



UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE –ARDENNE

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

Discipline : Physique, spécialité Biophysique

présentée et soutenue publiquement

par **Blandine ROIG**

le 19 novembre 2015

Titre :

**Caractérisation de tissus cutanés par spectroscopie bimodale :
Réflectance Diffuse et Raman**

JURY

M. Walter BLONDEL	Professeur	<i>Université de Lorraine</i>	Président du jury et Rapporteur
M. François RAMAZ	Maître de Conférences HDR	<i>ESPCI ParisTech</i>	Rapporteur
M. Michel MANFAIT	Professeur émérite	<i>URCA</i>	Directeur de thèse
M. Olivier PIOT	Professeur	<i>URCA</i>	Directeur de thèse
Mme Anne KOENIG	Docteur HDR	<i>CEA</i>	Encadrante
M. François PERRAUT	Ingénieur Chercheur	<i>CEA</i>	Encadrant
Mme Geneviève BOURG-HECKLY	Chercheur bénévole, Maître de Conférences Hors Classe HDR retraitée	<i>UPMC-Paris 6</i>	Invitée

N° attribué par la bibliothèque

| | | R | E | I | | | | |

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier M. Walter Blondel et M. François Ramaz d'avoir accepté d'être les rapporteurs de mon travail de thèse et Mme Geneviève Bourg-Heckly pour sa participation à mes soutenances de thèse et mi-thèse. Les avis et questions émises lors de ces restitutions ont permis des échanges toujours très enrichissants et valorisants.

J'exprime ensuite toute ma gratitude envers mes encadrants. Merci à Michel et Olivier pour votre intérêt, votre confiance, votre présence malgré la distance, vos remarques constructives à chaque point d'avancement et pour les opportunités de faire avancer ce travail que vous m'avez offertes. Merci à mes deux fidèles collaborateurs du jeudi ! Merci Anne pour ta disponibilité, ton aide permanente et ta bonne humeur (grimpant en flèche le vendredi !). Je suis ravie d'avoir partagé tant de choses avec toi durant ces trois années : notre bureau paysagé, nos livres, le yoga, les chats, les séjours à Milan et San Francisco... et j'en passe. Merci François pour ton temps, ton enthousiasme, ta rigueur et ta gentillesse. Enfin, merci à tous les deux pour votre confiance, pour nos discussions techniques qui m'ont toujours permis d'avancer et pour toutes nos parenthèses « hors-sujet » qui ajoutent au plaisir que j'avais de vous retrouver chaque jeudi.

Merci ensuite à Jean-Marc de m'avoir intégrée au laboratoire LISA et permise de valoriser tant de fois mon travail. Je remercie vivement les membres de ce laboratoire du CEA, ingénieurs-chercheurs, techniciens, assistantes et doctorants, pour l'ambiance et le partage au cours de ces trois années. Merci plus particulièrement aux collègues de la thématique *In Vivo* : Anne (x2), Michel, Veronica, Fred, Agathe et Jérôme. Ces moments d'échanges étaient importants pour avancer et voir plus loin que le bout de son nez. Merci à Emmanuelle pour les très bons souvenirs de San Francisco. Merci aux membres piliers de l'équipe de foot : Cédric, Mathieu, Thomas, Jean-Guillaume, Lionel, Pierre. J'aurais préféré ne pas faire partie du palmarès des « bras cassés » de notre participation au tournoi de l'AS mais ce fut malgré tout de bons moments.

Je souhaite mettre à l'honneur les amitiés nées de mon passage au LISA. Les inséparables copines Agathe, Alice et Charlotte, je tiens à « nous » très fort ; nos indissociables Fred et Anthony ; Veronica, avec qui j'ai partagé bien plus qu'un coin bureau, des doutes, des fous rires et surtout de bons moments ; Gaelle, chère cousine de thèse ; Judy et Sophie qui nous rejoignaient aux pauses cafés et aux soirées raclettes... A toutes et tous, merci pour les moments de détente que nous avons passés ensemble et pour votre présence au quotidien. Je vous adore.

Je voudrais terminer en remerciant mes parents et ma sœur Mathilde pour votre soutien et votre confiance tout au long de ces vingt-huit dernières années et pour toutes les bonnes choses qui restent à venir. Merci à Camille, Cécile, Marion, Maxime, Mickaël, Nicolas, Pierre et Thomas, mes amis bretons. Vous étiez dans mon cœur bien avant ces trois années et y resterez encore des années après. Et enfin, Arnaud, mon co-équipier de vie. Les mots manquent pour tout exprimer mais tu sais que rien ne serait pareil sans toi.

Résumé

L'objectif de cette thèse concerne l'association de deux techniques de mesure dans le cadre de la caractérisation *in vivo* de la peau. La première, nommée Spectroscopie de Réflectance Diffuse (DRS), permet la caractérisation des paramètres optiques de la peau analysée et quantifie les phénomènes d'absorption et de diffusion de la lumière. La deuxième est la microspectroscopie Raman. Elle fournit une identification chimique des composés analysés sans marquage.

L'objet de cette thèse est d'évaluer l'effet de l'interaction lumière-matière sur les capacités de localisation et de quantification de la microspectroscopie Raman, lesquelles sont dégradées dans un milieu diffusant tel que la peau.

Une approche *in vivo* bimodale (DRS et Raman) est proposée pour la caractérisation biochimique quantitative des tissus cutanés avec l'idée d'établir un protocole de correction des spectres Raman acquis, en exploitant les propriétés optiques fournies par la DRS. Elle est décomposée en trois axes de travail complémentaires : le développement d'une instrumentation DRS permettant la mesure des spectres de réflectance diffuse et le calcul des propriétés optiques dans la zone sondée par la spectroscopie Raman; le développement de fantômes optiques permettant une compréhension expérimentale des phénomènes d'absorption, de diffusion élastique et de diffusion Raman; le développement d'un protocole de correction des spectres Raman à partir des propriétés optiques obtenues par DRS.

Mots-clés : caractérisation de la peau, spectroscopie de réflectance diffuse, spectroscopie Raman, profils d'intensité Raman, fantômes optiques

Abstract

This thesis relates to the combination of two *in vivo* skin characterization techniques. On the one hand, Diffuse Reflectance Spectroscopy (DRS) enables skin optical properties characterization by quantifying light absorption and light elastic scattering. On the other hand, Raman microspectroscopy provides information on molecular compositions of tissues with no need of labeling.

Localization and quantification functions of Raman microspectroscopy are both distorted in scattering media such as skin. Therefore, the aim of this thesis was to assess the effect of light-matter interactions on these functions.

A bimodal method is proposed to achieve quantitative biochemical characterization of cutaneous tissues *in vivo*. The main idea is to develop a procedure of Raman spectra correction based on the quantified optical properties provided by DRS. This work was divided in three complementary approaches: the development of a system enabling diffuse reflectance and optical properties measurements in the same zone as Raman microspectroscopy; the fabrication of optical phantoms improving our knowledge on absorption, elastic scattering and Raman scattering phenomena; and the development of a Raman spectra correction model as function of the skin optical properties given by DRS measurements.

Keywords : skin characterization, diffuse reflectance spectroscopy, Raman spectroscopy, Raman depth profiling, optical phantoms

Table des matières

REMERCIEMENTS	3
RESUME	5
ABSTRACT	7
TABLE DES MATIERES	9
LISTE DES ANNEXES	13
INTRODUCTION	15
CHAPITRE 1 : CONTEXTE ET PROBLEMATIQUE SCIENTIFIQUE	21
1.1 La peau	21
1.2 Caractérisation biochimique de la peau par Spectroscopie Raman	23
1.3 Caractérisation des propriétés optiques de la peau par DRS	36
1.4 Positionnement par rapport à d'autres méthodes optiques de caractérisation	54
1.5 Problématique scientifique	58
CHAPITRE 2 : DEVELOPPEMENT DE FANTOMES SOLIDES MIMANT LES PROPRIETES OPTIQUES DE LA PEAU	67
2.1 Objectifs.....	67
2.2 Etat de l'art	68
2.3 Matériaux choisis et leurs caractéristiques	69
2.4 Protocole de fabrication	73
2.5 Résumé	83

CHAPITRE 3 : DEVELOPPEMENTS SUR LA TECHNOLOGIE DRS DU LISA..... 85

3.1 Instrumentation existante 85

3.2 Amélioration de la méthode de traitement des données 94

3.3 Caractérisation des fantômes solides fabriqués 102

3.4 Résumé 107

CHAPITRE 4 : MICRO-DRS : DEVELOPPEMENT D'UNE APPROCHE BIMODALE DRS-RAMAN 109

4.1 Description de l'instrument 109

4.2 Dispositif expérimental 112

4.3 Résultats de simulation 118

4.4 Résultats obtenus sur fantômes 127

4.5 Résumé 137

CHAPITRE 5 : DIFFUSION DE LA LUMIERE DANS LA PEAU : VARIABILITE EN FONCTION DE LA ZONE DE MESURE ET DU VIEILLISSEMENT CUTANE139

5.1 DRS *in vivo* : influence du site et du vieillissement cutané 139

5.2 Micro-DRS *in vivo* : étude des propriétés optiques superficielles 149

5.3 Origine moléculaire des variations de propriétés optiques liées au vieillissement cutané : le réseau de collagène..... 153

5.4 Résumé 155

CHAPITRE 6 : DEVELOPPEMENT D'UN MODELE DE CORRECTION DES SPECTRES RAMAN 157

6.1 Matériel et méthodes..... 157

6.2 Profils obtenus sur fantômes solides monocouches..... 167

6.3	Evaluation de la dégradation de la fonction de localisation	170
6.4	Evaluation de la dégradation de la fonction de quantification	176
6.5	Proposition d'un protocole de correction des spectres	187
6.6	Résumé	189
CHAPITRE 7 : LA PEAU, UN MILIEU STRATIFIE		191
7.1	Profils Raman de fantômes multicouches	191
7.2	Sectionnement en profondeur des propriétés optiques obtenues par DRS	195
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES		199
BIBLIOGRAPHIE		203
ANNEXES		219
Liste des publications et communications		233

Liste des annexes

Annexe 1 : Algorithme Monte Carlo 3D	221
Annexe 2 : Algorithme Monte Carlo 2D	223
Annexe 3 : Accessing deep optical properties of skin using Diffuse Reflectance Spectroscopy	225

Introduction

La peau est un organe complexe qui assure une fonction barrière pour le corps humain et dont les méthodes optiques de caractérisation sont diverses et variées (Réflectance Diffuse, Fluorescence, Raman, OCT...). D'un point de vue quantitatif, la spectroscopie Raman présente un très fort potentiel car elle fournit une identification chimique des composés analysés. Intégrée à un système confocal, cette méthode de mesure présente une très bonne résolution volumique permettant d'identifier la frontière entre tissus sain et pathologique, ou de suivre la diffusion d'un actif dans les couches superficielles de la peau.

La peau est constituée de plusieurs couches aux propriétés optiques différentes. Les deux principales sont l'épiderme (entre 100 et 200 μm d'épaisseur) et le derme (entre 1 et 2 mm d'épaisseur). Des phénomènes d'absorption et de diffusion élastique de la lumière, liés à la composition et à la structure du tissu, donc dépendants du sujet examiné, sont spécifiques à ces différentes strates. La spectroscopie de réflectance diffuse (*Diffuse Reflectance Spectroscopy* - DRS) permet de quantifier ces phénomènes avec une instrumentation simple et peu coûteuse. Elle fournit les coefficients d'absorption et de diffusion de la peau sur le spectre visible et proche infra-rouge à partir d'une mesure spectrale de la lumière rétrodiffusée par le tissu. Selon l'instrumentation utilisée, les profondeurs sondées peuvent atteindre l'hypoderme et la résolution axiale, commandée par le trajet optique des photons, n'est pas ajustable. On estime qu'elle est de l'ordre de 500 μm dans une configuration sondant le derme.

Malgré l'utilisation d'un système confocal et d'une source laser intense, la microspectroscopie Raman en milieux absorbants et diffusants perd son caractère quantitatif dès la dizaine de microns sous la surface. La capacité à illuminer le tissu en profondeur et de manière localisée est limitée et l'intensité du signal Raman détectable à la surface du tissu est atténuée par les phénomènes d'absorption et de diffusion élastique. Les fonctions de localisation et de quantification de la microspectroscopie Raman sont toutes les deux dégradées. En général, la profondeur maximale à laquelle on peut détecter un signal Raman est de 200 μm pour une résolution axiale d'environ 7 μm . L'objectif de ce travail de thèse est donc de développer une approche bimodale *in vivo* (DRS et Raman) pour la caractérisation biochimique quantitative des tissus cutanés avec l'idée d'établir un modèle de correction des spectres Raman en exploitant les propriétés optiques fournies par DRS. Ce travail est co-encadré par l'unité MEDyC (UMR CNRS/URCA 7369), laboratoire des directeurs de thèse à Reims, et le LISA (CEA-LETI), laboratoire d'accueil à Grenoble.

Dans ce but, trois axes de travail complémentaires ont été empruntés :

- le développement et la caractérisation d'une **instrumentation Micro-DRS** permettant la mesure des spectres de réflectance diffuse et le calcul des propriétés optiques de l'épiderme (couche superficielle sondée en microspectroscopie Raman);

- le développement de **fantômes optiques**, objets tests simulant les propriétés optiques de la peau et permettant une compréhension expérimentale des phénomènes physiques concernés que sont l'absorption, la diffusion élastique et la diffusion Raman. Ces objets servent également à la qualification de l'instrument;
- le développement d'un **modèle de correction des spectres Raman** basé sur les résultats expérimentaux obtenus sur fantômes et permettant de rendre quantitative la signature biochimique des coupes profondes de la peau.

Ce manuscrit rend compte de ces différents travaux et s'articule en sept chapitres :

Le **Chapitre 1** donne les principales caractéristiques du tissu cutané avant de présenter la spectroscopie Raman comme méthode de caractérisation biochimique de la peau et la DRS comme méthode de caractérisation optique des milieux diffusants, et de positionner ces techniques par rapport à d'autres méthodes optiques d'analyse de la peau. Enfin, il expose la problématique à laquelle nous tentons de répondre et la démarche empruntée dans ce but.

Afin d'évaluer la performance des développements réalisés en DRS et d'étudier l'effet de variations de la diffusion élastique sur les spectres Raman, des fantômes optiques dédiés ont été développés. Ils peuvent être homogènes (fantômes dits monocouches) ou présenter des propriétés optiques définies couche par couche (fantômes dits multicouches). Le protocole de fabrication est décrit au **Chapitre 2**.

Le **Chapitre 3** présente l'instrumentation DRS qui a été développée au LISA, les améliorations apportées à la méthode de calcul des propriétés optiques et les résultats de caractérisation des fantômes fabriqués.

Cette instrumentation DRS, que l'on qualifie de standard, sonde l'épiderme et le derme. Afin de déterminer uniquement les coefficients d'absorption et de diffusion de l'épiderme (zone analysée par la microspectroscopie Raman), un nouvel instrument nommé Micro-DRS est décrit au **Chapitre 4**. Sa mise en œuvre est simple et consiste à ajouter un ensemble optique à l'extrémité de mesure de la sonde standard. De plus, sa configuration rend possible le couplage à un microspectromètre Raman pour une caractérisation cutanée bimodale. La méthode de traitement des spectres de réflectance diffuse aboutissant au calcul des coefficients d'absorption, de diffusion et d'anisotropie est exposée et testée sur fantômes.

Le **Chapitre 5** illustre l'importance d'effectuer la mesure des propriétés optiques de la peau à l'endroit même où les spectres Raman sont acquis si on souhaite les corriger des effets de diffusion élastique. En effet, les résultats d'une campagne de mesures de DRS et de Micro-DRS *in vivo* montrent la variabilité du coefficient de diffusion en fonction de l'individu. Ceci s'explique en partie par le vieillissement cutané, mais aussi par des différences en fonction du lieu de la mesure.

Au **Chapitre 6**, les fonctions de localisation et de quantification de la microspectroscopie Raman sont évaluées. L'interaction lumière-matière de ce processus est donc étudiée. Par des

mesures Raman sur fantômes aux propriétés de diffusion variables, un protocole de correction des spectres Raman qui tient compte des propriétés optiques mesurées par DRS est établi.

Enfin, nous présentons au **Chapitre 7** les résultats d'un travail préliminaire sur le caractère stratifié de la peau. En effet, ses propriétés optiques varient d'une couche élémentaire à l'autre. Les spectres Raman acquis sur les fantômes multicouches sont interprétés en ce sens et une méthode permettant de différencier en DRS le spectre d'absorption du derme de celui obtenu sur tout le volume sondé est proposée et testée.

Chapitre 1 : Contexte et problématique scientifique

L'objectif de ce chapitre est de présenter le contexte et de définir le cadre dans lesquels ce sujet de thèse a été posé. Celui-ci porte sur la caractérisation des tissus cutanés. Les caractéristiques physiologiques de la peau sont donc présentées en première partie de ce chapitre. La spectroscopie Raman est présentée dans la deuxième partie. La troisième partie décrit la spectroscopie de réflectance diffuse. Ces deux modes de spectroscopie sont comparés, dans la quatrième partie de ce chapitre, à d'autres méthodes optiques de caractérisation de la peau pour mieux comprendre leurs spécificités. C'est dans la dernière partie de ce chapitre que la problématique à laquelle nous tentons de répondre est énoncée.

1.1 La peau

La peau est constituée de trois couches élémentaires, l'épiderme, le derme et l'hypoderme, en les nommant de la couche la plus superficielle à la plus enfouie (voir Figure 1-1). Nous détaillons ci-dessous leurs caractéristiques physiologiques (S. Tfaili 2012).

1.1.1 L'épiderme

L'épiderme est la couche superficielle de la peau et joue le rôle de barrière. Il est pourtant la plus fine des trois couches avec une épaisseur de quelques dizaines de micromètres. Il se compose lui-même de cinq sous-couches cellulaires (voir Figure 1-2) que nous énumérons ci-dessous en partant de la plus profonde à la plus superficielle:

- La **couche basale** (ou *stratum germinativum*) est le lieu où naissent et se multiplient les cellules constitutives de l'épiderme : les kératinocytes et les mélanocytes. Les kératinocytes ou cellules épithéliales, de forme parallélépipédique, synthétisent la kératine, protéine aux vertus protectrices. Ils migrent progressivement vers les couches supérieures de l'épiderme. Les mélanocytes fabriquent les mélanosomes porteurs d'un pigment foncé appelé mélanine donnant un phototype plus ou moins élevé aux individus en fonction de leur nombre. Les mélanocytes restent dans la couche basale, alors que les mélanosomes, phagocytés par les kératinocytes, atteignent les couches superficielles (Magnain 2009);
- Dans la **couche épineuse** (ou *stratum spinosum*), les kératinocytes y sont cubiques;
- La **couche granuleuse** empêche la perte en eau de la peau grâce à des kératinocytes de forme aplatie;
- À partir de la **couche de transition** (ou *stratum lucidum*), les kératinocytes n'ont plus de noyaux;
- Ces cellules mortes, appelées cornéocytes, constituent la **couche cornée** (ou *stratum corneum*) sur une vingtaine de microns, jouant le rôle de barrière. Cette couche cornée, épaisse de 10 à 20 microns sur la majeure partie du corps, empêche non seulement d'éventuels microbes ou poussières de pénétrer la peau, mais elle la protège aussi des agressions extérieures (abrasion ou changement de température).

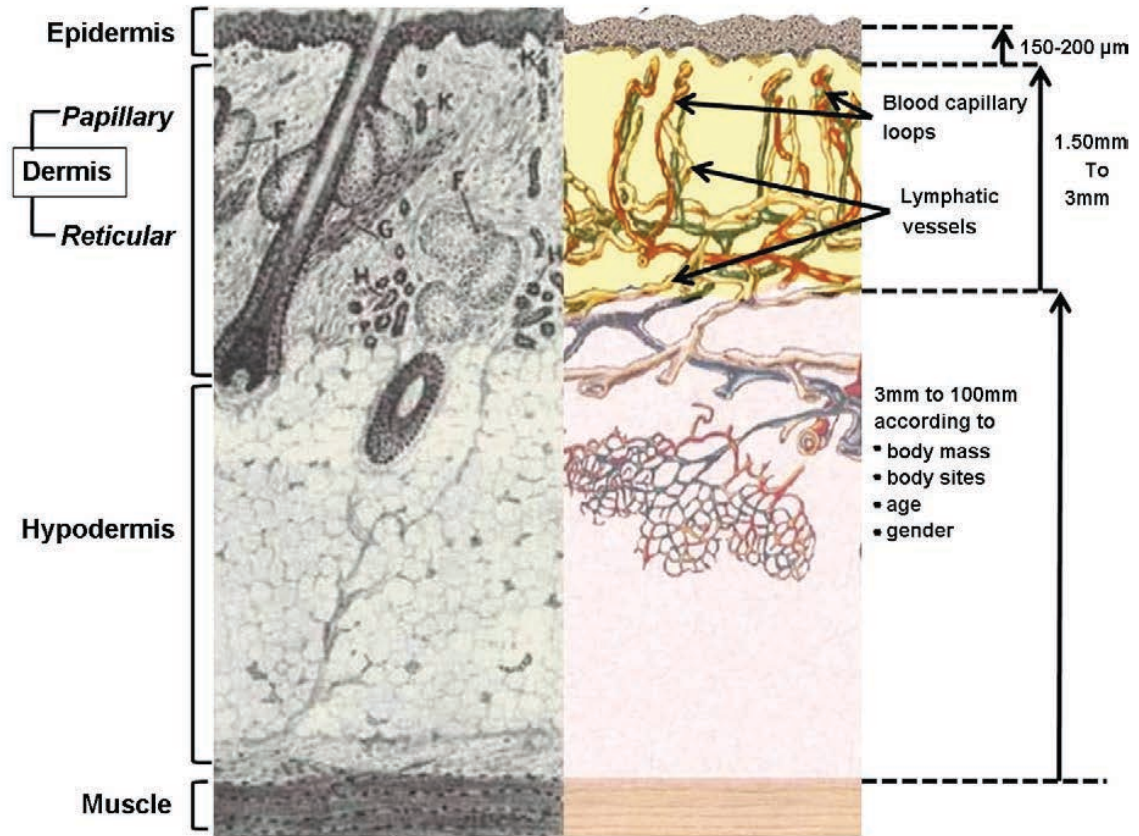


Figure 1-1 Structure de la peau (Laurent 2008)

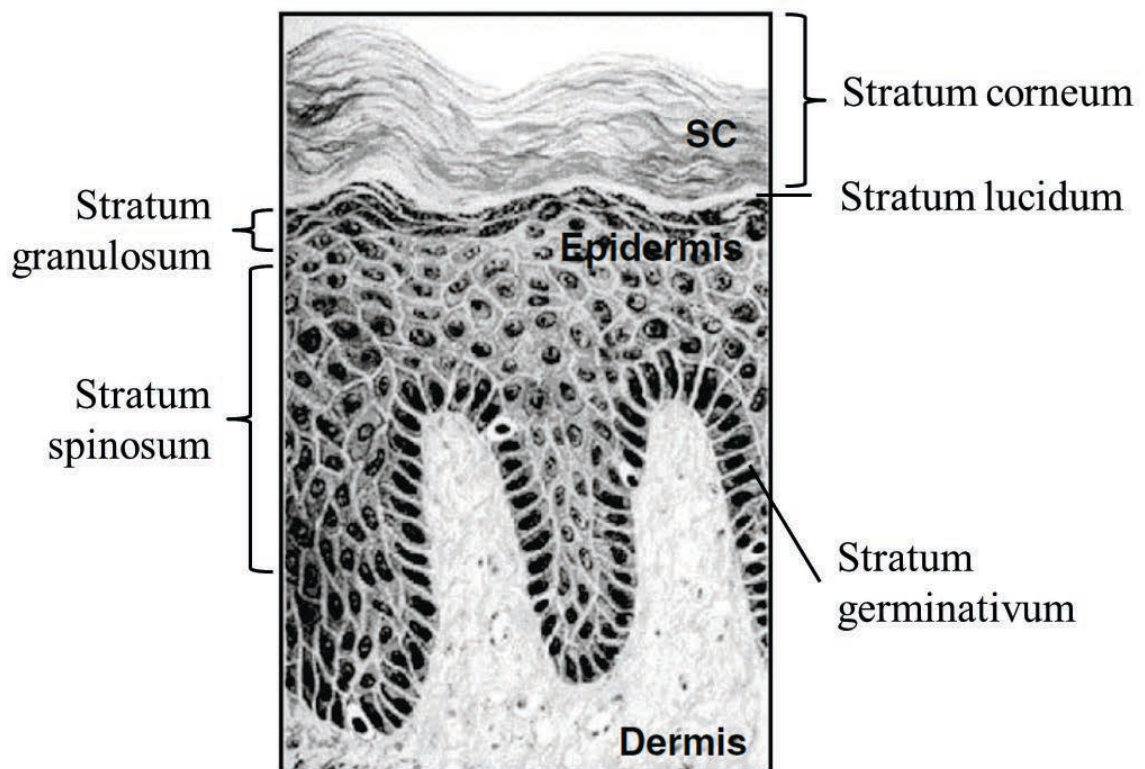


Figure 1-2 Coupe histologique de l'épiderme et du derme (Flach et Zhang 2010)

L'épiderme adhère au derme via la **jonction dermo-épidermique** constituée à la fois de kératinocytes et de fibroblastes présents dans le derme. On y trouve aussi du collagène de type IV et de type VII qui lui confèrent des propriétés mécaniques de support (S. Tfaili 2012).

1.1.2 Le derme

Le derme est donc constitué de fibroblastes, les cellules responsables de la synthèse des fibres de collagène et d'élastine, et de vaisseaux sanguins. Le collagène assure la résistance mécanique de la peau, alors que l'élastine lui donne son élasticité.

Dans la couche supérieure, le **derme papillaire** (voir Figure 1-1), la structure fibreuse est très ordonnée et les vaisseaux sanguins sont petits. Le **derme réticulaire**, plus profond, se caractérise par des fibres plus denses et désordonnées, des vaisseaux sanguins plus gros, et moins de fibroblastes.

1.1.3 L'hypoderme

Le tissu adipeux situé entre les couches inférieures de la peau et les muscles est appelé **hypoderme**. Il peut mesurer de 0 à 3 cm selon la zone corporelle.

1.2 Caractérisation biochimique de la peau par Spectroscopie Raman

Dans cette partie, nous présentons la spectroscopie Raman comme outil de caractérisation des tissus cutanés. Cette présentation est déclinée suivant les trois principales fonctions de la technique : l'identification des composés biochimiques, leur quantification et leur localisation.

1.2.1 Fonction d'identification et de quantification de la spectroscopie Raman

Raman et Krishnan sont les premiers à publier sur l'existence de l'effet Raman en 1928. Raman a reçu le Prix Nobel en 1930 pour cette découverte.

Lorsqu'une molécule est illuminée par une source lumineuse monochromatique intense (laser) de nombre d'onde $\sigma_0 = \frac{1}{\lambda_0}$, une grande majorité de la lumière est diffusée élastiquement, c'est-à-dire sans changement de nombre d'onde. Ceci correspond au phénomène de diffusion élastique décrit dans le paragraphe suivant (paragraphe 1.3). Cependant, une faible part des photons incidents (1 sur 10^8) est diffusée avec un changement énergétique $\sigma_0 \rightarrow \sigma_R$ au contact de la molécule : c'est l'effet Raman (voir Figure 1-3). Il en existe deux types. Soit les photons perdent de l'énergie par l'excitation d'un état vibrationnel σ_v de la molécule (effet Raman de type Stokes), soit les photons gagnent en énergie en induisant le retour de cette vibration moléculaire à son état fondamental σ_f (effet Raman de type Anti-Stokes). À l'équilibre thermique, les molécules d'un matériau sont majoritairement dans l'état fondamental de plus faible énergie. C'est la raison pour laquelle le spectre Raman de type Stokes est le plus couramment mesuré (LaPlant 2010).

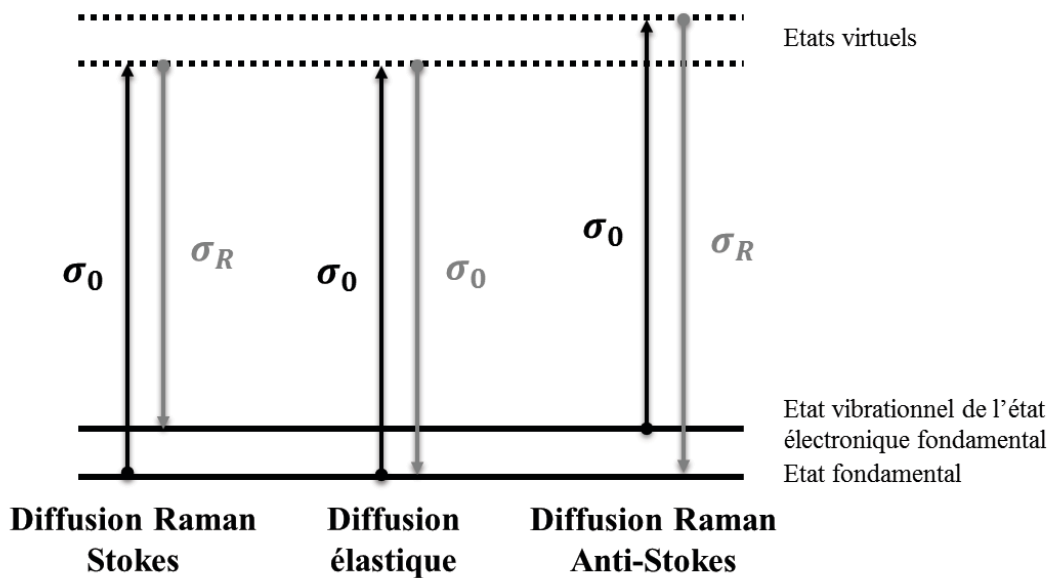


Figure 1-3 : Représentation schématisée des transitions énergétiques ayant lieu lors d'une diffusion Raman et comparaison au phénomène de diffusion élastique

$$\sigma_0 - \sigma_R = \sigma_v - \sigma_f \quad (1-1)$$

Un spectre Raman est donc classiquement obtenu en mesurant la lumière diffusée à une plus grande longueur d'onde que la lumière d'excitation. Par convention, les spectres Raman sont affichés en fonction du décalage en nombre d'onde $\sigma = \sigma_0 - \sigma_R$ (*Raman shift* en anglais). La coordonnée $\sigma = 0 \text{ cm}^{-1}$ correspond à la diffusion élastique de la lumière, c'est-à-dire à celle de l'excitation.

Il est à noter que l'effet Raman est un processus linéaire dans le sens où l'intensité d'un spectre mesuré est proportionnelle à l'intensité de l'excitation lumineuse. Quant à l'intensité des raies Raman observées, elles sont proportionnelles à la concentration de l'échantillon sondé en composés moléculaires détectés (Stone 2001). Cette caractéristique de la spectroscopie Raman lui confère sa fonction de quantification.

Toute molécule possède un spectre Raman, bien que chaque mode vibrationnel ne soit pas forcément actif en Raman. On parle de section efficace de diffusion Raman (*Raman cross section*) pour exprimer la probabilité qu'une liaison moléculaire réémette un photon Raman. Cette probabilité dépend de la polarisabilité de la liaison. L'intensité des raies Raman observées dépend donc aussi linéairement de cette quantité (LaPlant 2010).

Un paramètre directement contrôlable pour optimiser l'intensité du spectre Raman d'un échantillon est la longueur d'onde d'excitation. La section efficace Raman est, en approximation, proportionnelle à λ_0^{-4} pour une excitation Raman non résonante (Stone 2001). Ceci indique que, lorsque la longueur d'onde d'excitation se rapproche de l'infra-rouge, la quantité de photons Raman émis diminue rapidement. On aurait donc tendance à utiliser une longueur d'onde laser se rapprochant du bleu pour maximiser l'intensité d'émission Raman. Cependant, dans cette zone spectrale, l'autofluorescence du milieu est bien plus efficace que la diffusion Raman et le spectre détecté porte principalement l'information de

fluorescence masquant le signal Raman. C'est généralement le cas des échantillons biologiques. Il est donc important de trouver un compromis, c'est-à-dire une longueur d'onde intermédiaire permettant de maximiser le rapport entre le signal Raman et le fond de fluorescence parasite.

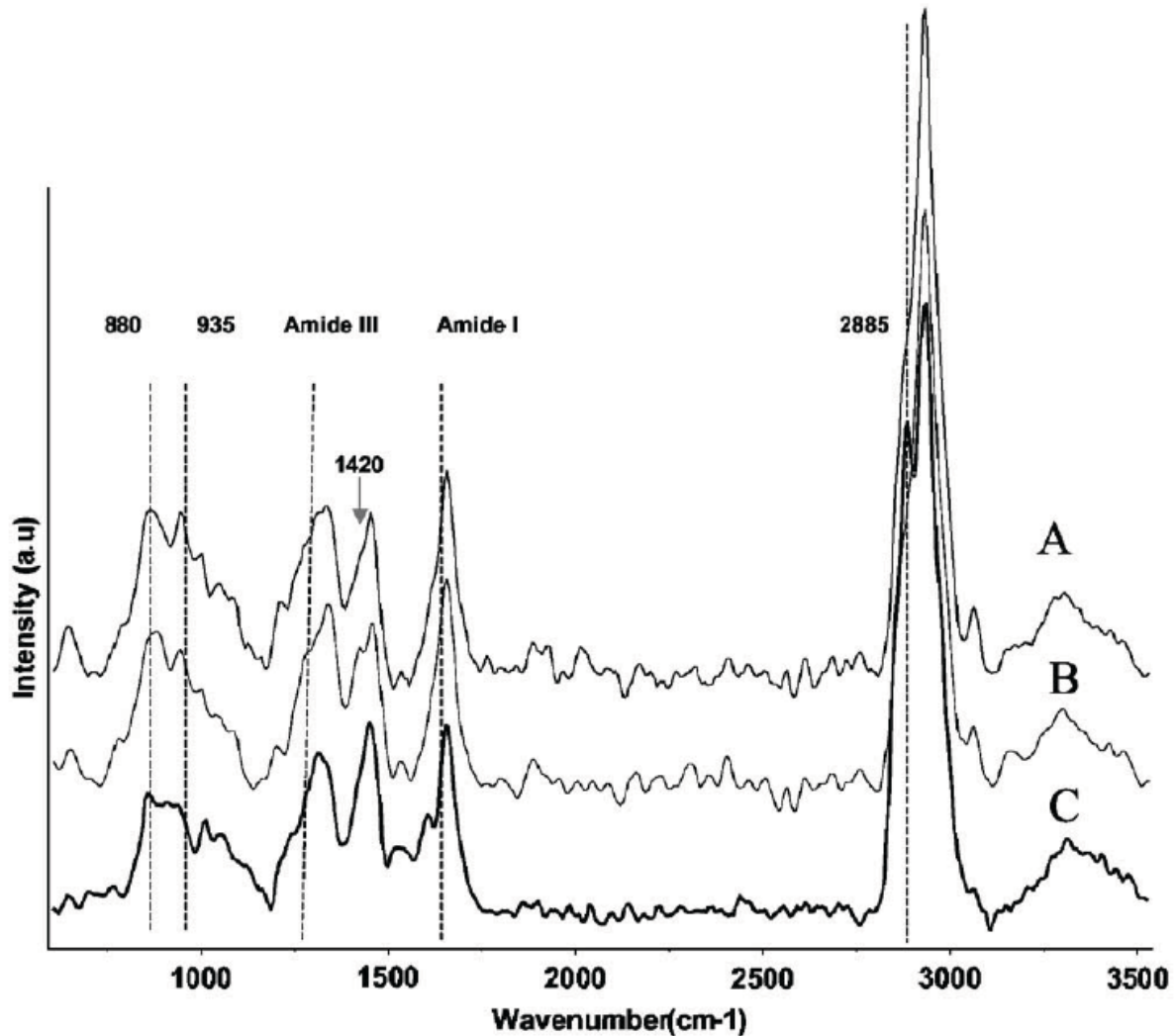


Figure 1-4 : Exemples de spectres Raman de la peau obtenus sur différentes parties du corps (A) Bout du doigt (B) Paume de la main (C) Avant-bras. Les bandes spectrales des liaisons chimiques caractéristiques sont indiquées (Chrit, et al. 2005).

Un spectre Raman d'un échantillon de peau peut être considéré comme une véritable signature moléculaire pouvant être utilisée pour l'identification biochimique des constituants du tissu (voir Figure 1-4). Ce spectre contient une multitude de raies dont le décalage en nombre d'onde est représentatif des niveaux énergétiques de vibration des molécules présentes dans l'échantillon analysé. C'est, ensuite, par une analyse des liaisons mises en évidence que la composition moléculaire en est déduite; et ceci sans marquage.

1.2.2 Instrumentation

L'instrumentation de base permettant d'obtenir un spectre Raman comporte :

- un laser pour l'excitation par une source monochromatique intense;
- un ou plusieurs éléments optiques permettant de collecter les photons Raman tout en bloquant un maximum de photons diffusés élastiquement. La géométrie de collection la plus fréquemment utilisée est la géométrie de rétrodiffusion bien que des systèmes Raman en géométrie de transmission existent aussi (Buckley et Matousek 2011). L'emploi d'un filtre réjecteur de bande très efficace (ou filtre Notch), défini sur une étroite plage de longueurs d'onde, est nécessaire pour bloquer les photons diffusés élastiquement;
- l'association d'un spectrographe et d'un détecteur permettant d'acquérir un spectre. Les longueurs d'onde d'excitation privilégiées pour l'analyse de matériaux biologiques sont comprises entre 700 et 900 nm (intervalle spectral de faibles absorption et autofluorescence des tissus). Dans ce cas, un spectromètre à dispersion est utilisé (spectrographe à grille et détecteur CCD). Pour une excitation à 1064 nm réduisant significativement le fond de fluorescence, un spectromètre à transformée de Fourier est utilisé. Dans ce cas, le spectrographe est remplacé par un interféromètre.

