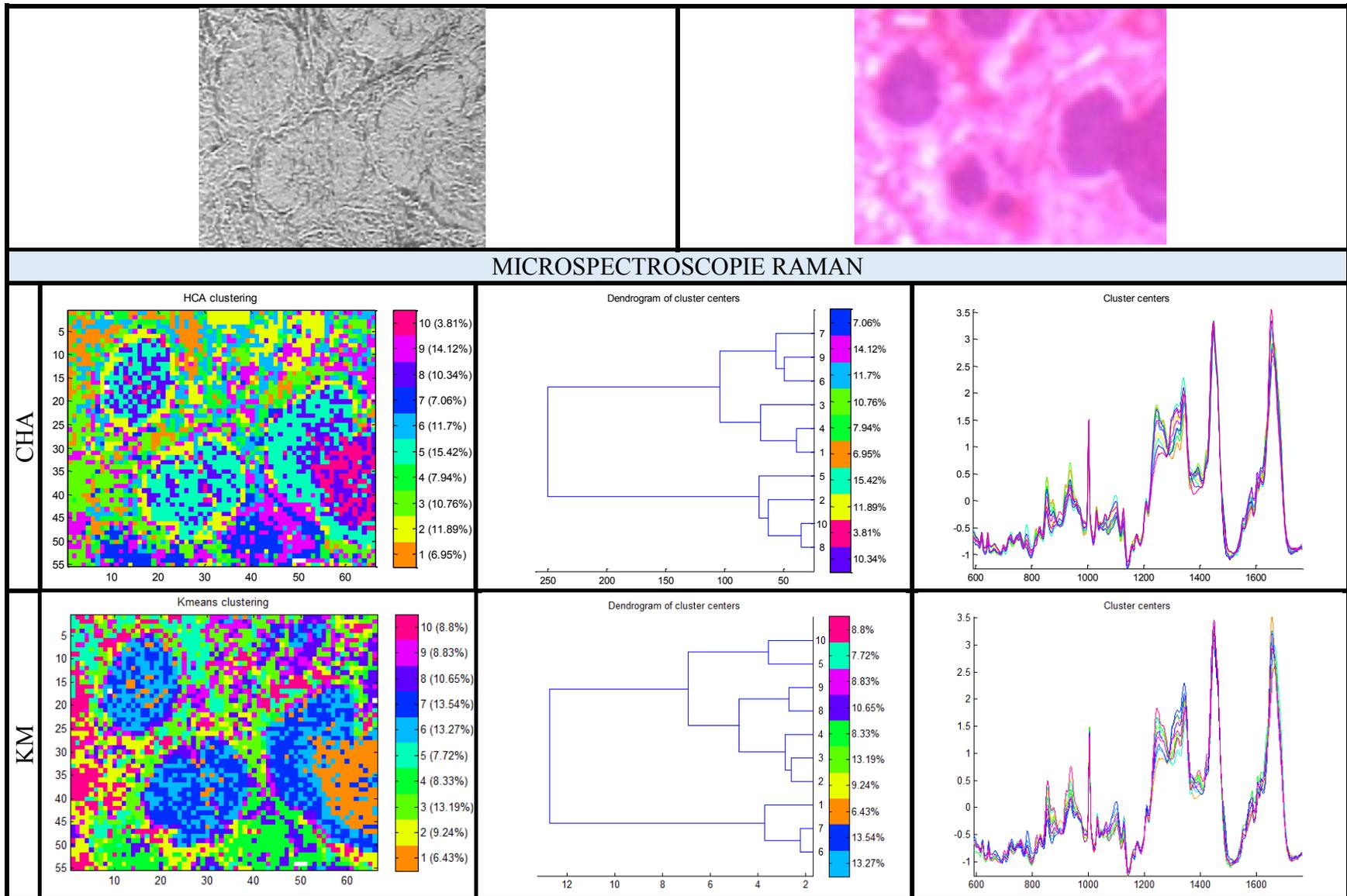


Figure 66 Classification KM et CHA. Cadres inférieurs : Images pseudo-colorées obtenues après classification KM et CHA sur la base de 10 clusters d'une image Raman regroupant plusieurs nodules de CBC, avec les dendrogrammes et les centroïdes respectifs associés. Cadre supérieur : Photographies de la zone analysée sur la coupe congelée et sur la coupe colorée HE adjacente.

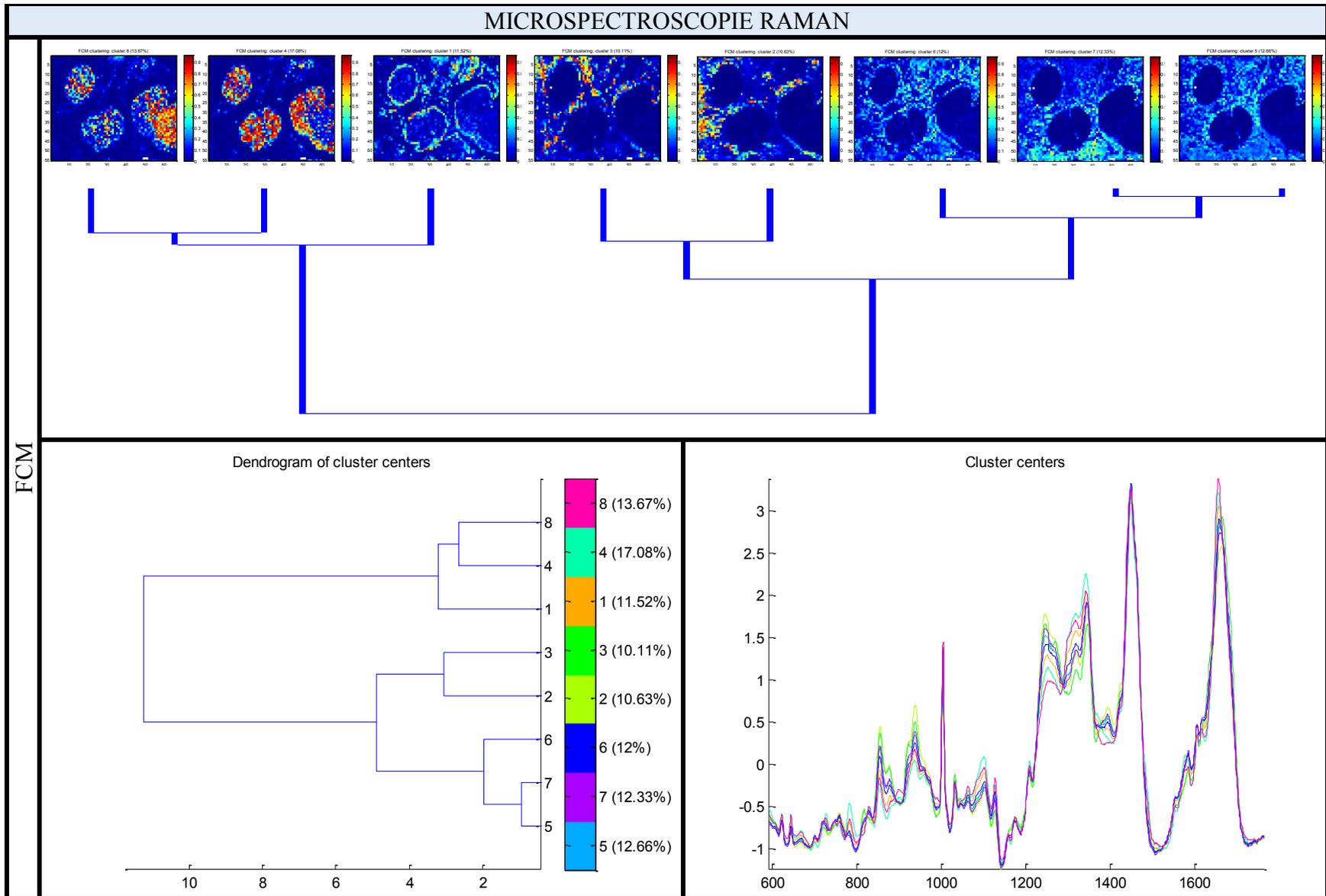


Figure 67 Résultat obtenu après classification FCM en 8 clusters (paramètre Fuzzy = 1,6) de l'image spectrale Raman précédemment analysée par KM et CHA dans la Figure 66, avec le dendrogramme et les centroïdes associés.

## 2. Origine cellulaire du CBC

Les CBC dériveraient de cellules pluripotentes situées dans les couches basales épidermique et pileuse (14). Certains résultats de classification obtenus sur les coupes congelées témoignent de cette origine des CBC.

Premièrement, l'analyse vibrationnelle d'une zone cutanée contenant à la fois des follicules pileux et des nodules de CBC montre des caractéristiques communes entre les deux structures. Ainsi une classification KM de l'image infrarouge de cette zone montre que les cellules à arrangement palissadique des nodules de CBC et la partie externe du follicule pileux sont classées dans un même cluster (vert foncé). Ce cluster est de plus associé avec le cluster vert clair qui regroupe les cellules internes des nodules de CBC ainsi que quelques cellules en périphérie du follicule pileux (**Figure 68**). Si on analyse cette même image en FCM, on constate que c'est surtout la couche cellulaire la plus externe des follicules pileux qui est proche des cellules palissadiques, ce qui est cohérent avec le fait que les follicules pileux sont aussi entourés de ce type de cellules (cluster 5). Le reste de l'enveloppe folliculaire est plus proche des cellules intranodulaires (cluster 4) (**Figure 69**). Les classifications KM et FCM d'une image Raman de cette même zone cutanée montrent également le regroupement des pixels de CBC et des pixels de l'enveloppe externe du follicule pileux dans un même cluster, mais seul le FCM permet de mettre en évidence les cellules à arrangement palissadique qui appartiennent au même cluster qu'une couche de cellules épidermiques (cluster 5) (**Figure 70** et **Figure 71**).

Deuxièmement, l'image d'un nodule de CBC accolé à l'épiderme révèle l'existence d'une interface de caractéristiques communes. En effet en microspectroscopie Raman, une zone cutanée transitionnelle entre l'épiderme et le nodule de CBC est mise en évidence sur l'image pseudo-colorée après CHA (cluster turquoise), classification KM (cluster rose) ou classification FCM (cluster 5) (**Figure 72** et **Figure 73**). Cette interface est également visible en microspectroscopie infrarouge après classification KM ou FCM (clusters violet foncé et 2 respectivement) (**Figure 74** et **Figure 75**). Remarquons que cette coupe congelée passe par un follicule pileux (cf. photographie de la zone cutanée sélectionnée sur la **Figure 72**) qui est bien identifiable par les différentes classifications (clusters 1 et 8 de la **Figure 75** par exemple).