Nous déclinons cette instrumentation de base dans le développement d'appareils Raman *in vivo* par l'étude de quelques exemples (Figure 1-5 à Figure 1-8). La majorité de ces systèmes se présente sous la forme de sondes fibrées. Ils permettent de répondre au besoin de collecter un maximum de photons émis par diffusion Raman étant donnée la faiblesse de ce signal, tout en satisfaisant les contraintes d'ergonomie liées aux manipulations *in vivo*.

Les applications de ces différents exemples correspondent principalement à des finalités diagnostiques en clinique. Ils sont utiles dans le diagnostic de différentes pathologies:

- le diagnostic des cancers de la peau avec le système présenté en Figure 1-5 (Lui, et al. 2012);
- le diagnostic du cancer du col de l'utérus avec le système présenté en Figure 1-6 (Mo, et al. 2009);
- le diagnostic de certaines maladies du sang comme la sclérose en plaque avec le système présenté en Figure 1-7 (Scepanovic, et al. 2011);
- le diagnostic du cancer du sein avec la méthode SORS (Figure 1-8) (Keller, et al. 2011) ou avec le système présenté en Figure 1-7 (Haka, et al. 2006);
- et, enfin, la détection de certaines maladies des os comme l'ostéoporose ou la maladie des os de verre avec la méthode SORS (Figure 1-8) (Schulmerich, et al. 2006).

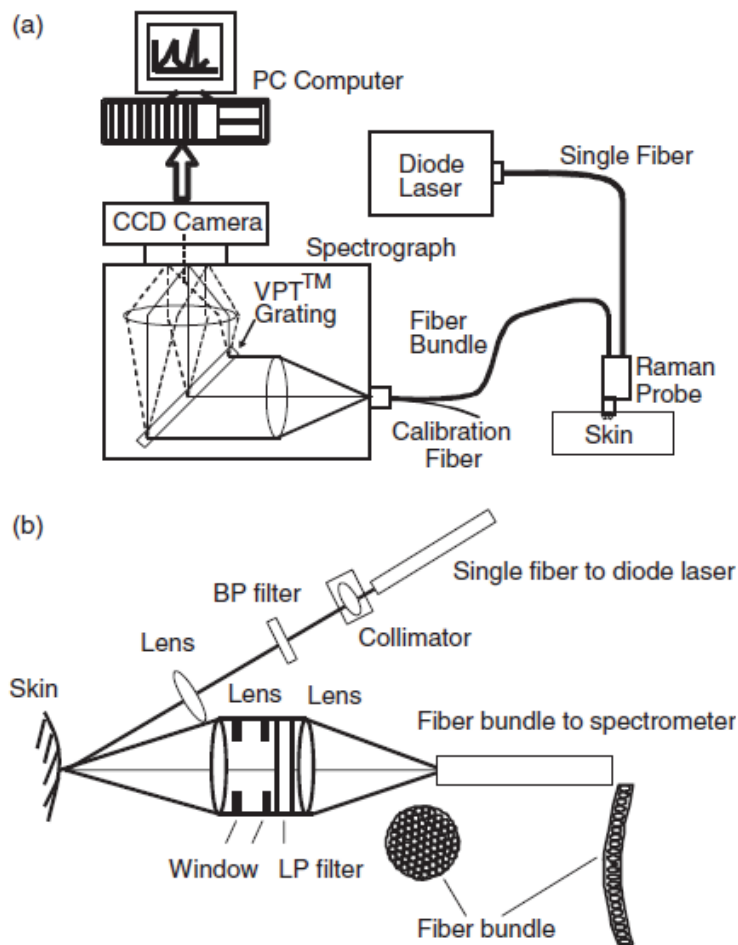


Figure 1-5 : (a) Exemple d'un système Raman dans son intégralité et (b) Zoom sur la partie fibrée spécialement conçue pour une mesure sur tissus cutanés (Zhao, et al. 2008)

Les modifications biochimiques associées au développement d'une pathologie ne sont pas directement visibles dans les spectres Raman. Ce sont des modifications spectrales subtiles et difficiles à détecter et à quantifier. Ces diagnostics font appel, dans la plupart des cas, à des traitements statistiques pointus : BTEM (*Band Target Entropy Minimization*) (Schulmerich, et al. 2006), SMLR (*Sparse Multinomial Logistic Regression*), PCA (*Principal Component Analysis*) et PLS (*Partial Least Squares*) (Lui, et al. 2012) et d'autres procédés de classification (Scepanovic, et al. 2011).

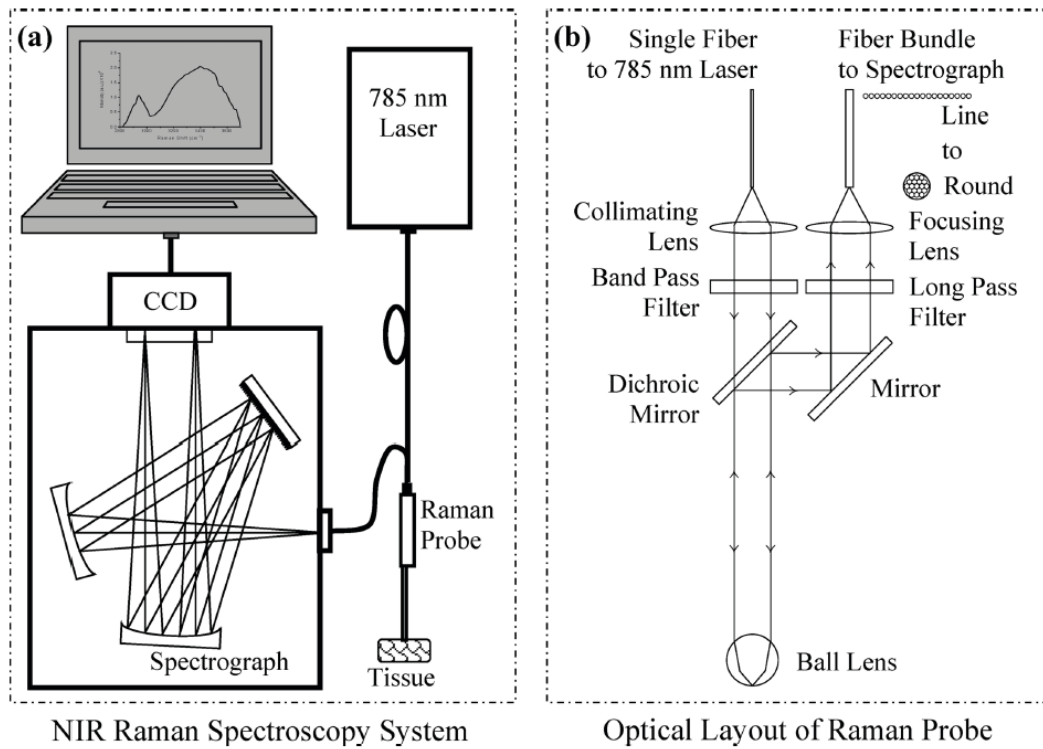


Figure 1-6 : (a) Exemple d'un système Raman dans son intégralité et (b) Zoom sur la partie fibrée couplée à une lentille sphérique (Mo, et al. 2009)

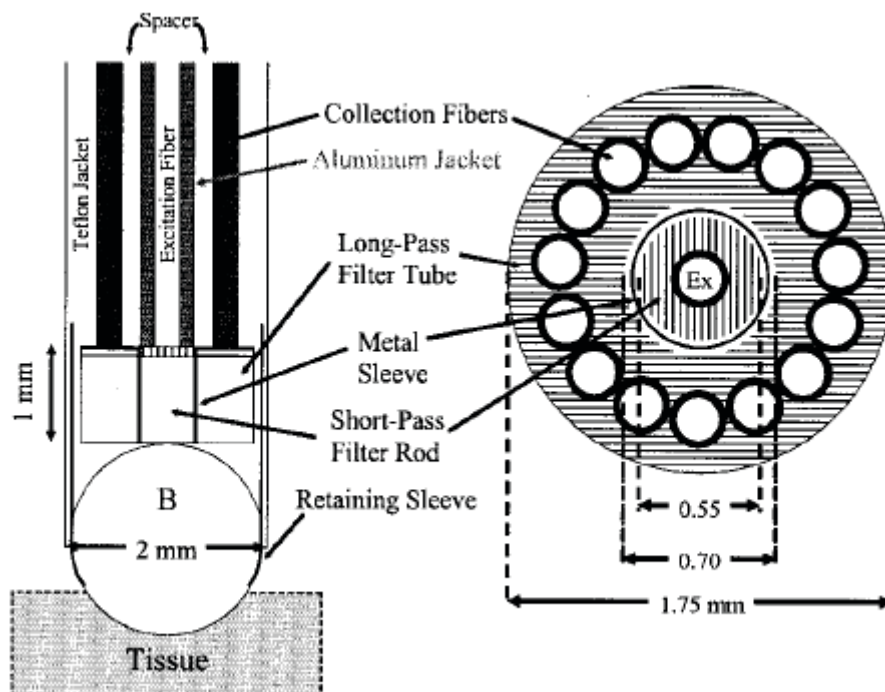


Figure 1-7 : Schéma d'un embout de sonde Raman en vue longitudinale à gauche et en coupe transversale à droite (Motz, et al. 2004)

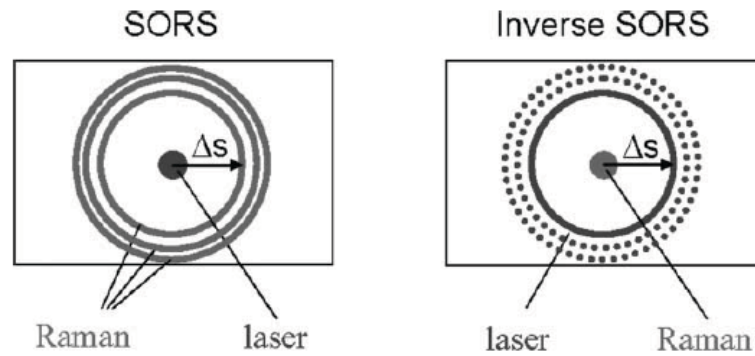


Figure 1-8 : Vues schématiques des méthodes SORS (*Spatially Offset Raman Spectroscopy*) et SORS inversée (Matousek 2007)

Pour certaines applications, la résolution spatiale de ces systèmes n'est pas suffisante. Ils ont été conçus de manière à optimiser la collection des signaux Raman et non de manière à localiser précisément l'information. Quand le besoin de localisation est avéré, on préfère à ces systèmes fibrés les systèmes dits confocaux présentés dans le paragraphe qui suit.

1.2.3 Mise en œuvre de la fonction de localisation

Comme décrit dans le paragraphe 1.2.1, la spectroscopie Raman assure une fonction d'**identification** des composés chimiques présents dans la peau et peut donner une information spectrale **quantitative**. Or, la fonction de **localisation** peut aussi être nécessaire pour des problématiques de caractérisation (par exemple dans l'étude des différences de composition entre la couche basale et la couche cornée) voire même de diagnostic (par exemple dans la détection des marges d'un mélanome avant résection). Dans le premier cas, on recherche une bonne résolution axiale; dans le deuxième cas, on sollicitera aussi une bonne résolution latérale.

Dans ce paragraphe, nous présentons quelques systèmes Raman dédiés à l'analyse de la peau avec en ligne de mire une optimisation de la fonction de localisation. Nous verrons comment les systèmes développés répondent aux besoins de localisation latérale et axiale avec quelques exemples de conception dédiés aux acquisitions *in vivo*. En outre, d'autres systèmes Raman *in vivo* sont développés pour une utilisation par voie endoscopique, avec des contraintes de dimensionnement importantes. C'est pourquoi nous choisissons de ne pas les mentionner ici.

Microscopie Raman

Le couplage de la spectroscopie Raman avec un microscope confocal rend possible une lecture axiale au cœur de l'échantillon. Nous verrons le principe de cette technique et son champ d'applications dans les lignes qui suivent.

La microscopie confocale a été inventée par Minsky en 1957 pour des observations en fluorescence (Minsky 1961). Un microscope Raman confocal combine une illumination monochromatique focalisée dans l'échantillon avec une détection des photons rétrodiffusés filtrée spatialement (Figure 1-9). L'utilisation d'un filtre Notch entre l'objectif et le spectromètre Raman permet d'éliminer les photons diffusés de manière élastique.

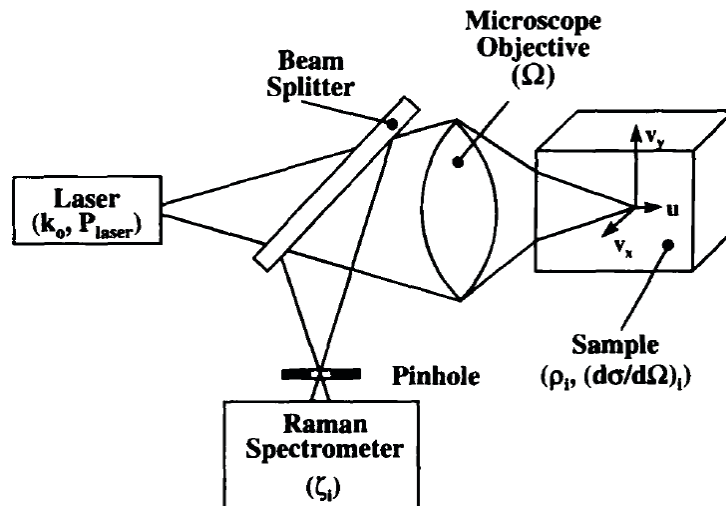


Figure 1-9 : Eléments de base d'un microscope Raman confocal (Brenan et Hunter 1996)

Comme dans un microscope, la fonction de focalisation est assurée par un objectif de microscope (voir Figure 1-10(a)). La fonction de filtrage spatial est réalisée grâce à un diaphragme de petit diamètre (*pinhole* en anglais) placée entre l'objectif et le détecteur (voir Figure 1-10(b)). Le diaphragme est conjugué avec le point de focalisation du laser. Ceci permet de détecter la lumière provenant d'un petit élément de volume de l'échantillon, et d'atténuer la lumière émanant des autres régions de l'échantillon.

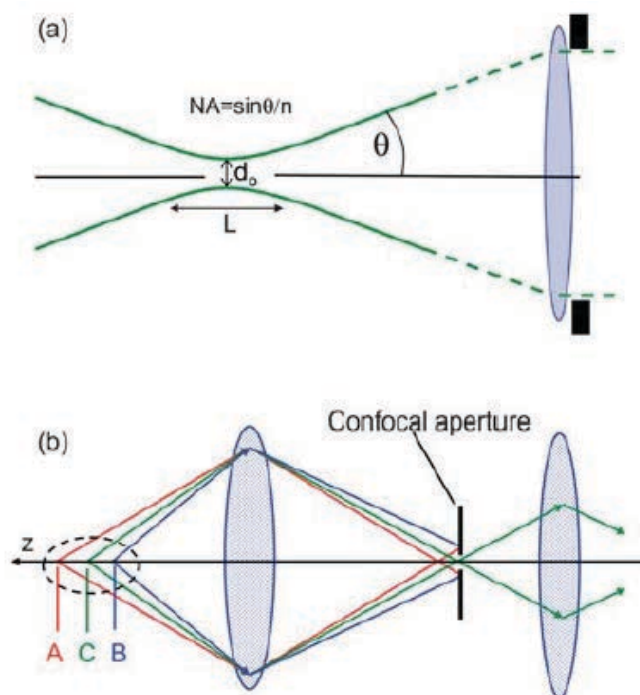


Figure 1-10 : Schémas illustrant le principe du filtrage confocal (Everall 2010) (a) Le faisceau laser est focalisé en un petit élément de volume par un objectif de grande ouverture numérique NA (b) L'ouverture confocale bloque les rayons A et B ne provenant pas du volume focal, laissant uniquement les rayons émanant du point C atteindre le détecteur

Ensuite, par auto-focus ou en plaçant l'échantillon sur une platine de translation, un microscope Raman confocal permet d'effectuer la spectroscopie Raman par balayage axial en faisant progressivement varier la distance entre la surface de l'échantillon et le plan focal de l'objectif. On constitue ainsi ce que nous appellerons par la suite un "profil axial" ou tout simplement un "profil Raman". L'ordre de grandeur de la résolution axiale de ce type de système est de 2 μm . En ce qui concerne la résolution latérale, elle peut être inférieure à 1 μm .

Dans cette configuration instrumentale, on parle de *spectroscopie Raman confocale* ou bien de *microspectroscopie Raman*.

Suivi d'actifs

Ce type de systèmes permet de répondre à un certains nombres de problématiques regroupées sous la dénomination du *suivi d'actifs* (Foerster, et al. 2011) :

- la diffusion d'actifs cosmétiques ou dermatologiques appliqués en surface;
- plus spécifiquement, la profondeur de pénétration de ces actifs;
- la durée de vie des composés ayant effectivement pénétré la peau;
- les changements métaboliques ou chimiques pouvant intervenir sur ces composés;
- l'effet biochimique induit sur les éléments constitutifs de la peau par la présence de composés actifs dans le tissu cutané;
- la présence dans la peau de produits ingérés par le corps par une autre voie que la voie cutanée.

Pour cela, il suffit de connaître les vibrations Raman caractéristiques des composés dont on souhaite suivre l'évolution dans la peau et d'être capable de les distinguer de la signature spectrale du tissu cutané lui-même. Cela est possible si la sensibilité du système et la concentration en composés sont suffisantes.

Dans (Tfaily, et al. 2014), les auteurs ont par exemple effectué un suivi cinétique de la caféine et du resveratrol (un composé communément utilisé dans les formulations cutanées) 9 heures après application des produits. La pénétration du Metronidazole, un médicament prescrit dans le traitement de la rosacée (Galderma France), a aussi été étudiée sur des peaux excisées (A. Tfayli, et al. 2007-a) et des modèles de peau reconstituée (A. Tfayli, et al. 2007-b).

Caractérisation des tissus cutanés

La microspectroscopie Raman peut aussi être utilisée dans la caractérisation des tissus cutanés eux-mêmes pour étudier leur structure et leurs éléments constitutifs:

- Une étude de la jonction dermo-épidermique a été réalisée en 2012 par (Nguyen, Gobinet, et al. 2012). En identifiant les différences spectrales associées aux différences de conformation moléculaire qui existent entre les collagènes de type I et IV (Figure

1-11), ce dernier étant localisé dans la jonction dermo-épidermique, il a été possible d'identifier les marqueurs spectraux des couches du derme, de l'épiderme et de leur interface (Figure 1-12);

- Dans (Boncheva, et al. 2009), les auteurs ont suivi le niveau d'hydratation de la couche cornée par son contenu en eau en fonction de la profondeur;
- Le vieillissement cutané induit des modifications moléculaires et structurales des principaux composants de la peau. Ceci a été plus particulièrement étudié en spectroscopie Raman confocale via les interactions moléculaires existants entre l'eau et le collagène en fonction de l'âge (Nguyen, Happillon, et al. 2013);
- La microspectroscopie Raman a aussi démontré son potentiel dans la détection des cancers de la peau avec la possibilité de diagnostiquer différents types de lésions (bénignes et tumorales) (Lieber, et al. 2008).

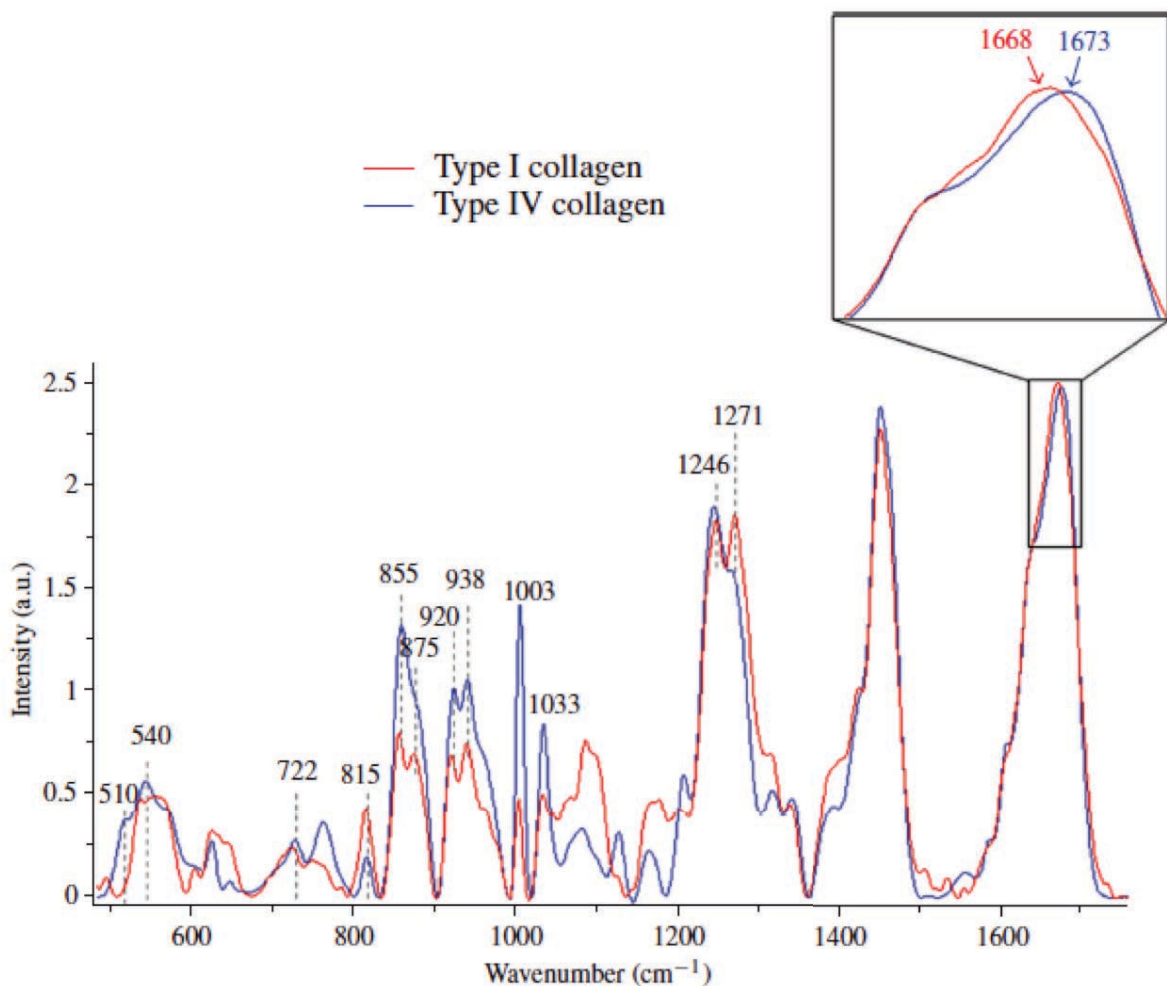


Figure 1-11 : Spectres Raman obtenus sur du collagène de types I et IV (Nguyen, Gobinet, et al. 2012)

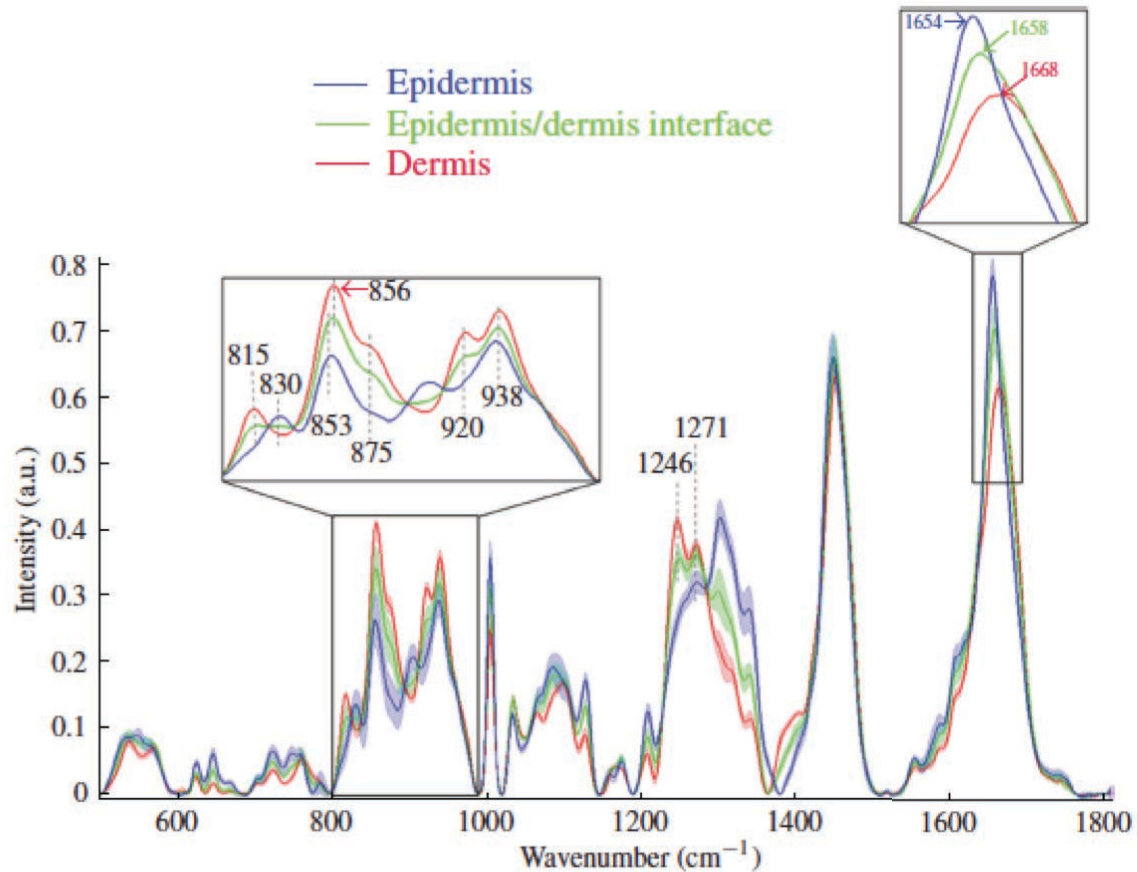


Figure 1-12 : Spectres moyens et leurs écarts-types obtenus sur sections de peau au niveau de l'épiderme, de la jonction dermo-épidermique et du derme (Nguyen, Gobinet, et al. 2012)

Transposition in vivo du microscope Raman confocal

Ces dernières années, les développements instrumentaux en microspectroscopie Raman ont été orientés vers la miniaturisation et le design de sondes utilisables *in vivo*. Nous présentons quelques-uns de ces systèmes de la Figure 1-13 à la Figure 1-15.

Les systèmes présentés en Figure 1-13 et Figure 1-14 contiennent un actionneur piézo-électrique faisant varier la distance entre l'objectif et la surface de la peau. Cela permet d'acquérir un profil d'intensité Raman en fonction de la profondeur de pénétration du volume confocal dans la peau. Afin de contrôler cette distance et de disposer d'un repère spatial par rapport à la surface de la peau, le système de (Chrit, et al. 2005) est équipé d'une caméra de visualisation.

Le système Raman *in vivo* présenté en Figure 1-15 est particulier car sa configuration optique génère un volume confocal étalé sur une centaine de microns. Il présente donc *a priori* une faible résolution axiale. C'est grâce à une analyse par régression PLS (*Partial Least Squares*) en post-traitement que les auteurs de ce travail améliorent la résolution axiale des acquisitions en l'estimant *a posteriori* à une dizaine de microns (Yamamoto, et al. 2008). Ces travaux illustrent l'importance du traitement des données, en complément des développements instrumentaux, pour l'optimisation de la technique Raman (paragraphe 1.5 et Chapitre 6).

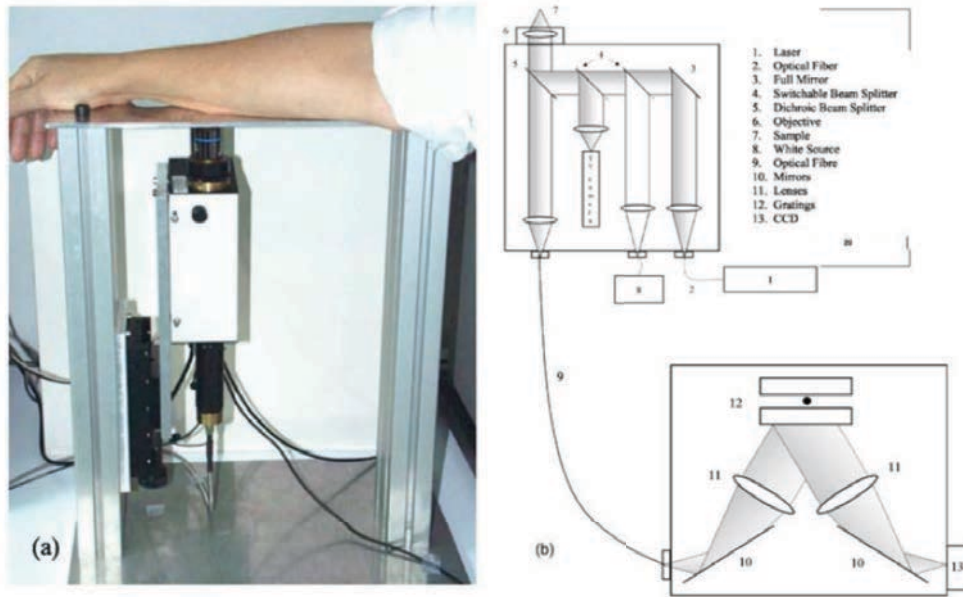


Figure 1-13 : (a) Photos d'un microspectromètre Raman in vivo (b) Représentation schématique du trajet optique de ce système (Chrit, et al. 2005)

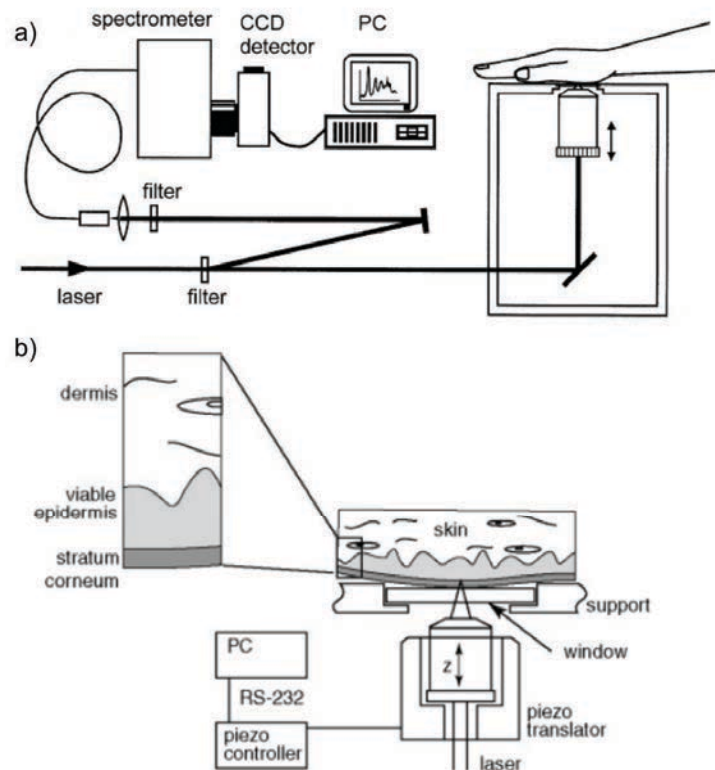


Figure 1-14 : (a) Représentation schématique d'un microspectromètre Raman in vivo (Caspers, Lucassen et Carter, et al. 2001) (b) Vue détaillée zoomée sur le couplage entre l'instrument et la peau (Caspers, Lucassen et Bruining, et al. 2000)

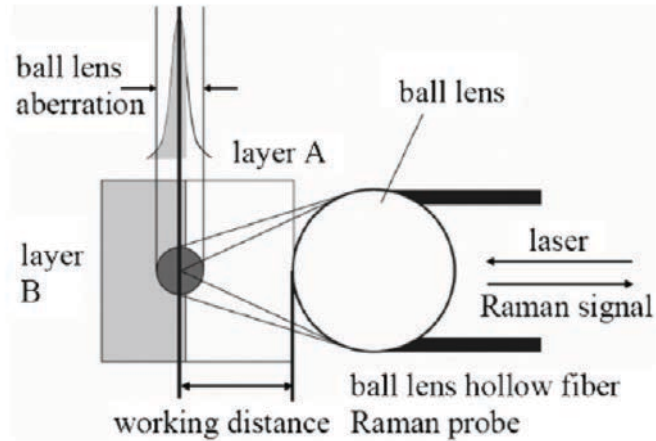


Figure 1-15 : Représentation schématique du volume d'excitation d'un système Raman couplant une lentille sphérique à l'extrémité d'une fibre vide de cœur (Yamamoto, et al. 2008)

Imagerie Raman

Une fois la fonction de localisation latérale mise en œuvre, l'étape suivante est de constituer des images combinant l'information spatiale 2D et l'information spectrale. La manière la plus directe de le réaliser est d'utiliser la microspectroscopie Raman pour laquelle l'illumination est ponctuelle et de balayer la surface de l'échantillon sur la zone d'intérêt dans les deux directions (Figure 1-16 (a)). C'est dans cette configuration que la localisation est la meilleure.

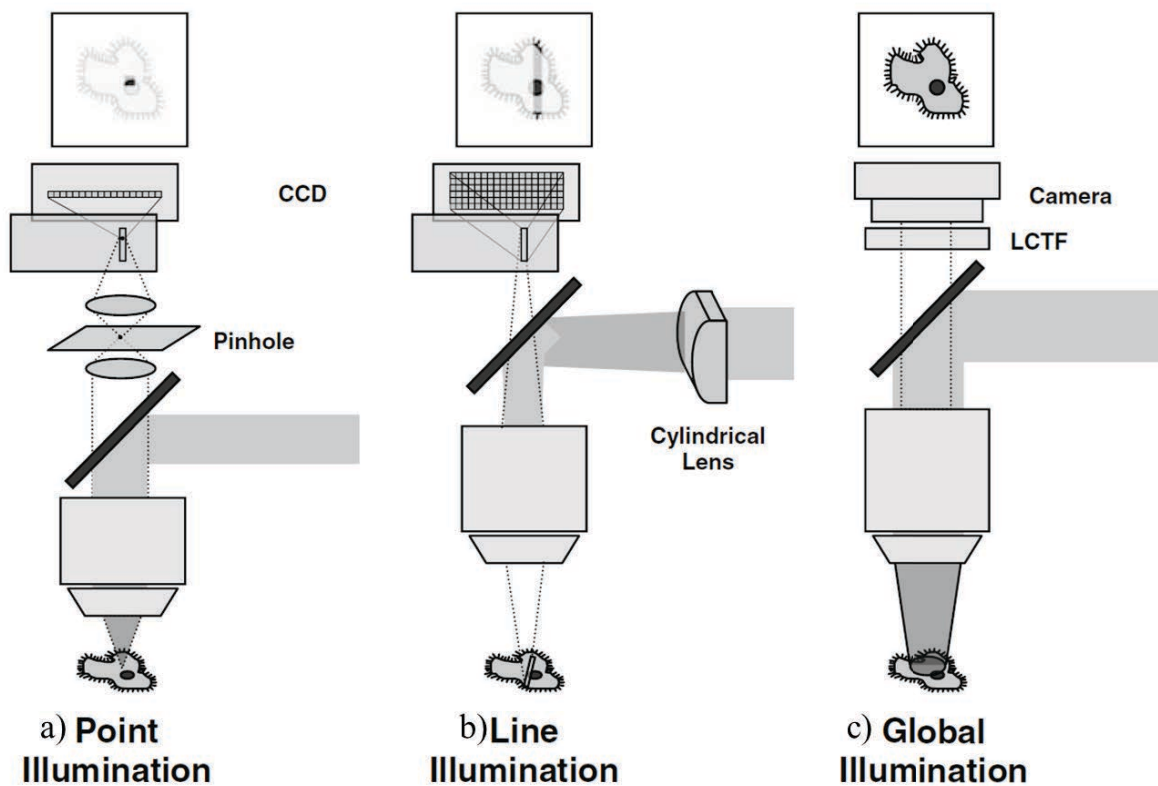


Figure 1-16 : Différentes configurations permettant d'acquérir une image Raman (a) par scan 2D d'une illumination ponctuelle (b) par scan 1D d'une illumination linéaire et (c) par illumination grand-champ (LaPlant 2010)

Cette étape peut prendre des heures et une façon de réduire le temps d'acquisition est de créer une illumination linéaire et de réaliser le balayage dans la direction perpendiculaire (Figure 1-16 (b)). Pour obtenir alors l'information spatiale et spectrale, le spectromètre doit être équipé d'un capteur CCD 2D. La détection spatiale est réalisée parallèlement à la fente du spectromètre et la dispersion spectrale est réalisée perpendiculairement à cette fente. Dans cette configuration, la résolution axiale est dégradée car le filtrage confocal est moins efficace.

Une autre possibilité est d'éclairer l'échantillon en grand-champ (Figure 1-16 (c)). Cette fois, aucun balayage spatial n'est requis. C'est un élément optique tel qu'un filtre à cristaux liquides qui va permettre de sélectionner successivement les différentes longueurs d'onde du spectre Raman afin d'acquérir une image par longueur d'onde. Dans cette configuration, il n'existe plus de filtrage confocal et le gain de temps est relatif à l'étendue spectrale de l'acquisition. Le balayage spectral peut par exemple être limité aux raies Raman d'intérêt.