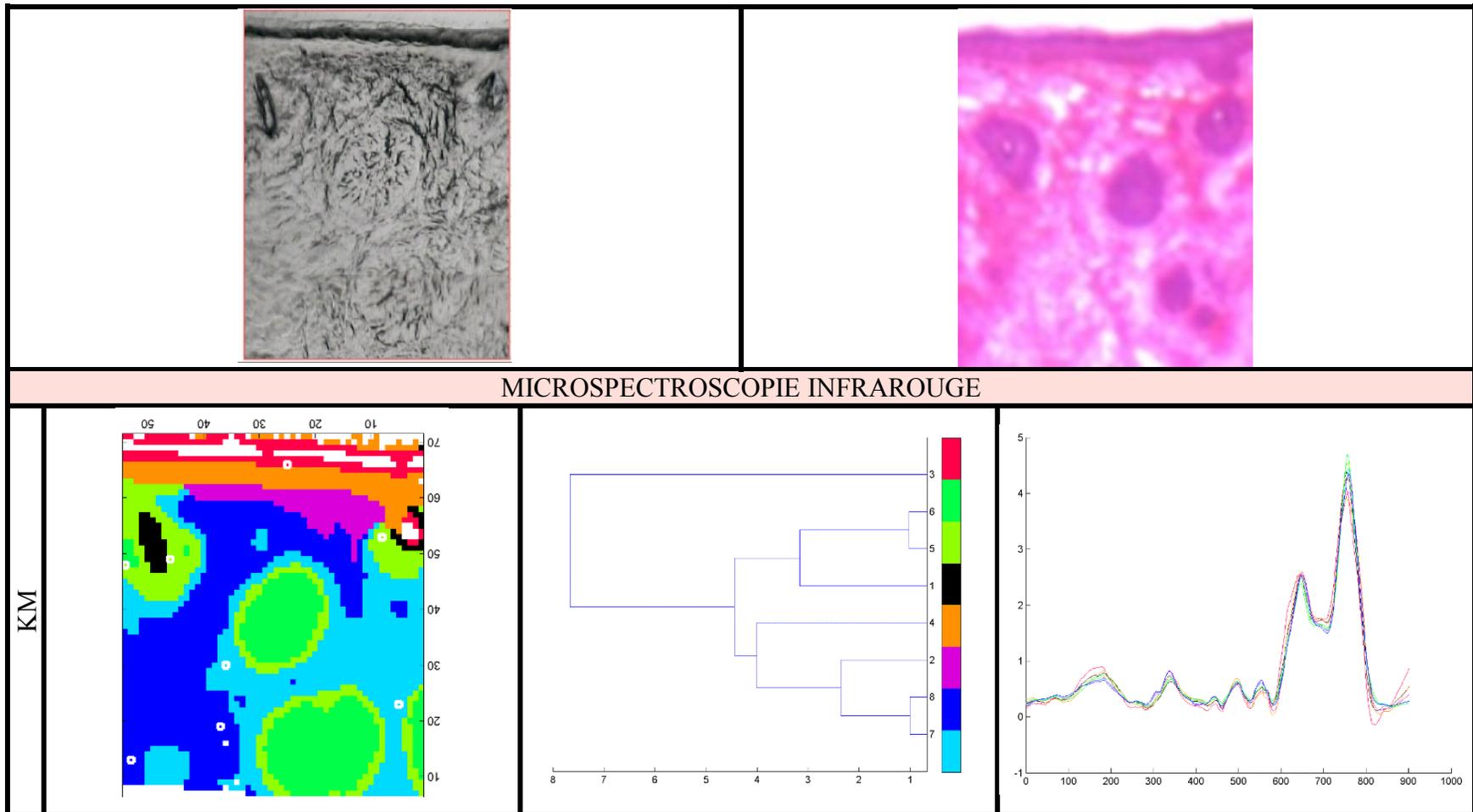


Figure 68 Classification KM. Cadre inférieur : Image pseudo-colorée obtenue après classification KM en 8 clusters d'une image infrarouge regroupant des nodules de CBC et des follicules pileux, avec le dendrogramme et les centroïdes associés. Cadre supérieur : Photographies de la zone analysée sur la coupe congelée et sur la coupe colorée HE adjacente.

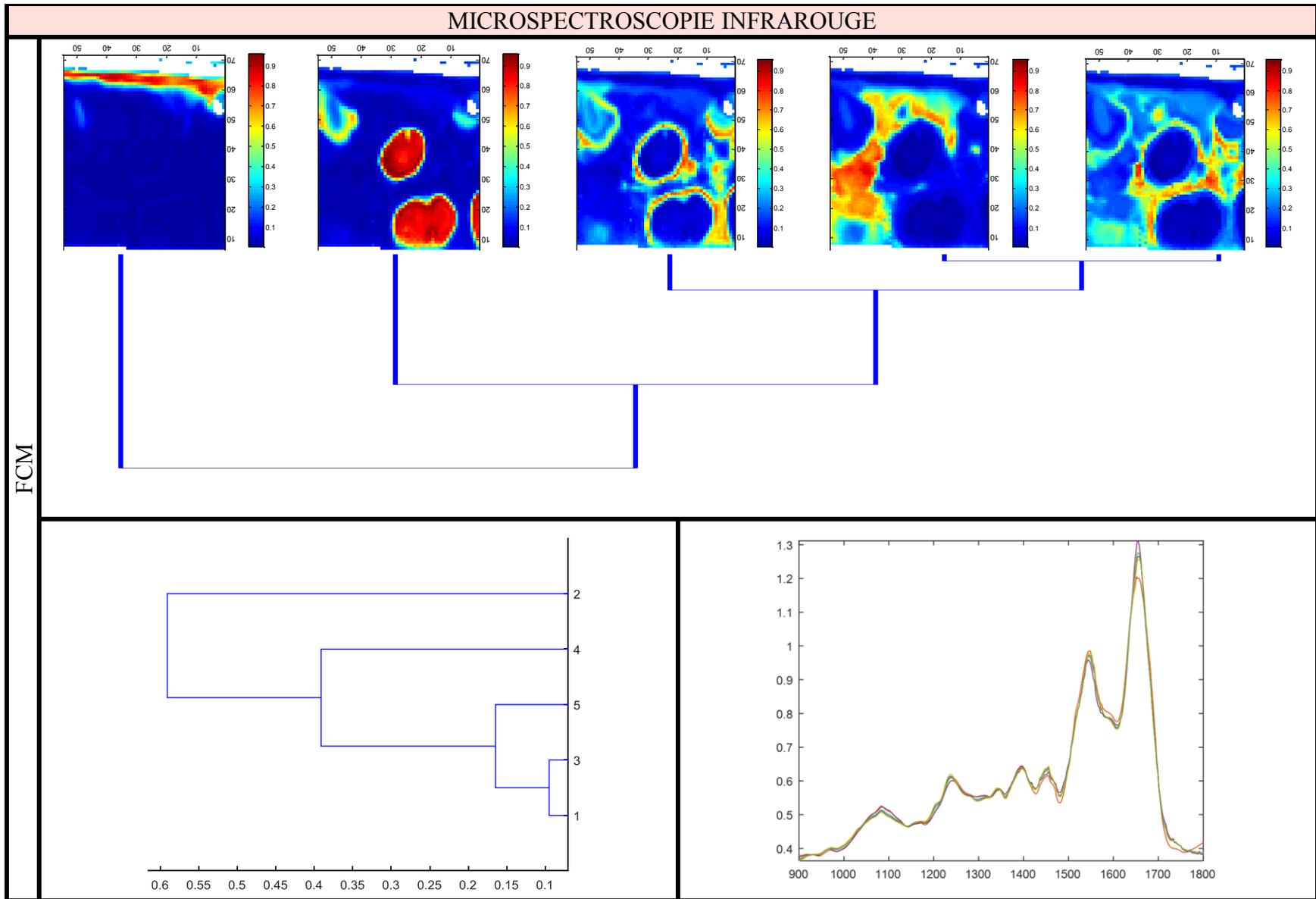


Figure 69 Résultat obtenu après classification FCM en 5 clusters (paramètre Fuzzy = 2,2) de l'image spectrale infrarouge précédemment analysée par KM dans la Figure 68, avec le dendrogramme et les centroïdes associés.

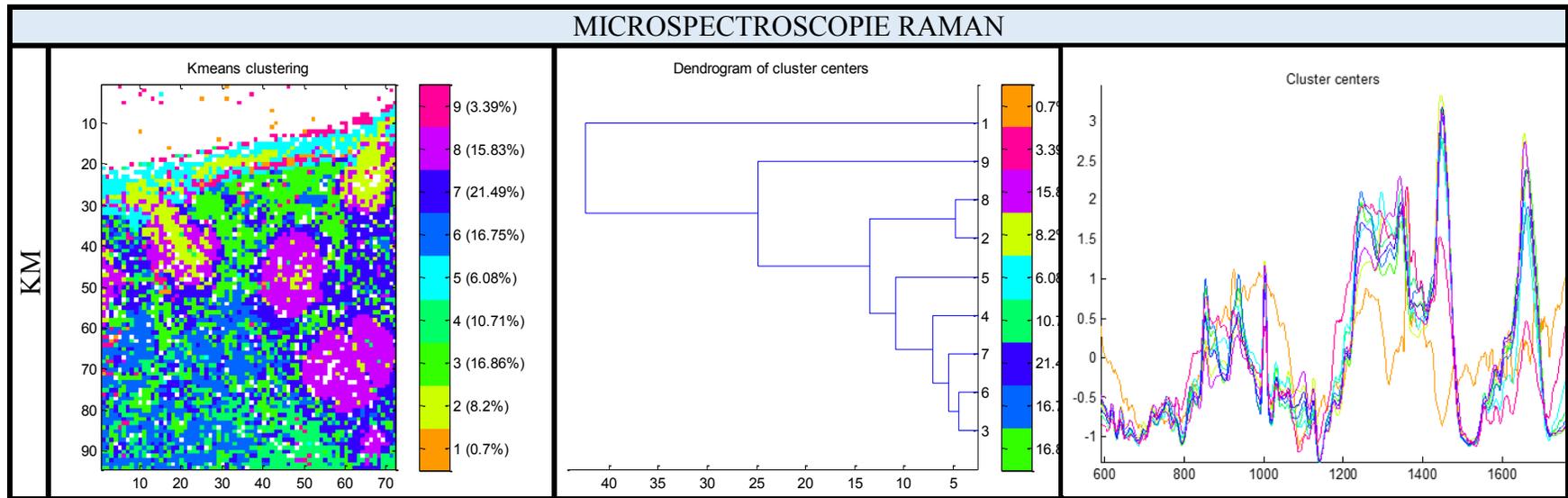


Figure 70 Image pseudo-colorée obtenue après classification KM sur la base de 9 clusters de l'image Raman de la même zone photographiée dans la Figure 68 regroupant des nodules de CBC et des follicules pileux, avec le dendrogramme et les centroïdes associés.

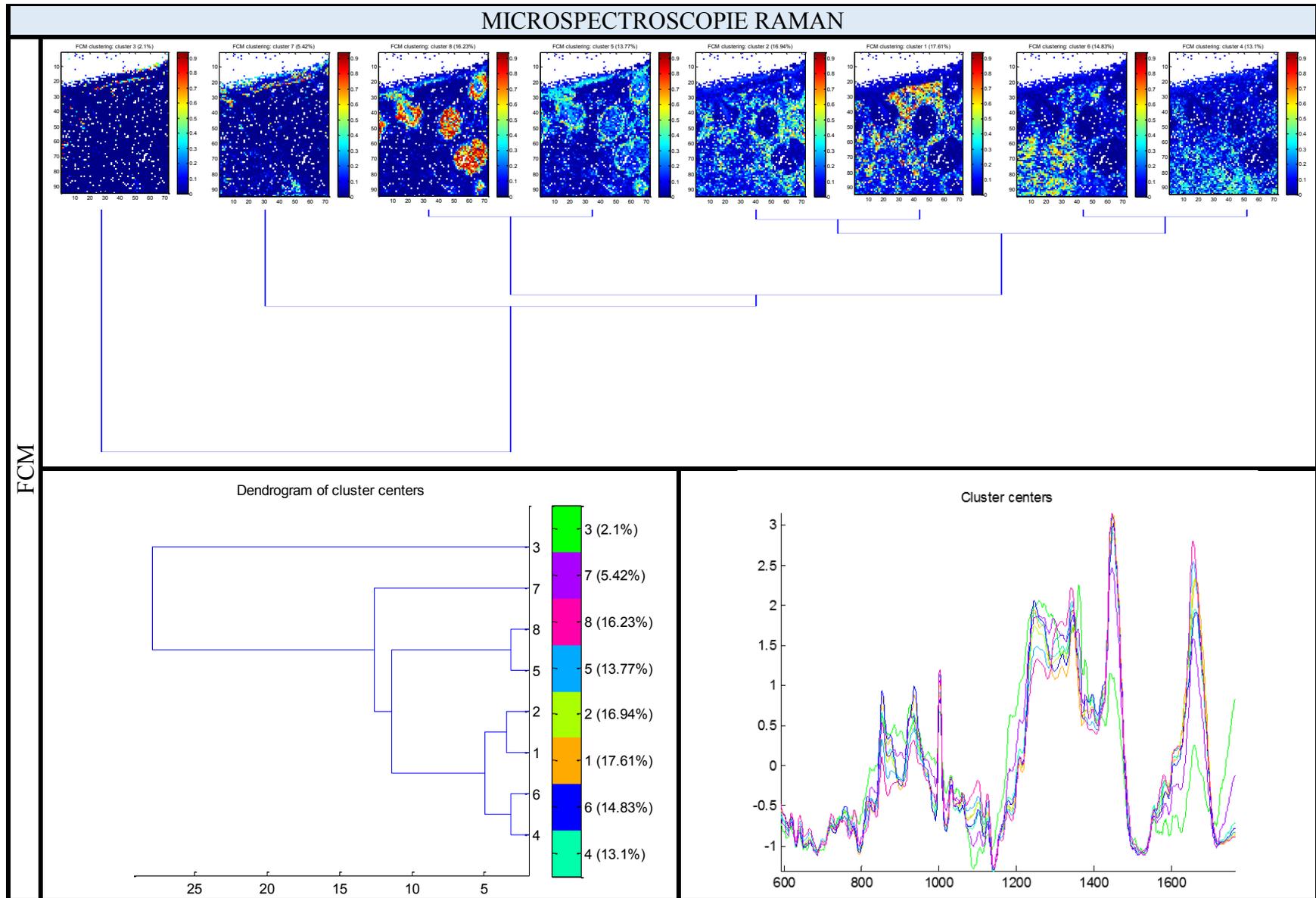


Figure 71 Résultat obtenu après classification FCM en 8 clusters (paramètre Fuzzy = 1,6) de l'image spectrale Raman précédemment analysée par KM dans la Figure 70, avec le dendrogramme et les centroïdes associés.

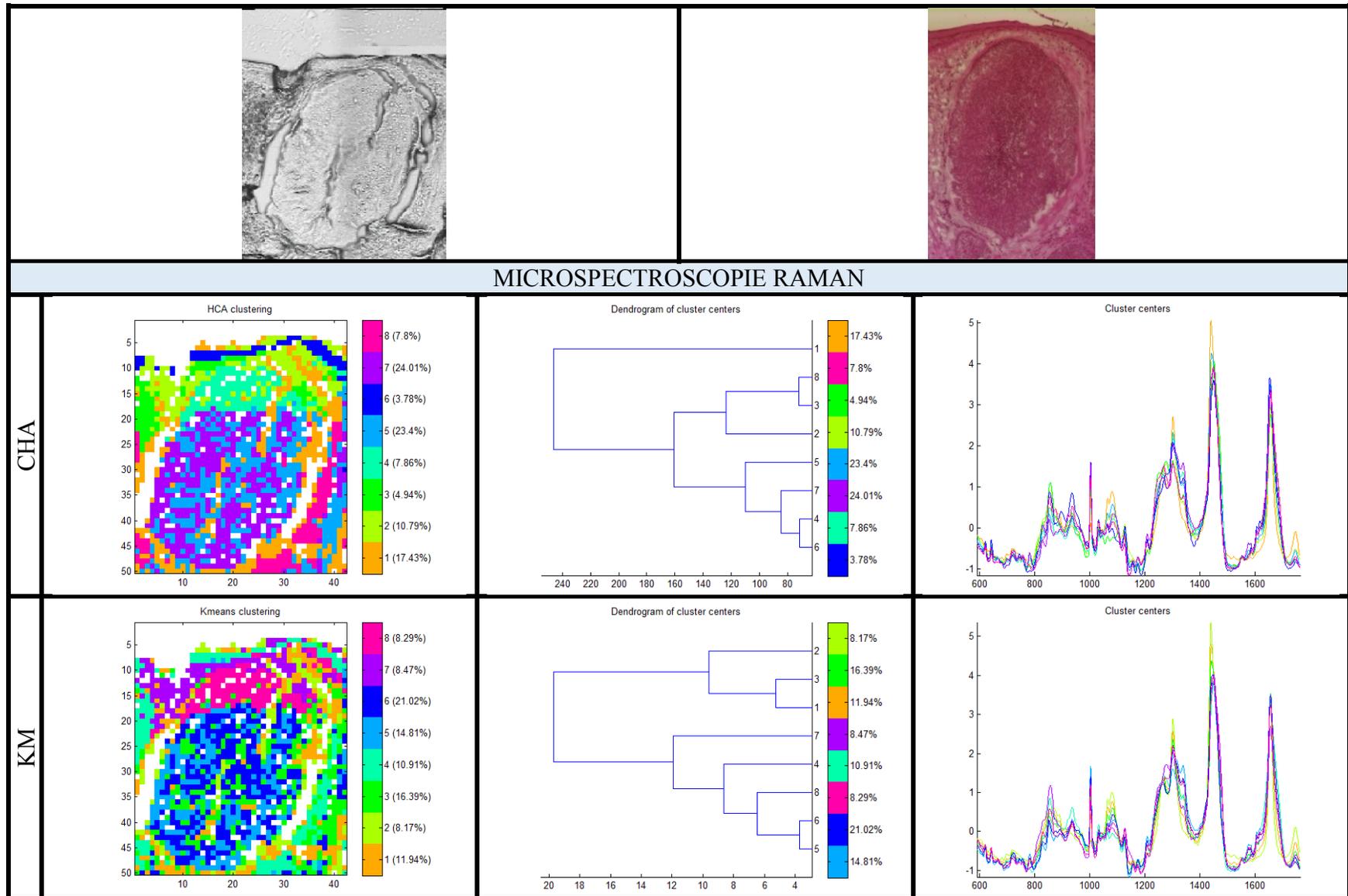


Figure 72 Classification KM et CHA. Cadres inférieurs : Images pseudo-colorées obtenues après classification KM et CHA sur la base de 8 clusters d'une image Raman d'un nodule de CBC accolé à l'épiderme, avec les dendrogrammes et les centroïdes respectifs associés. Cadre supérieur : Photographies de la zone analysée sur la coupe congelée et sur la coupe colorée HE adjacente.

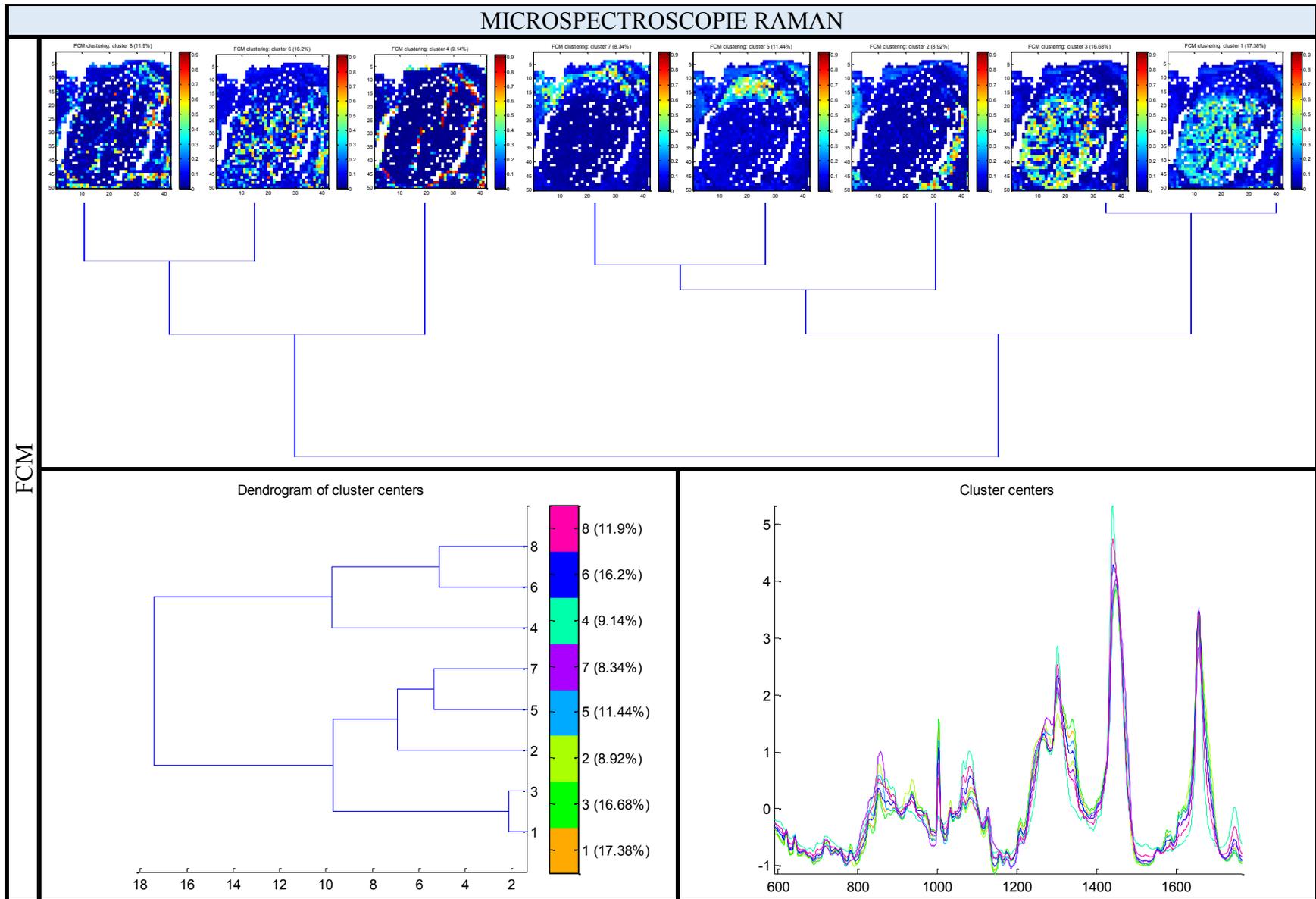


Figure 73 Résultat obtenu après classification FCM en 8 clusters (paramètre Fuzzy = 1,8) de l'image spectrale Raman précédemment analysée par KM et CHA dans la Figure 72, avec le dendrogramme et les centroïdes associés.

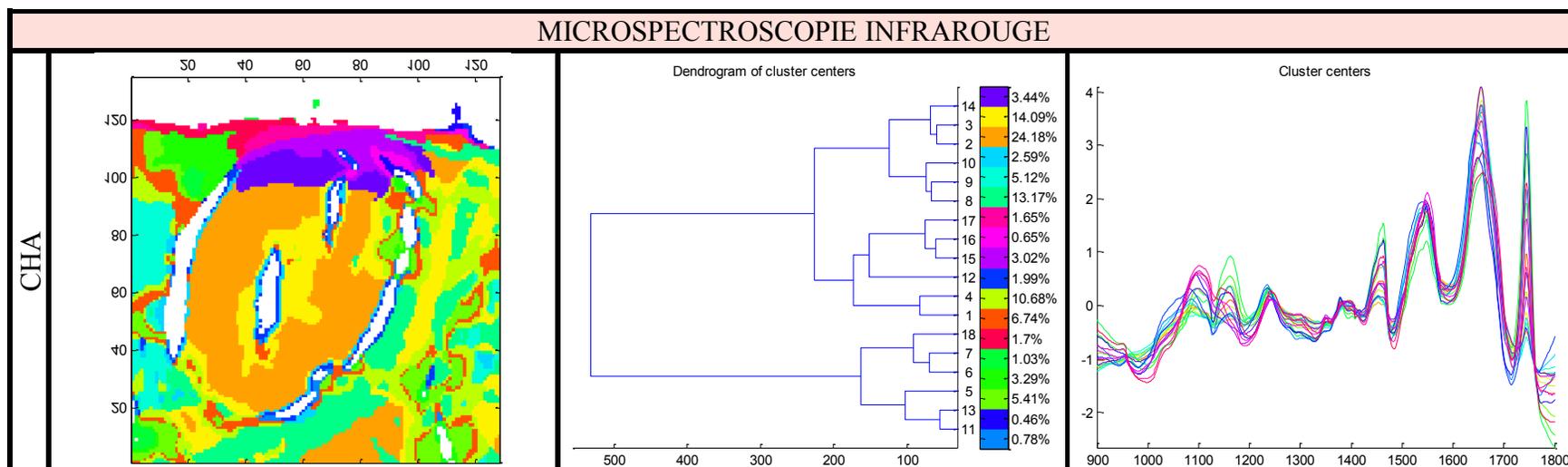


Figure 74 Image pseudo-colorée obtenue après une CHA en 18 clusters de l'image infrarouge de la même zone photographiée dans la Figure 72, avec le dendrogramme et les centroïdes associés.