1.2.4 Limitations intrinsèques

La spectroscopie Raman fournit une information locale voire microscopique lorsque l'instrument employé est confocal. Dans ce cas, la profondeur maximale qu'il est possible de sonder est très faible: aux alentours de la centaine de microns. Avec la spectroscopie Raman, il est donc difficile d'obtenir *in vivo* une information provenant du derme.

D'autre part, le rapport signal sur bruit des spectres Raman obtenus sur tissus biologiques est souvent faible. Les spectres acquis comprennent, en plus du spectre Raman propre au tissu, le signal d'autofluorescence des tissus et le spectre Raman des éléments placés sur le trajet optique de la lumière (comme le signal Raman des fibres par exemple). Beaucoup de progrès ont été accomplis pour la correction de ces signaux parasites (Zhao, et al. 2008, Huang, et al. 2001, Lieber, Wu et Yang 2013), mais le signal de fluorescence de fond est toujours supprimé sans réelle quantification.

1.2.5 Résumé

Nous avons résumé les principes fondamentaux de la spectroscopie Raman comme outil d'identification biochimique. En fonction des applications visées par cette méthode non-invasive (diagnostic, caractérisation et suivi d'actif), la résolution axiale et latérale des systèmes peut être ajustée.

1.3 Caractérisation des propriétés optiques de la peau par DRS

Dans cette partie, nous présentons les grandeurs physiques permettant de décrire la propagation de la lumière dans les tissus biologiques, puis leurs ordres de grandeur dans les tissus cutanés. La spectroscopie de réflectance diffuse (DRS pour *Diffuse Reflectance Spectroscopy*), méthode permettant la quantification de ces grandeurs physiques dans la peau, est enfin introduite.

1.3.1 Théorie de l'optique diffuse

Sur le spectre visible et proche infra-rouge, les tissus biologiques sont des objets dits "turbides". Nous allons donc introduire ici les grandeurs communément utilisées pour décrire l'optique en milieux turbides, à savoir : l'indice de réfraction, les coefficients d'absorption et de diffusion et le coefficient d'anisotropie qui est lié à ce dernier.

Indice de réfraction

L'indice de réfraction n d'un milieu est défini comme le rapport entre c_0 la vitesse de la lumière dans le vide et sa vitesse V dans le milieu en question. Cette dernière dépend de la longueur d'onde :

$$n(\lambda) = \frac{c_0}{V(\lambda)} \quad (1-2)$$

Cette grandeur est sans unité et toujours supérieure ou égale à 1.

Ce coefficient exprime la déviation d'une onde lorsque celle-ci franchit l'interface entre deux milieux différents et change alors de vitesse. Concrètement, hormis le cas d'une incidence normale, un faisceau lumineux incident à la paroi entre deux milieux d'indices différents change de direction à la traversée de celle-ci, et est dit "réfracté".

Dans son état actuel, la DRS ne permet pas de quantifier cette grandeur mais elle est prise en compte dans les modèles. Elle est aussi introduite car ce sont les variations d'indice entre les microstructures des tissus biologiques qui créent les changements de direction de la lumière et plus généralement le phénomène de diffusion.

Absorption

À l'échelle macroscopique, l'absorption est décrite par la loi de Beer-Lambert. Pour un faisceau collimaté incident à un milieu non diffusant tel que représenté en Figure 1-17, elle s'exprime comme :

$$I(\lambda) = I_0(\lambda)e^{-\mu_a(\lambda)x} \quad (1-3)$$

où $\mu_a(\lambda)$ est le coefficient d'absorption. Il dépend de la longueur d'onde et est exprimé en m^{-1} en unité SI mais plus couramment en cm^{-1} .

On peut ensuite définir le libre parcours moyen d'un photon avant absorption comme l'inverse du coefficient μ_a .

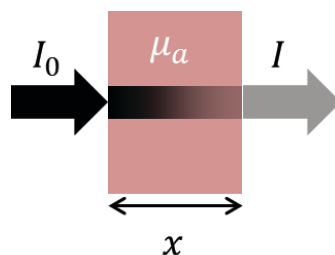


Figure 1-17 : Absorption de la lumière dans un milieu non diffusant

L'absorption se traduit par une transformation de l'énergie lumineuse, en général en énergie thermique, contrairement à la diffusion.

Diffusion

Le phénomène de diffusion élastique a pour origine des changements d'indice de réfraction dans le milieu à l'échelle microscopique. Les caractéristiques de cette diffusion varient avec la taille et/ou la forme des microstructures en question. Cela se traduit par différents types de régime permettant de décrire analytiquement le phénomène lorsque la microstructure est assimilée à un ensemble de particules sphériques :

- le régime de Rayleigh lorsque la dimension des particules est très petite devant la longueur d'onde;
- le régime de Mie (dont le régime de Rayleigh est un cas particulier) lorsque la dimension des particules est de l'ordre de grandeur de la longueur d'onde;
- le régime de diffraction ainsi que l'optique géométrique lorsque la dimension des particules est grande devant la longueur d'onde.

Comme pour le phénomène d'absorption, un coefficient de diffusion $\mu_s(\lambda)$ macroscopique peut être défini. Il relie l'intensité lumineuse I mesurée à la sortie d'un milieu non absorbant lorsque celui-ci est éclairé par un faisceau collimaté d'intensité I_0 via la formule suivante, analogue par son expression à celle de l'absorption :

$$I(\lambda) = I_0(\lambda)e^{-\mu_s(\lambda)x} \quad (1-4)$$

Le libre parcours moyen de diffusion l_s correspond à la distance moyenne parcourue par un photon entre deux événements de diffusion successifs :

$$l_s = \frac{1}{\mu_s} \quad (1-5)$$

Ce coefficient ne suffit pas à caractériser la manière dont la lumière se propage après un événement de diffusion : il donne un ordre de grandeur de la distribution spatiale des centres diffuseurs, mais ne décrit pas la façon dont la lumière est déviée. Dans le cadre d'une diffusion isotrope, μ_s suffit à décrire le phénomène. En revanche, dans la plupart des tissus biologiques, la direction de diffusion privilégiée est vers l'avant. C'est la raison pour laquelle est introduite la fonction de phase $f(\vec{s}, \vec{s}')$ donnant la probabilité qu'un photon de direction d'incidence \vec{s} soit diffusé dans la direction \vec{s}' . Elle est considérée comme dépendante du seul paramètre θ , l'angle de déflexion (voir Figure 1-18).

Le coefficient d'anisotropie, donnant une indication de la direction de diffusion privilégiée, est alors défini comme le cosinus moyen de l'angle θ :

$$g = \int_{-1}^1 f(\cos \theta) \cos \theta d(\cos \theta) \quad (1-6)$$

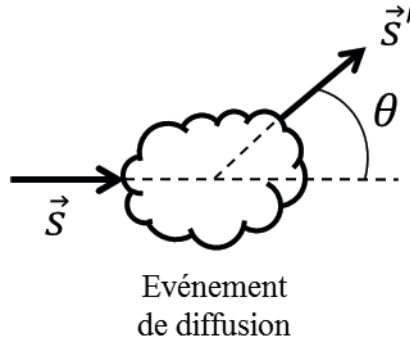


Figure 1-18 : Représentation de l'angle de déflexion θ suite à un événement de diffusion

Les valeurs limites sont :

- $g = -1$ pour une diffusion anisotrope, vers l'arrière de l'onde incidente;
- $g = 0$ pour une diffusion parfaitement isotrope;
- $g = 1$ pour une diffusion anisotrope, vers l'avant de l'onde incidente.

L'**approximation de la diffusion** permet d'établir que la propagation de la lumière dans un milieu homogène, semi-infini, d'anisotropie $g_1 \neq 0$ et de coefficient de diffusion μ_{s1} est équivalente à celle du milieu isotrope équivalent ($g_0 = 0$) de coefficient de diffusion $\mu_{s0} = (1 - g_1)\mu_{s1}$ (Ishimaru 1978, Groenhuis, Ferwerda et Ten Bosch 1983). Un équivalent du coefficient de diffusion isotrope a donc été défini dans lequel l'information directionnelle est prise en compte. Sous les conditions de cette approximation, un coefficient de diffusion réduit μ'_s est alors défini comme :

$$\mu'_s = (1 - g)\mu_s \quad (1-7)$$

L'approximation de la diffusion est valide sous deux conditions:

- la lumière a parcouru une distance $d \gg \frac{1}{\mu'_s}$
- et $\mu_a \ll \mu'_s$.

Dans le cadre de l'approximation de la diffusion, la propagation des photons dépend donc des paramètres optiques μ_a et μ'_s . En dehors de cette hypothèse, et notamment pour des distances source-détecteur $d_{s-D} \ll 1/\mu'_s$, le parcours de la lumière dépend des trois paramètres μ_a , μ_s et g . Deux domaines spatiaux peuvent donc être définis pour décrire la propagation de la lumière dans un milieu homogène et semi-infini. Ils sont discriminés par la distance caractéristique $\frac{1}{\mu'_s}$ (Figure 1-19).

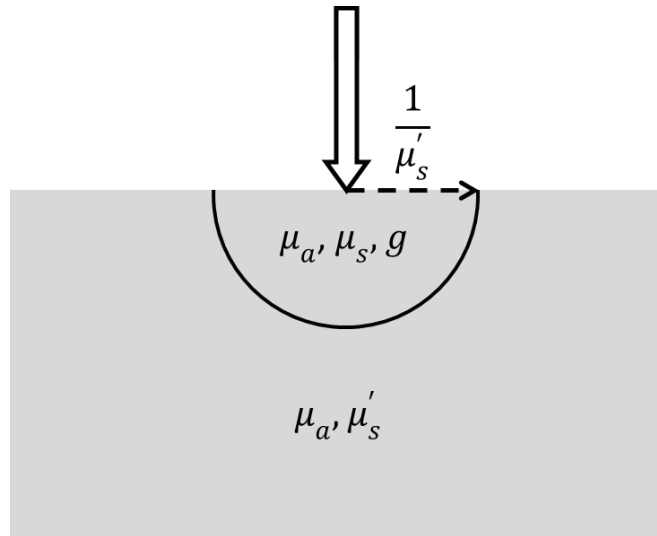


Figure 1-19 : Vue schématique des deux domaines spatiaux descriptifs de la propagation de la lumière dans un milieu homogène et semi-infini

Coefficient d'extinction

Le coefficient d'extinction, utilisé dans certains cas, est défini par :

$$\mu_t = \mu_a + \mu_s \quad (1-8)$$

Il exprime l'atténuation totale de la lumière due à l'absorption et à la diffusion. Il relie l'intensité lumineuse balistique I_{bal} mesurée à la sortie d'un milieu absorbant et diffusant lorsque celui-ci est éclairé par un faisceau collimaté d'intensité I_0 via la formule suivante, analogue par son expression à celle de l'absorption :

$$I_{bal}(\lambda) = I_0(\lambda)e^{-\mu_t(\lambda)x} \quad (1-9)$$

Dans le paragraphe qui suit, nous expliciterons ces propriétés optiques en donnant leur ordre de grandeur pour les tissus cutanés. Ces valeurs nous seront utiles au Chapitre 2 pour dimensionner les propriétés optiques des fantômes que nous développerons.

1.3.2 Propriétés optiques de la peau

Connaissant la structure et la composition de la peau dans chacune de ses couches, certaines équipes calculent ses propriétés optiques comme une combinaison linéaire des propriétés optiques de chacun de ses constituants. Nous répertorierons ces résultats sous la dénomination "Modèles".

D'autres travaux rapportent des propriétés optiques mesurées. Ces résultats seront référencés en tant que "Mesures". Il est à noter que, dans ce cas, les résultats sont très variables d'une équipe à l'autre, notamment entre des mesures réalisées *in vitro* ou *ex vivo* et des mesures réalisées *in vivo*. Nous ne donnerons la plupart du temps que des résultats obtenus *in vivo* et ne précisons pas la méthode de mesure utilisée. Nous souhaitons mettre l'accent sur l'ordre

de grandeur, ainsi que sur la dépendance à la longueur d'onde. Lorsque cela est jugé pertinent, les valeurs obtenues *in vitro* ou *ex vivo* seront indiquées.

Lorsque cela est possible, pour chacune des propriétés optiques étudiées, nous tenterons de faire le lien entre information macroscopique et information locale.

Volontairement, nous ne mentionnerons pas les propriétés de l'hypoderme car ni l'instrumentation de DRS ni l'instrumentation Raman utilisées au cours de ce travail n'atteignent cette profondeur.

Indice de réfraction

Modèles

Parmi les travaux rapportant l'indice de réfraction de la peau, la dépendance à la longueur d'onde de celui-ci est rarement indiquée et est souvent négligée (S. L. Jacques 2008, Zonios et Dimou 2009, Lisenko et Kugeiko 2013).

Ainsi, S.L. Jacques utilise un indice de réfraction sur peau totale valant $n = 1,4$ pour en déduire les autres propriétés optiques de la peau (S. L. Jacques 2008). Il indique cependant que l'eau a une influence sur sa valeur (Zonios et Dimou 2009):

$$n_{peau} = n_{sec} - (n_{sec} - n_{eau})W \quad (1-10)$$

où $n_{sec} = 1,514$ est l'indice de réfraction de la matière sèche, $n_{eau} = 1,33$ l'indice de réfraction de l'eau et W le contenu en eau de la peau.

De façon similaire, en précisant le rapport de la masse d'eau à la masse protéique à 70/30, dans (Bashkatov, Genina et Tuchin 2011), les auteurs proposent le modèle suivant :

$$n_{peau} = 0,7 \times n_{eau} + 0,3 \times n_{protéine} \quad (1-11)$$

avec λ en nm et où l'indice de réfraction de l'eau est le résultat d'une interpolation polynomiale de points expérimentaux :

$$n_{eau} = 1,58 - 8,45 \times 10^{-4} \lambda + 1,1 \times 10^{-6} \lambda^2 - 7,19 \times 10^{-10} \lambda^3 + 2,32 \times 10^{-13} \lambda^4 - 2,98 \times 10^{-17} \lambda^5 \quad (1-12)$$

L'indice de réfraction est supposé indépendant de la longueur d'onde :

$$n_{protéine} = 1,5 \quad (1-13)$$

Ce modèle permet d'exprimer la dépendance à la longueur d'onde λ . Il peut même être affiné en tenant compte des constituants que sont le collagène et le liquide interstitiel (Bashkatov, Genina et Tuchin 2011):

$$n_{peau} = 1,309 - 4,346 \times 10^2 \lambda^{-2} + 1,6065 \times 10^9 \lambda^{-4} - 1,2811 \times 10^{14} \lambda^{-6} \quad (1-14)$$

Ces deux modèles sont représentés Figure 1-20 sur leur gamme spectrale de validité. Les deux courbes ont une dépendance à la longueur d'onde identique bien que les paramètres de ces interpolations polynomiales soient très différents. La différence entre ces deux courbes se réduit à une différence d'*offset*. Comme nous le verrons dans le paragraphe qui suit, cet *offset* est difficile à mesurer de façon absolue sur la peau et doit varier en fonction des individus.

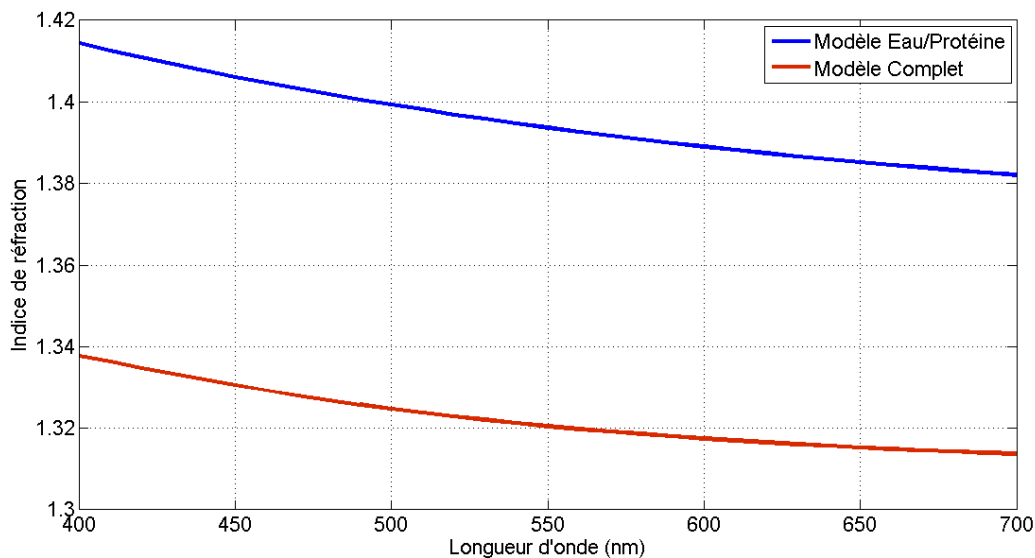


Figure 1-20 : Modèles de l'indice de réfraction de la peau en fonction de la longueur d'onde (Bashkatov, Genina et Tuchin 2011)

Finalement, le modèle eau/protéine de l'équation (1-11) fournit un indice de réfraction proche de $n = 1,4$, valeur utilisée dans (S. L. Jacques 2008) pour la peau totale.

Mesures

La littérature rapporte aussi un indice de réfraction discriminé couche par couche, que nous synthétisons dans le Tableau 1-1. Nous retiendrons de ce tableau la variabilité des mesures. Par exemple, dans (Tearney 1995), la valeur de 1,41 pour le derme est une valeur moyenne. Les résultats expérimentaux de cet article varient entre 1,38 et 1,44.

La tendance montre cependant un indice de réfraction de l'épiderme légèrement supérieur à celui du derme, certainement du fait de la présence de la couche cornée.

Il est à noter que les variations locales d'indice au sein même du tissu sont faibles. Nous rapportons ici quelques valeurs de la gamme proche infra-rouge (Bashkatov, Genina et Tuchin 2011) estimées sur des cellules:

- $n = 1,35 - 1,36$ pour le liquide extracellulaire;
- $n = 1,360 - 1,375$ pour le cytoplasme;
- $n = 1,46$ pour la membrane cellulaire;

- $n = 1,38 - 1,41$ pour le noyau et les mitochondries;
- $n = 1,6 - 1,7$ pour la mélanine.

Longueur d'onde	Couche cornée	Epiderme	Derme
1300 nm (Tearney 1995)	1,51	1,34	1,41 <i>in vitro</i>
1300 nm (Ding, et al. 2006)	-	1,42 <i>in vitro</i>	1,36 <i>in vitro</i>
1300 nm (Bashkatov, Genina et Tuchin 2011)	-	1,39	-
400-700 nm (Tuchin 1997)	-	1,5	1,4

Tableau 1-1 : Indices de réfraction de différentes couches de la peau

Absorption

Les principaux chromophores du derme sur la gamme spectrale 400-900 nm sont le sang (composé de l'oxy- et deoxy-hémoglobine et de la bilirubine), et l'eau dont nous donnons les spectres d'absorption dans la Figure 1-21 en unité d'extinction molaire ($L. mol^{-1}. cm^{-1}$) ou d'absorption cm^{-1} . Le coefficient d'extinction molaire ε est relié au coefficient d'absorption μ_a via la concentration molaire C en composé concerné par la formule suivante :

$$\varepsilon = \frac{-\log(I/I_0)}{C \times x} = \frac{\mu_a}{\ln(10) \times C} \quad (1-15)$$

x est l'épaisseur d'échantillon traversée (Figure 1-17).

Les spectres des oxy- et deoxy-hémoglobine et de l'eau proviennent de (S. L. Jacques 2006), données compilées respectivement d'après (Takatani et Graham 1987) et (Hale et Query 1973). Le spectre d'absorption de la bilirubine provient de (Prahl 2012) d'après (Dixon, M. et Lindsey 2005, Du, et al. 1198).

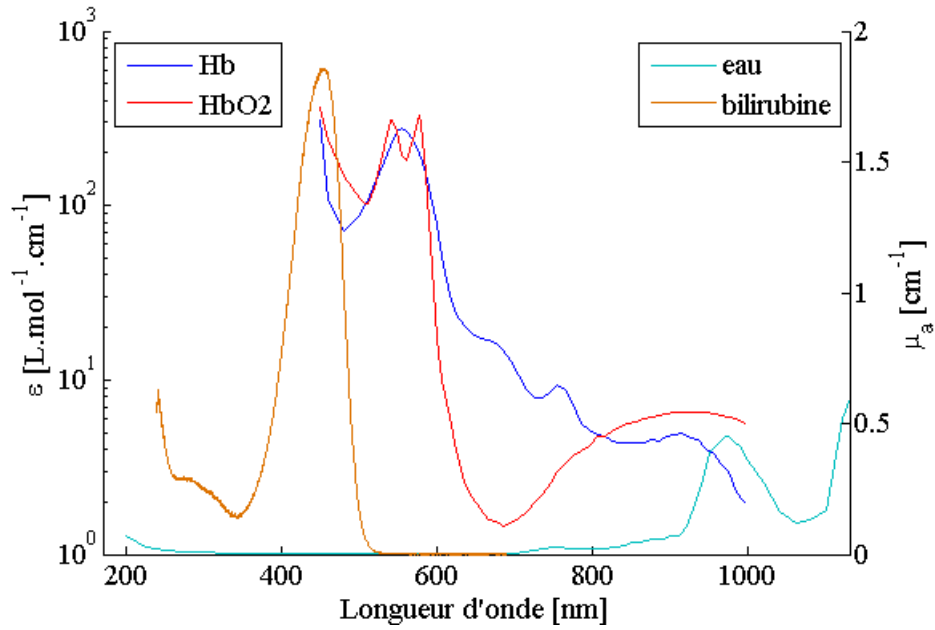


Figure 1-21 : Spectres d'absorption des chromophores du derme

Les principaux chromophores de l'épiderme sur la gamme spectrale 400-900 nm sont la mélanine et l'eau. Leurs spectres d'absorption sont indiqués en Figure 1-22. Le spectre d'absorption de la mélanine en cm^{-1} est décrit par l'expression analytique (1-16) provenant de (S. L. Jacques 1998).

$$\mu_{a,mélanine} = 6,6 \times 10^{11} \lambda^{-3.33} \quad (1-16)$$

avec λ en nm .

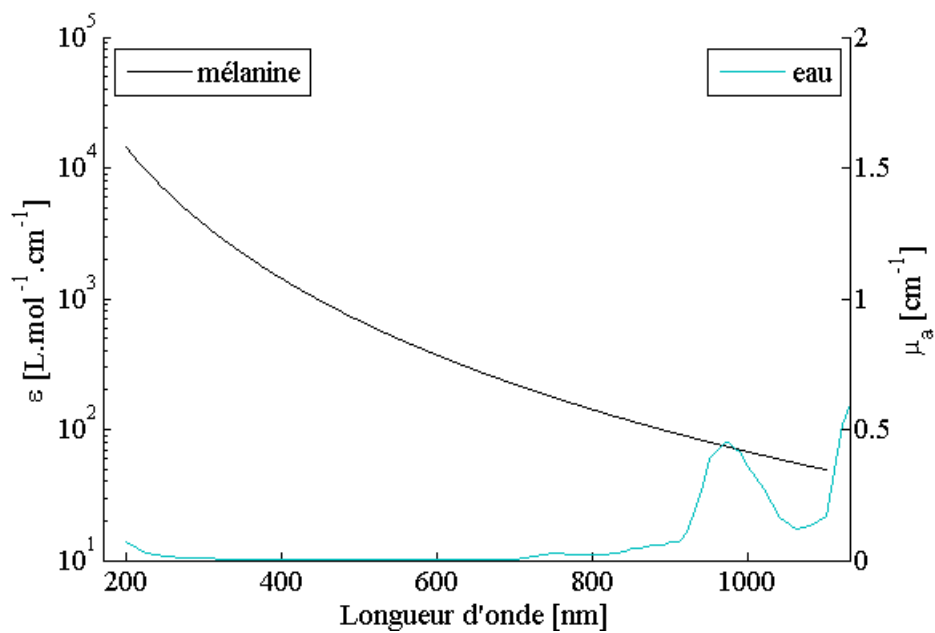


Figure 1-22 : Spectres d'absorption des chromophores de l'épiderme

Modèles

La prise en compte de ces différents constituants peut varier d'une équipe à l'autre en fonction de l'application visée ou de l'intervalle spectral étudié. *A minima*, les modèles utilisés tiennent compte du sang (Kim, et al. 2010) et on y ajoute alternativement la contribution de l'eau (S. L. Jacques 2008) ou de la mélanine (Zonios et Dimou 2006). L'expression la plus complète est donc proposée en équation (1-17).

$$\mu_{a,peau} = \alpha_{sang} \times \mu_{a,sang} + \alpha_{eau} \times \mu_{a,eau} + \alpha_{mel} \times \mu_{a,mel} \quad (1-17)$$

avec les fractions volumiques du sang α_{sang} , de l'eau α_{eau} et de la mélanine α_{mel} , et les coefficients d'absorption de l'eau $\mu_{a,eau}$ et de la mélanine $\mu_{a,mel}$. $\mu_{a,sang}$ est le coefficient d'absorption du sang total tenant compte de la saturation en oxygène S :

$$\mu_{a,sang} = S \times \mu_{a,oxyHb} + (1 - S) \times \mu_{a,deoxyHb} \quad (1-18)$$

D'autres travaux permettent de discriminer les contributions du derme et de l'épiderme. Dans ces cas, on voit apparaître un coefficient d'absorption de "fond" correspondant à de la peau déshydratée sans sang et sans mélanine : $\mu_{a,fond} = 0,25 \text{ cm}^{-1}$ (Randeberg 2005) ou $\mu_{a,fond}(\lambda) = 0,244 + 85,3e^{-(\lambda-154)/66,2} \text{ cm}^{-1}$ (Lisenko et Kugeiko 2013, S. L. Jacques 1998). On obtient alors des expressions du type :

$$\mu_{a,epiderme} = \alpha_{eau} \times \mu_{a,eau} + \alpha_{mel} \times \mu_{a,mel} + (1 - \alpha_{mel}) \times \mu_{a,fond} \quad (1-19)$$

$$\mu_{a,derme} = \alpha_{eau} \times \mu_{a,eau} + \alpha_{sang} \times \mu_{a,sang} + (1 - \alpha_{sang}) \times \mu_{a,fond} \quad (1-20)$$

Mesures

Dans les tableaux Tableau 1-2 et Tableau 1-3, nous affichons quelques valeurs du coefficient d'absorption de la peau obtenues expérimentalement. Là encore, les résultats sont dispersés, indiquant une grande variabilité des propriétés optiques de la peau en fonction de la zone sondée ou des individus.

Référence	Peau totale	Epiderme	Derme
(A. Bashkatov, et al. 2005) $\lambda = 500 \text{ nm}$	1,19	-	-
(Salomatina, et al. 2006) $\lambda = 500 \text{ nm}$	-	7	3,5
(Andree, Helfmann et Gersonde 2011) $\lambda = 500 \text{ nm}$	entre 2 et 4	-	-

Tableau 1-2 : Coefficients d'absorption de la peau en cm^{-1} obtenus expérimentalement autour de 500 nm.

Référence	Peau totale	Epiderme	Derme
(A. Bashkatov, et al. 2005) $\lambda = 600 \text{ nm}$	0,69	-	-
(Salomatina, et al. 2006) $\lambda = 600 \text{ nm}$	-	3	2
(Doornbos, et al. 1999) $\lambda = 633 \text{ nm}$	0,17	-	-
(Andree, Helfmann et Gersonde 2011) $\lambda = 600 \text{ nm}$	entre 0,5 et 1,5	-	-

Tableau 1-3 : Coefficients d'absorption de la peau en cm^{-1} obtenus expérimentalement autour de 600 nm.

Diffusion

Les principaux centres diffuseurs de la peau sont les fibres de collagène et d'élastine, de dimensions comprises entre 60 et 100 nm de diamètre, et formant des bundles de fibres de dimensions comprises entre 1 et 8 μm (A. Bashkatov, et al. 2005). Ces deux échelles structurelles caractéristiques de la peau génèrent deux régimes de diffusion différents sur le spectre visible: le régime de Mie et le régime de Rayleigh (S. L. Jacques 1998).

Modèles

Le coefficient de diffusion réduit est classiquement décomposé (Lisenko et Kugeiko 2013, S. Jacques 2013, Randeberg 2005, Bashkatov, Genina et Kochubey, et al. 2005) de la manière suivante:

$$\mu'_{s,peau}(\lambda) = \mu'_{s,peau}(\lambda_0) \left[f_{Ray} \times \left(\frac{\lambda}{\lambda_0}\right)^{-4} + (1 - f_{Ray}) \times \left(\frac{\lambda}{\lambda_0}\right)^{-p_{Mie}} \right] \quad (1-21)$$

où f_{Ray} est la part de diffusion suivant le régime de Rayleigh, $1 - f_{Ray}$ est la part de diffusion suivant le régime de Mie et λ_0 une longueur d'onde arbitraire servant à la mise à l'échelle du spectre de diffusion par rapport aux données expérimentales. p_{Mie} est un paramètre directement lié à la taille moyenne des centres diffuseurs (Zonios et Dimou 2009).

Les coefficients d'anisotropie du derme et de l'épiderme sont souvent considérés comme identiques (Van Gemert, et al. 1989). On trouve, dans la littérature, les deux lois suivantes en fonction de la longueur d'onde en nm (affichées Figure 1-23) :

- d'après van Gemert et al. (Randeberg 2005, Van Gemert, et al. 1989)

$$g_{peau}(\lambda) \approx g_{derme}(\lambda) \approx g_{epiderme}(\lambda) \approx 0,62 + 29 \times 10^{-5} \lambda \quad (1-22)$$

- d'après Jacques (Lisenko et Kugeiko 2013, S. Jacques 1996)

$$g_{peau}(\lambda) = 0,7645 + 0,2355 \times (1 - e^{(500-\lambda)/729.1}) \quad (1-23)$$

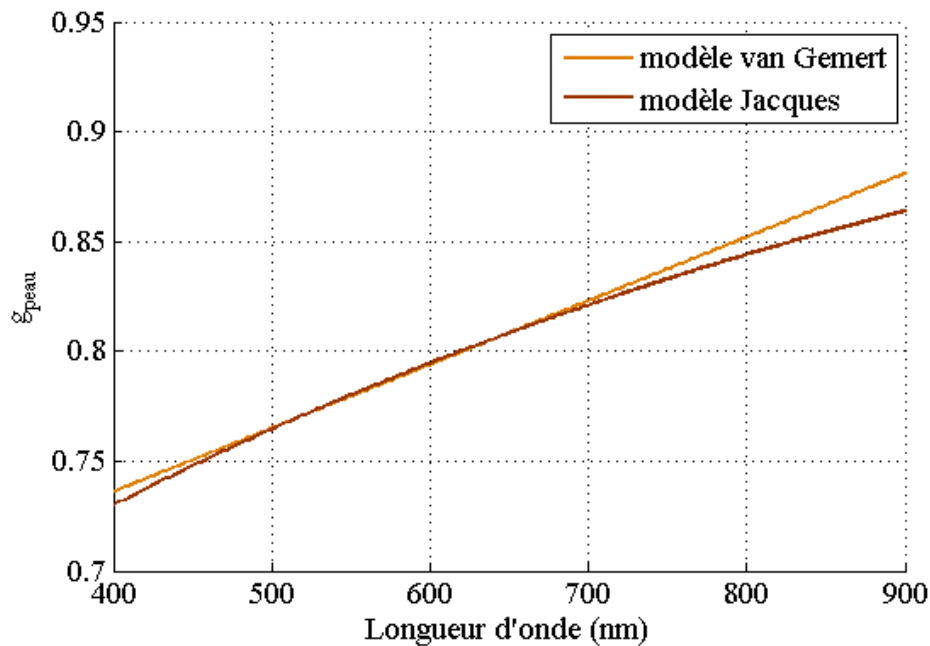


Figure 1-23 : Modèles décrivant l'anisotropie de diffusion de la peau (Van Gemert, et al. 1989, S. Jacques 1996)

Le coefficient de diffusion de la peau $\mu_{s,peau}(\lambda)$ est déduit des expressions (1-21) et (1-22) ou (1-23) en calculant $\mu'_{s,peau}(\lambda)/(1 - g_{peau}(\lambda))$.

Mesures

Dans (S. Jacques 2013), l'auteur a repris quelques spectres de diffusion de la littérature afin d'associer des valeurs expérimentales aux paramètres $\mu'_{s,peau}(\lambda_0)$, f_{Ray} et p_{Mie} lorsque $\lambda_0 = 500 \text{ nm}$ (équation (1-21)). Quelques résultats de cette étude sont indiqués dans le Tableau 1-4.

Références	$\mu'_{s,peau}(\lambda_0)$ en cm^{-1}	f_{Ray}	p_{Mie}
Peau totale (Bashkatov, Genina et Kochubey, et al. 2005)	36,4	0,48	0,220
Derme (Salomatina, et al. 2006)	43,6	0,41	0,562
Epiderme (Salomatina, et al. 2006)	66,7	0,29	0,689

Tableau 1-4 : Paramètres de diffusion de la peau obtenus expérimentalement d'après une étude comparative de S.L. Jacques (S. Jacques 2013)

Dans cette étude, nous pouvons aussi lire graphiquement quelques valeurs du coefficient d'anisotropie de la peau obtenues expérimentalement. Une synthèse de ces valeurs, faisant clairement apparaître la variabilité des mesures, est affichée dans le Tableau 1-5. Pour les

modèles de DRS, qu'ils soient numériques ou analytiques, une valeur moyenne de 0,8 est communément utilisée sur le spectre visible.

Références	$\lambda = 500 \text{ nm}$	$\lambda = 600 \text{ nm}$	$\lambda = 700 \text{ nm}$
(Samatham 2012)	0,55	-	-
(S. A. Prahl 1988)	0,10	0,40	0,70
(Ma, et al. 2005)	0,77	0,85	0,88

Tableau 1-5 : Coefficients d'anisotropie de la peau obtenus expérimentalement d'après une étude comparative de S.L. Jacques (S. Jacques 2013)

1.3.3 Spectroscopie de Réflectance diffuse

La Spectroscopie de Réflectance Diffuse (DRS pour *Diffuse Reflectance Spectroscopy* en anglais) est une méthode de mesure de la lumière rétrodiffusée par un milieu diffusant lorsque celui-ci est illuminé par une source lumineuse large bande (typiquement entre 300 et 900 nm). L'étude est ici centrée sur la DRS résolue spatialement (*spatially resolved*) mais certaines équipes caractérisent les propriétés optiques des tissus biologiques avec une illumination continue mais sans résolution spatiale (Zhang, et al. 2013, Verkruysse, et al. 2005), ou avec des méthodes résolues en temps (*time resolved*) (S. Jacques 1989, Patterson, Chance et Wilson 1989, Taroni, et al. 2009) et en fréquence (*frequency resolved*) (Tseng, Grant et Durkin 2008).

Théorie et problème direct

Le principe de la DRS résolue spatialement est d'éclairer l'échantillon à analyser de manière ponctuelle, de collecter les photons rétrodiffusés par l'échantillon du même côté de l'illumination (géométrie de réflexion), ceci à un ou plusieurs points distants de l'illumination. Les photons entrant dans le milieu s'y propagent en étant absorbés et diffusés. On peut représenter les trajets les plus probables des photons détectés à une distance donnée de la source sous la forme d'une "banane" comme cela est représenté sur la Figure 1-24.

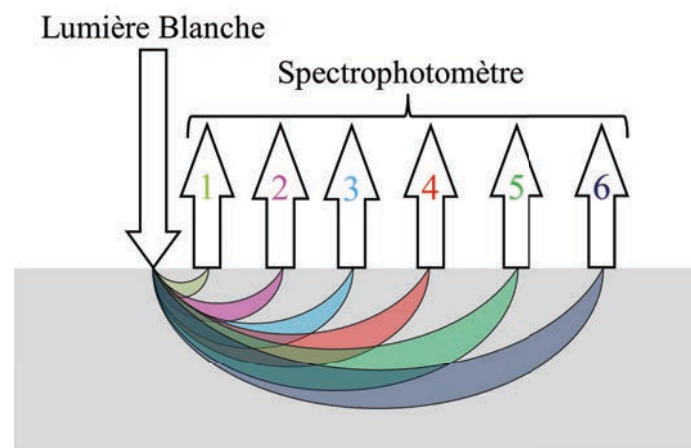


Figure 1-24 : Schéma de principe de la DRS. L'exemple illustré présente une géométrie de collection générant six distances source-détecteur différentes.

La réflectance diffuse est définie comme le rapport entre l'intensité lumineuse détectée par unité de surface (ou flux de photons émis au point de détection) et l'intensité lumineuse totale incidente au milieu. Elle est donc homogène à des m^{-2} .

Modèles analytiques

L'évolution de la réflectance diffuse en fonction de la distance source-détecteur et des coefficients d'absorption et de diffusion réduit d'un milieu homogène et semi-infini a été modélisée dans (Farrell, Patterson et Wilson 1992) et indépendamment dans (Groenhuis, Ferwerda et Ten Bosch 1983). En utilisant l'**approximation de la diffusion** (voir paragraphe 1.3.1 page 39), l'équation du transfert radiatif (Ishimaru 1978) est résolue. La solution de cette équation décrit la réflectance diffuse comme une fonction des coefficients d'absorption μ_a et de diffusion réduit μ'_s du milieu, de la distance entre source et détecteurs d_{S-D} et de l'indice de réfraction du milieu n (voir Equation (1-24)). Kienle a plus récemment revu le modèle proposé par Farrell (Kienle et Patterson 1997). On dispose donc d'expressions analytiques permettant de faire le lien entre les propriétés optiques d'un milieu et la réflectance mesurée.

$$R(\mu_a, \mu'_s, d_{S-D}, n) = \frac{z_0}{4\pi} \times \left[\left(\mu_{eff} + \frac{1}{d_1} \right) \frac{e^{-\mu_{eff}d_1}}{d_1^2} + \left(1 + \frac{4}{3}A \right) \left(\mu_{eff} + \frac{1}{d_2} \right) \frac{e^{-\mu_{eff}d_2}}{d_2^2} \right] \quad (1-24)$$

avec :

$$z_0 = \frac{1}{\mu_a + \mu'_s} \quad (1-25)$$

$$\mu_{eff} = \sqrt{3\mu_a(\mu_a + \mu'_s)} \quad (1-26)$$

$$d_1 = \sqrt{z_0^2 + d_{S-D}^2} \quad (1-27)$$

$$d_2 = \sqrt{z_0^2 \left(1 + \frac{4}{3}A \right)^2 + d_{S-D}^2} \quad (1-28)$$

$$A = \frac{1+r}{1-r} \quad (1-29)$$

$$r = -1,44n_r^{-2} + 0,710n_r^{-1} + 0,0636n_r + 0,668 \quad (1-30)$$

$$n_r = \frac{n}{n_{milieu\ exterieur}} \quad (1-31)$$

L'équation (1-24) donne l'évolution de la réflectance diffuse en fonction de la distance source-détecteur cohérente avec ce qu'on peut déduire intuitivement par un raisonnement basé sur la Figure 1-24. Plus le détecteur est éloigné de la source, plus les photons auront *a priori* voyagé profondément, plus la distance parcourue par ces photons est grande. En premier lieu, ils seront moins nombreux à ressortir à cause de l'absorption du milieu (Equation (1-3)). De plus,

l'équation (1-24) indique que la diffusion joue aussi un rôle dans cette décroissance à travers le coefficient μ_{eff} des exponentielles décroissantes.

Dans le cadre de l'approximation de la diffusion, l'intensité de lumière rétrodiffusée mesurée dépend des deux paramètres optiques μ_a et μ'_s . L'étude de la réflectance de façon analytique empêche la connaissance de g indépendamment de μ_s .

Modèles numériques

En dehors des hypothèses de l'approximation de la diffusion, et notamment pour des distances source-détecteur $d_{S-D} \ll 1/\mu'_s$, l'intensité de lumière rétrodiffusée dépend des trois paramètres μ_a , μ_s et g (voir Figure 1-19). Il n'existe pas de modèle analytique simple permettant de décrire cette propagation dans ce domaine de propagation. Pour décrire l'évolution de la réflectance en fonction de la distance source-détecteur et des propriétés optiques, l'option des simulations numériques est possible et a été employée par plusieurs équipes (Wang, Jacques et Zheng 1995, Bevilacqua et Depeursinge 1999, Zonios et Dimou 2011). L'utilisation de la méthode de Monte-Carlo permet de simuler la trajectoire des photons en faisant intervenir des procédés aléatoires et de calculer la réflectance, toujours à partir des paramètres optiques et d_{S-D} . Son inconvénient principal est le temps de calcul relativement long, mais cette méthode est valable quelles que soient les hypothèses de départ.

Fonctions d'identification, de quantification et de localisation

La principale fonction offerte par la DRS est la quantification des propriétés optiques des tissus.

Consécutivement à cela, il est possible d'identifier des composés chimiques présents dans le tissu analysé via la loi d'additivité des spectres d'absorption permettant ainsi de les quantifier. En effet, le coefficient d'absorption global obtenu est égal à la somme des coefficients d'absorption de chacun des composés absorbants présents pondérés par leurs concentrations respectives.

En revanche, la fonction de localisation n'est pas assurée par la DRS. Cette méthode optique caractérise le milieu diffusant de façon macroscopique en donnant des caractéristiques globales sur le volume sondé sans résolution spatiale. Au contraire; la forte intensité du signal de diffusion élastique (supérieure de plusieurs ordres de grandeur au signal Raman) est exploitée pour avoir accès à la profondeur du tissu (de 2 à 5 mm sous la surface) inatteignable en microspectroscopie Raman. Pourtant, la discrimination des propriétés optiques couche par couche est possible et est d'intérêt croissant (Lisenko et Kugeiko 2013, Tseng, et al. 2011). Nous aborderons cette problématique au Chapitre 7.

Effectuée à de faibles distances source-détecteur (inférieures à 200 μm), la DRS est sensible aux changements de structure cellulaire et subcellulaire (Mourant, et al. 1996, Bigio et Bown 2004). Mise en œuvre à une échelle plus grande, elle donne accès à la profondeur du tissu et reste sensible aux modifications pathologiques de la peau (Murphy, et al. 2005, Kollias, Seo et Bargo 2010) potentiellement non détectables par d'autres méthodes telles que la chromamétrie (Koenig, et al. 2015).

Instrumentation

Sources et détecteurs

La plupart du temps, une source blanche de type halogène est utilisée pour illuminer le milieu afin de quantifier μ_a et μ'_s sur un spectre continu. Cependant, certaines équipes préfèrent employer plusieurs LED dont les longueurs d'onde d'émission sont choisies pour répondre à un besoin spécifique (Dam, et al. 2001).

Dans le premier cas, le détecteur employé est un spectrophotomètre; dans le second, une simple photodiode suffit si l'illumination aux différentes longueurs d'onde est faite de manière séquentielle.

Acquisition d'une mesure résolue spatialement

Pour acquérir des spectres de réflectance diffuse avec une résolution spatiale, il existe deux stratégies. La première est d'effectuer une mesure ponctuelle et de déplacer successivement le détecteur par rapport au point d'illumination du tissu (Figure 1-25) (Groenhuis, Ten Bosch et Ferwerda 1983, Andree, Reble, et al. 2010).

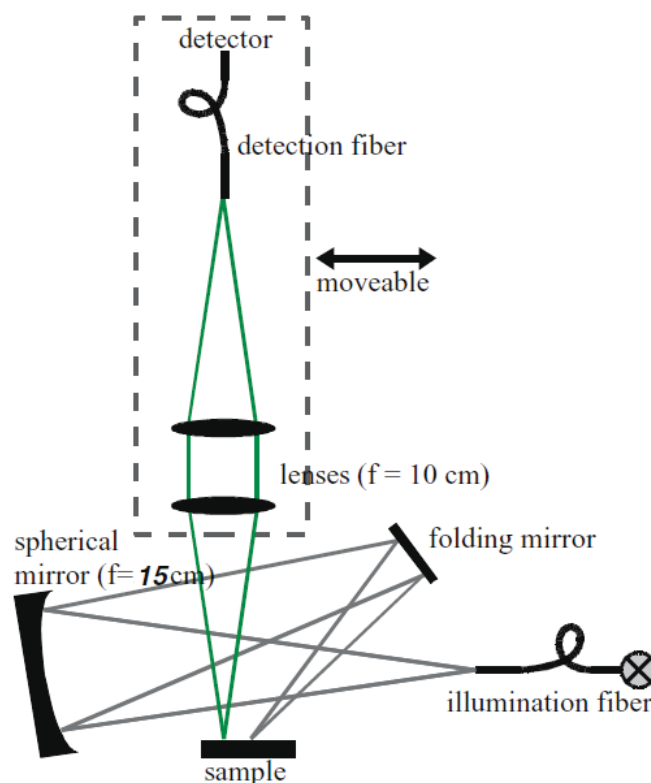


Figure 1-25 : Dispositif expérimental de DRS de type "scan" avec déplacement séquentiel du détecteur par rapport au couple source lumineuse-échantillon (Andree, Reble, et al. 2010)

La deuxième stratégie consiste à générer différentes distances source-détecteur sans déplacement mécanique. Le développement des sondes à fibre optique l'a rendue possible. Ces systèmes optiques offrent un grand éventail de géométrie d'illumination et de collection. Les fibres peuvent être ordonnées de façon linéaire, soit avec un point d'illumination et plusieurs points de détection (Figure 1-26) (Doornbos, et al. 1999, Tseng, et al. 2011), soit

avec plusieurs fibres d'illumination et une unique fibre de détection (Figure 1-27) (Kim, et al. 2010).

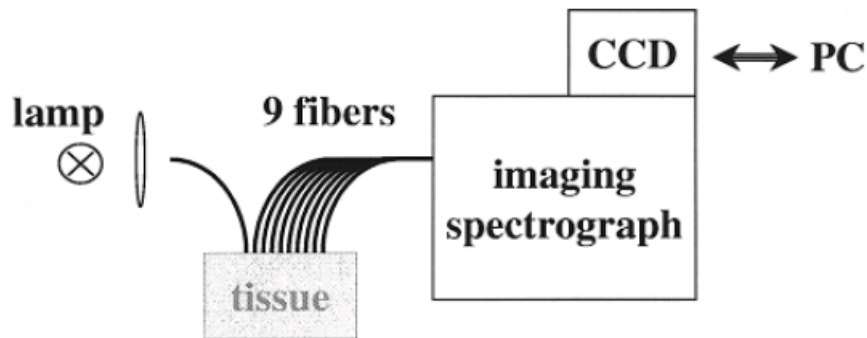


Figure 1-26 : Sonde fibrée en géométrie linéaire (Doornbos, et al. 1999)

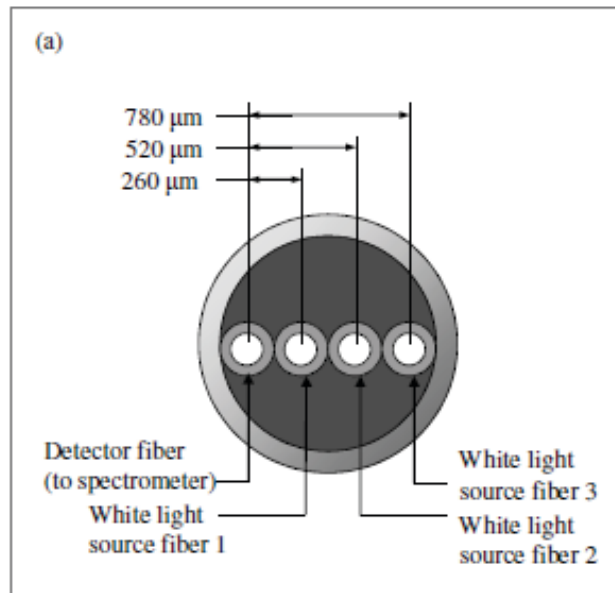


Figure 1-27 : Sonde fibrée en géométrie linéaire inversée (Kim, et al. 2010)

Il existe aussi des sondes avec une géométrie circulaire composées de cercles concentriques de fibres optiques. Comparées aux sondes linéaires, elles augmentent le rapport signal sur bruit quelle que soit la distance de détection et ceci que l'illumination se fasse par la fibre centrale (Dam, et al. 2001) ou par les fibres constituant les cercles (Zonios et Dimou, Modeling diffuse reflectance from semi-infinite turbid media: Application to the study of skin optical properties 2006).

Étalonnage et calcul de la réflectance

La réflectance mesurée est définie comme la fraction de l'intensité lumineuse incidente au milieu détectée à sa surface à une certaine distance de l'illumination. Elle correspond à la définition de la réflectance diffuse du paragraphe 1.3.3 intégrée sur la surface de détection.

Puisque l'intensité incidente n'est généralement pas connue de façon exacte et est rarement mesurée de façon précise, le calcul des propriétés optiques passe nécessairement par une étape d'étalonnage permettant de relier la mesure à la théorie de façon quantitative. Cela permet de tenir compte des fonctions d'appareil (réponse du détecteur, transmission des fibres optiques, etc...).

Par exemple, certaines équipes mesurent une quantité proportionnelle à l'intensité incidente soit en mesurant directement le flux lumineux en sortie de sonde (Groenhuis, Ten Bosch et Ferwerda 1983), soit en l'obtenant via une sphère intégrante (Doornbos, et al. 1999). Une autre méthode consiste à effectuer une mesure de DRS sur un objet aux propriétés optiques connues en plus de la mesure sur l'objet à analyser. Les objets communément utilisés sont soit un standard de réflectance (Andree, Reble, et al. 2010) soit un fantôme (Zonios et Dimou 2006, Kim, et al. 2010, Dam, et al. 2001, Wang, et al. 2008). On désigne par fantôme les objets fabriqués selon un protocole permettant de contrôler leurs propriétés d'absorption et de diffusion à l'aide de lois empiriques fournies par la littérature ou de mesures de caractérisation optique préalables. Le Chapitre 2 de ce rapport est dédié à la fabrication de fantômes solides.

Problème inverse

Dans ce paragraphe sont présentées les deux grandes méthodes utilisées pour calculer les propriétés optiques μ_a et μ'_s à partir d'une mesure de réflectance et après l'étape d'étalonnage (paragraphe ci-dessus).

Méthode par identification du spectre de réflectance à un modèle

Cette méthode consiste à utiliser une expression analytique de la réflectance en fonction de μ_a et μ'_s et d'identifier le spectre mesuré à l'expression analytique en utilisant μ_a et μ'_s comme paramètres d'ajustement. Les valeurs de μ_a et μ'_s pour lesquelles il y a superposition entre le spectre mesuré et le spectre théorique sont prises pour résultat de mesure.

L'expression analytique utilisée peut être, par exemple, une de celles mentionnées au paragraphe "**Théorie et problème direct**" découlant de la résolution de l'équation du transfert radiatif dans le cadre de l'approximation de la diffusion (Doornbos, et al. 1999, Kim, et al. 2010). Dans (Zonios et Dimou 2006), les auteurs ont développé un modèle de réflectance simplifié mais valable uniquement pour la géométrie de leur sonde fibrée. L'originalité des travaux présentés dans (Wang, et al. 2008) est que l'expression analytique utilisée a été déterminée par un réseau de neurone (méthode fonctionnant par apprentissage).

Parmi les travaux cités ci-dessus, les méthodes décrites dans (Zonios et Dimou 2006) et (Kim, et al. 2010) ne se contentent pas d'extraire μ_a et μ'_s . Les auteurs disposent d'expressions semblables à celles présentées aux paragraphes 1.3.2- **Absorption** et 1.3.2- **Diffusion** reliant μ_a et μ'_s à certaines constantes physiologiques d'un tissu biologique (concentration en hémoglobine, saturation de l'hémoglobine en oxygène, dimension des centres diffuseurs, etc...). Ce sont ces constantes qui sont utilisées comme paramètres d'ajustement, les coefficients μ_a et μ'_s sont alors calculés en dernier lieu.

Méthode par comparaison à une base de données

Le deuxième processus de calcul des propriétés optiques consiste à comparer la réflectance mesurée à une base de données. Cette base de données est constituée de la valeur de la réflectance pour différents couples (μ_a, μ'_s) aux distances d_{S-D} concernées par la sonde utilisée. Afin de couvrir tous les cas de figures possibles (satisfaisant ou non l'approximation de la diffusion), la base de donnée peut être hybride (Groenhuis, Ten Bosch et Ferwerda 1983), c'est-à-dire calculée à partir d'un modèle analytique comme l'équation (1-24) de Farrell sur sa zone de validité et calculée par simulations Monte Carlo en dehors du cadre de l'approximation de la diffusion, ou bien être calculée entièrement par des simulations Monte Carlo (Andree, Reble, et al. 2010, Tseng, et al. 2011). L'instrument développé au LISA est employé avec cette dernière méthode pour calculer les propriétés optiques de la peau.

Limitations intrinsèques

Une première limitation connue de la DRS est liée au fait que la mesure soit effectuée en contact direct avec la peau. Cette mesure est donc soumise aux aléas de positionnement et d'orientation de la sonde assurant ou non un bon couplage optique. La pression appliquée sur la peau joue aussi sur la qualité de mesure (Lim, et al. 2011, Ti et Lin 2008, Reif, et al. 2008) : appuyer la sonde trop fortement sur la peau peut en chasser le sang et fausser l'interprétation. De plus, la répétabilité sur le positionnement est difficile à mettre en œuvre.

Ensuite, la DRS donne une information macroscopique rendant parfois difficile l'interprétation des résultats vis à vis des paramètres physiologiques. Par exemple, d'un sujet à l'autre, l'épaisseur de la couche cornée et de l'épiderme peuvent varier, les spectres acquis portent donc plus ou moins l'information du derme selon le sujet. L'épaisseur des couches n'étant pas fournie par la DRS, il n'est aujourd'hui pas possible de corriger la mesure de ces biais.

1.3.4 Résumé

Cette partie a permis de définir les paramètres gouvernant la propagation de la lumière dans les tissus biologiques et de donner leur ordre de grandeur pour la peau. Cette propagation repose sur une succession d'événements d'absorption et de diffusion des photons. Une part des photons incidents sur le milieu n'est pas absorbée par la peau et s'en échappe par la surface, ce qui permet d'effectuer une mesure de Spectroscopie de Réflectance Diffuse. En comparant la réflectance mesurée à un modèle analytique ou à des résultats de simulation, il est possible de quantifier les phénomènes d'absorption et de diffusion de manière dissociée.

1.4 Positionnement par rapport à d'autres méthodes optiques de caractérisation

L'objectif de cette partie est de positionner la microspectroscopie Raman et la DRS par rapport à d'autres méthodes optiques de caractérisation de la peau en termes de résolution spatiale et de profondeur sondée (voir Figure 1-29) et de la nature des informations accessibles.

1.4.1 Caractérisation structurelle

La Microscopie de Réflectance Confocale (rCLSM pour *reflectance-mode Confocal Laser Scanning Microscopy*) obtenue par illumination laser et collection de la lumière rétrodiffusée est une méthode optique donnant des informations morphologiques sur le tissu cutané grâce aux variations d'indice de réfraction du milieu (Rajadhyaksha, et al. 1995, Gonzalez et Tannous 2002). La réalisation de balayages axiaux successifs permet de former des images structurelles avec une résolution microscopique. Avec cette technique optique, la peau peut être analysée jusqu'à une profondeur d'environ 300 μm , avec au mieux une résolution axiale de l'ordre de 500 nm et une résolution latérale de 150 nm.

L'OCT (*Optical Coherence Tomography*) est une méthode interférométrique permettant d'acquérir le même type d'information mais en temps réel. Contrairement à la méthode précédente, les images acquises (coupes "en face" ou de type "B-scan" (Welzel 2001)) ou vues 3D (Alex, et al. 2010) révèlent les changements architecturaux de sa structure avec un unique point de mesure. La résolution spatiale peut varier entre 1 et 10 μm et la profondeur sondée atteint 1,5 mm.

Ces deux techniques optiques renseignent sur la morphologie des tissus et non sur leur composition.

1.4.2 Caractérisation fonctionnelle

Spectroscopies subsurfaciques

On entend par "spectroscopies subsurfaciques" les techniques spectrales permettant d'analyser un volume et une profondeur de peau supérieurs aux techniques microscopiques (entre 500 μm et 5 mm sous la surface).

Parmi les méthodes de caractérisation fonctionnelle, la mise en œuvre de l'AFS (*AutoFluorescence Spectroscopy*) (Brancaleon, et al. 2001) est très similaire à celle de la DRS bien que l'information produite soit de nature différente. Dans la peau, on compte parmi les sources naturelles de fluorescence sur le spectre UV-visible certains enzymes et coenzymes (flavines, NAD(P)H, NADH), les porphyrines, les lipides (phospholipides), le collagène, l'élastine et la kératine (Rossetti, Vieira Depieri et Lopes Badra Bentley 2013). Elle permet d'identifier des molécules à laquelle la DRS n'est pas sensible. C'est la raison pour laquelle des systèmes bimodaux AFS-DRS ont été développés (Péry, et al. 2008, Amouroux, et al. 2009).

L'instrumentation SORS (*Spatially Offset Raman Spectroscopy*) (voir Figure 1-8) repose sur le même principe que la DRS résolue spatialement (à savoir une collection effectuée à différentes distances de l'illumination) (Matousek 2007). Dans ce cas, l'illumination est une source laser et c'est le spectre Raman qui est collecté.

Ces techniques optiques caractérisent biochimiquement la peau de façon macroscopique.

Microscopies confocales

La Microscopie de Fluorescence Confocale ("fCLSM" dans Figure 1-29) (Alvarez-Roman, et al. 2004) et la microspectroscopie Raman ("Raman CLSM" dans Figure 1-29) sont des

déclinaisons de la rCLSM. Dans ces cas, le signal collecté (fluorescent ou Raman) est spécifique de la composition biochimique du milieu. La résolution microscopique des systèmes permet de combiner informations fonctionnelles et structurales dans les images formées. Par fluorescence, on entend aussi bien mesurer de la fluorescence exogène qu'endogène avec cette technique.

Microspectroscopie FTIR

La spectroscopie FTIR (*Fourier Transform InfraRed*) fournit le même type d'information que la spectroscopie Raman. Le mécanisme physique mis en jeu diffère cependant (Krafft et Sergo 2006). Pour pouvoir détecter une absorption du rayonnement infra-rouge, les vibrations moléculaires doivent induire le changement du moment dipolaire de la molécule. Etant donné que la longueur d'onde d'excitation est dans l'infra-rouge, la limite de diffraction rend la microspectroscopie FTIR moins résolue spatialement que la microspectroscopie Raman (Lasch et Naumann 2006). De plus, cette technique fonctionnant dans une géométrie de transmission, elle ne peut être employée *in vivo*.

Microscopies non linéaires

C'est le développement de la microscopie multiphoton qui a permis d'atteindre des résolutions submicroniques et des plans plus profonds. Cette méthode réalise le sectionnement optique axial sans nécessité d'un trou confocal. En effet, en TPEF (*Two-Photon Excitation Fluorescence*) (Masters, So et Gratton 1997, Palero, et al. 2007), le signal est produit sous les conditions de l'absorption simultanée de deux photons et d'une forte densité de photons dans le volume focal. Pour cela, des lasers impulsionsnels à haute puissance dans l'infrarouge sont utilisés. De plus, l'intensité d'émission varie comme le carré de l'intensité incidente. Le rapport signal sur bruit en milieu diffusant est par conséquent meilleur qu'en microscopie confocale (fCLSM), en particulier dans les plans profonds. Cette technique permet d'obtenir une information spectrale à haute résolution.

L'emploi de ces sources permet aussi de réaliser des images SHG (*Second Harmonic Generation*) (Fine et Hansen 1971, Palero, et al. 2007), à condition que l'échantillon comporte des molécules non-centrosymétriques comme le collagène par exemple (Freund, Deutsch et Sprecher 1986). Dans ce cas, deux photons combinent leur énergie et un photon est réémis avec une énergie égale à deux fois celle des photons incidents (longueur d'onde divisée par deux). Cette méthode optique permet de détecter la présence (ou l'absence) d'une molécule dans les tissus analysés.

Le principe de la microscopie CARS (*Coherent Anti-stokes Raman Spectroscopy*) est similaire bien que plus complexe techniquement (deux faisceaux incidents de longueurs d'onde différentes sont nécessaires pour générer l'émission Raman recherchée). Avec cette méthode, on recherche dans le milieu sondé les molécules ayant un mode Raman vibrationnel prédéterminé en ajustant les longueurs d'onde incidentes (Chen, et al. 2015). Comme la microscopie SHG, cette technique ne fournit pas une information spectrale.

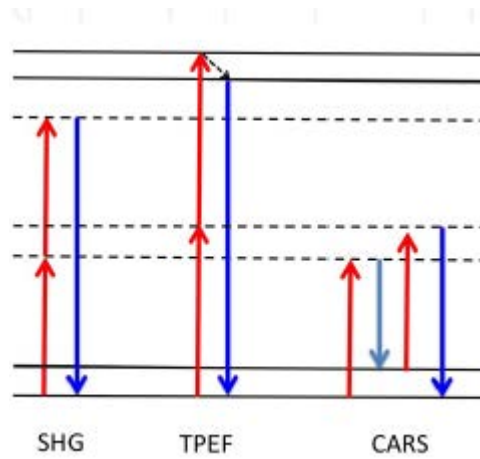


Figure 1-28 : Diagramme de Jablonski illustrant les différents mécanismes non-linéaires (Lilledahl, Chinga-Carrasco et de Lange Davies 2013)

Bilan

La microspectroscopie Raman se place dans cet environnement comme une des techniques les plus riches spectralement avec une résolution spatiale subcellulaire adaptée à la caractérisation cutanée et une profondeur sondée globalement limitée à l'épiderme. La DRS présente un contenu spectral moins riche mais nous l'utiliserons pour sa capacité à caractériser de façon macroscopique les propriétés optiques de la peau.

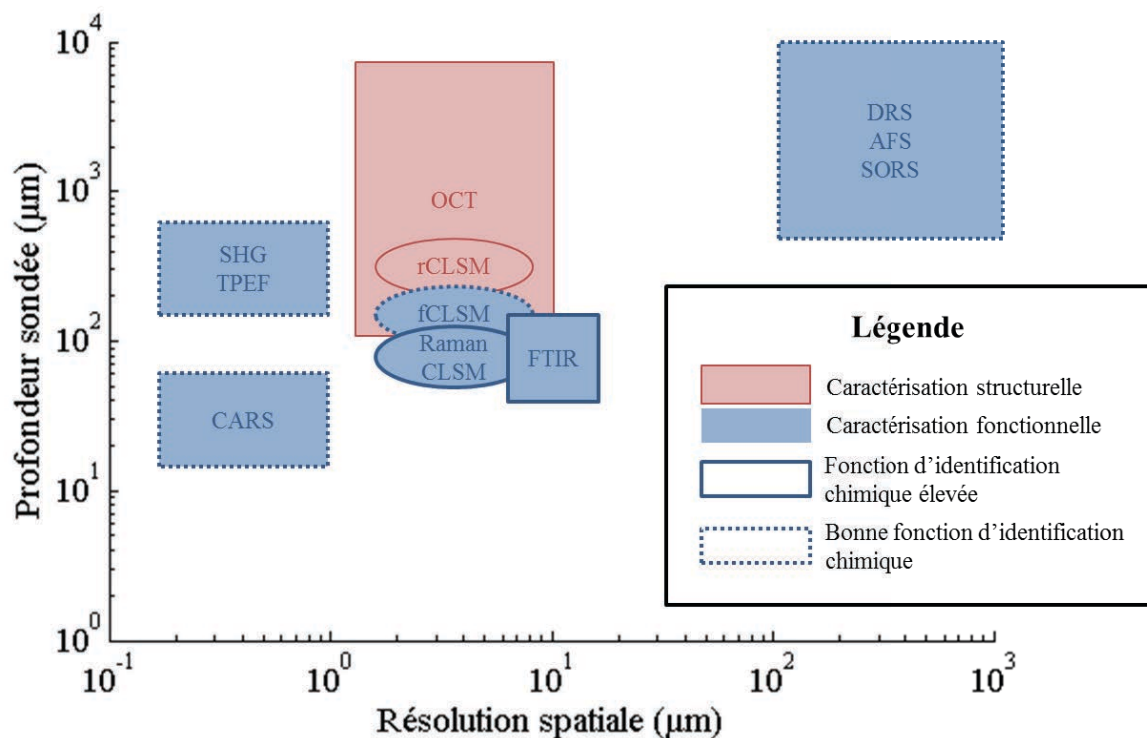


Figure 1-29 : Positionnement des spectroscopies Raman et Reflectance Diffuse par rapport à d'autres méthodes de caractérisation optique en termes de résolution spatiale et profondeur maximale sondée

1.5 Problématique scientifique

Cette partie a pour rôle de délimiter les contours de la thèse et de présenter les axes de travail suivis.

Nous répondons avant tout au besoin de caractériser la peau avec une différenciation en profondeur et une information moléculaire. Ainsi, le travail est orienté sur la spectroscopie Raman confocale, par opposition aux méthodes Raman sans fonction de localisation, pour obtenir une caractérisation biochimique avec une résolution axiale élevée dans les deux cents premiers microns sous la surface.

Le premier paragraphe expose un premier axe de travail qui consiste à évaluer la dégradation de la fonction de localisation de la spectroscopie Raman confocale et à en corriger la fonction de quantification des biais introduits par la réfraction et la diffusion de la lumière. Le deuxième axe de travail est présenté dans le deuxième paragraphe : permettre la caractérisation des propriétés optiques de la zone sondée par la microspectroscopie Raman, à savoir l'épiderme, avec une instrumentation de DRS dédiée. Le troisième axe de travail, décrit dans le troisième paragraphe, concerne le développement de fantômes mimant les propriétés optiques de la peau. Un des objectifs de ce travail est de fabriquer des objets multicouches permettant de simuler les propriétés optiques des différentes couches élémentaires de la peau. Cela permettra d'aborder la peau comme un système multicouche tant en spectroscopie Raman qu'en DRS. Ce dernier axe de travail est énoncé dans le dernier paragraphe.

1.5.1 Correction des profils d'intensité Raman

Au-delà des limitations intrinsèques à la spectroscopie Raman (citées au paragraphe 1.2.4) pouvant intervenir quel que soit l'échantillon analysé, qu'il soit transparent ou non, des défauts de quantification et de localisation interviennent significativement lorsque la mesure est effectuée sur un tissu biologique. En effet, le signal Raman détecté est altéré par la réfraction, l'absorption et la diffusion générées par la structure hétérogène constituant le tissu (phénomènes décrits au paragraphe 1.3.1). La lumière incidente et la lumière générée après diffusion Raman subissent ces interactions avec la matière et sont toutes les deux dépendantes des propriétés optiques du tissu.

Nous illustrons ces propos par quelques résultats préliminaires obtenus expérimentalement et complétés par des informations issues de la littérature.

Matériel et méthodes

Nous disposons d'un objet constitué de deux couches (Figure 1-30): du PDMS (Polydiméthylsiloxane) dopé avec du dioxyde de titane, constituant une couche diffusante, a été déposé sur une lame de silicium. Le protocole de fabrication de cet objet test sera explicité au Chapitre 2.

Le silicium est un matériau classiquement utilisé pour évaluer la résolution axiale des microscopes Raman confocaux en effectuant l'acquisition du profil d'intensité de la raie Raman à $520,7 \text{ cm}^{-1}$ le long de l'**Axe 1**. C'est en acquérant un profil le long de l'**Axe 2** que nous pourrions illustrer les distorsions introduites par la matrice diffusante.

Le micro-spectromètre Raman utilisé est équipé d'une source laser émettant à 532 nm, d'un objectif 100X ouvert à 0.9 et l'ouverture du trou confocal est paramétrée à 50 μm . Au Chapitre 6, ce système et ses caractéristiques sont détaillés de façon plus approfondie.

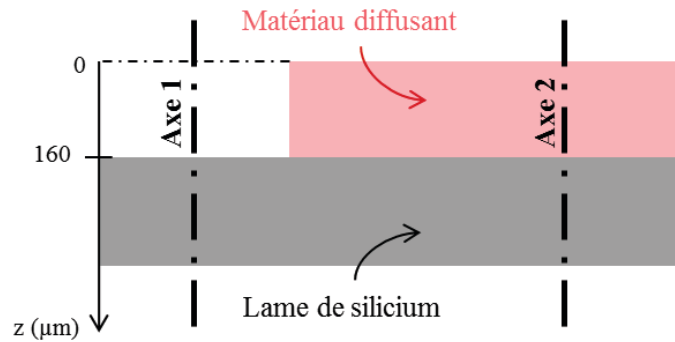


Figure 1-30 : Objet test constitué d'une couche de matériau diffusant (PDMS+dioxyde de titane) déposée sur une lame de silicium

Dégradation de la fonction de localisation

Lorsque le profil d'intensité de la raie Raman à 521 cm^{-1} propre au silicium est acquis le long de l'**Axe 1**, le maximum d'intensité intervient à l'interface air/silicium ($z=160\text{ }\mu\text{m}$). C'est aussi à cette position que la résolution axiale du système est évaluée par la mesure de la largeur à mi-hauteur du profil. Elle est d'environ $2\text{ }\mu\text{m}$.

En revanche, lorsque ce profil est acquis selon l'**Axe 2**, l'information de localisation diffère en deux points avec le précédent (Figure 1-31). D'une part, le maximum d'intensité Raman intervient à une autre coordonnée axiale ($z=110\text{ }\mu\text{m}$); la profondeur de l'interface PDMS/silicium est donc sous-estimée. D'autre part, la largeur à mi-hauteur du profil change, indiquant une résolution axiale d'environ $8\text{ }\mu\text{m}$. La résolution de la réponse axiale est donc dégradée.

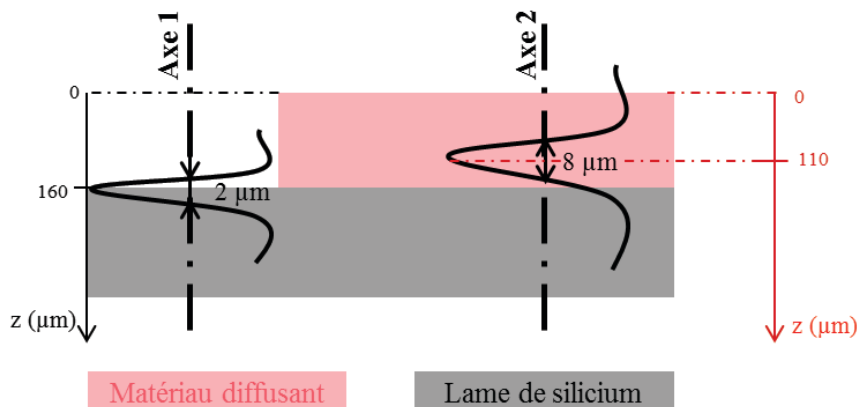


Figure 1-31 : Comparaison des réponses axiales du système obtenues selon deux axes différents de l'objet test

Ces phénomènes sont connus de la communauté scientifique (N. J. Everall, Confocal Raman microscopy: why the depth resolution and spatial accuracy can be much worse than you think 2000-a, Tomba, Arzondo et Pastor 2007, Meglinskii, et al. 2002) et interviennent non seulement en milieu diffusant, mais aussi en milieu transparent dès lors qu'il y a un changement d'indice de réfraction entre le milieu environnant l'objectif de microscope et le milieu sondé.

Cette dégradation de la fonction de localisation de la microspectroscopie Raman sera évaluée au Chapitre 6.

Dégradation de la fonction de quantification

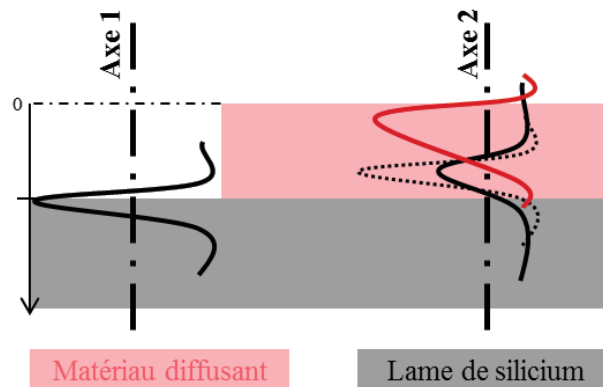


Figure 1-32 : Comparaison de l'intensité Raman détectée selon deux axes différents de l'objet test (raie propre au silicium en noir) et évolution de l'intensité d'une raie Raman propre au PDMS en rouge

A la perte de localisation en milieu diffusant s'ajoute la dégradation de la fonction de quantification. En effet, la représentation de l'intensité Raman dans la Figure 1-31 n'est pas tout à fait exacte. En réalité, le maximum d'intensité Raman détectée selon l'**Axe 1** est significativement réduit lorsque le profil est acquis selon l'**Axe 2** (Figure 1-32) pour une épaisseur mécanique de PDMS de 160 μm .

De plus, si on s'intéresse à l'intensité d'une raie Raman propre au matériau diffusant (profil rouge), celle-ci décroît avec la profondeur alors que la couche est homogène en propriétés optiques et moléculaires (concentration uniforme).

Cette atténuation du signal avec la profondeur sondée est en partie dû à l'absorption de la lumière par les matériaux utilisés mais le phénomène prépondérant est avant tout la diffusion des photons. Dans une géométrie de détection donnée, elle joue sur la probabilité des photons d'atteindre le système de collection. Des équipes ont déjà étudié l'effet de la diffusion sur les profils d'intensité Raman en fonction de la profondeur sondée (Yamamoto, Itoh, et al. 2014, Brenan et Hunter 1996, MacDonald, Vaughan et Wyeth 2003), et ont rapporté qu'il est conséquent dès la dizaine de microns malgré le filtrage confocal (Franzen, et al. 2013).

Le défi est alors d'obtenir un spectre Raman représentatif de la composition de l'échantillon biologique à partir d'un spectre Raman mesuré dégradé par la diffusion lumineuse. Cela revient à trouver le moyen de rendre ce spectre Raman quantitatif en le corrigeant *a posteriori*

des distorsions générées par les phénomènes d'absorption et de diffusion élastique. Le principal objectif de ce travail de thèse est de quantifier les propriétés optiques de l'échantillon par DRS et de les exploiter pour développer un modèle de correction des spectres Raman acquis (objet du Chapitre 6).