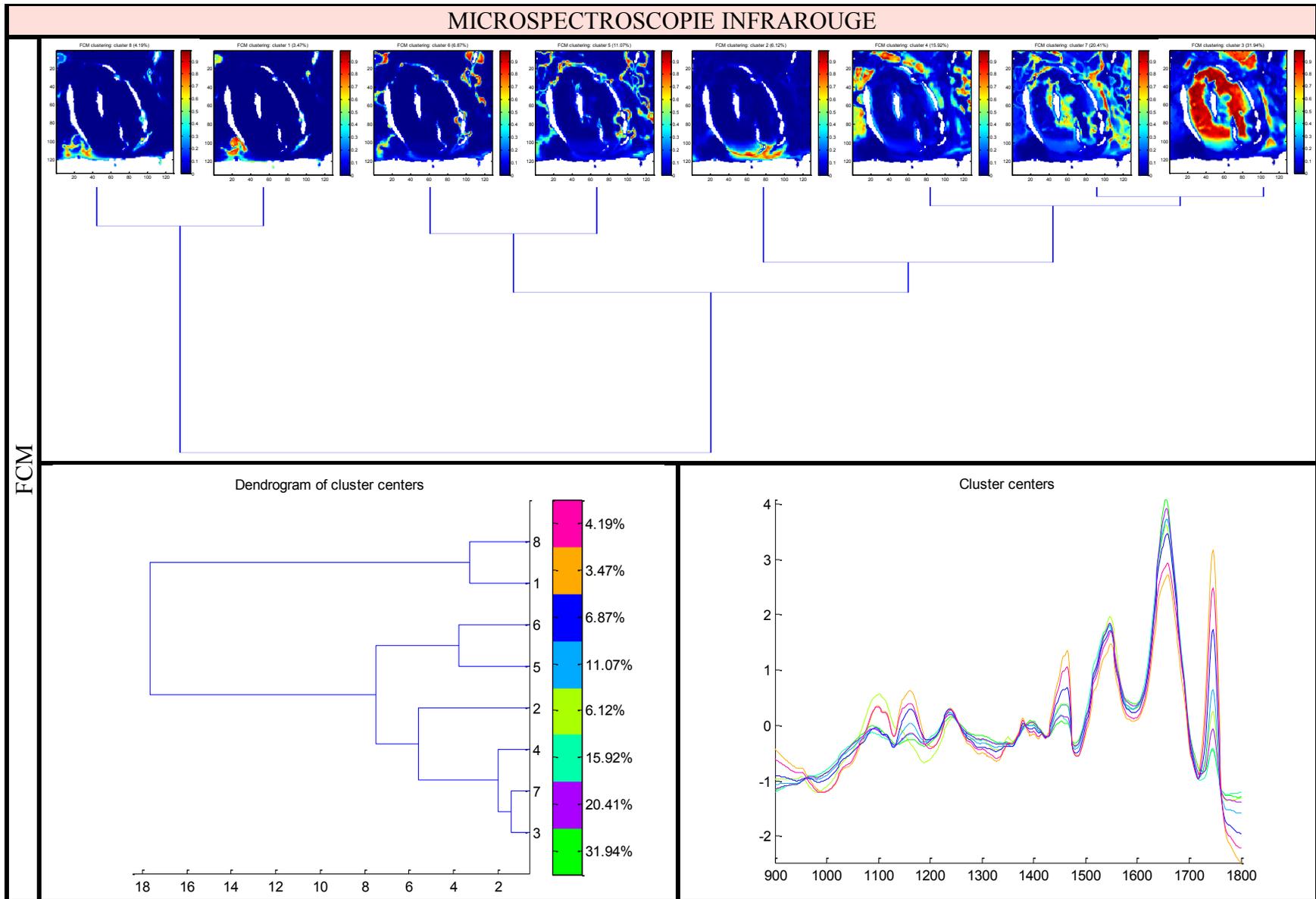


Figure 75 Résultat obtenu après classification FCM en 8 clusters (paramètre Fuzzy = 1,8) de l'image spectrale Raman précédemment analysée par CHA dans la Figure 74, avec le dendrogramme et les centroïdes associés.

### 3. Différents degrés de différenciation tumorale du follicule pileux

Tout comme le CBC, le trichofolliculome est une tumeur se développant également à partir de cellules pluripotentes du follicule pileux. Il s'agit cependant d'une tumeur bénigne contrairement au CBC. Des analyses spectrales communes de ces différentes structures ont été réalisées.

Dans un premier temps, des classifications ont été appliquées sur les images spectrales Raman et infrarouge d'une zone cutanée contenant un trichofolliculome et un follicule pileux. En microspectroscopie Raman (**Figure 76**), une classification KM permet de mettre en évidence le trichofolliculome ainsi que sa nature hétérogène puisque qu'il est codé par deux clusters différents (vert et bleu foncé). Il est intéressant de constater que le cluster bleu foncé (n°4) contient également des pixels au niveau de l'enveloppe du follicule pileux (à gauche du trichofolliculome) et d'une partie de l'épiderme. Le cluster rose (n°5) semble coder la kératine pileuse, et l'on observe que la coupe congelée sectionne probablement un deuxième follicule pilo-sébacé puisque l'on retrouve un disque de pixels rose à droite du trichofolliculome. Les clusters turquoise et jaune sont spectralement proches mais correspondent à des zones cutanées différentes. Le cluster turquoise (n°3) correspond à une zone tissulaire entourant étroitement la tumeur et s'étendant jusqu'à l'épiderme ; tandis que le cluster jaune (n°1) correspond à une zone globalement plus en profondeur. Ces deux clusters sont supposés être associés au stroma. En microspectroscopie infrarouge (**Figure 76** et **Figure 77**), l'hétérogénéité tumorale n'apparaît qu'à partir d'environ 15 clusters en FCM et 10 clusters en Raman. Bien que la zone cutanée où se situe le follicule pilo-sébacé se distingue (cluster bleu n°9 en KM et cluster n°6 en FCM), le follicule en lui-même n'est pas clairement mis en évidence.

Ensuite, nous avons réalisé une classification commune de l'image infrarouge du trichofolliculome avec l'image infrarouge de CBC nodulaire déjà présentée dans les **Figure 68** et **Figure 69**. Les résultats obtenus en KM montrent que les nodules de CBC et le trichofolliculome sont regroupés dans un même cluster (cluster bleu foncé). Le stroma autour des nodules et celui autour du trichofolliculome sont classés dans des clusters différents bien que spectralement très proches (clusters bleu clair et turquoise). Le cluster jaune regroupe des cellules hautement kératinisées (poil et *stratum corneum*). L'enveloppe folliculaire et les autres couches épidermiques semblent être représentées par les clusters rose et vert. Les follicules pileux autour du trichofolliculome ne sont pas visibles ici (**Figure 78**). En ce qui concerne l'analyse FCM de ces images, on observe que le cluster 2 regroupe les cellules du

trichofolliculome avec les cellules internes des nodules de CBC ainsi que les cellules des follicules pileux. Ce cluster est associé au cluster 4 qui est principalement représenté, au niveau du trichofolliculome, par la zone cutanée où se situe le follicule pileux. On remarque que les cellules palissadiques des nodules de CBC et des follicules pileux appartiennent également à ce cluster. De même, on observe que les cellules entourant le trichofolliculome (en profondeur et au niveau épidermique), présentent également un coefficient d'appartenance non négligeable à ce cluster. Le cluster 5 est associé au stroma, et le cluster 3 plutôt à la zone cutanée sous-épidermique. Les clusters 2 et 6 sont associés à l'épiderme et à la kératine, mais cette dernière n'est toujours pas visible au niveau de l'image du trichofolliculome (**Figure 79**).

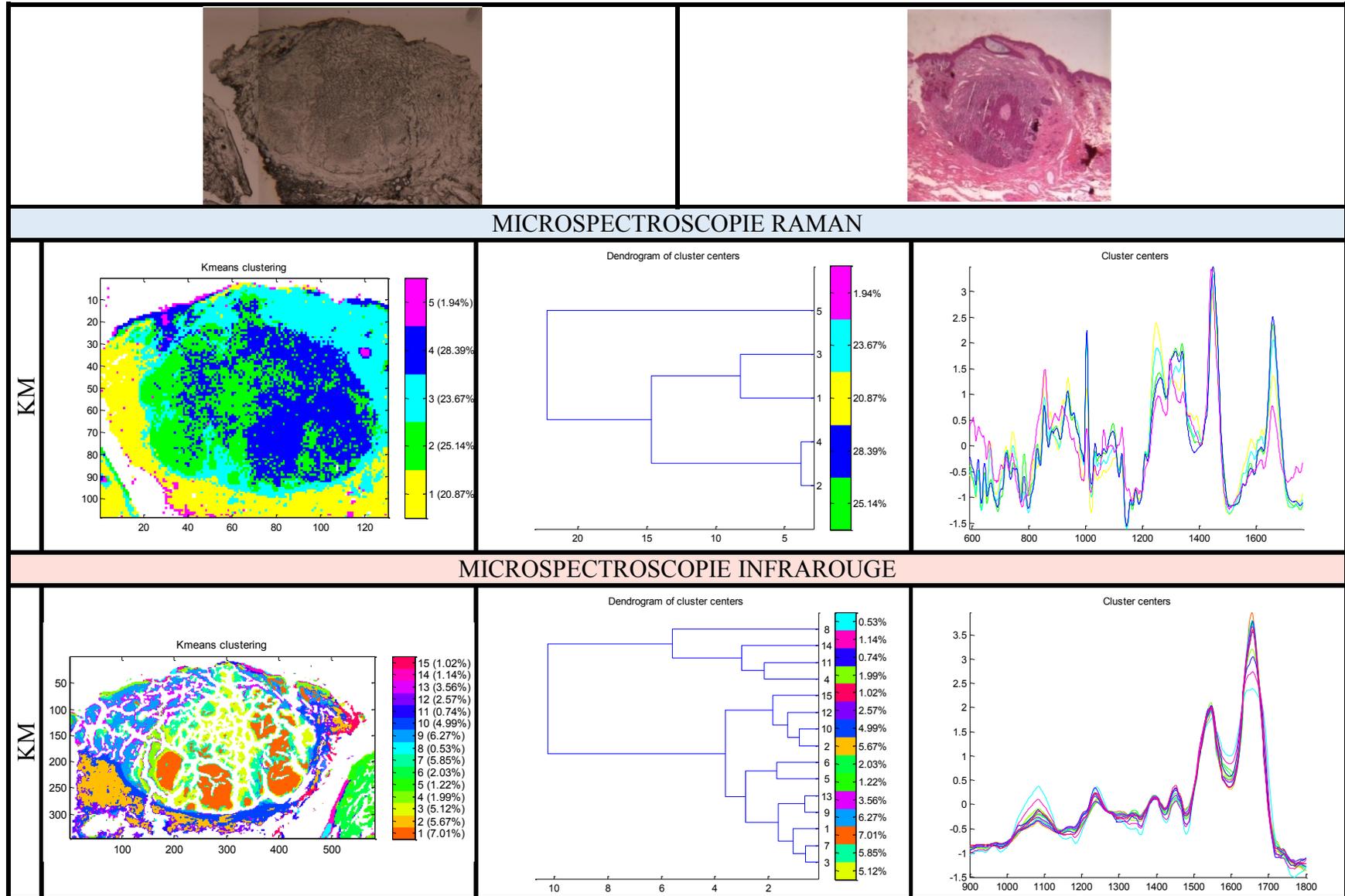


Figure 76 Classifications KM. Cadres inférieurs : Images pseudo-colorées obtenues après classifications KM des images Raman et infrarouge d'un trichofollicule (en 5 et 15 clusters respectivement), avec les dendrogrammes et les centroïdes respectifs associés. Cadre supérieur : Photographies de la zone analysée sur la coupe congelée et sur la coupe colorée HE adjacente.

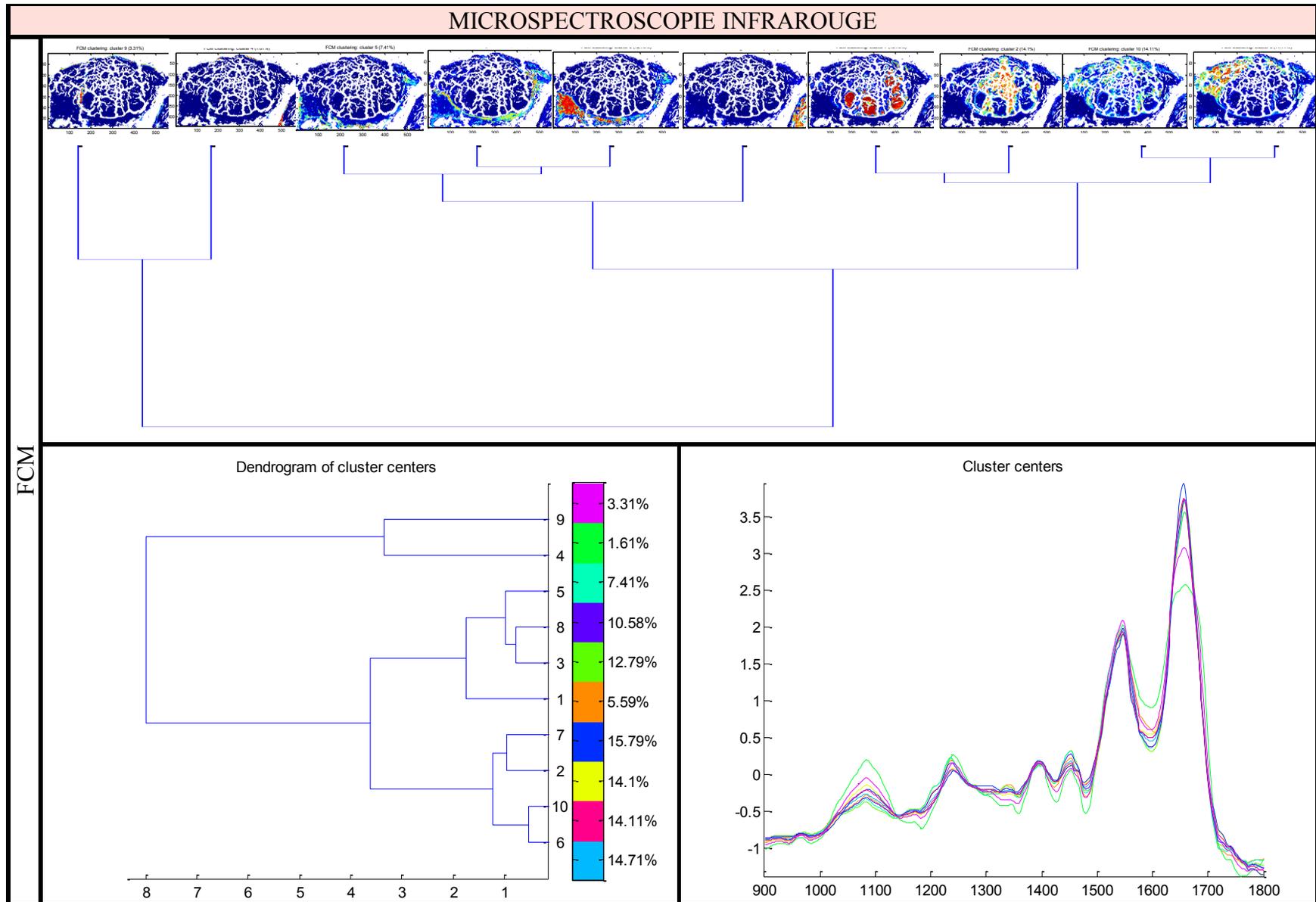


Figure 77 Résultat obtenu après classification FCM en 10 clusters (paramètre Fuzzy = 1,6) de l'image spectrale infrarouge précédemment analysée par KM dans la Figure 76, avec le dendrogramme et les centroïdes associés.

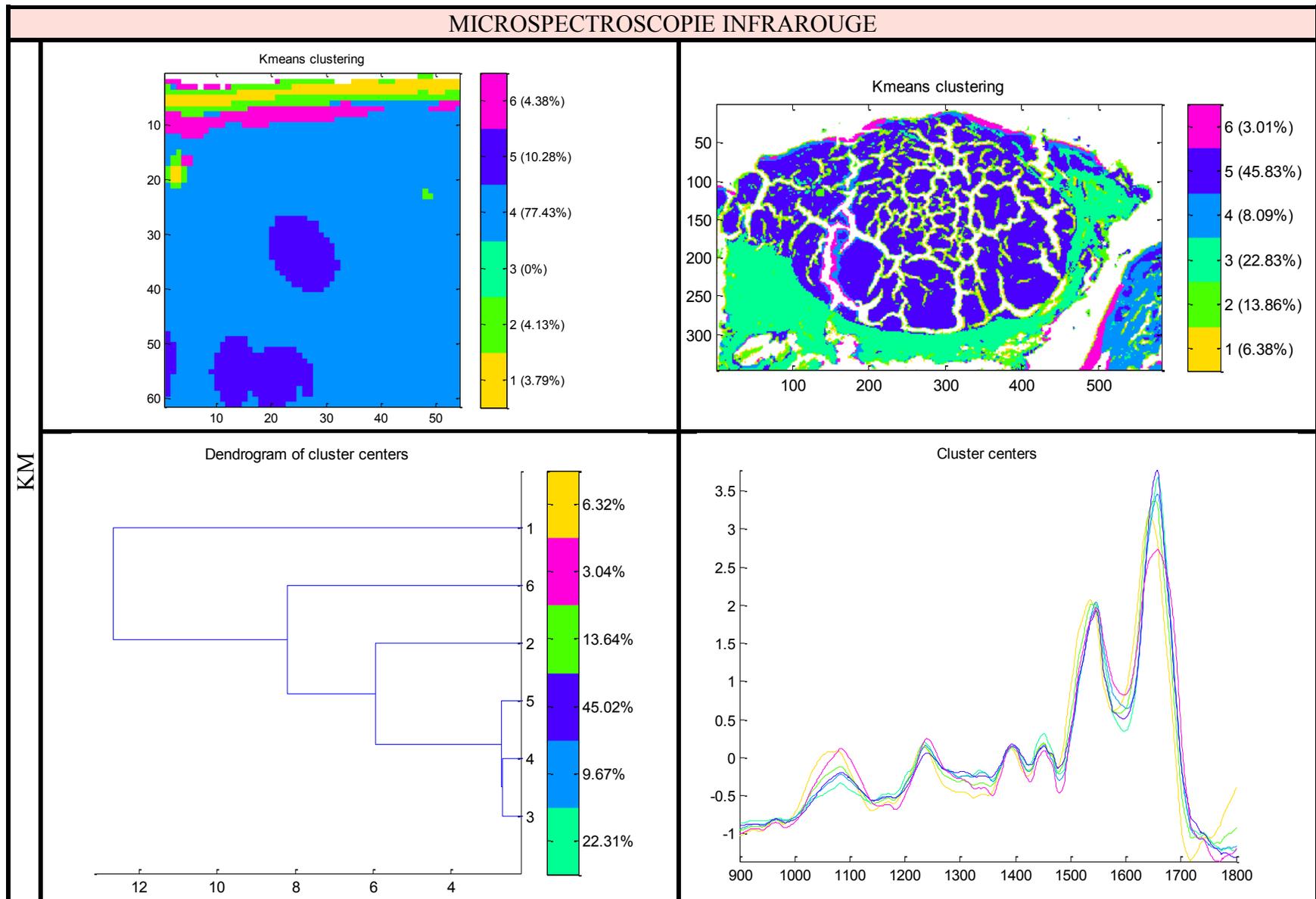


Figure 78 Images pseudo-colorées obtenues après classification KM commune en 6 clusters de l'image infrarouge incluant des follicules pileux et des nodules de CBC (cf. Figure 68) et de l'image infrarouge du trichofolliculome (cf. Figure 76).

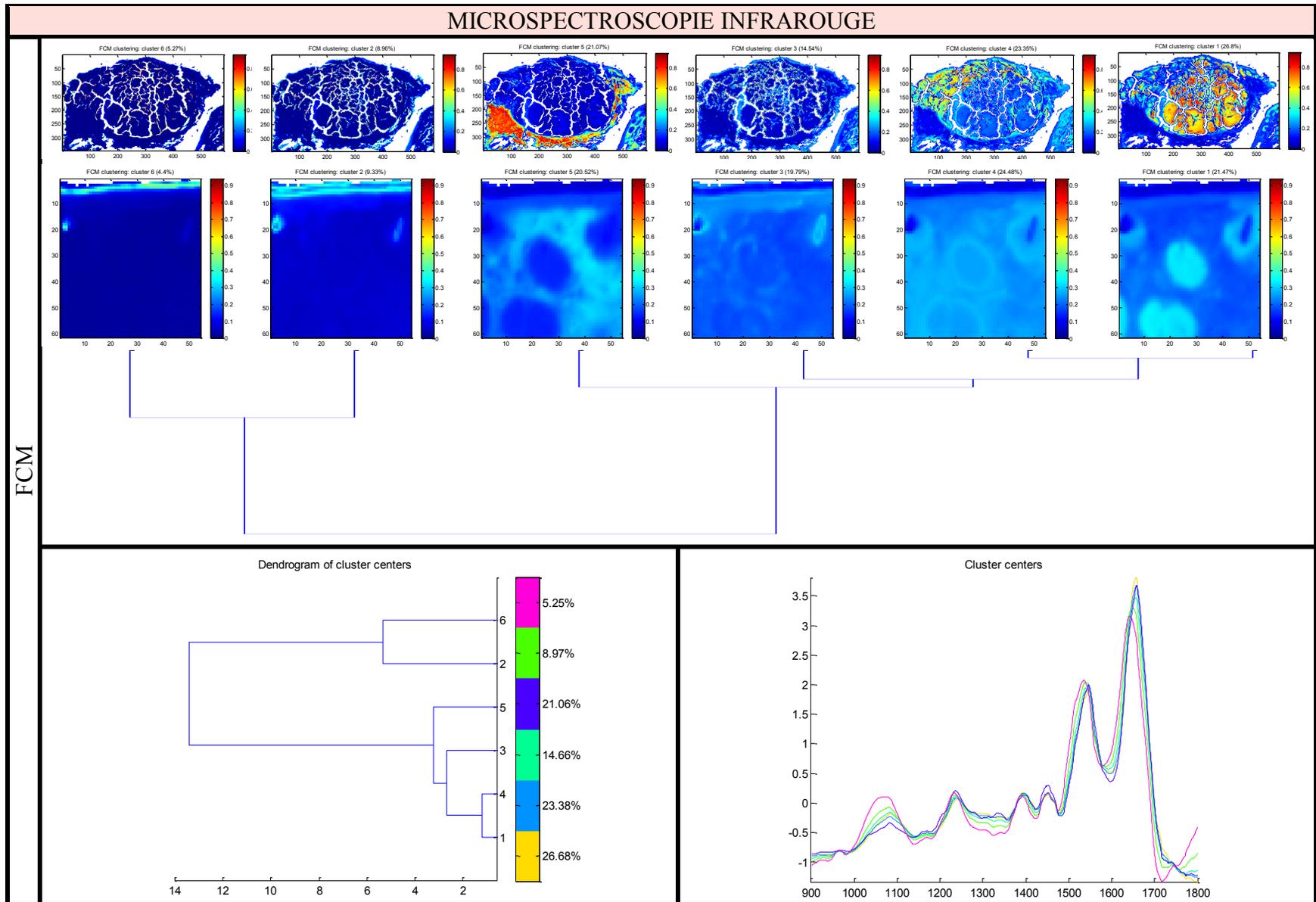


Figure 79 Résultat obtenu après classification FCM en 6 clusters (paramètre Fuzzy = 2) commune des images infrarouges précédemment analysées par classification commune KM dans la Figure 78, avec le dendrogramme et les centroïdes associés.