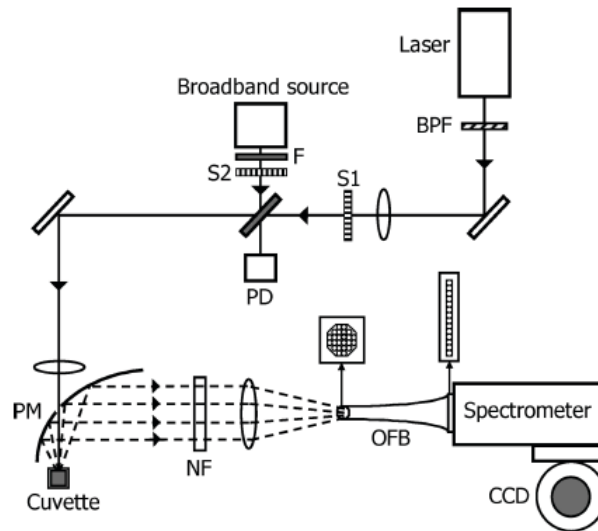


Figure 1-33 : Schéma du dispositif expérimental bimodal développé dans (Barman, et al. 2009)

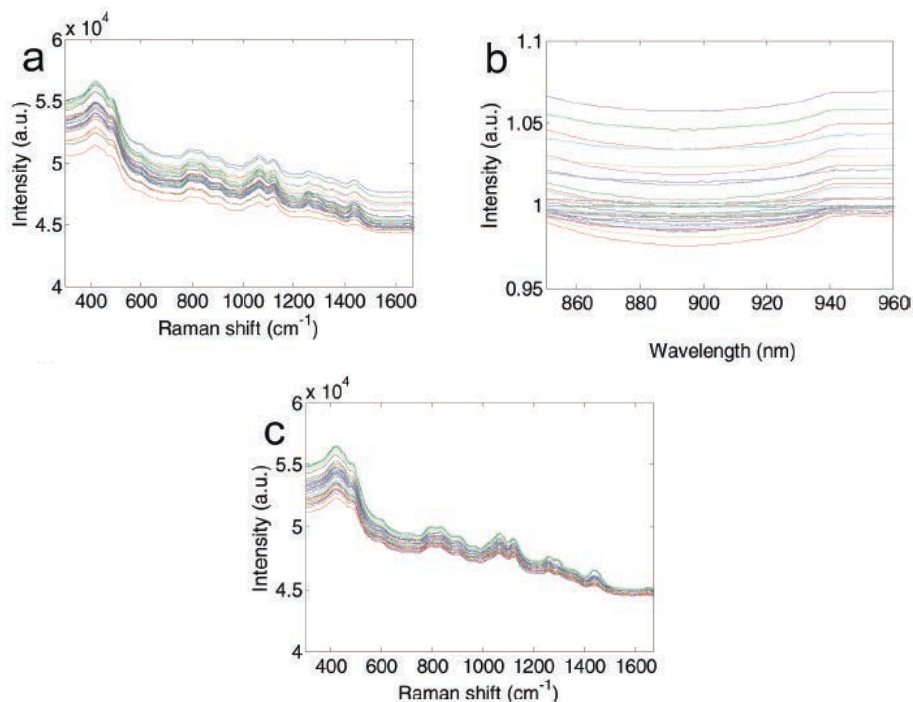


Figure 1-34 : (a) Spectres Raman mesurés sur 20 fantômes aux propriétés optiques différentes (b) Spectres de Réflectance Diffuse normalisés obtenus sur ces 20 fantômes, démontrant l'étendue des propriétés optiques testées (c) Spectres Raman corrigés de la diffusion : leur dispersion diminue, en particulier dans le proche-infra-rouge (Barman, et al. 2009)

Ce problème bien connu a été étudié pour des géométries de sondes Raman non confocales. Dans (Barman, et al. 2009), les auteurs ont conduit la première étude théorique et

expérimentale sur la correction des spectres Raman pour des valeurs de coefficients μ_a et μ'_s typiques de la région spectrale proche-infrarouge des tissus biologiques. Le système bimodal DRS-Raman utilisé est présenté en Figure 1-33 ainsi que quelques résultats de correction obtenus sur fantômes en Figure 1-34. La validité du modèle de correction proposé a été démontrée par simulations Monte Carlo (Shih, Bechtel et Feld 2008).

Dans (Reble, et al. 2010), les auteurs ont aussi développé une instrumentation bimodale (Figure 1-35) permettant de mesurer les propriétés optiques d'un échantillon (fantôme et peau) en complément de son spectre Raman. Afin de déterminer le spectre Raman absolu, deux méthodes sont proposées pour le corriger des variations liées à l'absorption et à la diffusion.

La première méthode utilise des fonctions analytiques déterminées empiriquement sur fantômes et dépendantes des propriétés optiques mesurées sur l'échantillon étudié. La deuxième méthode consiste à générer et propager des photons Raman par simulations Monte Carlo dans un milieu aux propriétés optiques identiques à celles mesurées pour calculer, de manière directe, le facteur de correction.

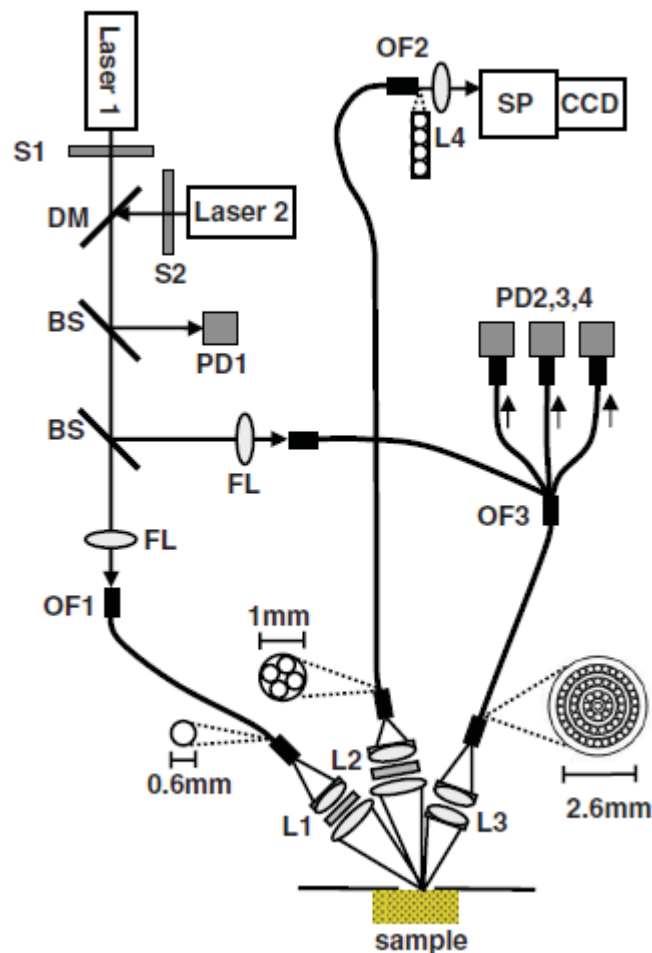


Figure 1-35 : Schéma du dispositif expérimental bimodal développé dans (Reble, et al. 2010)

Ces travaux antérieurs ont montré qu'il est possible de corriger les spectres Raman des effets de diffusion mais avec une instrumentation non confocale : la localisation spatiale est donc réduite à quelques millimètres et n'est donc pas applicable à l'analyse de l'épiderme.

Le travail de thèse a donc été orienté vers le couplage de la spectroscopie Raman dans sa géométrie confocale avec la spectroscopie de Réflectance Diffuse résolue spatialement en vue d'acquisition *in vivo*.

Les applications visées peuvent en conséquence aussi bien concerner la caractérisation cutanée que le suivi d'actif. La motivation technique est d'améliorer les fonctions de localisation et de quantification et la localisation de la microspectroscopie Raman, en ciblant plus précisément les plans profonds de la peau c'est-à-dire au-delà de la vingtaine de microns sous la surface.

1.5.2 Développement d'une instrumentation DRS caractérisant l'épiderme

Comme décrit dans le Chapitre 3, l'instrumentation de DRS développée par le LISA sonde la peau et en caractérise les propriétés optiques jusqu'au derme. Or, la microspectroscopie Raman ne fournit des spectres exploitables que dans la zone superficielle de l'épiderme.

Par conséquent, le deuxième axe de travail est le développement d'une instrumentation et méthodologie DRS permettant de sonder et de caractériser optiquement les tissus dans la zone inspectée par la microspectroscopie Raman. Nous appelons cette nouvelle modalité la Micro-DRS et son développement fait l'objet du Chapitre 4. Nous verrons par ailleurs que cette nouvelle technique permet une mesure de μ_s et de g quand la DRS conventionnelle ne le permet pas.

1.5.3 Développement de fantômes solides

Des objets tests aux propriétés optiques connues et dont les valeurs représentent une gamme proche de celle de la peau sont nécessaires pour évaluer de manière quantitative l'effet des propriétés optiques d'un milieu sur les profils Raman qui y sont mesurés. Ils permettent d'établir le modèle de correction des spectres Raman en fonction des paramètres fournis par DRS. Ces objets tests, appelés par la suite "fantômes", permettent également de s'affranchir des difficultés d'approvisionnement et de manipulation liées aux tissus biologiques naturels : la disponibilité de tels fantômes facilite le travail expérimental au quotidien (réglage des instruments, évolution de ceux-ci, étalonnage ...).

Ces fantômes sont aussi utilisés pour évaluer la faisabilité et les performances de la Micro-DRS.

Le protocole de fabrication de ces fantômes est décrit au Chapitre 2.

1.5.4 Travail prospectif sur les systèmes multicouches

Les travaux précités étudiant l'effet de la diffusion élastique de la lumière sur les spectres Raman (Barman, et al. 2009, Reble, et al. 2010, Yamamoto, Itoh, et al. 2014) considèrent le milieu sondé comme homogène en propriétés optiques et en composition biochimique. C'est un cas simplifié dans lequel la distribution spatiale de l'énergie lumineuse à la longueur d'onde d'excitation dans le tissu, bien que prise en compte, importe peu dans le modèle de correction.

Cependant, la localisation des sources de photons Raman pose question dans le tissu cutané car ses propriétés optiques et biochimiques varient couche par couche. Et, *a fortiori*, la distribution de l'énergie lumineuse d'excitation entre en jeu dans le spectre Raman détecté à la surface.

Ce problème a été très récemment étudié dans (Wang, et al. 2013) grâce à des simulations Monte Carlo. Le code de propagation des photons mis au point par cette équipe permet de simuler le spectre Raman détecté *in vivo* à la surface de la peau avec un système non confocal, connaissant les spectres Raman absolus de différentes couches de la peau (au nombre de huit dans leur modèle), et après calcul de la distribution spatiale de l'énergie lumineuse incidente. Ces spectres absolus ont été préalablement acquis par microspectroscopie Raman sur des coupes de peau excisée. Le spectre simulé est tout à fait représentatif de mesures *in vivo* (Figure 1-36). Cette étude a donc permis d'évaluer la contribution de chacune des couches au spectre Raman total généré à la surface de la peau (Figure 1-37).

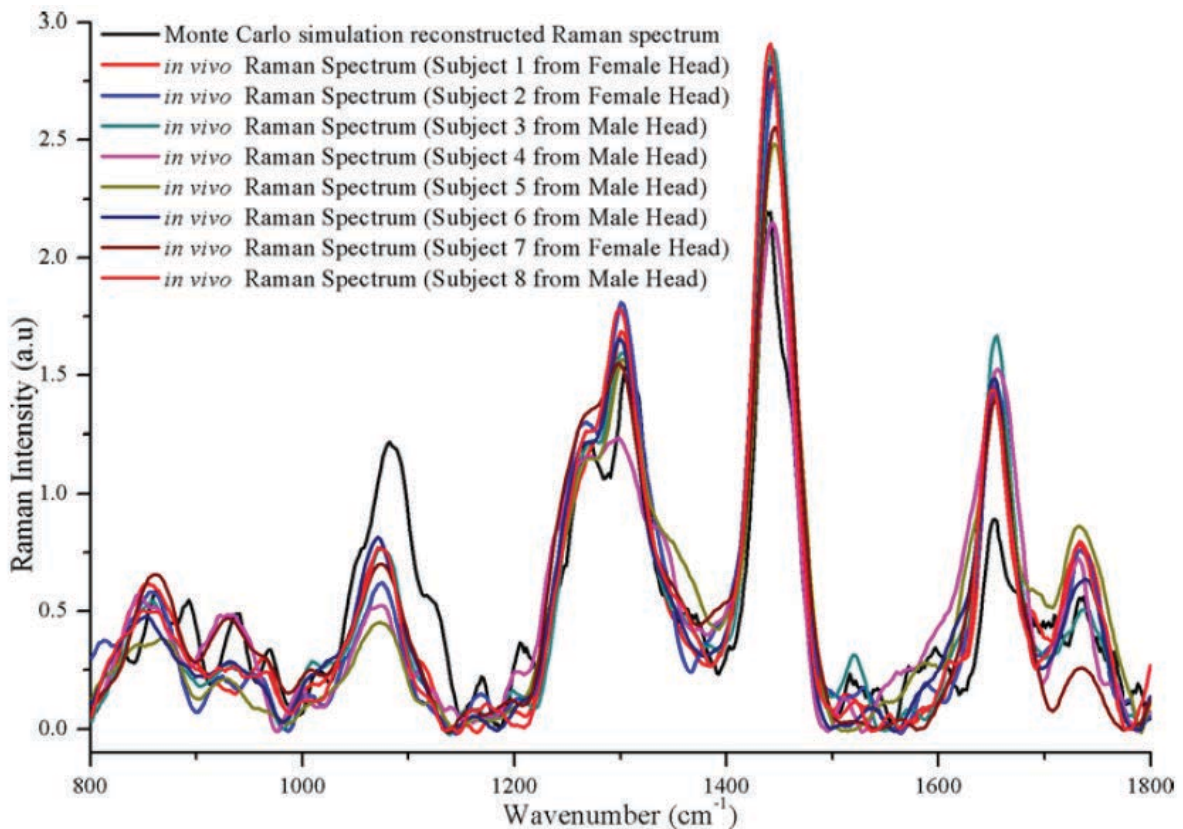


Figure 1-36 : Comparaison du spectre Raman simulé de la peau du visage avec des spectres Raman expérimentaux (Wang, et al. 2013)

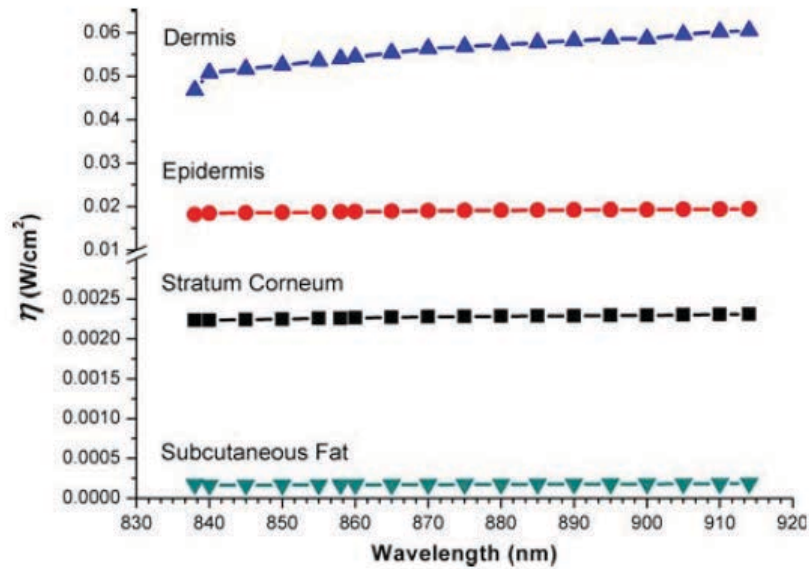


Figure 1-37 : Efficacités de détection Raman simulées en fonction de la longueur d'onde pour quatre couches de la peau (Wang, et al. 2013)

Dans ce contexte, nous proposons un chapitre prospectif (Chapitre 7) sur la DRS et la microspectroscopie Raman en milieux stratifiés. Nous verrons comment une mesure de DRS standard pourrait permettre la détermination des propriétés optiques couche par couche et quel pourrait être l'effet des variations de diffusion sur les spectres Raman acquis. Le protocole de fabrication de fantômes solides présenté au Chapitre 2 permet le développement de fantômes multicouches sur lesquels des spectres de Réflectance Diffuse et des profils Raman ont été mesurés. Au regard des résultats obtenus, des orientations possibles pour la suite de ce travail sont proposées.

Chapitre 2 : Développement de fantômes solides mimant les propriétés optiques de la peau

La première partie de ce chapitre définit les objectifs de la fabrication de fantômes solides dans le cadre de ce travail de thèse. Après avoir montré quelques exemples de fantômes solides développés par la communauté internationale pour mimer les propriétés optiques des tissus biologiques (deuxième partie), nous présenterons les matériaux choisis ainsi que le protocole de fabrication mis au point durant cette thèse (troisième partie). Ce protocole permet la construction de fantômes mono- et multicouches (quatrième partie). Les résultats de caractérisation de ces fantômes par DRS sont fournis au Chapitre 3.

2.1 Objectifs

Fabriquer des fantômes solides présente plusieurs avantages par rapport aux fantômes liquides usuels constitués d'eau et d'Intralipide. D'une part, poser une sonde de type DRS sur un matériau solide ne nécessite pas forcément de nettoyer la sonde après la mesure alors que l'Intralipide est gras et salissant. D'autre part, la surface d'un fantôme liquide bouge et la manipulation en devient délicate pour les mesures sans contact. C'est surtout le cas pour les mesures microscopiques où les faibles vibrations des systèmes ou infrastructures suffisent à bruyier la mesure. Enfin, le défaut du fantôme d'Intralipide est sa durée de vie : des propriétés optiques stables et fiables sont garanties pendant 1 à 2 mois, à condition de le conserver au frais. L'idéal est donc un fantôme constitué d'une matrice solide de longue durée de vie dans laquelle on puisse incorporer des éléments absorbants et diffusants.

De plus, une fois le protocole de fabrication de fantômes solides mis au point pour une couche, on peut envisager de constituer des fantômes multicouches, ce qui n'est pas faisable avec des fantômes liquides (à moins de trouver des phases non miscibles sans transfert des particules absorbantes et diffusantes d'une phase à l'autre).

Dans la problématique de thèse, des fantômes solides dont les propriétés optiques constituent une gamme proche de celle des couches de la peau auront été nécessaires pour plusieurs raisons :

- L'étude de faisabilité et de sensibilité de la Micro-DRS aux propriétés optiques est réalisée en partie avec ces fantômes solides (Chapitre 4).
- Nous les utilisons comme objets d'étalonnage (dits fantômes de référence) des instruments de DRS et Micro-DRS dans une étude *in vivo* (Chapitre 5).
- Ils servent à étudier de manière quantitative l'effet de la diffusion élastique sur les profils d'intensité Raman acquis en fonction de la profondeur (Chapitre 6). Cela permet d'établir un modèle de correction.

Enfin, la confection d'objets multicouches (aux propriétés optiques différenciées couche par couche) rend possible le travail prospectif sur des milieux stratifiés tels que la peau (Chapitre 7).

2.2 Etat de l'art

Parmi les fantômes solides communément utilisés (Pogue et Patterson 2006), on trouve les fantômes dont la matrice est en gélatine (Solarte et Ipus 2013, Esmonde-White, et al. 2011) ou en résine (époxy, polyester ou polyuréthane) (Firbank, Oda et Delpy 1995, Park, et al. 2013, Vernon, et al. 1999), les premiers ne se conservant pas plus d'une semaine, les seconds étant stables dans le temps. Durant la phase de durcissement, ces résines génèrent un gaz rendant difficile l'obtention d'un fantôme sans bulle. Un photo-blanchiment des colorants ajoutés par ces résines a aussi été rapporté (Vernon, et al. 1999). Elles sont donc mal adaptées à nos besoins.

Autre exemple, dans (Ayers, et al. 2008, Saager, et al. 2010), le PDMS (Polydiméthylsiloxane), un matériau silicone, est choisi. En plus de sa stabilité, sa souplesse le rend idéal pour le couplage optique avec les sondes de contact. Il est transparent sur le spectre visible et présente un indice optique proche de celui de la peau. Le PDMS est alors dopé avec du TiO_2 en poudre pour obtenir une matrice diffusant la lumière, et de l'encre de chine ou de la caféine pour leurs propriétés absorbantes.

Grâce à ce protocole de fabrication de fantômes solides, les auteurs ont développé des fantômes homogènes en PDMS à l'aide de moules d'épaisseur variable : en superposant ces fantômes monocouches, des fantômes multicouches sont fabriqués. L'intérêt de cette technique réside dans la possibilité d'intervertir les couches. Le défaut est la faible maîtrise des épaisseurs de couche car la viscosité du PDMS rend difficile le contrôle du volume versé dans un moule.

Dans (Park, et al. 2013), les auteurs construisent leurs fantômes multicouches par dépôt à la tournette (*spin coating* en anglais) d'une résine non durcie sur une couche de résine durcie au préalable. Après réticulation de la couche superficielle, un fantôme bicouche est obtenu. C'est la vitesse de rotation de la tournette qui détermine l'épaisseur de couche (voir Figure 2-1).

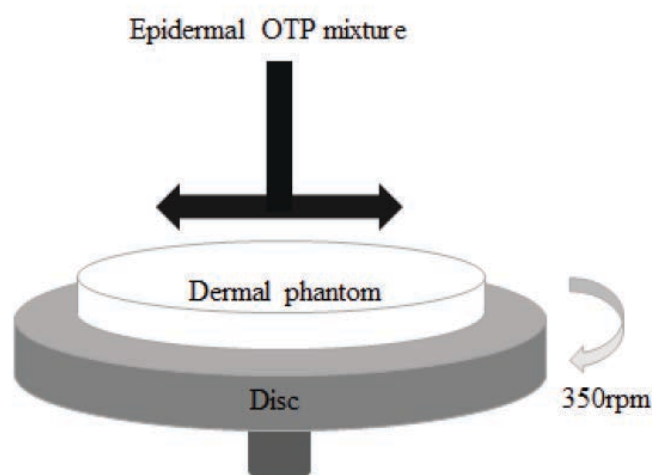


Figure 2-1 Méthode de dépôt à la tournette pour constituer un fantôme multicouche (Park, et al. 2013)

2.3 Matériaux choisis et leurs caractéristiques

Nous choisissons de nous inspirer des travaux présentés dans (Ayers, et al. 2008, Saager, et al. 2010, Park, et al. 2013) pour mettre au point le protocole de fabrication des fantômes solides. En adaptant la première méthode, le PDMS dopé en TiO_2 forme la matrice diffusante. Et nous obtenons des fantômes en PDMS multicouches par dépôt à la tournette de façon similaire à la deuxième méthode.

Nous fixons le **cahier des charges** suivant:

- Les fantômes monocouches doivent être suffisamment épais pour satisfaire l'hypothèse de milieu semi-infini nécessaire à la validité du processus d'extraction des propriétés optiques par DRS. En résumé, les dimensions d'un fantôme doivent être très grandes devant $1/\mu'_s$. On vise une épaisseur supérieure ou égale à 1 cm et des dimensions latérales supérieures ou égales à 2 cm.
- Les fantômes multicouches seront utilisés pour des mesures de spectroscopie Raman confocale. Ils sont constitués de trois couches d'épaisseur et de propriétés optiques différentes simulant un "derme" d'environ 2 mm d'épaisseur, un "épiderme" d'environ 80 μm d'épaisseur et une "couche cornée" d'environ 20 μm .

Dans cette section, nous donnons quelques propriétés optiques et physiques des différents matériaux pour argumenter notre choix.

2.3.1 Polydiméthylsiloxane (PDMS)

Le PDMS utilisé est du Sylgard 184 (Dow Corning). Il est vendu sous forme de kit : la base de PDMS à la texture visqueuse est contenue dans un premier pot et le réticulant à la texture liquide est contenu dans un second pot. Pour réticuler le PDMS, c'est-à-dire pour le solidifier, il faut y ajouter 1 masse de réticulant pour 10 masses de base de PDMS. Il réticule en 48 heures à température ambiante et en 2 ou 3 heures à 85°C.

Nous avons obtenu ses propriétés de réfraction dans la littérature. Elles sont données par les coefficients de Sellmeier (Cai 2008, Qiu 2012) dans la proportion base/réticulant 10:1 (voir Figure 2-2). Ceci confirme que l'indice de réfraction du PDMS est très proche de celui de la peau (voir Chapitre 1), soit d'environ 1,4.

Le spectre d'absorption obtenu est non nul mais faible par rapport aux propriétés d'absorption visées avec ces fantômes (entre 0,5 et 2 cm^{-1}). L'absorption des colorants ajoutés étant forte devant celle du PDMS, cela revient à considérer que $\mu_{a\text{PDMS}} = 0 \text{ cm}^{-1}$ pour $400 \text{ nm} \leq \lambda \leq 900 \text{ nm}$.

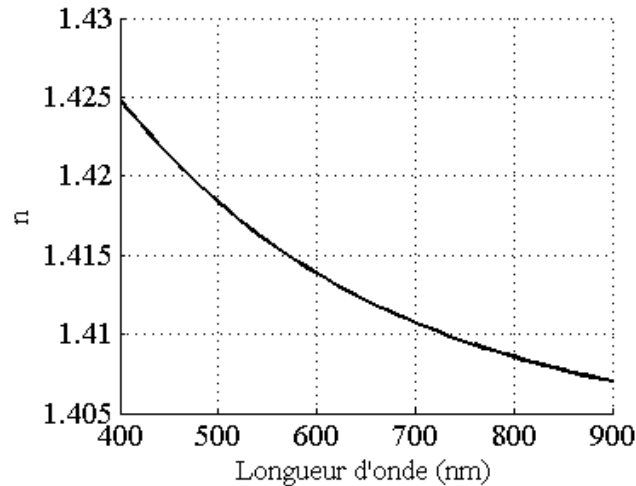


Figure 2-2 Indice de réfraction du PDMS en proportion 10:1

Le spectre d'absorption du PDMS a été mesuré à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible bifaisceau (Cary 300, Agilent) en laissant la voie de référence vide (mesure prise contre l'air), en insérant un échantillon de PDMS de la dimension des cuves à spectrophotomètre et en tenant compte des coefficients de Fresnel aux interfaces Air-PDMS et PDMS-Air en incidence normale. Ces mesures permettent de calculer μ_a selon la longueur d'onde comme indiqué en Figure 2-3.

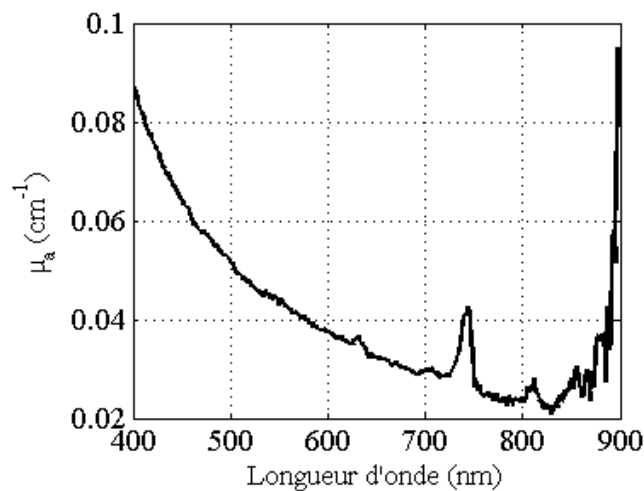


Figure 2-3 Coefficient d'absorption du PDMS mesuré avec un spectrophotomètre bifaisceau

2.3.2 Dioxyde de Titane (TiO_2)

Le Dioxyde de Titane utilisé se présente sous forme de poudre (anatase). Le diamètre des particules de TiO_2 devrait être autour de 200 nm (Cabrera, Alfano et Cassano 1996) mais cette espèce chimique est électrostatique et les particules ont tendance à s'agglomérer. Dans (Bruin, et al. 2010), l'auteur a d'ailleurs rapporté une distribution des diamètres centrée autour de 400 nm avec une asymétrie suggérant la formation d'agglomérats.

En ce qui concerne l'indice de réfraction du TiO_2 , il est de 2,49 (Bruin, et al. 2010). Cette espèce n'absorbe pas les radiations lumineuses sur le spectre visible (Serpone, Lawless et Khairutdinov 1995) et ne fait que diffuser la lumière. Utiliser du TiO_2 permet donc de décorréler les propriétés d'absorption et de diffusion dans le processus de fabrication des fantômes.

Pour évaluer ses propriétés de diffusion, nous nous rapportons aux travaux de B. Montcel (Montcel 2005) donnant l'expression du coefficient de diffusion réduit en cm^{-1} d'une résine contenant 10 mg/mL de TiO_2 dans le mélange final en fonction de la longueur d'onde en nm :

$$\mu'_s(\lambda) = 1,211 \times 10^7 \lambda^{-1,668} (1 - g) \quad (2-1)$$

avec

$$g(\lambda) = 0,78 - 1,07 \times 10^{-4} \lambda \quad (2-2)$$

et λ en nm.

L'intervalle de validité de cette expression n'est pas précisé mais l'auteur l'utilise pour $690 \text{ nm} \leq \lambda \leq 870 \text{ nm}$. Nous extrapolons cette formule aux longueurs d'onde inférieures en gardant à l'esprit que cela peut être source d'erreur. C'est l'ordre de grandeur de ces paramètres qui est important dans la fabrication des fantômes plus que leur valeur exacte. Ils seront ensuite caractérisés par DRS et nous comparerons les résultats avec l'expression (2-1).

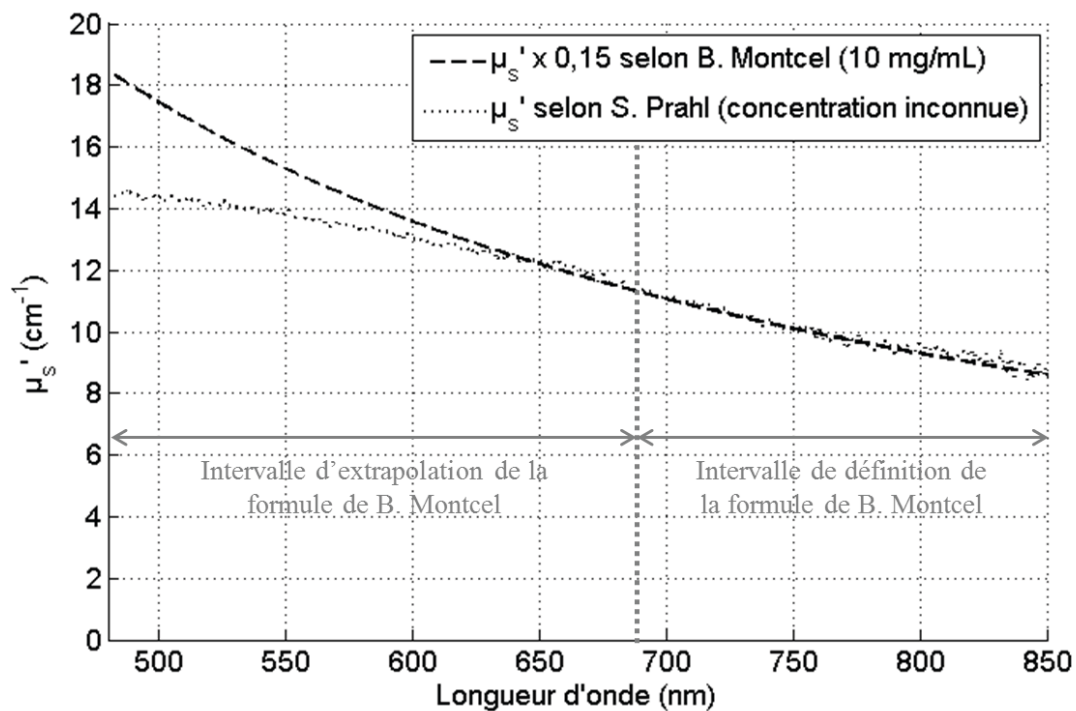


Figure 2-4 : Dépendances spectrales du coefficient de diffusion réduit du TiO_2 obtenues par B. Montcel et S. Prahl

Cette dépendance spectrale est différente de celle obtenue par S. Prahl dans ses travaux sur la méthode IAD (*Inverse Adding-Doubling method*) (voir Figure 2-4). Mais le spectre de diffusion fourni par S. Prahl est obtenu pour un échantillon dont la concentration en TiO_2 n'est pas précisée. C'est pourquoi nous nous fions dans un premier temps à l'expression de B. Montcel.

La référence du TiO_2 que nous utilisons est la suivante : 14027 Titanium(IV) oxide extra pure, Riedel-de-Haën.

2.3.3 Encres et colorants

Nous disposons au laboratoire d'une encre noire de marque Rotring servant à mimer la mélanine, et d'un colorant bleu (Gubra, *Colori mordenti per legno-Bleu Souro*) sous forme de poudre ayant un profil d'absorption proche de celui de l'oxyhémoglobine pour $500 \text{ nm} \leq \lambda \leq 650 \text{ nm}$ (Figure 2-5). Ces deux composants se diluent dans l'éthanol qui est un solvant du PDMS. Le PDMS est un matériau hydrophobe, ce qui signifie que nous ne pouvons pas utiliser de colorants en phase aqueuse sous peine de créer une émulsion au lieu d'un mélange homogène.

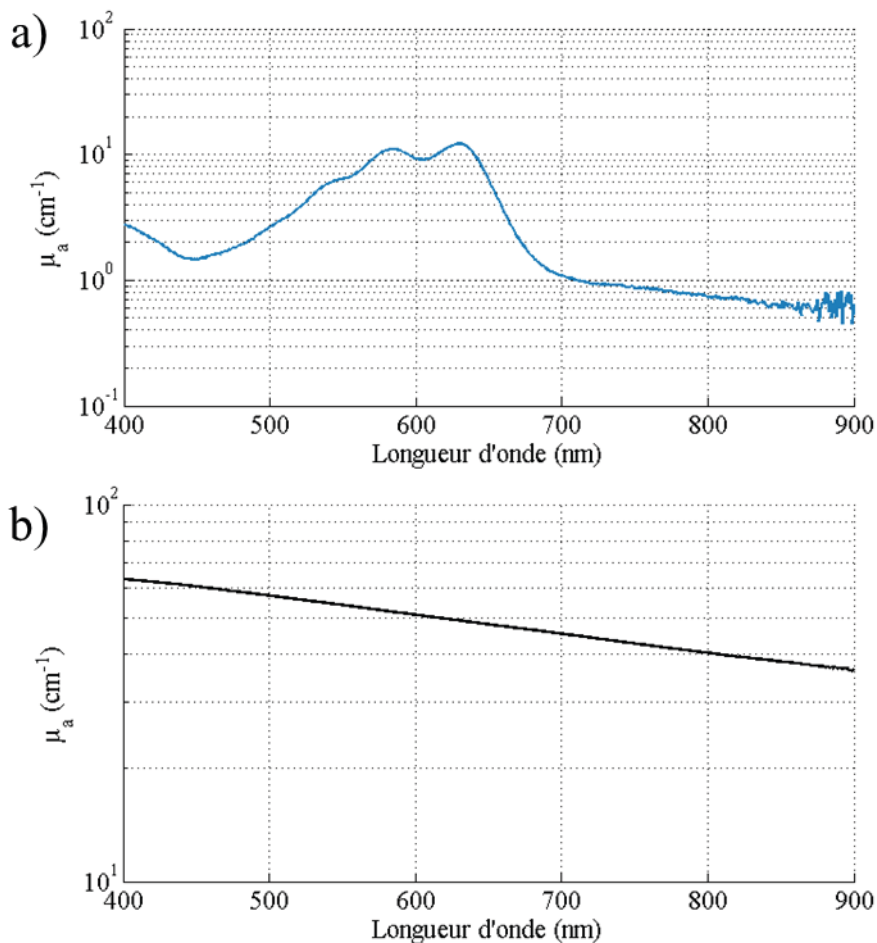


Figure 2-5 : Spectres d'absorption des colorants et encres utilisés. a) Colorant Bleu b) Encre noire

Le colorant bleu est utilisé dans la couche représentative du derme pour les fantômes multicouches. L'encre noire est utilisée pour construire une gamme de fantômes monocouches absorbants avec quatre niveaux d'absorption distincts et dans la couche représentative de l'épiderme pour les fantômes multicouches.

2.4 Protocole de fabrication

Cette partie détaille les étapes de base du processus de fabrication d'un fantôme en PDMS absorbant et diffusant puis précise les étapes propres à la confection de fantômes multicouches. Nous appellerons "mélange final" le matériau final constitué de la base de PDMS et de son réticulant. Ces fantômes ont été contrôlés par microtomographie à rayons X.

2.4.1 Obtention d'un fantôme monocouche

La Figure 2-6 décrit l'ensemble des étapes nécessaires à l'élaboration d'un échantillon de PDMS absorbant et diffusant. Les étapes apparaissant en rouge sont des étapes amont à effectuer avant toute manipulation du PDMS. Il s'agit des phases d'incorporation du TiO_2 au réticulant et de préparation des solutions colorées.

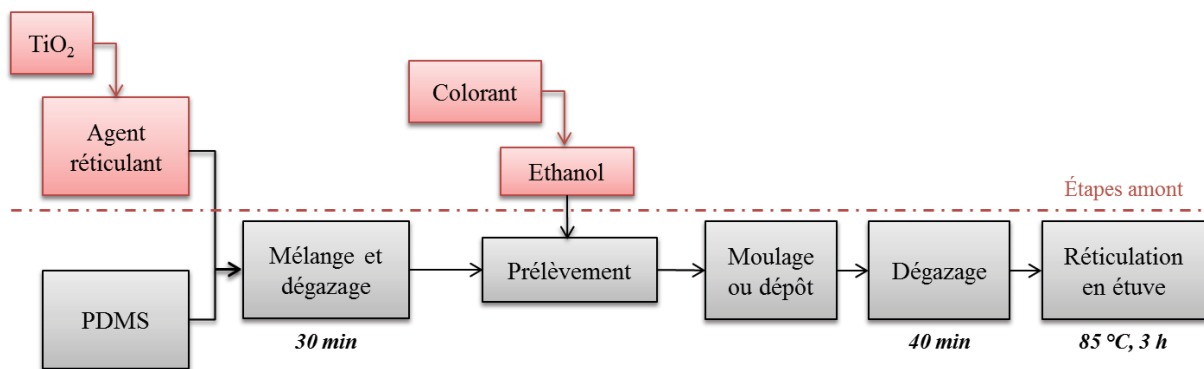


Figure 2-6 : Étapes de fabrication d'un fantôme homogène monocouche

Incorporation du TiO_2 au réticulant

On souhaite réaliser une gamme de réticulant dopé au TiO_2 afin d'obtenir quatre mélanges finaux aux coefficients de diffusion réduits μ'_s distincts. L'objectif est que ces fantômes aient des propriétés de diffusion représentatives de la peau. Nous visons donc les propriétés optiques suivantes:

- $\mu'_{s1}(532 \text{ nm}) = 20 \text{ cm}^{-1}$
- $\mu'_{s2}(532 \text{ nm}) = 35 \text{ cm}^{-1}$
- $\mu'_{s3}(532 \text{ nm}) = 70 \text{ cm}^{-1}$
- $\mu'_{s4}(532 \text{ nm}) = 90 \text{ cm}^{-1}$

D'une part, nous spécifions ces propriétés à 532 nm car c'est la longueur d'onde du laser utilisé pour la spectroscopie Raman au Chapitre 6. D'autre part, d'un point de vue quantitatif, μ'_{s1} est plutôt représentatif du derme, μ'_{s2} de l'épiderme sans couche cornée, μ'_{s3} et μ'_{s4} de la couche cornée (Chapitre 1).

Pour déterminer la concentration de TiO₂ donnant ces coefficients de diffusion, nous utilisons la formule théorique (2-1) de B. Montcel (Montcel 2005). Par une règle de trois, les concentrations volumiques et massiques de TiO₂ dans le mélange final sont calculées en tenant compte de la densité du PDMS et de son réticulant (voir Tableau 2-1). Travailler en masse est plus adéquat puisqu'on incorpore 1 masse de réticulant dans 10 masses de base de PDMS.

	μ'_{s1}	μ'_{s2}	μ'_{s3}	μ'_{s4}
Concentration volumique (mg/mL de mélange final)	2,1	3,7	7,4	9,5
Concentration massique (mg/g de mélange final)	1,9	3,3	6,7	8,6
Concentration massique (mg/g de réticulant)	21,0	36,7	73,3	94,3

Tableau 2-1 : Concentrations volumiques et massiques de TiO₂ permettant de viser les coefficients de diffusion réduits μ'_{s1} à μ'_{s4}

Nous préparons donc quatre solutions de réticulant concentrées en TiO₂ comme indiqué dans la dernière ligne du Tableau 2-1. Ces solutions sont passées aux ultrasons pendant 30 minutes pour homogénéiser le mélange et éviter au mieux la formation d'agglomérats (paragraphe 2.3.2).

Préparation des solutions colorées

Les encres et colorants choisis sont incorporés dans le mélange final PDMS + réticulant en les diluant dans l'éthanol. L'éthanol est un solvant du PDMS, cela signifie que c'est un moyen simple pour mélanger les colorants au PDMS. Mais on ne peut pas ajouter une quantité illimitée d'éthanol au PDMS car cela modifie ses propriétés physiques (élasticité, indice de réfraction, etc...). La formation de bulles pendant la réticulation en étuve a même été observée lorsque la quantité d'éthanol ajoutée était trop importante. Nous avons donc ainsi pu définir une quantité maximale d'éthanol à ne pas dépasser : le volume de PDMS doit être 35 fois supérieur au volume d'éthanol ajouté. En conclusion, si on souhaite comparer deux fantômes dont la concentration en colorant est différente, il faut que la quantité d'éthanol ajoutée à ces deux fantômes soit la même. C'est pourquoi nous avons créé une gamme d'éthanol avec différentes concentrations en colorant bleu et encre noire.

Encre noire

Quatre solutions d'encre noire diluée dans de l'éthanol sont préparées. Leurs spectres d'absorption sont donnés Figure 2-7. Ces solutions sont passées aux ultrasons pendant 20 minutes pour homogénéisation.

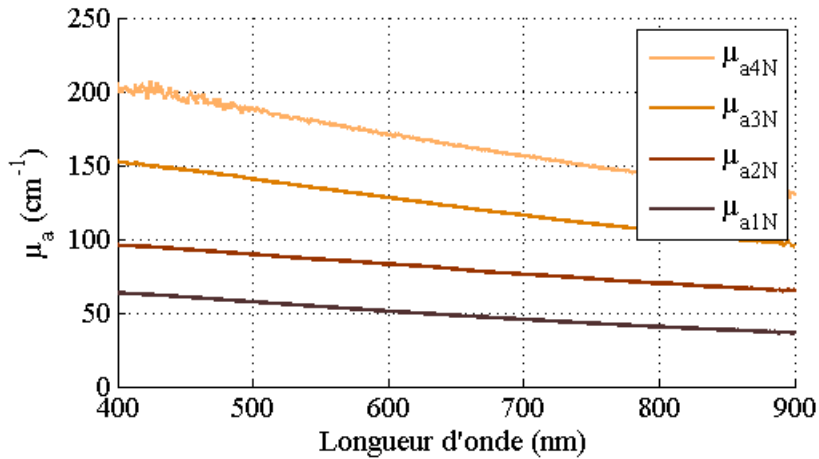


Figure 2-7 : Spectres d'absorption de la gamme d'encre noire obtenus au spectrophotomètre Cary 300 (Agilent)

Colorant bleu

Deux solutions de colorant bleu dilué dans de l'éthanol sont préparées. Leurs spectres d'absorption sont donnés Figure 2-8. Ces solutions sont passées aux ultrasons pendant 20 minutes pour homogénéisation.

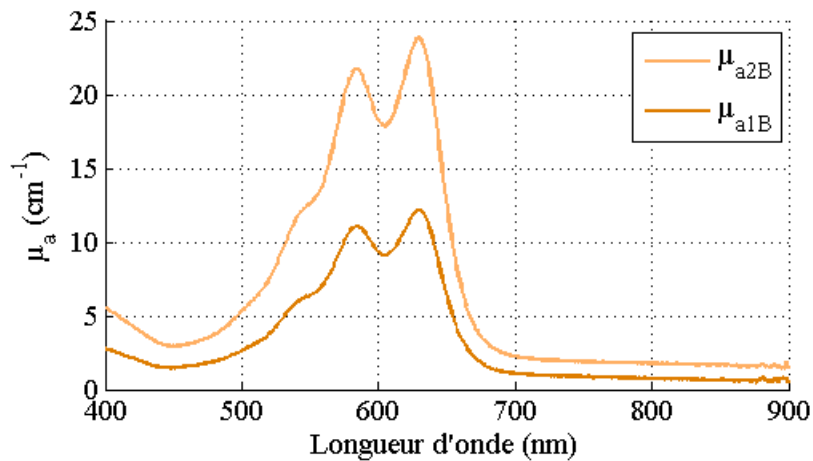


Figure 2-8 : Spectres d'absorption de la gamme de colorant bleu obtenus au spectrophotomètre Cary 300 (Agilent)

Étapes menant à la réticulation du PDMS

Une fois ces étapes amont effectuées, le réticulant dopé en TiO_2 peut être ajouté à la base de PDMS en respectant la proportion de 10:1 en masse (voir Figure 2-6). On mélange les deux phases pendant au moins 1 minute à la main à l'aide d'une spatule. Le récipient utilisé est ensuite placé dans une cloche à vide pendant au moins 30 minutes pour éliminer les bulles d'air générées pendant le mélange.

Ceci est répété pour les quatre coefficients de diffusion visés (Tableau 2-1).

Colorant	$\frac{V_{PDMS}}{V_{Ethanol}}$	μ_a visé	Monocouche	Derme	Epiderme
Colorant Bleu					
$\mu_{a1B}(584nm)$	39,5	$0,28 \text{ cm}^{-1}$	-	μ'_{s1}	-
$\mu_{a2B}(584nm)$	39,5	$0,55 \text{ cm}^{-1}$	-	μ'_{s1}	-
Encre Noire					
$\mu_{a1N}(532nm)$	91,4	$0,60 \text{ cm}^{-1}$	$\mu'_{s1}/\mu'_{s2}/\mu'_{s3}/\mu'_{s4}$	-	
$\mu_{a2N}(532nm)$	91,4	$0,95 \text{ cm}^{-1}$	$\mu'_{s1}/\mu'_{s2}/\mu'_{s3}/\mu'_{s4}$	-	μ'_{s2}
$\mu_{a3N}(532nm)$	91,4	$1,49 \text{ cm}^{-1}$	$\mu'_{s1}/\mu'_{s2}/\mu'_{s3}/\mu'_{s4}$	-	-
$\mu_{a4N}(532nm)$	91,4	$2,00 \text{ cm}^{-1}$	$\mu'_{s1}/\mu'_{s2}/\mu'_{s3}/\mu'_{s4}$	-	μ'_{s2}

Tableau 2-2 : Dilutions à appliquer aux gammes d'éthanol coloré pour obtenir le coefficient d'absorption visé et répartition de ces colorants dans les fantômes monocouches et multicouches avec le coefficient de diffusion réduit associé

De ces quatre mélanges finaux, des volumes précis sont prélevés à l'aide de seringues de contenance 10 ou 5 mL. C'est une façon simple de prélever le PDMS sans générer de nouvelles bulles, sans en laisser sur les parois et ainsi sans erreur de volume. Dans chacun de ces volumes prélevés, on ajoute le volume d'éthanol coloré permettant d'atteindre le coefficient d'absorption visé avec une pipette 10-100 μL . Pour cela, on se réfère au Tableau 2-2 indiquant le rapport volumique $\frac{V_{PDMS}}{V_{Ethanol}}$ pour atteindre le μ_a visé. Ce tableau indique aussi que l'encre noire est utilisée dans la gamme de fantômes monocouches pour générer plusieurs couples (μ_a, μ'_s) , et dans l'épiderme des fantômes multicouches à μ'_{s2} . Le colorant bleu est utilisé uniquement dans le derme des fantômes multicouches à μ'_{s1} .

On mélange la substance finale jusqu'à ce qu'elle soit homogène. Cela génère de nouvelles bulles. Les différents gels obtenus sont versés dans les moules préalablement choisis pour donner la forme finale aux fantômes. Pour notre part, des boîtes de culture cellulaire (Figure 2-9) sont utilisées pour mouler le derme des fantômes tricouches et des plaques 6 puits (Figure 2-10) sont utilisées pour mouler la gamme de fantômes monocouches.



Figure 2-9 : Boîte de culture cellulaire (FALCON) utilisée pour mouler les dermes des fantômes multicouches

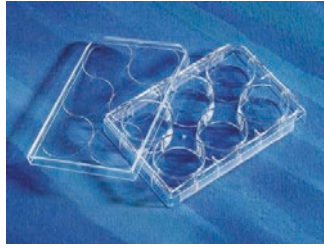


Figure 2-10 : Plaque 6 puits (VWR) utilisée pour mouler les fantômes monocouches

Puis tous ces objets sont placés dans une cloche à vide pendant 40 minutes pour évacuer les dernières bulles d'air. Enfin, le recuit est assuré en étuve à 85°C pendant environ 3 heures. Nous évitons ainsi une éventuelle sédimentation du TiO₂ dans le PDMS engendré par un processus de réticulation lent (2 jours à température ambiante).

2.4.2 Obtention d'un fantôme multicouche

Pour obtenir un fantôme multicouche conforme à la Figure 2-11, l'étape de dépôt est revue et précisée (Figure 2-12).

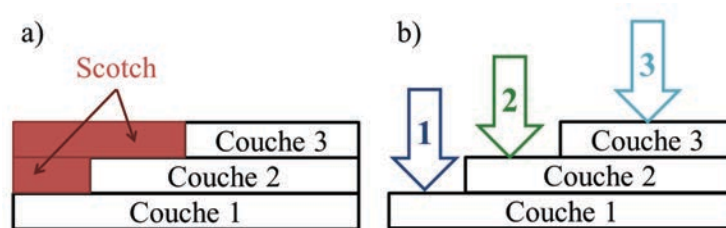


Figure 2-11 : a) Protection des surfaces avec du scotch avant traitement de surface et dépôt b) Positions des points de mesures après élimination du scotch

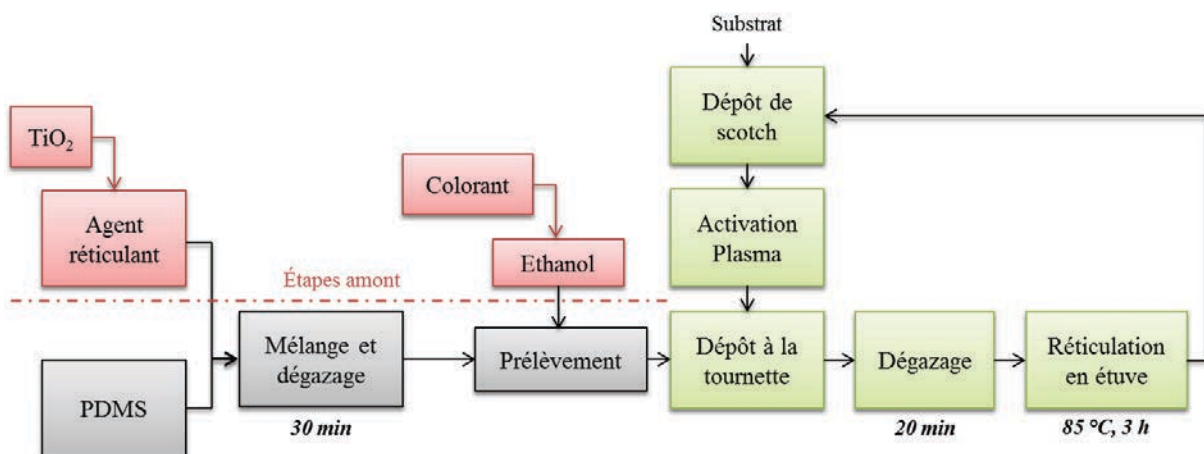


Figure 2-12 : Étapes de fabrication d'un fantôme homogène tricouche

1. Un substrat est choisi pour élaborer la première couche. Ici, ce sera un fantôme de PDMS moulé dans une boîte de culture cellulaire de 2 mm d'épaisseur (correspondant à la couche

du derme) mais cela pourrait être une lame de Silicium (objet bicouche utilisé au paragraphe 1.5.1) ou de verre.

2. Du scotch (Kapton) est collé sur une petite surface du substrat pour pouvoir éliminer une partie de la couche nouvellement déposée après recuit. Cela permet de laisser "libre" une partie de la surface du substrat pour des mesures comparées entre des zones mono-, bi- et tri-couches (Figure 2-11).
3. Le substrat ainsi préparé subit un traitement plasma oxygéné pour "activer" sa surface (Figure 2-13). Ceci le rend hydrophile pour une dizaine de minutes et permet d'y déposer une nouvelle couche de PDMS avec adhésion chimique.
4. Le substrat est placé dans une tournette (voir Figure 2-14). Sa vitesse de rotation est paramétrée à 600 rpm pour la couche représentative de l'épiderme et à 3000 rpm pour la couche représentative du *stratum corneum*, donnant respectivement une épaisseur de PDMS déposée de 80 μm et 20 μm . Ces vitesses ont été déterminées au préalable après dépôt de PDMS sur des lames de Silicium à différentes vitesses de rotation et une mesure au palpeur de l'épaisseur des couches déposées.
5. L'ensemble formé du substrat et de la couche déposée est placé dans une cloche à vide pendant 20 minutes.
6. Le recuit est effectué en étuve à 85°C pendant environ 3 heures.

Ces étapes sont répétées pour le dépôt de la couche mimant la couche cornée et peuvent être renouvelées jusqu'à atteindre le nombre de couches souhaité.

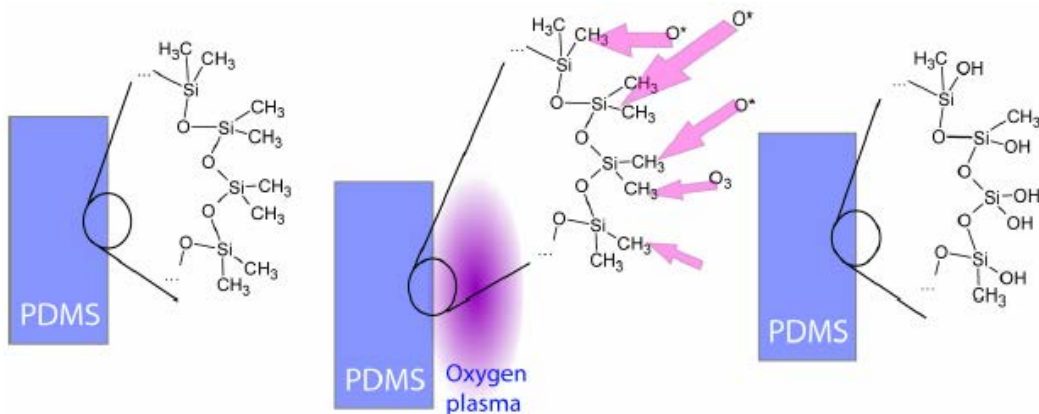


Figure 2-13 : Traitement plasma du PDMS et "activation" de sa surface (Ainla)



Figure 2-14 : Tournette ou spin coater servant au dépôt d'une couche de PDMS d'épaisseur contrôlée

2.4.3 Contrôle par microtomographie à rayons X

Les fantômes ont été imagés par microtomographie à rayons X (ou microCT pour *micro-Computed Tomography*) avec le système VivaCT 40 (SCANCO Medical) (Figure 2-15). L'idée était d'utiliser cette technique pour mettre en évidence d'éventuels défauts dans le cœur des fantômes fabriqués. Nous avons donc imagé des fantômes réalisés volontairement avec des défauts : agrégats de TiO_2 sédimentés en fond de fantômes et bulles d'air liées à l'ajout d'une quantité trop importante d'éthanol. Pour comparaison, des fantômes réalisés en suivant le protocole décrit au paragraphe 2.4.1 ont aussi été analysés pour vérifier qu'ils n'ont aucun de ces défauts.

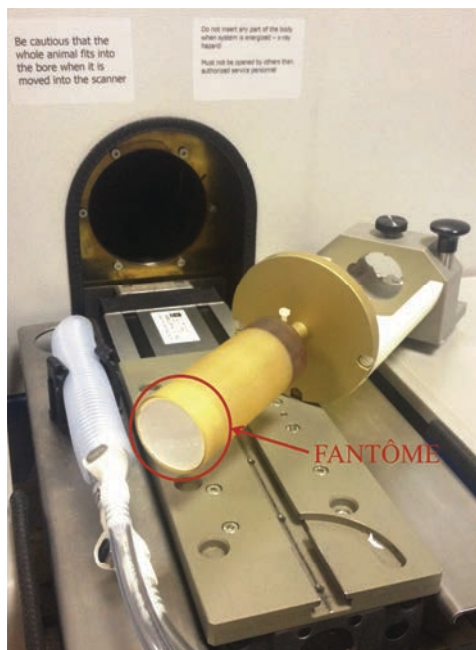


Figure 2-15 : Mise en place d'un fantôme dans le chariot du VivaCT 40

Le VivaCT a été paramétré de façon à obtenir une résolution dite "moyenne" : taille de voxel isotrope de 80 μm , tension de 55 kV et courant de 145 mA. Les résultats sont présentés en Figure 2-16 pour deux fantômes représentatifs des catégories "avec" et "sans" défaut.

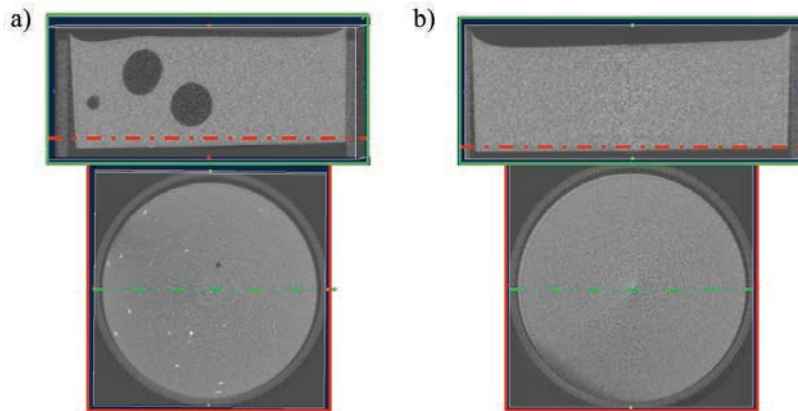


Figure 2-16 : a) Coupes longitudinale (vert) et transversale (rouge) d'un fantôme contenant des bulles d'air et des agrégats de TiO_2 obtenue par microtomographie à rayons X; b) Coupes longitudinale (vert) et transversale (rouge) d'un fantôme sans défaut notable obtenues par microtomographie à rayons X

Sur une échelle de gris, les zones noires correspondent à l'absence de matière ou de la matière n'absorbant pas les rayons X, alors que le blanc correspond à de la matière absorbant très fortement les rayons X. Sur la Figure 2-16a), les gros pois foncés indiquent donc la présence de bulles d'air, et les petits points blancs visibles sur la coupe transversale de fond de fantôme correspondent à des agrégats de TiO_2 . Etant donnée la résolution de l'image, on en déduit que ces agrégats ont un volume supérieur à 80 μm^3 . Il est donc normal qu'ils aient sédimenté et qu'ils ne soient visibles qu'en fond de fantôme. En comparaison, la Figure 2-16b) est représentative des images obtenues sur les fantômes réalisés avec le protocole décrit au paragraphe 2.4.1. Ces fantômes sont donc dépourvus de bulles d'air et d'agrégats de dimension supérieure à 80 μm de diamètre.

Nous avons aussi réalisé des images à "haute résolution" (taille de voxel isotrope de 10 μm , tension de 70 kV et courant de 114 mA) sur les fantômes tricouches afin de visualiser les sauts de marche entre les différentes couches (voir Figure 2-17) et d'évaluer leur épaisseur (à 10 μm près). Pour cela, on trace les profils de niveau de gris obtenus en 3 positions clés du fantôme sur une coupe longitudinale où les trois couches sont visibles (Figure 2-18). Les zones sans matière ont un niveau de gris à environ 250, et les zones dans la matière ont un niveau de gris d'environ 100. Ainsi, les positions des "sauts de gris" entre ces deux niveaux correspondent aux interfaces air/matière. L'épaisseur de la première couche déposée (couche 2) est évaluée à environ 150 μm et celle de la couche superficielle (couche 3) à une cinquantaine de microns. Ces valeurs sont supérieures d'un facteur 2 par rapport à celles visées (paragraphe 2.4.2). Il faudrait augmenter la statistique des profils de niveaux de gris sur les fantômes pour vérifier si cette tendance est uniforme et conservée sur l'ensemble des fantômes. Un ajustement de la vitesse de rotation de la tournette en phase de dépôt pourrait alors être envisagé.

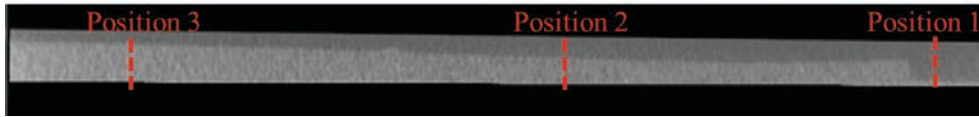


Figure 2-17 : Coupe longitudinale d'un fantôme tricouche

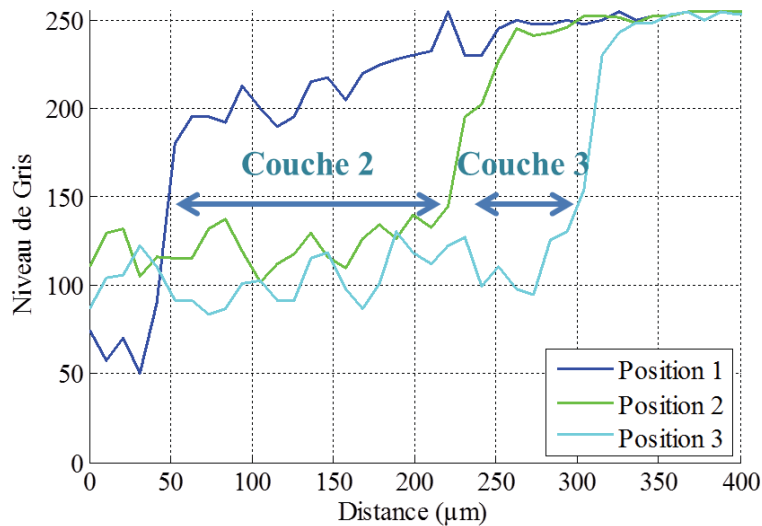


Figure 2-18 : Profils de niveaux de gris obtenus sur fantômes tricouches aux trois positions désignées en Figure 2-17

2.4.4 Récapitulatif des fantômes fabriqués

Nous pouvons maintenant faire une synthèse des fantômes effectivement fabriqués. On note e l'épaisseur de couche, μ_a et μ'_s les coefficients d'absorption et diffusion visés.

Coefficients de diffusion réduits visés	Coefficients d'absorption visés avec l'encre noire	Coefficients d'absorption visés avec le colorant bleu
$\mu'_{s1}(532\text{ nm}) = 20\text{ cm}^{-1}$	$\mu_{a1N}(532\text{ nm}) = 0,60\text{ cm}^{-1}$	$\mu_{a1B}(584\text{ nm}) = 0,28\text{ cm}^{-1}$
$\mu'_{s2}(532\text{ nm}) = 35\text{ cm}^{-1}$	$\mu_{a2N}(532\text{ nm}) = 0,95\text{ cm}^{-1}$	$\mu_{a2B}(584\text{ nm}) = 0,55\text{ cm}^{-1}$
$\mu'_{s3}(532\text{ nm}) = 70\text{ cm}^{-1}$	$\mu_{a3N}(532\text{ nm}) = 1,49\text{ cm}^{-1}$	
$\mu'_{s4}(532\text{ nm}) = 90\text{ cm}^{-1}$	$\mu_{a4N}(532\text{ nm}) = 2,00\text{ cm}^{-1}$	
	$\mu_{a0}(532\text{ nm}) = 0,00\text{ cm}^{-1}$	

Tableau 2-3 : Tableau récapitulatif des coefficients de diffusion réduits et d'absorption visés dans les fantômes fabriqués

Fantômes monocouches avec $e \geq 1\text{ cm}$

Toutes les combinaisons possibles entre $\mu'_{s1} < \mu'_{s2} < \mu'_{s3} < \mu'_{s4}$ et $\mu_{a0} < \mu_{a1N} < \mu_{a2N} < \mu_{a3N} < \mu_{a4N}$ ont été réalisées, ce qui comptabilise 20 fantômes monocouches formant quatre gammes sur l'encre noire. La gamme à μ'_{s2} est présentée en Figure 2-19.



Figure 2-19 : Gamme de fantômes à μ'_{s2} avec, de gauche à droite, μ_a décroissant

Fantômes tricouches

Nom	Couche 1, $e \geq 2 \text{ mm}$		Couche 2, $e \cong 80 \mu\text{m}$		Couche 3, $e \cong 20 \mu\text{m}$	
	μ'_{s1}	μ_a	μ'_{s2}	μ_a	μ'_{s3}	μ_a
A	μ'_{s1}	μ_{a0}	μ'_{s2}	μ_{a0}	μ'_{s3}	μ_{a0}
B	μ'_{s1}	μ_{a2B}	μ'_{s2}	μ_{a2N}	μ'_{s3}	μ_{a0}
C	μ'_{s1}	μ_{a2B}	μ'_{s2}	μ_{a2N}	μ'_{s4}	μ_{a0}
D	μ'_{s1}	μ_{a2B}	μ'_{s2}	μ_{a4N}	μ'_{s3}	μ_{a0}
E	μ'_{s1}	μ_{a2B}	μ'_{s2}	μ_{a4N}	μ'_{s4}	μ_{a0}
F	μ'_{s1}	μ_{a1B}	μ'_{s2}	μ_{a2N}	μ'_{s3}	μ_{a0}
G	μ'_{s1}	μ_{a1B}	μ'_{s2}	μ_{a2N}	μ'_{s4}	μ_{a0}
H	μ'_{s1}	μ_{a1B}	μ'_{s2}	μ_{a4N}	μ'_{s3}	μ_{a0}
I	μ'_{s1}	μ_{a1B}	μ'_{s2}	μ_{a4N}	μ'_{s4}	μ_{a0}

Tableau 2-4 : Tableau récapitulatifs des fantômes tricouches fabriqués

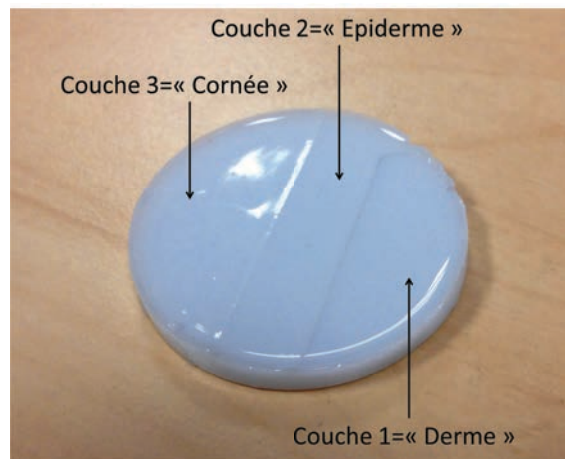


Figure 2-20 : Exemple de fantôme tricouche fabriqué

2.5 Résumé

Dans ce chapitre, nous avons décrit un protocole de fabrication de fantômes solides, aux propriétés d'absorption et de diffusion ajustables. Le protocole inclut le développement de fantômes multicouches aux épaisseurs de couches contrôlables.

Une imagerie de ces fantômes par microtomographie à rayons X a permis de vérifier qu'ils étaient exempts de bulles d'air, et que, si des agrégats de TiO_2 étaient présents, ils se localisaient en fond de fantômes et ne seraient donc pas gênants pour une mesure en surface.

Ils seront utilisés dans l'ensemble des chapitres qui suivent, notamment après la caractérisation de leurs propriétés optiques par DRS.

Chapitre 3 : Développements sur la technologie DRS du LISA

La première partie de ce chapitre présente l'instrumentation de Spectroscopie de Réflectance Diffuse résolue spatialement développée au LISA en amont de ce travail de thèse. Dans la deuxième partie, nous verrons une modification apportée au processus d'extraction des coefficients d'absorption et de diffusion améliorant leur estimation. Les résultats de caractérisation par la DRS des fantômes monocouches développés au Chapitre 2 sont décrits dans la dernière partie de ce chapitre.

3.1 Instrumentation existante

3.1.1 Système

Le schéma du banc de spectroscopie de réflectance diffuse développé au LISA est illustré en Figure 3-1. Son installation, telle que mise en œuvre pour des études cliniques, est présentée en Figure 3-2. Le système est composé d'une source de lumière blanche fibrée (lampe tungstène-halogène HL2000, Ocean Optics), d'une sonde fibrée servant à l'illumination du tissu et à la collection de la lumière rétrodiffusée, d'un spectrophotomètre fibré refroidi (QE65000, Ocean Optics) pour l'acquisition de ce signal et d'un ordinateur pour le contrôle-commande de l'instrument et le traitement des données. Dans son ensemble, le système d'acquisition a été conçu pour permettre l'acquisition de données en temps réel avec un instrument peu coûteux, transportable et ergonomique.

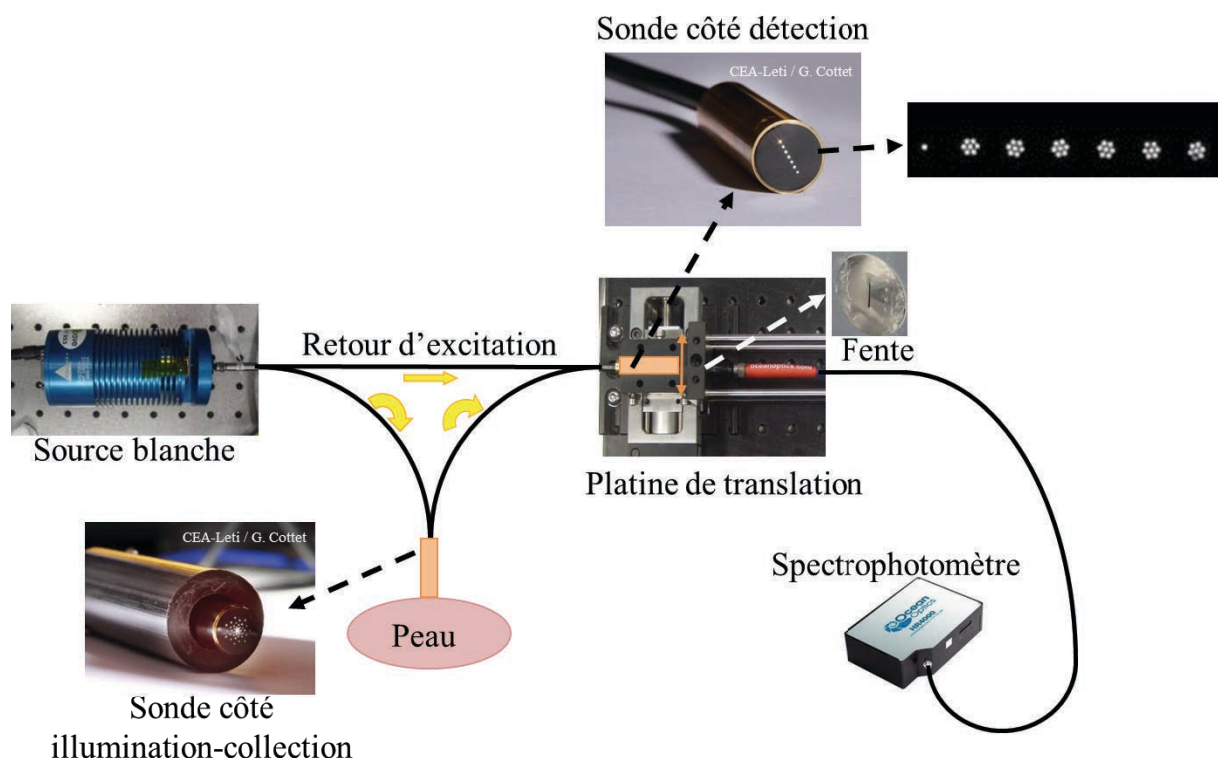


Figure 3-1 Schéma de principe du banc de spectroscopie.



Figure 3-2 Photo du système en situation d'utilisation.

La sonde fibrée possède deux extrémités. L'embout destiné à être posé sur la peau du patient est constitué d'une fibre d'illumination centrale de $480\ \mu\text{m}$ de diamètre de cœur et d'un réseau de fibres de $130\ \mu\text{m}$ de diamètre de cœur disposées en anneaux concentriques pour collecter les photons rétrodiffusés. Cet agencement des fibres de collection génère six distances source-détecteur (voir Figure 3-3 à gauche). On réalise de cette manière de la DRS résolue spatialement : les fibres disposées sur un même cercle sont regroupées pour former un bundle de fibres. L'extrémité de la sonde côté détection (vers le spectrophotomètre) est alors composée de six bundles de fibres correspondant aux six distances source-détecteur (voir Figure 3-3 à droite) et d'une fibre unitaire provenant directement de la source blanche que nous dénommons *retour d'excitation*. La fibre d'entrée du spectrophotomètre est déplacée séquentiellement devant chacun de ces bundles grâce à une platine de translation motorisée pour l'acquisition des signaux.

Dans la suite du manuscrit, nous notons **Fibre i** une distance source-détecteur de ce système avec :

- $0 \leq i \leq 6$;
- $i = 0$ correspond à la fibre du retour d'excitation;
- $i = 1$ correspond à l'anneau de fibres de collection le plus proche de la fibre d'illumination;
- $i = 6$ correspond à l'anneau de fibres de collection le plus éloigné de la fibre d'illumination.

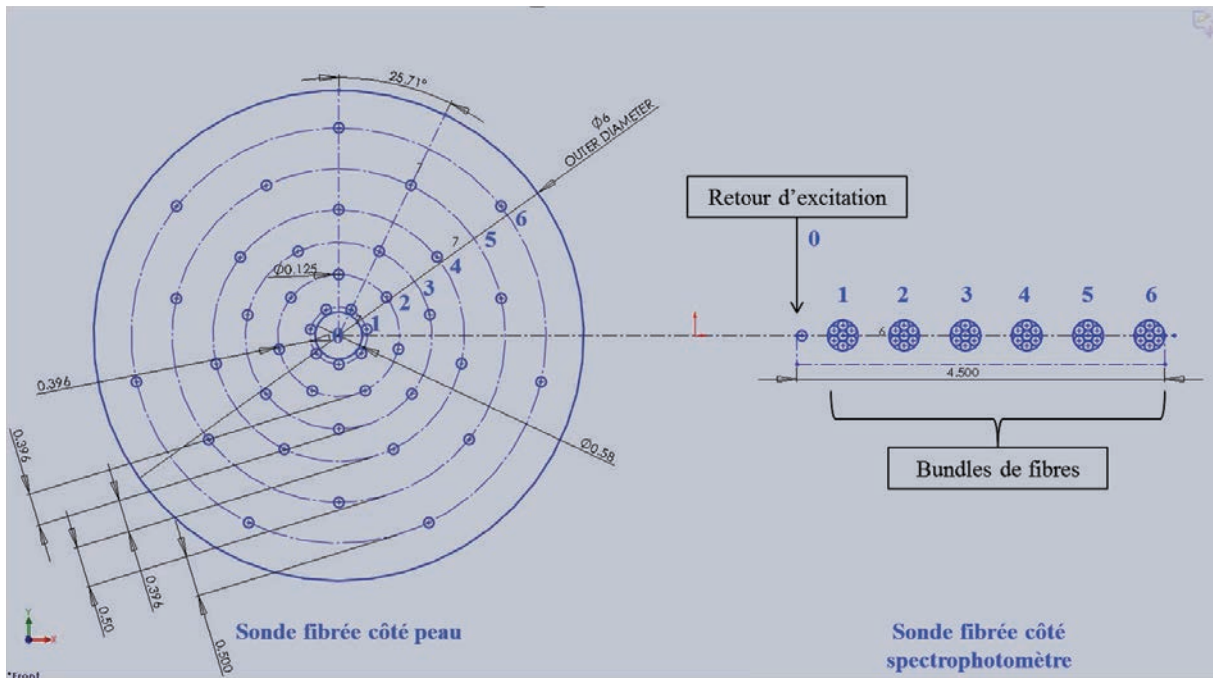


Figure 3-3 Géométrie des extrémités de la sonde fibrée (côté peau à gauche, côté spectrophotomètre à droite).