## IV- CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Nous avons donc pu mettre en évidence par microspectroscopies Raman et infrarouge l'existence d'une hétérogénéité au sein des nodules de CBC et du tissu environnant. Les cellules palissadiques entourant les nodules de CBC sont distinguées. Il serait intéressant en perspective d'analyser en termes de vibrations moléculaires les centroïdes, en particulier pour une comparaison entre le stroma, le derme peritumoral et le derme sain. En effet, cela permettra d'une part d'étudier le remaniement dermique dû à la présence d'une tumeur, d'autre part de mieux définir la limite entre derme remanié et derme sain en vue d'identifier des marqueurs spectroscopiques associés à la définition des marges d'exérèse.

Nous avons également montré qu'il existait des caractéristiques communes entre certaines cellules de follicules pileux, de l'épiderme et de CBC, révélant ainsi l'origine cellulaire de ces tumeurs. De même, le trichofolliculome apparaît spectralement proche du CBC et de l'enveloppe des follicules pileux. Ici aussi l'analyse des centroïdes serait intéressante pour aider à comprendre les différences moléculaires existant entre une tumeur bénigne et une tumeur maligne de même origine.

# CONCLUSION GENERALE

Il a été donné l'opportunité, avec cette thèse, d'analyser par spectroscopie Raman, 32 lésions de CBC nodulaires sur trois niveaux successifs : *in vivo* directement sur le patient, *ex vivo* juste après l'excision chirurgicale et *in vitro* après réalisation de coupes fines.

Avec les spectres *in vivo*, nous avons pu développer un modèle capable de discriminer les CBC nodulaires de la peau saine avec de très bonnes performances. Nous avons montré la possibilité d'exploiter des spectres Raman enregistrés en condition clinique à la condition de respecter un certain seuil de rapport signal sur bruit (importance d'un contrôle qualité des spectres). Cette discrimination repose sur des vibrations précises identifiables et classables selon leur pouvoir discriminant. Les marges d'exérèse latérales en surface cutanée ont pu être évaluées avec ce modèle. D'après les résultats obtenus, quatre CBC nodulaires sembleraient avoir été excisés avec des marges d'exérèse latérales un peu justes. Un de ces quatre CBC a effectivement nécessité une reprise chirurgicale plusieurs mois après son exérèse initiale. Nous avons également remarqué, dès l'étape d'acquisition des spectres, une différence d'intensité significative entre les fonds des spectres bruts *in vivo* de CBC et ceux de peau saine.

Avec les spectres *ex vivo*, nous avons cherché à identifier dans une approche univariée des marqueurs Raman visuellement identifiables pouvant être utilisés pour l'évaluation des marges profondes d'exérèse des CBC nodulaires. Les pics présentant une évolution d'intensité de la surface vers la profondeur ont été exploités car cette évolution est susceptible d'être associée à la présence d'une tumeur cutanée. Ils ont de plus également été étudiés *in vitro* en construisant des images spectrales Raman sur les intensités intégrées sur ces vibrations. Nos travaux montrent que les meilleurs candidats pour l'étude des marges profondes d'exérèse sont les pics centrés à  $1316\text{ cm}^{-1}$  et à  $1344\text{ cm}^{-1}$ . On remarque que ces pics correspondent aux marqueurs identifiés lors de l'analyse des spectres *in vivo*. Ces nombres d'onde peuvent donc être utilisés pour discriminer CBC et peau saine *in vivo*, *ex vivo* et *in vitro*. De plus, en adéquation avec ce que nous avons observé *in vivo*, nous avons remarqué que les fonds des spectres Raman *in vitro* (images spectrales) sont également plus intenses lorsqu'ils sont enregistrés en zone cutanée non tumorale.

*In vitro*, nous avons pu aborder des investigations annexes telles que l'hétérogénéité tumorale des CBC ou encore l'origine cellulaire de ces tumeurs.

# PERSPECTIVES

En perspectives, nous proposons le développement d'un outil de discrimination *in vivo* CBC / peau saine basé sur un protocole d'analyse cutanée en plusieurs étapes.

1°/ Une exploration rapide de la zone cutanée au voisinage de la lésion permettra une première délimitation approximative de la zone tumorale à exciser. L'intensité de base des fonds spectraux, dont la valeur est propre au patient et à la région cutanée, sera évaluée en référence en zone saine à l'écart de la lésion. Cette étape nécessitera des acquisitions quasiment en temps réel de spectres avec des temps d'acquisition faibles (< 1s). Une diminution de l'intensité des fonds spectraux marquera la limite approximative de la zone cutanée altérée.

2°/ A ce niveau, les temps d'acquisition seront adaptés pour optimiser le signal Raman et accéder à des informations moléculaires exploitables. Il devra être mis en place ici un contrôle qualité automatisé des spectres (RSB >3). Les spectres Raman ayant passé ce test qualité, seront injectés dans l'algorithme de discrimination CBC / peau saine pour déterminer avec précision la zone cutanée à exciser.

3°/ Le même algorithme pourra également être utilisé pour contrôler et/ou aider à déterminer la marge profonde d'excision : soit après l'acte chirurgical en enregistrant des spectres Raman sur le lit d'exérèse, soit pendant l'acte chirurgical à chaque séquence d'excision dans le cadre par exemple d'une chirurgie de Mohs.

4°/ A plus long terme, cet algorithme pourra être amélioré en intégrant la signature Raman *in vivo* des lésions susceptibles d'être confondues avec un CBC. Il pourra alors être également utilisé à des fins de diagnostic différentiel.

## Bibliographie

1. Méliopoulos A. La peau : structure et physiologie. Paris ; Cachan : Tec & Doc Lavoisier ; Editions Médicales internationales; 1998.
2. Peyrefitte G. Biologie de la peau. Paris : Simep; 1997.
3. Agache P. Physiologie de la peau et explorations fonctionnelles cutanées. Cachan France; Paris : Editions médicales internationales ; Technique & documentation; 2000.
4. Démarchez M. Biologie de la peau [Internet]. [cité 22 mars 2016]. Disponible sur: <http://biologiedelapeau.fr/>
5. Kierszenbaum AL. Histologie et biologie cellulaire Une introduction à l'anatomie pathologique. Bruxelles, Belgique: De Boeck; 2006. 619 p.
6. Lüllmann-Rauch R. Histologie. De Boeck Supérieur; 2008. 704 p.
7. Sherwood L. Physiologie humaine: A Human Perspective. De Boeck Supérieur; 2006. 768p.
8. Organisation mondiale de la Santé (OMS) [Internet]. [cité 23 juin 2016]. Disponible sur: <http://www.who.int/fr/>
9. Site grand public de la Société Française de Dermatologie [Internet]. [cité 22 mars 2016]. Disponible sur: <http://dermato-info.fr/>
10. Institut National Du Cancer [Internet]. [cité 28 juin 2016]. Disponible sur: <http://www.e-cancer.fr/>
11. Jemec GBE, Miech D, Lajos K, Editors. Non-Surgical Treatment of Keratinocyte Skin Cancer. 1<sup>re</sup> éd. Springer-Verlag Berlin and Heidelberg GmbH & Co. K; 2009. 217 p.
12. Jacob A. Observations respecting an ucler of peculiar character which attacks the eye-lids and other parts of the face. Dans: The Dublin hospital reports communications in medicine and surgery. 1827. p. 232-9.
13. Krompecher E. Der Basalzellenkrebs. Jena: Gustav Fischer; 1903.
14. Haute Autorité de Santé (HAS). Recommandations de bonne pratique - Prise en charge diagnostique et thérapeutique du carcinome basocellulaire de l'adulte [Internet]. [cité 19 avril 2017]. Disponible sur: [http://www.has-sante.fr/portail/jcms/c\\_272312/fr/prise-en-charge-diagnostique-et-therapeutique-du-carcinome-basocellulaire-de-l-adulte](http://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_272312/fr/prise-en-charge-diagnostique-et-therapeutique-du-carcinome-basocellulaire-de-l-adulte)
15. Rigel DS, Friedman RJ, Dzubow LM, Reintgen DS, Bystryn J-C, Marks R. Cancer of the Skin. Elsevier - Health Sciences Division; 2005. 728 p.
16. Tilli CMLJ, Van Steensel MAM, Krekels GAM, Neumann HAM, Ramaekers FCS. Molecular aetiology and pathogenesis of basal cell carcinoma. Br J Dermatol. 2005;152(6):1108-24.
17. Xeroderma pigmentosum [Internet]. [cité 19 avril 2017]. Disponible sur: [www.orpha.net/data/patho/Pub/fr/XerodermaPigmentosum-FRfrPub3253v01.pdf](http://www.orpha.net/data/patho/Pub/fr/XerodermaPigmentosum-FRfrPub3253v01.pdf)

18. National Institute for Health and Clinical Excellence. Guidance on Cancer Services Improving outcomes for people with skin tumours including melanoma (update) : The management of low-risk Basal Cell Carcinomas in the community [Internet]. [cité 19 avril 2017]. Disponible sur: <https://www.nice.org.uk/guidance/csg8/resources/improving-outcomes-for-people-with-skin-tumours-including-melanoma-2010-partial-update-773380189>
19. Key statistics for basal and squamous cell skin cancers [Internet]. [cité 2 oct 2016]. Disponible sur: <http://www.cancer.org/cancer/skincancer-basalandsquamouscell/detailedguide/skin-cancer-basal-and-squamous-cell-key-statistics>
20. Crowson AN. Basal cell carcinoma : biology , morphology and clinical implications. *Mod Pathol.* 2006;19 Suppl 2:S127-174.
21. Roenigk RK, Ratz JL, Bailin PL, Wheeland RG. Trends in the presentation and treatment of basal cell carcinomas. *J Dermatol Surg Oncol.* 1986;12(8):860-5.
22. Rigel DS, Robins P, Friedman RJ. Predicting recurrence of basal-cell carcinomas treated by microscopically controlled excision: a recurrence index score. *J Dermatol Surg Oncol.* 1981;7(10):807-10.
23. Rowe DE, Carroll RJ, Day CL. Long-term recurrence rates in previously untreated (primary) basal cell carcinoma: implications for patient follow-up. *J Dermatol Surg Oncol.* 1989;15(3):315-28.
24. Silverman MK, Kopf AW, Grin CM, Bart RS, Levenstein MJ. Recurrence rates of treated basal cell carcinomas. Part 1: Overview. *J Dermatol Surg Oncol.* 1991;17(9):713-8.
25. Bentkover SH, Grande DM, Soto H, Kozlicak BA, Guillaume D, Girouard S. Excision of head and neck basal cell carcinoma with a rapid, cross-sectional, frozen-section technique. *Arch Facial Plast Surg.* 2002;4(2):114-9.
26. Presser SE, Taylor JR. Clinical diagnostic accuracy of basal cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol.* 1987;16(5 Pt 1):988-90.
27. Mohammad E-A, Mansour M, Parichehr K, Farideh D, Amirhossein R, Ahmad S-A. Assessment of clinical diagnostic accuracy compared with pathological diagnosis of basal cell carcinoma. *Indian Dermatol Online J.* 2015;6(4):258.
28. Marghoob AA, Braun RP, Kopf AW. Précis illustré de dermoscopie. Arnette, rédacteur. 2007. 334 p.
29. Ly A, Habib F, Zimmermann U, Gentil-Perret A, Joux J-M, Clerici T, et al. Les chirurgies micrographiques : techniques, indications et applications pratiques en cabinet. *Ann Dermatol Venereol.* 2013;140(10):647-55.
30. Examens anatomo-pathologiques extemporanés dans les pathologies mammaire et thyroïdienne [Internet]. [cité 19 avril 2017]. Disponible sur: <http://www.sfpathol.org/media/pdf/recomm-extempo.pdf>
31. Dalibart M, Servant L. Spectroscopie dans l' infrarouge. Dans: *Techniques de l'ingénieur.* 2000;P2845:1-26.
32. Barbillat J, Bougeard D, Buntinx G, Delhayé M, Dhamelincourt P, Fillaux F. Spectrométrie