3.1.2 Ordre de grandeur de la profondeur sondée

Simulations Monte Carlo

La profondeur de peau sondée par chacune des distances source-détecteur du système est estimée grâce à des simulations Monte Carlo 3D. L'algorithme en question a été développé au LISA et est succinctement décrit en Annexe 1. À l'issue de ces simulations, les trajectoires des photons détectés par chaque fibre sont enregistrées. À titre d'exemple, nous simulons la propagation des photons dans un milieu représentatif de la peau avec les propriétés optiques suivantes :

- $n = 1,4$ pour l'indice de réfraction du milieu de propagation des photons, similaire à celui de la peau;
- $g = 0,8$ pour le coefficient d'anisotropie, similaire à celui de la peau;
- $\mu_a = 2 \text{ cm}^{-1}$;
- $\mu_s = 150 \text{ cm}^{-1}$;

$N = 2 \times 10^6$ photons ont été simulés, c'est-à-dire qu'on effectue, pour chaque simulation, un tirage aléatoire de 2×10^6 photons.

Pour une comparaison directe, ce même milieu sera utilisé au Chapitre 4 pour évaluer la profondeur sondée par la Micro-DRS.

Résultats

Dans la Figure 3-4, pour chaque distance source-détecteur, une projection 2D des trajectoires des photons est affichée avec une résolution de $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$. L'objectif est de mettre en valeur les trajectoires privilégiées des photons dans le milieu (zone de plus grande densité de

photons) pour chacune des configurations de collection. Conformément à la Figure 1-24, on distingue une forme de banane pour les zones de plus forte densité de photons. C'est en particulier bien visible pour la fibre $i = 3$.

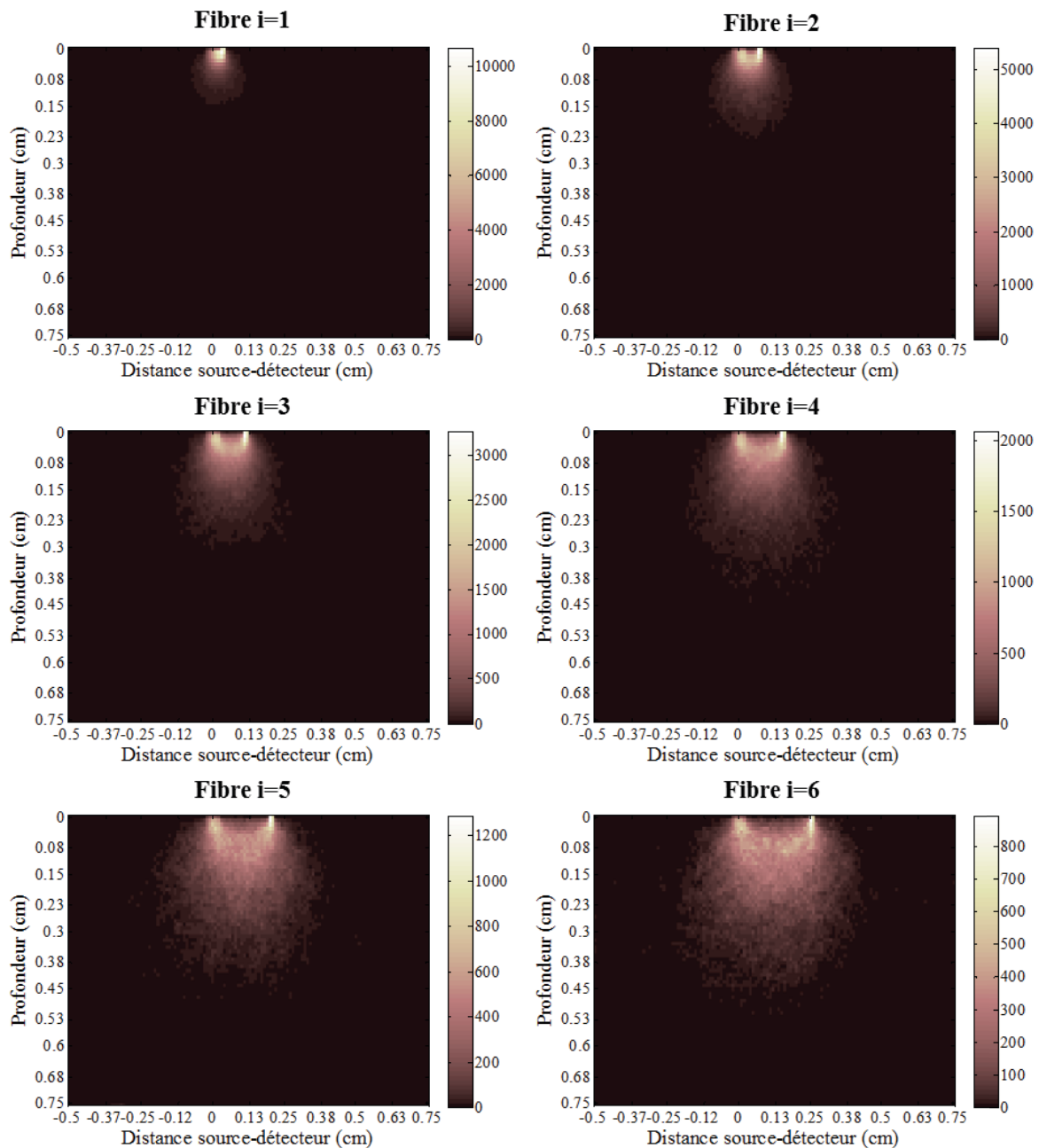


Figure 3-4 : Répartition 2D de la densité de photons dans le milieu en nombre de photons. Le nombre totale de photons simulés est $N = 2 \times 10^6$

À partir de ces vues 2D, une projection 1D selon l'axe orthogonal à la surface du milieu est mise en œuvre. Plus précisément, les profils d'intensité lumineuse en fonction de la profondeur sont construits en calculant la somme des photons détectés sur une même coordonnée axiale. Ils sont ensuite normalisés par rapport au maximum du signal détecté (Figure 3-5).

Nous appelons "profondeur privilégiée" la coordonnée axiale où la probabilité qu'un photon l'atteigne est maximale. Cela correspond aux profondeurs pour lesquelles l'intensité normalisée est maximale sur la Figure 3-5. Et nous appelons "profondeur maximale sondée" la coordonnée axiale d'intensité normalisée égale à 0,2. Cette définition est arbitraire. Pour autant, la soustraction de ce paramètre à la "profondeur privilégiée" peut donner un ordre de grandeur de la résolution axiale d'un couple source-détecteur. Nous donnons les valeurs de ces quantités pour chaque fibre dans le Tableau 3-1.

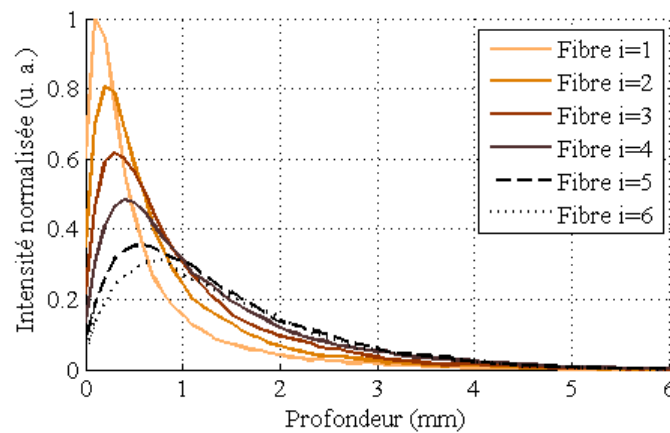


Figure 3-5 : Profils d'intensité lumineuse en fonction de la profondeur

Fibre	Profondeur privilégiée (mm)	Profondeur maximale sondée (mm)	Résolution axiale (mm)
$i = 1$	0,1	0,8	0,7
$i = 2$	0,2	1,1	0,9
$i = 3$	0,3	1,3	1,0
$i = 4$	0,4	1,5	0,9
$i = 5$	0,6	1,6	1,0
$i = 6$	0,8	1,6	0,8

Tableau 3-1 : Valeur des profondeurs privilégiées et maximales sondées pour chaque distance source-détecteur simulée

Nous retiendrons que la profondeur maximale sondée dans ce milieu par la DRS est d'environ 1,5 mm. C'est évidemment un ordre de grandeur, nous ne cherchons pas à être plus précis car cette valeur peut varier *in situ* étant donnée la variabilité des propriétés optiques de la peau d'un individu à un autre. Ce travail a permis de construire un point de comparaison pour le développement de la Micro-DRS comme nous le verrons au Chapitre 4.

3.1.3 Traitement des données

Nous décrivons dans ce paragraphe les étapes permettant de calculer les propriétés optiques d'un échantillon à analyser à partir des intensités mesurées sur chacune des sept fibres.

Conversion de l'intensité lumineuse en unité de réflectance

On note $I^i(\lambda)$ l'intensité mesurée sur la $i^{\text{ème}}$ fibre de collection pendant le temps d'intégration $TI(i)$ à la longueur d'onde λ

L'objectif est de convertir ces intensités mesurées en signaux de réflectance indépendamment de la fonction de transfert de chacun des éléments optiques du système. Pour cela, on calcule d'abord l'intensité prétraitée pour chacune des fibres en leur soustrayant l'*offset* du spectromètre (mesure du noir) et en normalisant par le temps d'intégration:

$$\forall \lambda, \forall i \in [0,6], I_p^i(\lambda) = \frac{I^i(\lambda) - \text{offset}(\lambda)}{TI(i)} \quad (3-1)$$

L'étape suivante consiste à diviser l'intensité prétraitée de chacune des fibres de collection par l'intensité prétraitée du retour d'excitation. Cela permet de normaliser les signaux par rapport à la réponse du détecteur et par rapport à la caractéristique d'émission de la source en fonction de λ . On obtient les signaux de réflectance suivants :

$$\forall \lambda, \forall i \in [1,6], R^i(\lambda) = \frac{I_p^i(\lambda)}{I_p^0(\lambda)} \quad (3-2)$$

Nous avons conscience que la quantité $R^i(\lambda)$ n'est pas une réflectance exacte. D'une part, l'intensité lumineuse incidente à l'échantillon n'est pas mesurée car nous n'en prenons que la caractéristique spectrale grâce au retour d'excitation. D'autre part, ces deux étapes ne tiennent pas encore compte de la réponse spectrale des fibres et des différences qui peuvent exister d'une fibre à l'autre. Elles ont cependant été caractérisées et leur réponse est considérée comme uniforme et très peu dépendante de la longueur d'onde.

Bien qu'inexacte, l'étape d'étalonnage avant extraction des propriétés optiques permet de s'affranchir des biais éventuels générés par ces deux derniers points et de constituer un signal de réflectance indépendant de la réponse optique des éléments du système. Nous le verrons dans ce qui suit. Cette faiblesse de la procédure de prétraitement est compensée par l'utilisation des fantômes qui permettent de comparer exactement les mesures obtenues avec des sondes de réponses différentes.

Extraction des propriétés optiques

Afin d'extraire les coefficients d'absorption et de diffusion d'un échantillon analysé par la sonde de DRS, nous employons la méthode par comparaison à une base de données (voir paragraphe 1.3.3 page 46) avec un étalonnage sur un fantôme de propriétés optiques connues (voir paragraphe 1.3.3 page 45).

Nous appelons LUT (*Look-Up Table*) la base de données en question construite par simulations Monte Carlo 2D. Cet algorithme est décrit en Annexe 2. Telle que nous l'utilisons, la LUT donne le nombre de photons détectés (pour N photons simulés) aux six distances de mesure R_{LUT}^i (voir Figure 3-6) avec les paramètres suivants :

- $n = 1,4$ pour l'indice de réfraction du milieu de propagation des photons, similaire à celui de la peau;

- $g = 0,8$ pour le coefficient d'anisotropie, similaire à celui de la peau;
- μ_a varie de $0,05 \text{ cm}^{-1}$ à $9,95 \text{ cm}^{-1}$ avec un pas de $0,02 \text{ cm}^{-1}$;
- μ_s varie de 10 cm^{-1} à 400 cm^{-1} avec un pas de 2 cm^{-1} ;
- $N = 5 \times 10^5$ photons simulés suffisent ici pour avoir des résultats statistiquement reproductibles.

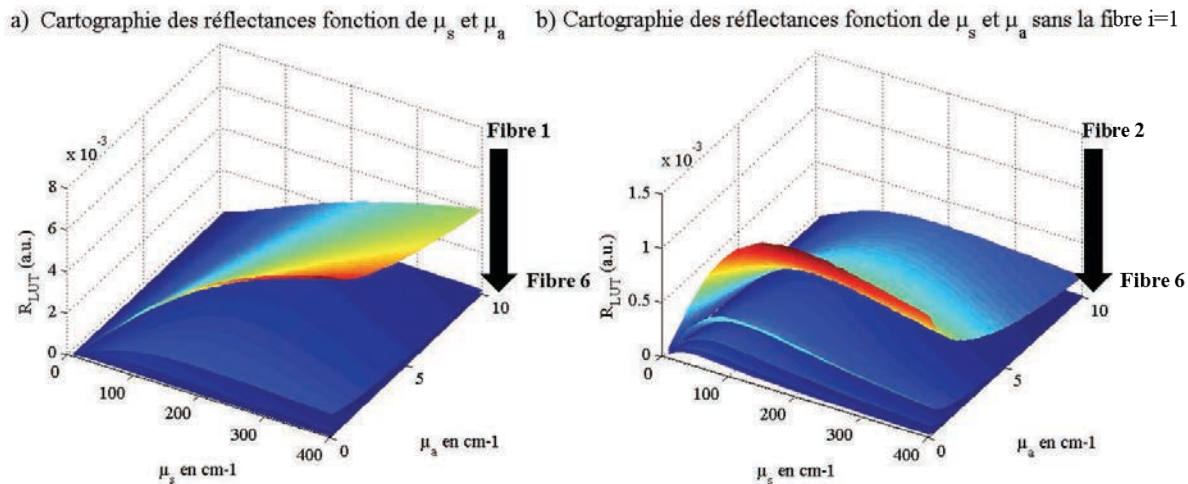


Figure 3-6 Cartographie des réflectances obtenues par des simulations Monte Carlo a) sur les fibres $i=1$ à 6 b) sur les fibres $i=2$ à 6 pour différents μ_s et μ_a , g restant fixé à 0,8.

Notre méthode consiste à rechercher, pour chaque longueur d'onde λ , le couple (μ_a, μ_s) donnant $R_{LUT}^i(\mu_a, \mu_s) \approx R_{inc}^i(\lambda), \forall i \in [1,6]$ où R_{inc}^i est la valeur de réflectance (Equation (3-2)) obtenue sur l'échantillon de propriétés optiques inconnues par la $i^{ème}$ fibre de collection. Nous considérons donc *a priori* que l'échantillon à analyser possède un indice de réfraction de 1,4 et un coefficient d'anisotropie de 0,8, ce qui est tout à fait représentatif d'un échantillon biologique sur la région spectrale 400-800 nm.

Etalonnage

Nous avons pour habitude d'utiliser un fantôme d'Intralipide concentré à 1% et dopé à l'encre noire de façon à obtenir un coefficient d'absorption compris entre $0,2$ et $0,4 \text{ cm}^{-1}$ à $\lambda=600 \text{ nm}$. La concentration d'Intralipide règle le coefficient de diffusion réduit du fantôme. Nous affichons en Figure 3-7 le spectre de diffusion théorique de l'Intralipide 1 % d'après van Staveren et al. (van Staveren, et al. 1991). Nous appelons "fantôme de référence" le fantôme utilisé dans cette étape d'étalonnage.

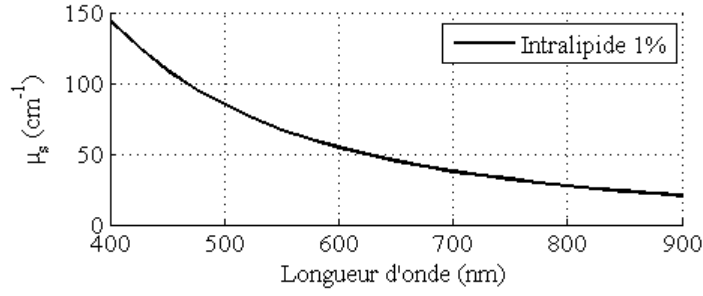


Figure 3-7 Spectre de diffusion de l'Intralipide 1% calculé à partir de l'expression empirique de van Staveren et al. (van Staveren, et al. 1991)

On note R_{ref}^i la valeur de réflectance (équation (3-2)) obtenue par la mesure sur fantôme de référence. Pour étalonner l'instrument et s'affranchir des fonctions de transfert de chacun de ses constituants, nous utilisons la LUT préalablement construite et nous calculons :

$$\forall \lambda, \forall i \in [1,6], R_{inc,calib}^i(\lambda) = R_{inc}^i(\lambda) \times \frac{R_{LUT}^i(\mu_a(\lambda), \mu_s(\lambda))_{ref}}{R_{ref}^i(\lambda)} \quad (3-3)$$

avec $(\mu_a(\lambda), \mu_s(\lambda))_{ref}$ la valeur théorique des propriétés optiques du fantôme de référence à la longueur d'onde λ considérée.

Algorithme de minimisation

La dernière étape de calcul des propriétés optiques de l'échantillon inconnu consiste à rechercher, pour chaque longueur d'onde λ , le couple $(\mu_{a,inc}, \mu_{s,inc})$ donnant $R_{LUT}^i(\mu_{a,inc}, \mu_{s,inc}) \approx R_{inc,calib}^i(\lambda), \forall i \in [1,6]$. Cette étape est décomposée en deux temps :

1. Recherche de $\mu_{s,inc}$

Pour chaque longueur d'onde λ , l'algorithme développé minimise par la méthode des moindres carrés la quantité :

$$Diff_{norm}^{\mu_s}(\lambda) = \sqrt{\sum_{i=1}^4 (Diff^i(\lambda))^2} \quad (3-4)$$

où $Diff^i(\lambda) = R_{LUT}^i(\mu_a, \mu_s) - R_{inc,calib}^i(\lambda)$.

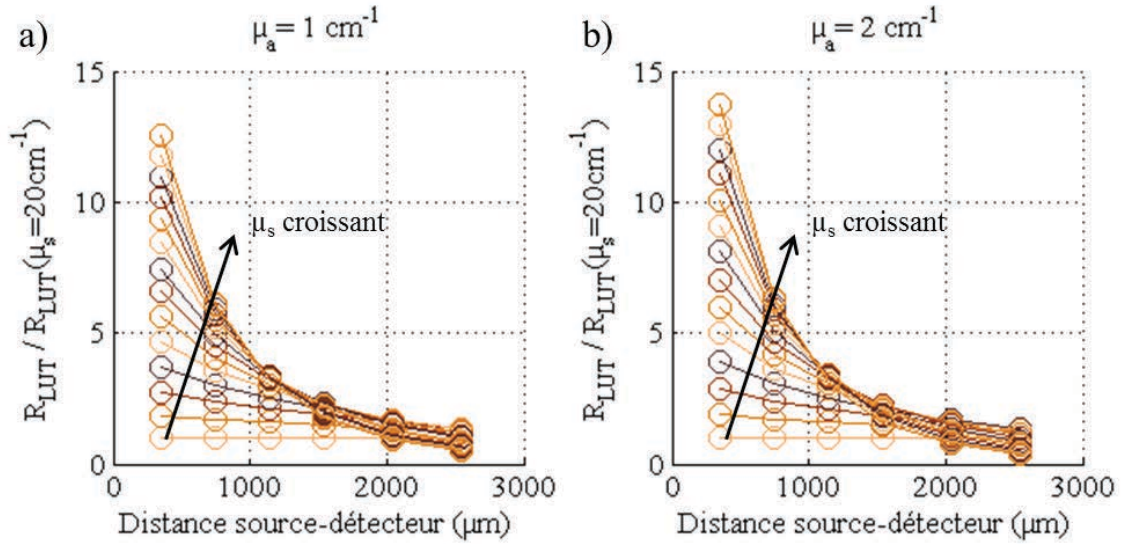


Figure 3-8 : Courbes de réflectance diffuse issues de la LUT et normalisées par $R_{LUT}^i(\mu_a, \mu_s = 20 \text{ cm}^{-1})$ en fonction de la distance-source-détecteur pour les six distances de collection du système. μ_s croît de 20 cm^{-1} à 150 cm^{-1} avec un pas de 10 cm^{-1} . μ_a vaut 1 cm^{-1} (a) et 2 cm^{-1} (b)

$\mu_{s,inc}$ est recherché en ne tenant compte que des fibres 1 à 4 pour des raisons de sensibilité de la méthode. En Figure 3-8, les courbes de réflectance diffuse en fonction de la distance source-détecteur sont affichées. Elles sont normalisées par rapport à la courbe de réflectance de plus faible niveau de signal ($\mu_s = 20 \text{ cm}^{-1}$). À titre d'exemple, elles sont présentées pour deux coefficients d'absorption particuliers mais la tendance est conservée quel que soit μ_a .

On observe ainsi que, dans notre configuration instrumentale, la sensibilité de la DRS au coefficient de diffusion est meilleure pour les distances source-détecteur les plus proches de l'illumination que pour les plus éloignées. En considérant les milieux sondés homogènes en propriétés optiques, cela justifie le choix de calculer le coefficient de diffusion à partir du signal collecté par les fibres 1 à 4.

La valeur de μ_s minimisant $Diff_{norm}^{\mu_s}$ est prise pour $\mu_{s,inc}$. Dans le deuxième temps, on cherche à affiner la valeur de μ_a correspondante.

2. Recherche de $\mu_{a,inc}$ connaissant $\mu_{s,inc}$

Pour chaque longueur d'onde λ , l'algorithme développé minimise par la méthode des moindres carrés la quantité :

$$Diff_{norm}^{\mu_a}(\lambda) = \sqrt{\sum_{i=2}^6 (Diff^i(\lambda))^2} \quad (3-5)$$

où $Diff^i(\lambda) = R_{LUT}^i(\mu_a, \mu_{s,inc}) - R_{inc,calib}^i(\lambda)$.

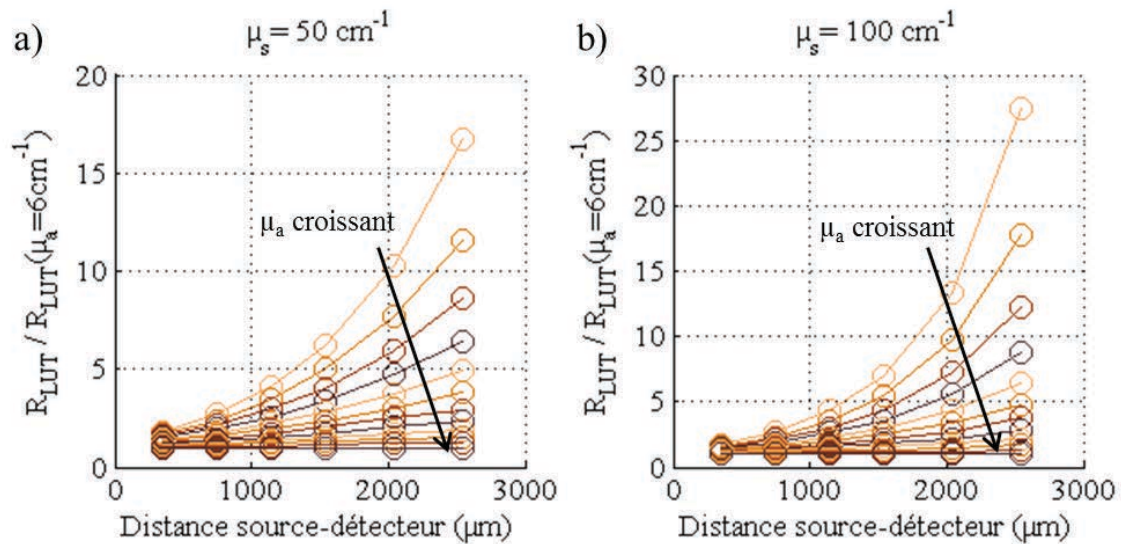


Figure 3-9 : Courbes de réflectance diffuse issues de la LUT et normalisées par R_{LUT}^i à $\mu_a = 6\text{ cm}^{-1}$ en fonction de la distance-source-détecteur pour les six distances de collection du système. μ_a croît de $0,5\text{ cm}^{-1}$ à 6 cm^{-1} avec un pas de $0,5\text{ cm}^{-1}$. μ_s vaut 50 cm^{-1} (a) et 100 cm^{-1} (b)

Là encore, pour des raisons de sensibilité de la méthode, $\mu_{a,inc}$ est recherché sans tenir compte de la fibre 1. Les courbes de réflectance diffuse affichées en Figure 3-9, normalisées par rapport à la courbe de réflectance de plus faible niveau de signal ($\mu_a = 6\text{ cm}^{-1}$), indiquent effectivement une augmentation de la sensibilité de la DRS au coefficient d'absorption avec la distance source-détecteur.

La valeur de μ_a minimisant $Diff_{norm}^{\mu_a}$ est prise pour $\mu_{a,inc}$.

3.1.4 Cas d'étude : le diagnostic de la tuberculose latente

Cette sonde et le traitement des données associé ont à la base été développés pour répondre à un besoin spécifique : lire le "test de Mantoux" (injection intradermique de tuberculine) de façon précoce (18 heures post-injection au lieu des 48 à 72 heures habituelles) par une lecture optique.

Les principaux résultats de cette étude, antérieure à ces travaux de thèse, sont présentés en Annexe 3 de ce rapport.

3.2 Amélioration de la méthode de traitement des données

3.2.1 Principe et simulations

Dans l'approximation de la diffusion, la réflectance d'un milieu dont la diffusion (de coefficient μ_{s0}) est isotrope ($g_0 = 0$) est équivalente à la réflectance d'un milieu dont la diffusion (de coefficient μ_{s1}) anisotrope ($g_1 \neq 0$) est telle que $\mu'_{s1} = \mu_{s1}(1 - g_1) = \mu_{s0}(1 - g_0) = \mu_{s0}$. Nous avons vérifié cette hypothèse à l'aide de simulations Monte Carlo dans le cas de la géométrie de notre sonde fibrée avec les paramètres suivants :

- $n = 1,37$ pour l'indice de réfraction du milieu de propagation des photons;
- μ'_s vaut successivement [10; 20; 30; 50; 80] cm^{-1} ;

- g varie de 0,5 à 0,9 avec un pas de 0,1;
- μ_a vaut successivement [0.05; 0.5; 1; 3; 6; 9] cm^{-1} ;
- $N = 5 \times 10^5$ photons simulés.

Ainsi, nous pouvons comparer les valeurs de réflectance obtenues sur des milieux de coefficients de diffusion réduits μ'_s identiques mais ayant un coefficient d'anisotropie g différent, et ceci sur une large gamme de coefficients d'absorption μ_a .

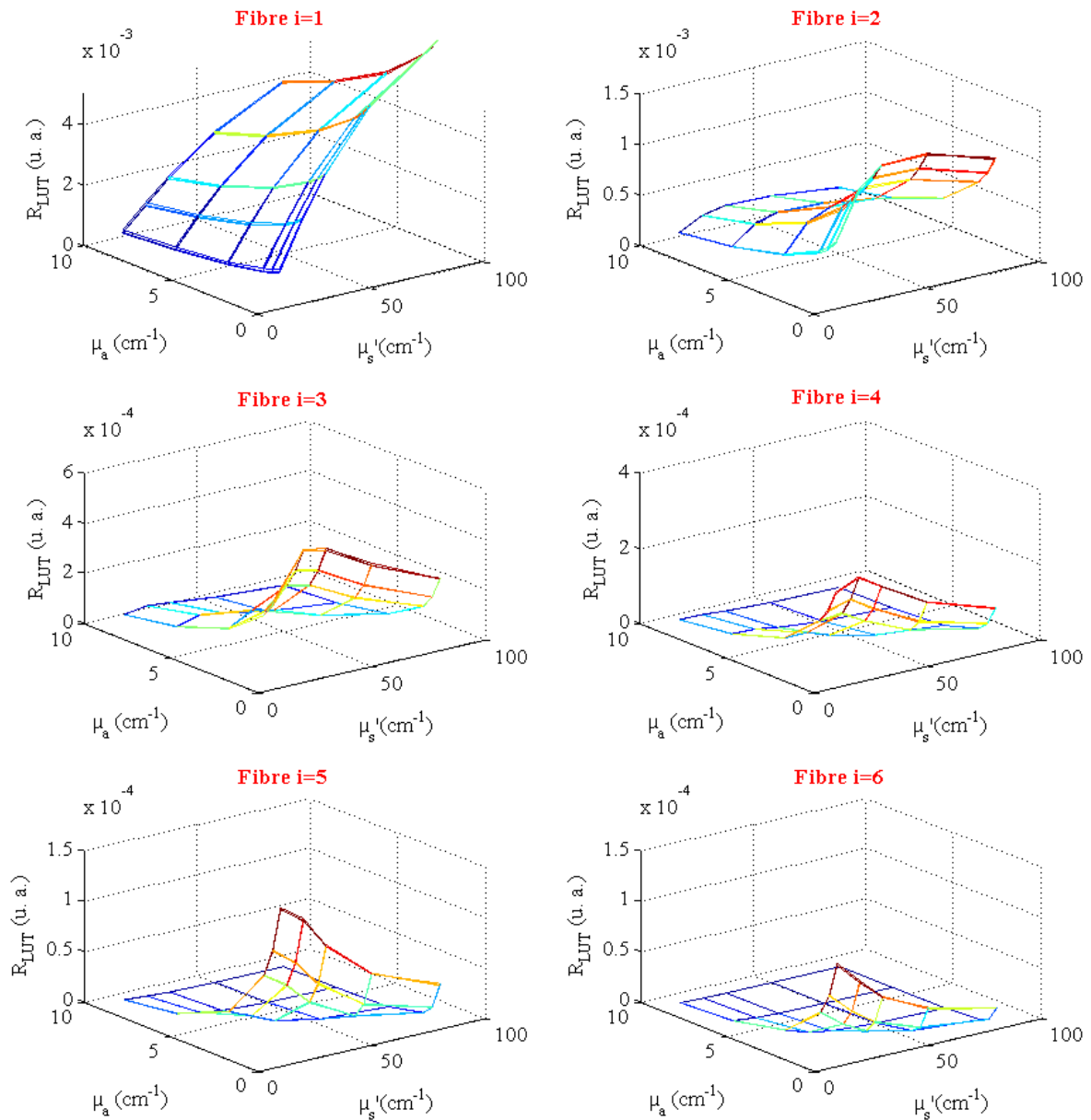


Figure 3-10 Cartographie des réflectances obtenues par des simulations Monte Carlo sur les six fibres de collection pour différentes valeurs de g (g varie de 0,5 à 0,9 avec un pas de 0,1).

Une comparaison quantitative est effectuée en calculant le pourcentage d'erreur qui existe entre les valeurs de réflectance calculées pour $g \neq 0,8$ par rapport aux valeurs de réflectance

calculées pour $g = 0,8$. Hormis les couples (μ_a, μ'_s) ne respectant pas les hypothèses de l'approximation de la diffusion (voir Chapitre 1 paragraphe 1.2.1), l'erreur ne dépasse pas les 5% pour une variation de g de 35%. Nous en concluons que $R(\mu_{a1}, \mu_{s1}, g_1) = R(\mu_{a2}, \mu_{s2}, g_2)$ si $\mu_{s1}(1 - g_1) = \mu_{s2}(1 - g_2)$. Les résultats de simulations concordent donc avec l'approximation de la diffusion.

Les résultats de cette comparaison sont illustrés Figure 3-10 où les nappes de réflectance obtenues pour différentes valeurs de g apparaissent parfaitement superposées.

Plutôt que de supposer $g = 0,8$ quel que soit l'échantillon analysé par la sonde de DRS et de chercher le coefficient de diffusion μ_s , on peut rechercher le coefficient de diffusion réduit μ'_s sans *a priori* sur la valeur du coefficient d'anisotropie. Cela va se caractériser par une meilleure justesse de l'étape d'étalonnage sur fantôme d'Intralipide car son coefficient d'anisotropie varie en fonction de la longueur d'onde λ et est globalement différent de 0,8 (voir Figure 3-11).

Pour l'étape d'étalonnage, l'équation (3-3) est donc revue :

$$\forall \lambda, \forall i \in [1,6], R_{inc,calib}^i(\lambda) = R_{inc}^i(\lambda) \times \frac{R_{LUT}^i(\mu_a(\lambda), \mu'_s(\lambda))_{ref}}{R_{ref}^i(\lambda)} \quad (3-6)$$

avec $(\mu_a(\lambda), \mu'_s(\lambda))_{ref}$ la valeur théorique des propriétés optiques du fantôme de référence à la longueur d'onde λ considérée. Le spectre de diffusion réduit de l'Intralipide 1% est donné Figure 3-12. En conservant le même algorithme de minimisation, on ne recherche plus, pour chaque longueur d'onde λ , le couple $(\mu_{a,inc}, \mu_{s,inc})$ donnant $R_{LUT}^i(\mu_{a,inc}, \mu_{s,inc}) \approx R_{inc,calib}^i(\lambda), \forall i \in [1,6]$. On recherche, pour chaque longueur d'onde λ , le couple $(\mu_{a,inc}, \mu'_{s,inc})$ donnant $R_{LUT}^i(\mu_{a,inc}, \mu'_{s,inc}) \approx R_{inc,calib}^i(\lambda), \forall i \in [1,6]$.

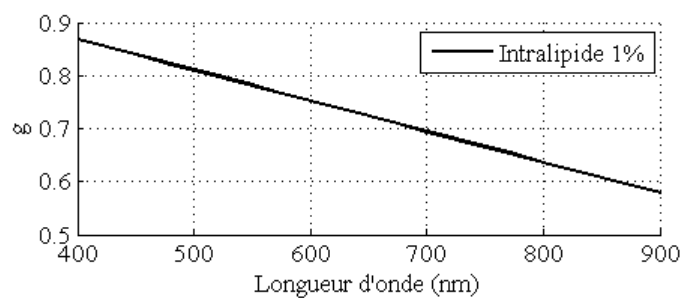


Figure 3-11 Spectre d'anisotropie de l'Intralipide 1% calculé à partir de l'expression empirique de van Staveren et al. (van Staveren, et al. 1991).

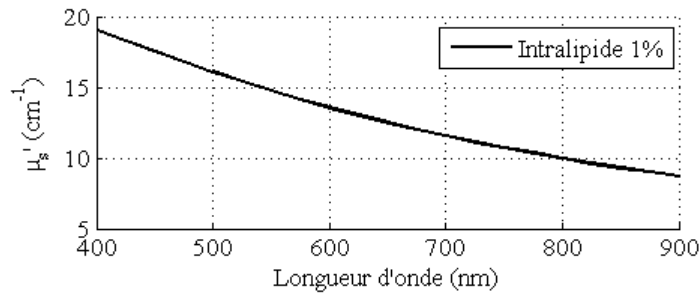


Figure 3-12 Spectre du coefficient de diffusion réduit de l'Intralipide 1% calculé à partir de l'expression empirique de van Staveren et al. (van Staveren, et al. 1991).

3.2.2 Validation sur fantômes liquides

Afin de vérifier et qualifier l'amélioration apportée par ce changement dans le traitement des données, deux gammes de fantômes d'Intralipide ont été fabriquées:

- une gamme de quatre fantômes de diffusion μ_{s2} , correspondant à de l'Intralipide concentré à 1,5%, et d'absorptions $\mu_{a1} < \mu_{a2} < \mu_{a3} < \mu_{a4}$ obtenues par différentes concentrations en encre noire;
- une gamme de quatre fantômes d'absorption μ_{a2} , et de diffusion $\mu_{s1} < \mu_{s2} < \mu_{s3} < \mu_{s4}$ correspondant, respectivement, à de l'Intralipide concentré à 1%, 1,5%, 2% et 3%.

L'objectif est de comparer la justesse de l'extraction des propriétés optiques entre l'ancienne méthode (décrite en paragraphe 3.1.3) et la nouvelle méthode (décrite au paragraphe 3.2.1).

La première gamme de fantômes, construite avec un niveau de diffusion constant et un niveau d'absorption variable, est traitée en prenant le fantôme (μ_{a1}, μ_{s2}) comme référence dans l'étape d'étalonnage. Les résultats d'extraction de cette gamme sont présentés Figure 3-13 ainsi que l'erreur entraînée sur l'estimation de la diffusion par rapport à la courbe théorique en Figure 3-15.

La deuxième gamme de fantômes, construite avec un niveau de diffusion variable et un niveau d'absorption constant, est traitée en prenant le fantôme (μ_{a2}, μ_{s1}) comme référence dans l'étape d'étalonnage. Les résultats d'extraction de cette gamme sont présentés Figure 3-16 ainsi que l'erreur entraînée sur l'estimation de la diffusion par rapport à la courbe théorique en Figure 3-17.