- Raman. Dans: Techniques de l'ingénieur. 1999;P2865:1-31.
33. Humbert B, Mevellec J-Y, Grausem J, Dossot M, Lorraine C De. Spectrométrie d'absorption dans l'infrarouge. Dans: Techniques de l'ingénieur. 2012;P2850:1-28.
  34. Poilblanc R, Crasnier F. Spectroscopies infrarouge et Raman. EDP Sciences, rédacteur. Broché; 2007. 674 p.
  35. Offroy M. Développement de la super-résolution appliquée à l'imagerie des spectroscopies vibrationnelles [Thèse de doctorat]. [LASIR, France]: Laboratoire de spectrochimie infrarouge et Raman; 2012.
  36. Lasch P. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems Spectral pre-processing for biomedical vibrational spectroscopy and microspectroscopic imaging. Chemom Intell Lab Syst. Elsevier B.V.; 2012;117:100-14.
  37. Lebart L, Morineau A, Piron M. Statistique Exploratoire Multidimensionnelle. Paris: Dunod; 2006.
  38. Introduction à l'analyse des données [Internet]. [cité 19 avril 2017]. Disponible sur: <http://www.cnsee.org/Publication/PDF/BAMSIREPRINT04.pdf>
  39. Baudot J-Y. Métriques des classifications [Internet]. [cité 20 avr 2016]. Disponible sur: <http://www.jybaudot.fr/Analdonnees/metriques.html>
  40. Husson F. Cours de classification : la classification ascendante hiérarchique (partie 1/4) [Internet]. [cité 7 mai 2016]. Disponible sur: [https://www.youtube.com/watch?v=SE\\_4dLh5vXY](https://www.youtube.com/watch?v=SE_4dLh5vXY)
  41. Husson F. Cours de classification : méthode de partitionnement (partie 3/4) [Internet]. [cité 9 mai 2016]. Disponible sur: <https://www.youtube.com/watch?v=3VLGFOMj8oI>
  42. Smith ZJ, Huser TR, Wachsmann-Hogiu S. Raman scattering in pathology. Anal Cell Pathol. 2012;35(3):145-63.
  43. Longo C, Farnetani F, Ciardo S, Cesinaro M, Moscarella E, Ponti G, et al. Is confocal microscopy a valuable tool in diagnosing nodular lesions? A study of 140 cases. Br J Dermatol. 2013;169(1):58-67.
  44. Patil C, Kirshnamoorthi H, Ellis DL, van Leeuwen TG, Mahadevan-Jansen A. A clinical instrument for combined raman spectroscopy-optical coherence tomography of skin cancers. Lasers Surg Med. 2011;43(2):143-51.
  45. Thissen MR, Neumann MH, Schouten LJ. A systematic review of treatment modalities for primary basal cell carcinomas. Arch Dermatol. 1999;135(10):1177-83.
  46. 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):367-73.
  47. Monici M. Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications. Biotechnol Annu Rev. 2005;11:227-56.

48. Zeng H, MacAulay C, McLean DI, Palcic B, Lui H. The dynamics of laser-induced changes in human skin autofluorescence--experimental measurements and theoretical modeling. *Photochem Photobiol.* 1998;68(2):227-36.
49. Huang Z, Lui H, Chen XK, Alajlan A, McLean DI, Zeng H. Raman spectroscopy of in vivo cutaneous melanin. *J Biomed Opt.* 2004;9(6):1198-205.
50. Deyl Z, Macek K, Adam M. Studies on the chemical nature of elastin fluorescence. *Biochim Biophys Acta - Protein Struct.* 1980;625(2):248-54.
51. Fujimoto D, Akiba K, Nakamura N. Isolation and characterization of a fluorescent material in bovine achilles tendon collagen. *Biochem Biophys Res Commun.* 1977;76(4):1124-9.
52. Wang S, Zhao J, Lui H, He Q, Zeng H. Monte Carlo simulation of near infrared autofluorescence measurements of in vivo skin. *J Photochem Photobiol B.* 2011;105(3):183-9.
53. Ramanujam N. Fluorescence Spectroscopy In Vivo. Dans: *Encyclopedia of Analytical Chemistry.* 2000. 20-56.
54. Huang Z, Cheah HM, Chia T-C, Ching TL. Laser-induced microscopic fluorescence and images of skin tissues. *Proc SPIE 4164, Laser Microscopy,* 43. 2000
55. Ramanujam N. Fluorescence spectroscopy of neoplastic and non-neoplastic tissues. *Neoplasia.* 2000;2(1-2):89-117.
56. Brancalion L, Durkin a J, Tu JH, Menaker G, Fallon JD, Kollias N. In vivo fluorescence spectroscopy of nonmelanoma skin cancer. *Photochem Photobiol.* févr 2001;73(2):178-83.
57. Drakaki E, Dessinioti C, Stratigos AJ, Salavastru C, Antoniou C. Laser-induced fluorescence made simple: implications for the diagnosis and follow-up monitoring of basal cell carcinoma. *J Biomed Opt.* 2014;19(3):30901.
58. Yuan Y, Relue P. Enzymatic degradation of human skin dermis revealed by fluorescence and reflectance spectroscopy. *Opt Express.* 2008;16(13):9857-68.
59. Hung J, Lam S, LeRiche JC, Palcic B. Autofluorescence of normal and malignant bronchial tissue. *Lasers Surg Med.* 1991;11(2):99-105.
60. Huang Z, Lui H, McLean DI, Korbek 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):1219-26.
61. Takamori S, Kong K, Varma S, Leach I, Williams HC, Nottingher I. Optimization of multimodal spectral imaging for assessment of resection margins during Mohs micrographic surgery for basal cell carcinoma. *Biomed Opt Express.* 2015;6(1):98.
62. Lim L, Nichols B, Migden MR, Rajaram N, Reichenberg JS, Markey MK, et al. Clinical study of noninvasive *in vivo* melanoma and nonmelanoma skin cancers using multimodal spectral diagnosis. *J Biomed Opt.* 2014;19(11):117003.
63. Motz JT 1972-. Development of in vivo Raman spectroscopy of atherosclerosis [Internet]. Massachusetts Institute of Technology; 2003 [cité 6 janv 2015]. Disponible sur:

<http://dspace.mit.edu/handle/1721.1/17576>

64. Shim M, Wilson B. Development of an in vivo Raman spectroscopic system for diagnostic applications. *J Raman Spectrosc.* 1997;28(September 1996):131-42.
65. Ghenuche P, Rammler S, Joly N, Scharrer M, Frosz M, Wenger J, et al. Kagome hollow-core photonic crystal fiber probe for Raman spectroscopy. *Opt Lett.* 2012;4371-3.
66. Tfayli A, Piot O, Derancourt S, Bernard P, Manfait M. In vivo Raman analysis of human skin lesions. *SPIE Newsroom: SPIE;* 2006;1-3.
67. Wang H, Zhao J, Lee AMD, Lui H, Zeng H. Improving skin Raman spectral quality by fluorescence photobleaching. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2012;9(4):299-302.
68. Schleusener J, Gluszczynska P, Reble C, Gersonde I, Helfmann J, Fluhr JW, et al. In vivo study for the discrimination of cancerous and normal skin using fiber probe based Raman spectroscopy. *Exp Dermatol.* 2015;24(10):767-72.
69. Motz JT, Hunter M, Galindo LH, Gardecki J a, Kramer JR, Dasari RR, et al. Optical fiber probe for biomedical Raman spectroscopy. *Appl Opt.* 2004;43(3):542-54.
70. World Health Organization. Ultraviolet radiation and the INTERSUN Programme. Health effects of UV radiation [Internet]. [cité 23 oct 2016]. Disponible sur: <http://www.who.int/uv/health/en/>
71. Lomas A, Leonardi-Bee J, Bath-Hextall F. A systematic review of worldwide incidence of nonmelanoma skin cancer. *Br J Dermatol.* 2012;166(5):1069-80.
72. Asgari MM, Olson J, Alam M. Needs assessment for Mohs micrographic surgery. *Dermatol Clin.* 2012;30(1):167-75.
73. Shetty G, Kendall C, Shepherd N, Stone N, Barr H. Raman spectroscopy: elucidation of biochemical changes in carcinogenesis of oesophagus. *Br J Cancer.* 2006;94(10):1460-4.
74. Cluff GM, Short MA, Lui H, McLean DI, Zeng H, Korbelik M, et al. Comparison of connective tissue invaded by Lewis lung carcinoma to healthy connective tissue by means of micro-Raman spectroscopy. *J Raman Spectrosc.* 2009;40(8):1087-90.
75. Choi J, Choo J, Chung H, Gweon DG, Park J, Kim HJ, et al. Direct observation of spectral differences between normal and basal cell carcinoma (BCC) tissues using confocal Raman microscopy. *Biopolymers.* 2005;77(5):264-72.
76. Larraona-Puy M, Ghita A, Zoladek A, Perkins W, Varma S, Leach IH, et al. Development of Raman microspectroscopy for automated detection and imaging of basal cell carcinoma. *J Biomed Opt.* 2009;14(5):54031.
77. 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):1782-4.
78. Caspers PJ, Lucassen GW, Puppels GJ. Combined in vivo confocal Raman spectroscopy and confocal microscopy of human skin. *Biophys J.* 2003;85(1):572-80.
79. Tfayli A. Piot O, Derancourt S, Bernard P, Manfait M. In vivo Raman analysis of human

- skin lesions. SPIE Newsroom: SPIE; 2006;1-3.
80. Lieber C, Mahadevan-Jansen A. Development of a handheld Raman microspectrometer for clinical dermatologic applications. *Opt Express*. 2007;15(19):11874-82.
  81. Zhao J, Lui H, Mclean DI, Zeng H. Integrated real-time Raman system for clinical in vivo skin analysis. *Ski Res Technol*. 2008;14(4):484-92.
  82. Stone N, Kendall C, Smith J, Crow P, Barr H. Raman spectroscopy for identification of epithelial cancers. *Faraday Discuss*. 2004;126:141-57.
  83. Mo J, Zheng W, Low JJ, Ng J, Ilancheran A, Huang Z. High wavenumber Raman spectroscopy for in vivo detection of cervical dysplasia. *Anal Chem*. 2009;81(21):8908-15.
  84. Lieber C, Majumder SK, Ellis DL, Billheimer DD, Mahadevan-Jansen A. In vivo nonmelanoma skin cancer diagnosis using Raman microspectroscopy. *Lasers Surg Med*. 2008;40(7):461-7.
  85. Lui H, Zhao J, McLean D, Zeng H. Real-time raman spectroscopy for in vivo skin cancer diagnosis. *Cancer Res*. 2012;72(10):2491-500.
  86. Silveira, Jr. L, Silveira FL, Bodanese B, Pacheco MTT, Zângaro R. Diagnosing basal cell carcinoma in vivo by near-infrared Raman spectroscopy: a Principal Components Analysis discrimination algorithm. *Proc SPIE*. 2012;8207:82070X-1-7.
  87. Philipsen PA, Knudsen L, Gniadecka M, Ravnbak MH, Wulf HC. Diagnosis of malignant melanoma and basal cell carcinoma by in vivo NIR-FT Raman spectroscopy is independent of skin pigmentation. *Photochem Photobiol Sci*. 2013;12(5):770-6.
  88. Haka AS, Volynskaya Z, Gardecki J, Nazemi J, Lyons J, Hicks D, et al. In vivo margin assessment during partial mastectomy breast surgery using Raman spectroscopy. *Cancer Res*. 2006;66(6):3317-22.
  89. Keller MD, Kanter EM, Lieber CA, Majumder SK, Hutchings J, Ellis DL, et al. Detecting temporal and spatial effects of epithelial cancers with Raman spectroscopy. *Dis Markers*. 2008;25(6):323-37.
  90. Liu H, Motoda H. *Feature Selection for Knowledge Discovery and Data Mining*. 1<sup>re</sup> éd. Kluwer Academic Publishers; 1998. 214 p.
  91. Nguyen TT, Happillon T, Feru J, Brassart-Passco S, Angiboust J-F, Manfait M, et al. Raman comparison of skin dermis of different ages: focus on spectral markers of collagen hydration. *J Raman Spectrosc*. 30 sept 2013;44(9):1230-7.
  92. Ross DT, Scherf U, Eisen MB, Perou CM, Rees C, Spellman P, et al. Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines. *Nat Genet*. mars 2000;24(3):227-35.
  93. Eklouh-molinier C, Happillon T, Bouland N, Fichel C, Diébold M-D, Angiboust J-F, et al. Investigating the relationship between changes in collagen fiber orientation during skin aging and collagen/water interactions by polarized-FTIR microimaging. *Analyst*. Royal Society of Chemistry; 2015;140(18):6260-8.

94. 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. [Thèse de doctorat]. [France]: Université de Reims Champagne-Ardenne; 2007.
95. Pence IJ, Vargis E, Mahadevan-Jansen A. Assessing variability of in vivo tissue Raman spectra. *Appl Spectrosc.* 2013;67(7):789-800.
96. Couturaud V. Biophysical Characteristics of the Skin in Relation to Race, Sex, Age and Site. Dans: *Handbook of Cosmetic Science and Technology.* 2009. p. 5-24.
97. Wechsler J, Zanetti R, Schrameck C, Rosso S, Pippione M, Linares J, et al. Reproducibility of histopathologic diagnosis and classification of non-melanocytic skin cancer: a panel exercise in the framework of the multicenter southern European study HELIOS. *Tumori.* 2001;87(2):95-100.

## Publications et communications

### PUBLICATION INTERNATIONALE DANS DES REVUES A COMITE DE LECTURE

---

MAINRECK Nathalie. GOBINET Cyril. DURLACH Anne. GOELDEL Anne-Laure. REGUIAI Ziad. ANGIBOUST Jean-François. MANFAIT Michel. BERNARD Philippe. PIOT Olivier. In vivo tumoral discrimination with fibered Raman spectroscopy and assessment of the lateral excision margin in BCC surgery. Journal of Investigative Dermatology. *Soumis le 2 novembre 2016*.

### COMMUNICATION ORALE DANS DES REUNIONS NATIONALES

---

GOBINET Cyril. MAINRECK Nathalie. UNTEREINER Valérie. EKLOUH-MOLINIER Christophe. NALLALA Jayakrupakar. SOCKALINGUM Ganesh. PIOT Olivier. Incorporation of neighbourhood constraints to Fuzzy C-Means algorithm to improve the spectral histology of human tissue sections by Raman microimaging. 12<sup>th</sup> European Congress on Digital Pathology. Paris, 18-21 juin 2014.

### COMMUNICATIONS PAR VOIE D’AFFICHE DANS DES REUNIONS INTERNATIONALES

---

MAINRECK Nathalie. GOBINET Cyril. REGUIAI Ziad. GOELDEL Anne-Laure. DURLACH Anne. BERNARD Philippe. PIOT Oliver. Analysis of skin cancers by infrared and Raman microspectroscopies. SPEC 2010. Manchester, UK, 26 juin - 1<sup>er</sup> juillet 2010.

MAINRECK Nathalie. GOBINET Cyril. REGUIAI Ziad. GOELDEL Anne-Laure. DURLACH Anne. BERNARD Philippe. PIOT Oliver. Analysis of skin tumors by Raman microspectroscopy. ICORS XXII. Boston, MA, USA, 8-13 août 2010

MANFAIT Michel. PIOT Olivier. LY Elodie. GOBINET Cyril. JEANNESSON Pierre.  
MAINRECK Nathalie. SEBISKVERADZE David. DURLACH Anne. BERNARD Philippe.  
VRABIE Valeriu. PETIT Laurent. JOMARD André. ANDRES Philippe. SCHOOT Bernard.  
Hyperspectral and statistical analysis of skin slices: potential as diagnostic and prognostic tool.  
Proceedings of the 22nd World Congress of Dermatology. Séoul, Corée, 24-29 mai 2011.

MAINRECK Nathalie. GOBINET Cyril. REGUIAI Ziad. GOELDEL Anne-Laure. DURLACH  
Anne. BERNARD Philippe. PIOT Oliver. Basal Cell Carcinoma characterization by infrared and  
Raman microspectroscopies. ECSBM 2011. Palerme, Portugal, 29 août - 3 septembre 2011.

*COMMUNICATIONS PAR VOIE D’AFFICHE DANS DES REUNIONS NATIONALES*

---

MAINRECK Nathalie. GOBINET Cyril. REGUIAI Ziad. GOELDEL Anne-Laure. DURLACH  
Anne. BERNARD Philippe. MANFAIT Michel. PIOT Olivier. Analyse des cancers de la peau par  
microspectroscopies infrarouge et Raman. CGE 2010. Strasbourg, 28-29 octobre 2010.

---

## Apport potentiel de la spectroscopie Raman dans le traitement chirurgical des carcinomes cutanés (CBC)

---

Le carcinome basocellulaire (CBC) est un cancer cutané très fréquent représentant un problème de santé publique majeur. Il métastase rarement mais peut devenir très invasif localement s'il n'est pas pris en charge rapidement. Actuellement, le diagnostic de certitude du CBC est obtenu par examen anatomopathologique de coupes fines ; ce qui présente pour inconvénient d'être invasif et de donner une réponse différée. De plus, la chirurgie du CBC ne bénéficie pas d'outil permettant de définir en temps réel la largeur optimale des marges de sécurité ; celles-ci devant être minimales pour éviter les séquelles esthétiques mais suffisantes pour empêcher toute récurrence. L'objectif de ces travaux de thèse est d'évaluer l'apport potentiel de la spectroscopie Raman dans la prise en charge du CBC. Cette technologie applicable *in vivo* grâce au développement de sondes adaptées, permet une exploration tissulaire à un niveau moléculaire relativement rapide. Au total, 32 patients ont été inclus dans cette étude. A partir des spectres enregistrés *in vivo*, un modèle de discrimination CBC / peau saine a été développé, à partir duquel les marges d'excision latérales ont pu être évaluées. Les marges profondes ont également été étudiées après enregistrement de spectres sur les pièces fraîchement excisées. Des marqueurs Raman de discrimination ont été identifiés aux différentes échelles *in vivo*, *ex vivo* et *in vitro*; ils constituent des bio-indicateurs potentiels pour orienter la prise de décision chirurgicale. Enfin, la contribution des fonds spectraux, habituellement écartés des analyses Raman, a été considérée et leur intérêt dans le cadre de ce projet a été discuté.

---

Spectroscopie Raman, Cancer cutané, Analyse *in vivo*, Applicabilité clinique, Marqueurs spectroscopiques

---

## Potential contribution of Raman spectroscopy in the surgical treatment of skin carcinomas (BCC)

---

Basal cell carcinoma (BCC) is the most common skin cancer and a major problem for healthcare services worldwide. BCC rarely metastasizes but can become highly damaging for surrounding tissue in case of late diagnosis. Actually, the gold standard for BCC diagnosis relies on histopathological assessment of thin sections, but it is an invasive method which provides a delayed response. Moreover, it will be helpful during surgery of BCC to assess in real-time the optimal size of the security margins, which has to be small enough to minimize aesthetic sequelae but sufficient to avoid recurrence. The aim of this work is to evaluate the potential contribution of Raman spectroscopy in the management of BCC. This technology can be applied *in vivo* thanks to the development of appropriate probes and allows a relatively rapid tissue exploration at a molecular level. A total of 32 patients were included in this study. From *in vivo* recorded spectra, a model of discrimination BCC / healthy skin was implemented, from which the width of excision margins was evaluated. Deep margins were also studied after recording spectra on freshly excised pieces. Discriminant Raman markers were identified at different levels *in vivo*, *ex vivo* and *in vitro*; they are potential bio-indicators to help the surgeon to define ideal excision margins. In addition, the contribution of spectral backgrounds, usually removed from Raman analysis, was considered and their interest in this project was discussed.

---

Raman spectroscopy, Skin cancer, *In vivo* analysis, Clinical applicability, Spectroscopic markers

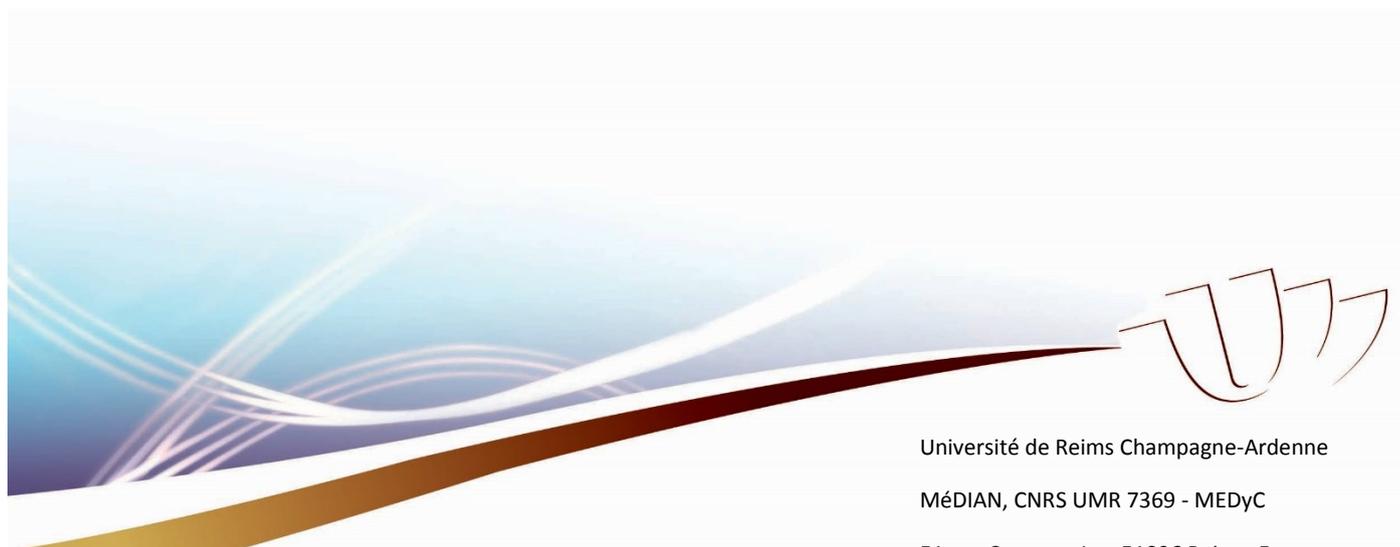
---

**Discipline : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**

---

**Spécialité : Biophysique**

---



Université de Reims Champagne-Ardenne

MéDIAN, CNRS UMR 7369 - MEDyC

51 rue Cognacq-Jay, 51096 Reims, France