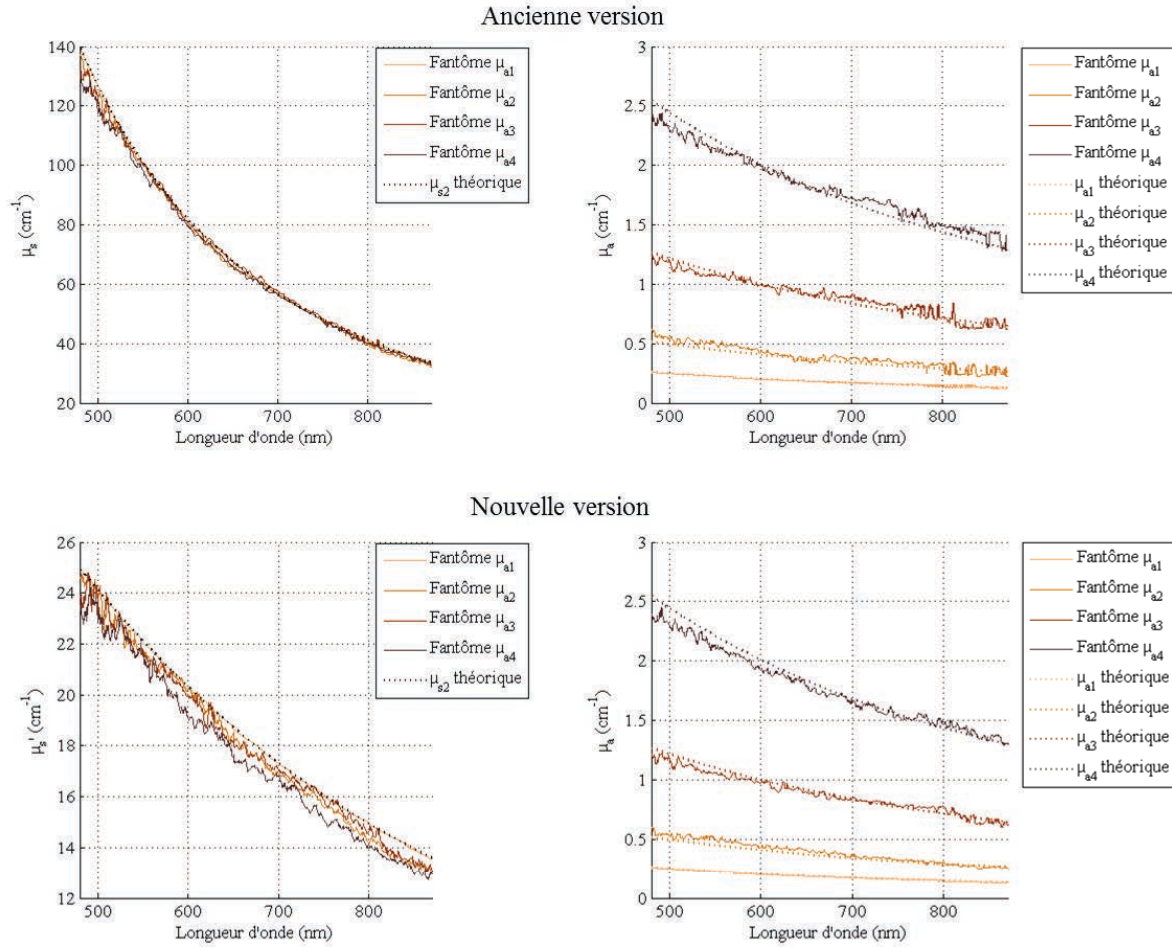


Figure 3-13 Résultats d'extraction des propriétés optiques des fantômes ayant la même concentration d'Intralipide mais des concentrations d'encre différentes. Les résultats sont présentés avec l'ancienne et la nouvelle version du code de traitement des données, et les courbes théoriques sont affichées pour comparaison.

Pour cette première gamme de fantômes (Figure 3-13), la nouvelle méthode de traitement des données ne présente pas d'apport significatif par rapport à l'ancienne méthode dans le calcul du coefficient d'absorption, excepté pour le rapport signal sur bruit qui semble diminué pour les longueurs d'onde supérieures à 600 nm. On peut expliquer cela en analysant les équations (3-3) et (3-6). Le bruit résultant sur les courbes extraites provient du bruit du rapport de la mesure sur l'échantillon inconnu et de la mesure sur le fantôme de référence $R_{inc}^i(\lambda)/R_{ref}^i(\lambda)$. Le facteur de ce rapport dans les équations (3-3) et (3-6) change entre les deux méthodes (voir Figure 3-14) : $R_{LUT}^i(\mu_a(\lambda), \mu_s(\lambda))_{ref}$ est remplacé par $R_{LUT}^i(\mu_a(\lambda), \mu'_s(\lambda))_{ref}$. Pour les fibres utilisées pour la minimisation dans l'étape de calcul de $\mu_{a,inc}$ (fibres 2 à 6), $R_{LUT}^i(\mu_a(\lambda), \mu'_s(\lambda))_{ref} \leq R_{LUT}^i(\mu_a(\lambda), \mu_s(\lambda))_{ref}$ lorsque $\lambda \geq 640 \text{ nm}$. Le bruit provenant de $R_{inc}^i(\lambda)/R_{ref}^i(\lambda)$ est donc affaibli sur cet intervalle spectral.

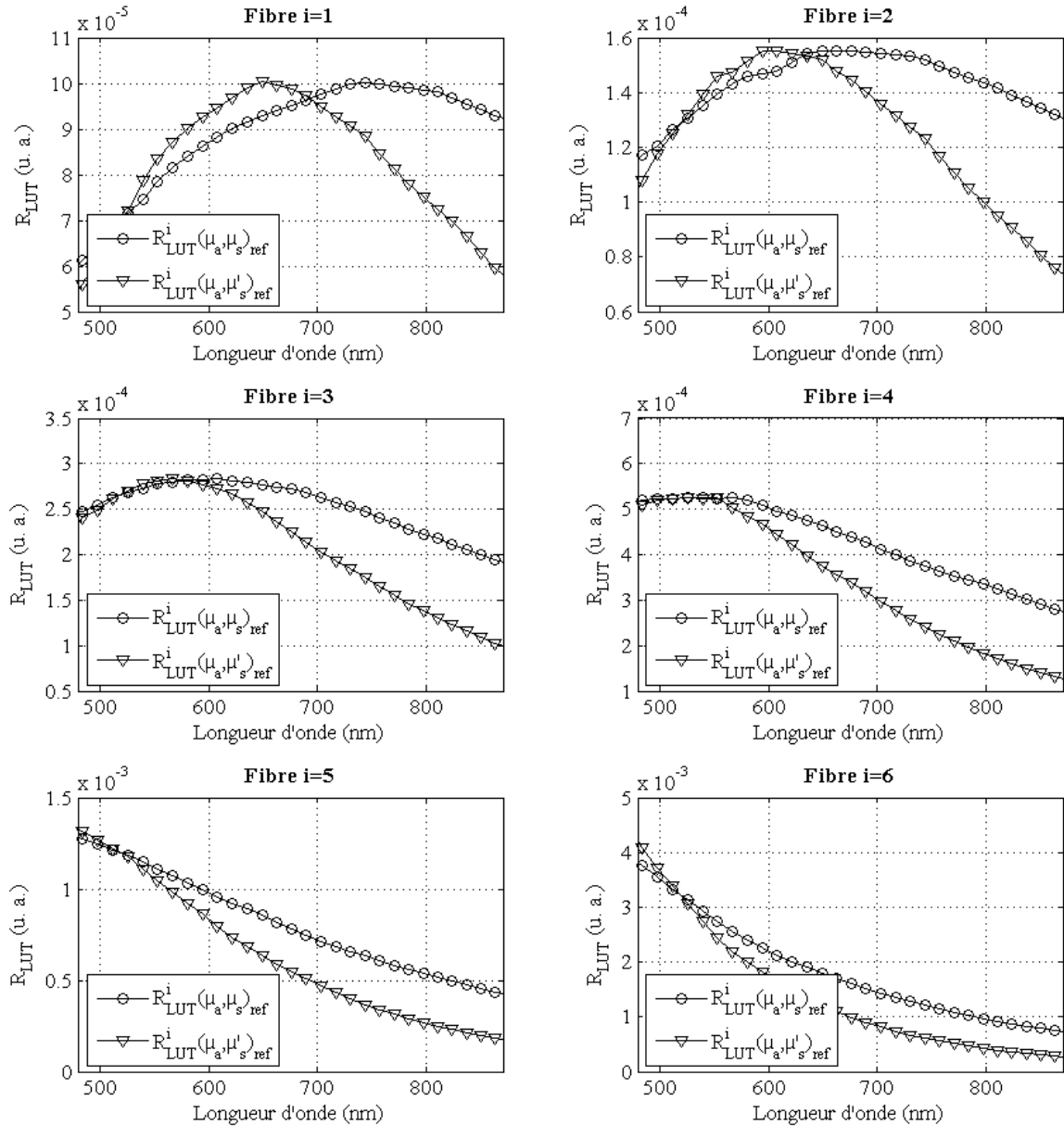


Figure 3-14 : Valeurs du coefficient d'étalonnage obtenues pour chaque méthode pour les six distances source-détecteur. $R_{LUT}^i(\mu_a(\lambda), \mu_s(\lambda))_{ref}$ est le facteur d'étalonnage de l'ancienne version du code de traitement des données, $R_{LUT}^i(\mu_a(\lambda), \mu'_s(\lambda))_{ref}$ celui de la nouvelle.

En revanche, le coefficient de diffusion semble légèrement sous-estimé par rapport à l'ancienne méthode comme on peut le voir sur la Figure 3-15. Notons que le fantôme de référence utilisé a le même coefficient de diffusion que la gamme testée.

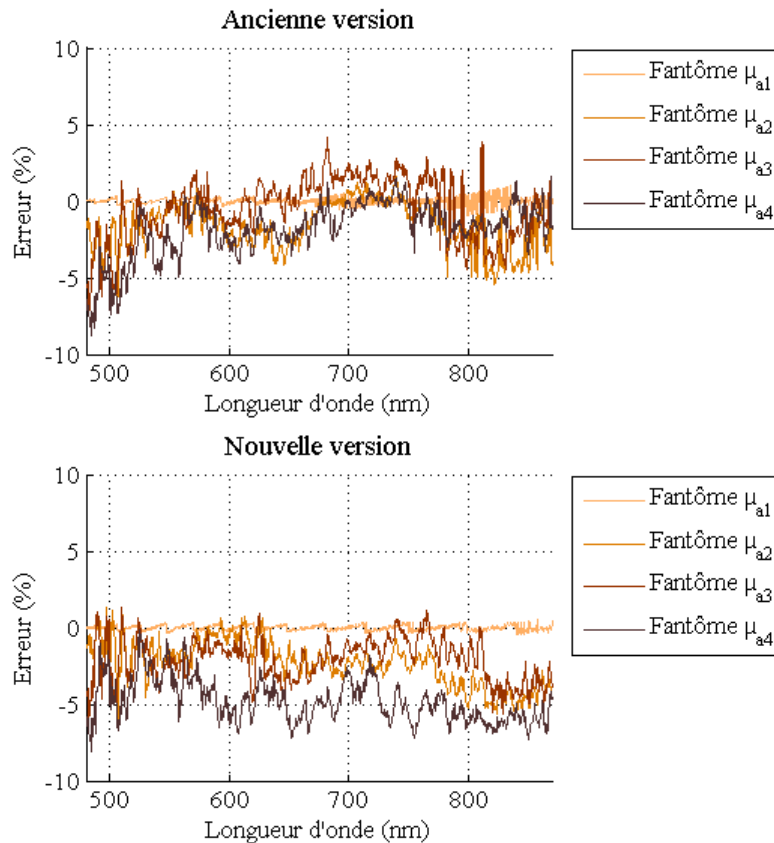


Figure 3-15 Erreur d'estimation du coefficient de diffusion en pourcentage par rapport à la courbe de diffusion théorique.

L'apport de la nouvelle méthode de traitement des données apparaît dans l'analyse de milieux dont le niveau de diffusion est différent de celui du fantôme de référence utilisée pour l'étalonnage (Figure 3-16). Il est observé que, plus le niveau de diffusion du milieu analysé est différent de celui du fantôme de référence, moins l'absorption est correctement estimée par l'ancienne méthode. Et ceci est corrigé lorsque le calcul des propriétés optiques est effectué en utilisant la nouvelle méthode. De plus, le niveau de diffusion du fantôme le plus diffusant est aussi mieux estimé (voir Figure 3-17).

Nous en concluons que cette modification dans le traitement des données améliore sensiblement la quantification du coefficient d'absorption quel que soit le niveau de diffusion du milieu. Elle semble aussi mieux quantifier le coefficient de diffusion. Cependant, il est sous-estimé lorsque le niveau de diffusion de l'objet à caractériser s'éloigne du niveau de diffusion du fantôme de référence utilisé. Cela était déjà le cas avec l'ancienne méthode.

On a vu au Chapitre 1 que les mesures des propriétés optiques cutanées rapportées dans la littérature présentent des différences très grandes qui sont inhérentes aux échantillons analysés et à la variabilité biologique inter-sujet. L'ancienne méthode donnait de bons résultats si le fantôme de référence avait des propriétés de diffusion proches de celles du sujet analysé. du fait de la variabilité biologique, ceci ne peut pas être respecté pour un panel de sujet. Cette

amélioration dans la quantification de la méthode aura donc une incidence positive sur la capacité de notre système à établir un diagnostic.

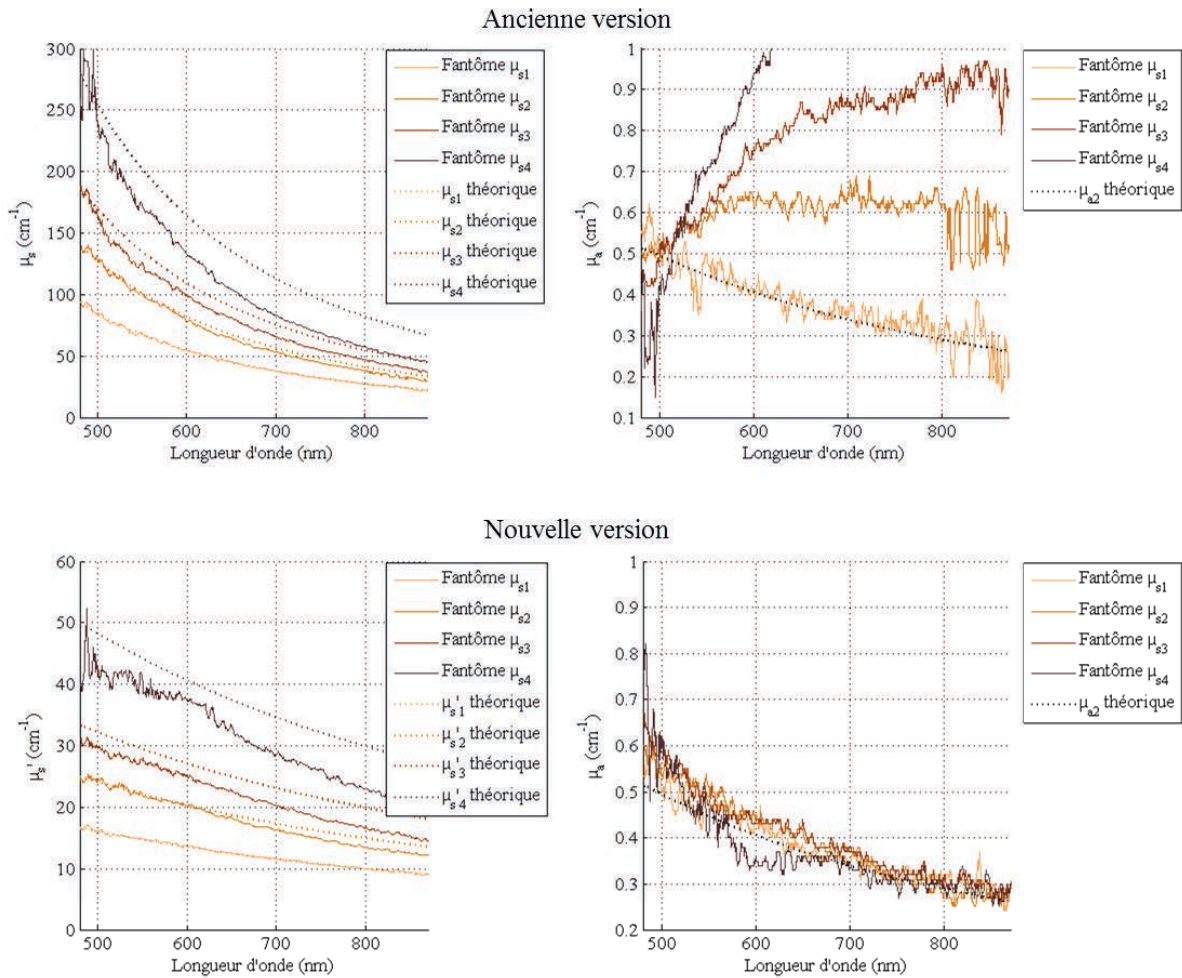


Figure 3-16 Résultats d'extraction des propriétés optiques des fantômes ayant la même concentration d'encre mais des concentrations d'Intralipide différentes, et donc des propriétés de diffusion différentes.. Les résultats sont présentés avec l'ancienne et la nouvelle version du code de traitement des données, et les courbes théoriques sont affichées pour comparaison.

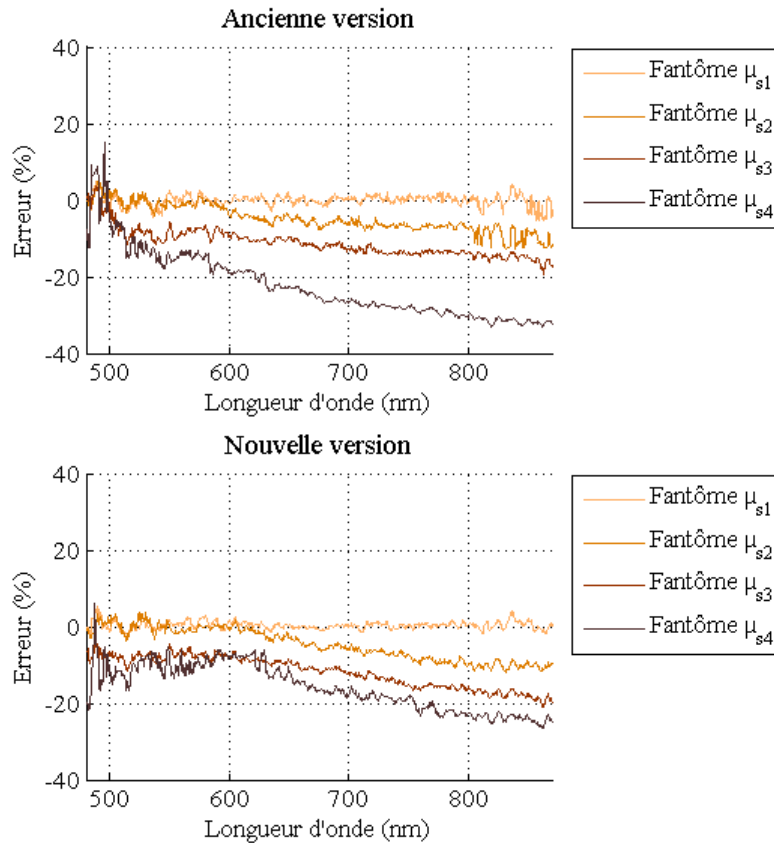


Figure 3-17 Erreur d'estimation du coefficient de diffusion en pourcentage par rapport aux courbes de diffusion théoriques

3.3 Caractérisation des fantômes solides fabriqués

3.3.1 Matériel et méthodes

L'ensemble des fantômes monocouches fabriqués au Chapitre 2 sont analysés par notre système de Spectroscopie de Réflectance Diffuse. L'objectif est de vérifier si les propriétés optiques visées au paragraphe 2.4.4 sont atteintes. Pour cela, on réalise $n=3$ mesures sur chaque fantôme que l'on moyenne.

Pour extraire leurs propriétés optiques, nous utilisons comme fantôme de référence un fantôme d'Intralipide concentré à 1% et absorbant tel que $\mu_a(532 \text{ nm}) = 0,51 \text{ cm}^{-1}$ (encre noire).

3.3.2 Résultats – Calcul du spectre de diffusion

Nous présentons dans ce paragraphe les spectres de diffusion μ'_s obtenus par niveau de diffusion visé ($\mu'_{s1} < \mu'_{s2} < \mu'_{s3} < \mu'_{s4}$). Les spectres affichés en Figure 3-18 sont les spectres moyens calculés sur les fantômes ayant la même concentration en TiO_2 , quelle que soit leur absorption. Les mesures ont été effectuées, pour chaque niveau de diffusion μ'_s , sur cinq fantômes correspondants aux cinq niveaux d'absorption visés (de μ_{a0} à μ_{a4N}). De ce fait, les valeurs moyennes et barres d'erreur (1 écart-type) sont calculées sur $N=5$ mesures.

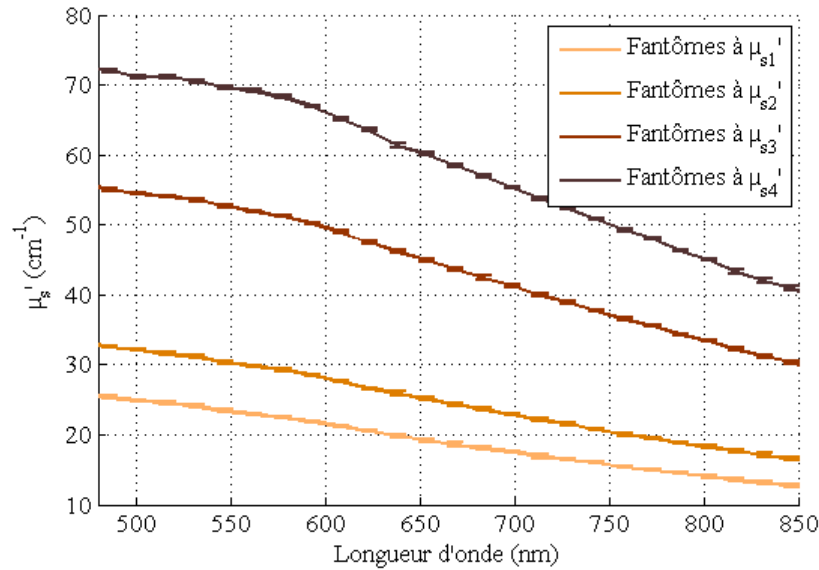


Figure 3-18 : Résultats d'extraction du coefficient de diffusion réduit par DRS. Les mesures ont été effectuées, pour chaque niveau de diffusion $\mu'_{s1} < \mu'_{s2} < \mu'_{s3} < \mu'_{s4}$, sur cinq fantômes. Les courbes affichées sont les spectres moyens avec barre d'erreur à un écart-type sur $N=5$ mesures

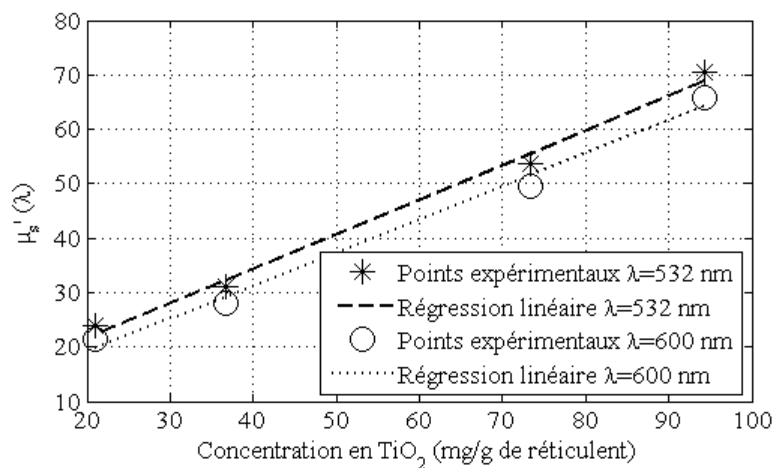


Figure 3-19 : Linéarité du coefficient de diffusion réduit des fantômes fabriqués en fonction de la quantité de TiO_2 incorporée à 532 nm et 600 nm

En utilisant la méthode d'extraction des propriétés optiques décrite au paragraphe 3.2.1, le coefficient de diffusion réduit obtenu augmente, comme attendu, linéairement avec la concentration en TiO_2 (voir Figure 3-19). Ceci nous conforte dans le protocole de fabrication mis au point.

Le niveau de diffusion est cependant inférieur à la valeur visée à 532 nm (voir Figure 3-20) pour les trois fantômes les plus diffusants. Il peut y avoir plusieurs raisons à cela. Premièrement, ces valeurs étaient estimées suite aux travaux de B. Montcel (Montcel 2005). Nous avons extrapolé les expressions (2-1) et (2-2) à 532 nm et l'allure du spectre pour $\lambda \leq 690 \text{ nm}$ diffère de l'allure spectrale affichée en Figure 2-4. Deuxièmement, les particules de dioxyde de titane que nous utilisons n'ont peut-être pas exactement les mêmes dimensions que

celles ayant servi à B. Montcel. Enfin, nous savons que la méthode de traitement sous-estime μ'_s lorsque le niveau de diffusion de l'objet analysé est éloigné du niveau de diffusion du fantôme de référence. C'est sans doute le cas ici.

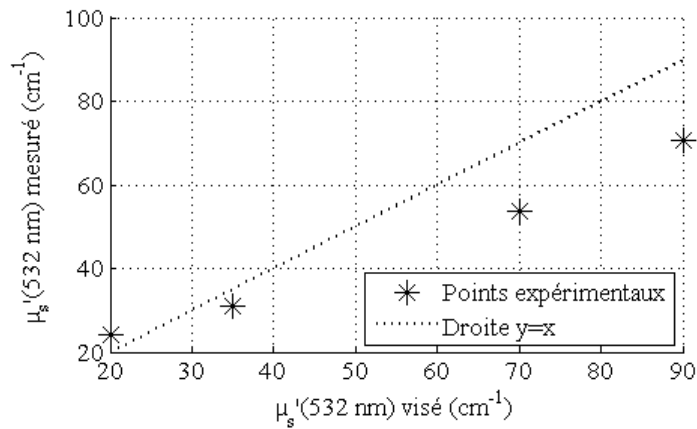


Figure 3-20 : Coefficient de diffusion réduit mesuré par DRS à 532 nm en fonction du coefficient de diffusion réduit visé par le protocole de fabrication des fantômes

En revanche, on observe que les spectres obtenus suivent assez bien l'allure spectrale obtenue par S. Prahl (voir Figure 2-4). Les dispersions spectrales observées d'une équipe à l'autre peuvent aussi bien dépendre de l'instrument (Swartling, Dam et Andersson-Engels 2003) que du TiO_2 utilisés.

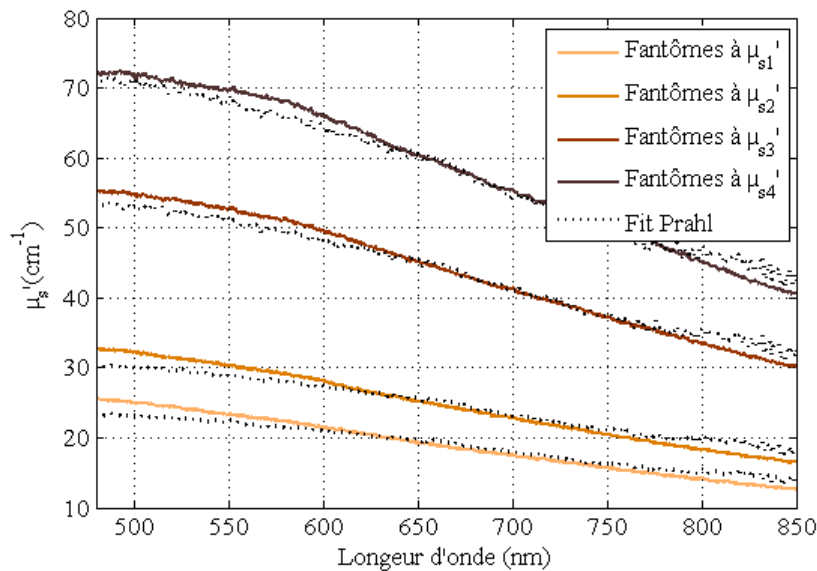


Figure 3-21 : Fit des spectres calculés par DRS avec le spectre obtenu par S. Prahl

3.3.3 Résultats – Calcul du spectre d'absorption

Nous présentons dans ce paragraphe les spectres d'absorption μ_a obtenus par niveau d'absorption visé ($\mu_{a0} < \mu_{a1N} < \mu_{a2N} < \mu_{a3N} < \mu_{a4N}$). Les spectres affichés en Figure 3-22 sont les spectres moyens calculés sur les fantômes ayant la même concentration en encre noire, quelle que soit leur concentration en TiO_2 . Les mesures ont été effectuées, pour chaque

niveau d'absorption μ_a , sur quatre fantômes correspondants aux quatre niveaux de diffusion visés (de μ'_{s1} à μ'_{s4}). De ce fait, les valeurs moyennes et barres d'erreur (1 écart-type) sont calculées sur N=4 mesures.

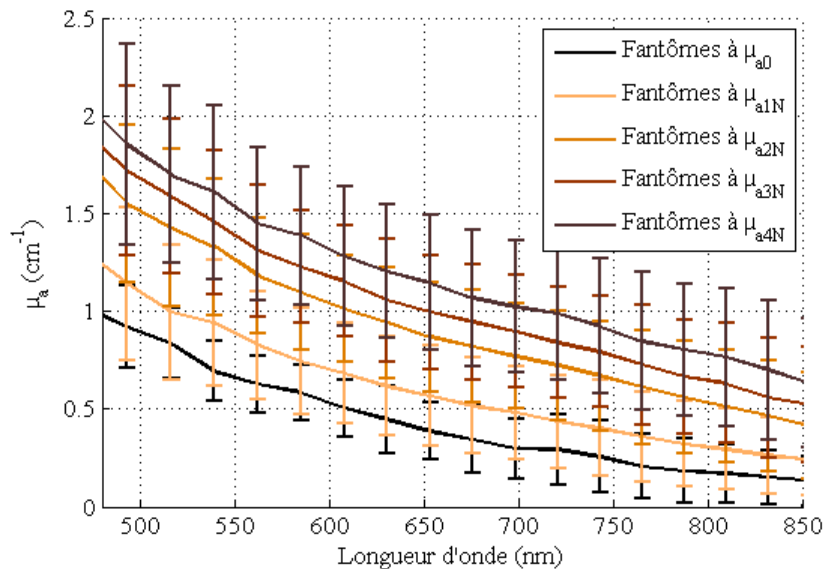


Figure 3-22 : Résultats d'extraction du coefficient d'absorption par DRS. Les mesures ont été effectuées, pour chaque niveau d'absorption, sur quatre fantômes. Les courbes affichées sont les spectres moyens avec barre d'erreur à un écart-type sur N=4 mesures

Comme le montre la Figure 3-22, les résultats concernant le calcul du spectre d'absorption des fantômes sont beaucoup plus dispersés que ceux obtenus sur le spectre de diffusion. Dans son état actuel, le protocole de fabrication ne permet pas de contrôler les propriétés d'absorption des fantômes fabriqués avec répétabilité et justesse.

En moyenne, l'absorption augmente avec la quantité d'encre incorporée mais les niveaux d'absorption visés à 532 nm ne sont pas atteints. La première erreur de justesse concerne les fantômes à μ_{a0} : ils présentent un spectre d'absorption non nul alors qu'ils ne contiennent que du PDMS et du TiO_2 . Ces matériaux sont normalement non absorbants sur le spectre visible. Ensuite, l'incorporation d'encre crée comme attendu un *offset* : le spectre d'absorption conserve la même décroissance en fonction de la longueur d'onde. Cependant, cette allure diffère de celle du spectre d'absorption de l'encre noire. La décroissance de μ_a avec la longueur d'onde est plus rapide ici. Pour être plus précis, nous présentons les résultats du coefficient d'absorption calculé à 532 nm sur chaque fantôme. Ils sont classés par niveaux de diffusion des fantômes en Figure 3-23. Pour une même quantité d'encre incorporée, le niveau d'absorption augmente avec la concentration en TiO_2 et de façon quasi-linéaire pour au moins trois séries (μ_{a1N} , μ_{a3N} et μ_{a4N}).

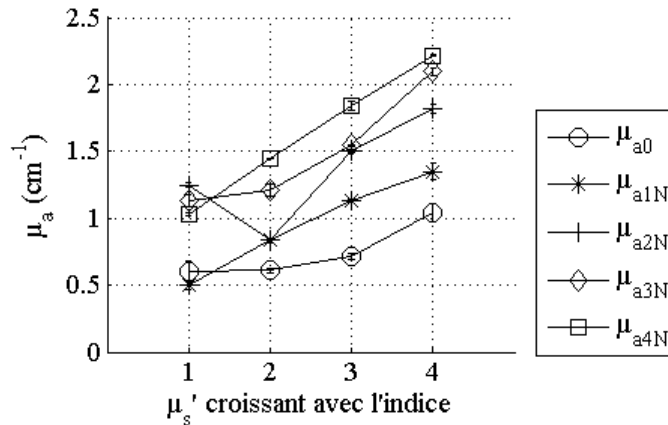


Figure 3-23 : Valeurs de μ_a obtenues par DRS à 532 nm ($n=3$ mesures par fantômes et barre d'erreur d'un écart-type). Les résultats sont présentés en fonction des fantômes de même concentration en TiO_2 .

3.3.4 Conclusions et discussion

La DRS a montré une déviation entre les propriétés de diffusion attendues et celles effectivement mesurées. En revanche, le niveau de diffusion obtenu est linéaire avec la concentration en TiO_2 . Nous considérons donc comme acquis ces résultats de caractérisation et validons le protocole de fabrication de fantômes pour la composante diffusion.

Une déviation existe entre les propriétés d'absorption attendues et celles effectivement mesurées. D'une part, la DRS donne un niveau d'absorption de fond qui, d'après la littérature, n'est pas attribué aux matières premières. La source de ce phénomène d'absorption n'a pas été identifiée de façon certaine. Elle peut être liée à la réaction chimique du processus de réticulation. Dans (Pradana, Kluge et Gerken 2014), les auteurs montrent une augmentation des indices de réfraction réel et imaginaire d'un polymère dopé avec des particules de TiO_2 lorsque la concentration volumique en TiO_2 augmente. Ce pourrait être à l'origine de la différence observée entre le spectre d'absorption attendu pour lequel la variation d'indice de réfraction réel est négligée et le spectre d'absorption effectivement mesuré. Cependant, la concentration volumique de nos fantômes en particules de TiO_2 varie de 0,05% à 0,24% si on suppose la masse volumique du dioxyde de titane égale à 4 (Centers for Disease and Prevention 2015). Elle est très inférieure aux concentrations volumiques modélisées et manipulées dans cet article (de 5 à 30%). A 5%, l'indice réel du polymère augmente de 2,3 % et son indice imaginaire augmente de 50%. On peut donc conclure de ces travaux que le changement d'indice de réfraction réel peut effectivement être négligé dans notre étude. De plus, ces travaux sont cohérents avec nos résultats : l'absorption non nulle obtenue sur le fantôme sans encre est due à l'incorporation de dioxyde de titane dans le polymère et μ_a augmente quasi-linéairement avec la concentration en TiO_2 .

D'autre part, les niveaux d'absorption ne sont pas linéaires avec la concentration en encre théorique. Il y a bien une tendance entre les fantômes les plus absorbants et les moins absorbants, mais nous n'avons pas pu obtenir un niveau d'absorption répétable entre chaque gamme. L'origine du décalage entre les niveaux d'absorption attendus et mesurés pourrait être dans la manipulation de l'encre noire en cours de fabrication de fantômes. En effet, malgré

l'emploi d'ultrasons pour la mélanger à l'éthanol, une partie de l'encre forme un dépôt pour les solutions les plus concentrées. Ces grains obstruent quelquefois l'embout de pipette servant à leur incorporation au mélange final de PDMS et réticulant. Cela pourrait aussi expliquer pourquoi l'*offset* créé par l'ajout d'encre noire est plus faible qu'attendu. Nous pensons donc que le protocole de fabrication des fantômes est à revoir sur ce point, soit dans le choix de l'encre utilisée, soit en imposant des concentrations d'encre dans l'éthanol à ne pas dépasser.

Nous disposons donc d'une gamme de fantômes aux propriétés de diffusion bien estimées mais dont l'absorption pose encore question.

3.4 Résumé

Ce chapitre a permis de présenter l'instrumentation de Spectroscopie de Réflectance Diffuse qui a été développée, en amont de ce travail de thèse, pour la lecture du test à la tuberculine. Le processus de traitement des données a été exposé et modifié, améliorant la quantification des coefficients d'absorption et de diffusion réduit. Des erreurs d'estimation subsistent. Elles peuvent être contournées en utilisant le fantôme de référence adéquat.

Ce système a ensuite été utilisé pour la caractérisation des propriétés optiques des fantômes solides monocouches développés au Chapitre 2. Ces résultats seront utilisés dans les chapitres suivants.

Chapitre 4 : Micro-DRS : développement d'une approche bimodale DRS-Raman

Nous présentons dans ce chapitre le développement d'une instrumentation de Micro-DRS et de la méthode de traitement associée permettant de sonder l'épiderme. Avec cette modalité, la DRS permet l'analyse de la même région que la microspectroscopie Raman : ainsi, on peut envisager de mesurer les propriétés de diffusion et d'absorption de l'épiderme et d'utiliser ces mesures pour corriger les spectres Raman. La première partie de ce chapitre décrit le principe et les avantages de la Micro-DRS telle que mise au point au cours de cette thèse. Nous verrons notamment qu'elle permet d'effectuer une mesure de DRS et une mesure Raman confocale à l'aide d'un même instrument. Le dispositif expérimental mis en œuvre pour l'étude de faisabilité de la Micro-DRS est détaillé en deuxième partie. Les résultats de simulation Monte Carlo dans la géométrie correspondante sont exposés dans la troisième partie et les résultats expérimentaux obtenus sur fantômes sont présentés en fin de chapitre. L'objectif de ce chapitre est de démontrer la sensibilité de la Micro-DRS aux variations de propriétés optiques et sa capacité à caractériser μ_a , μ'_s , μ_s et g de façon séparée.

4.1 Description de l'instrument

4.1.1 Principe

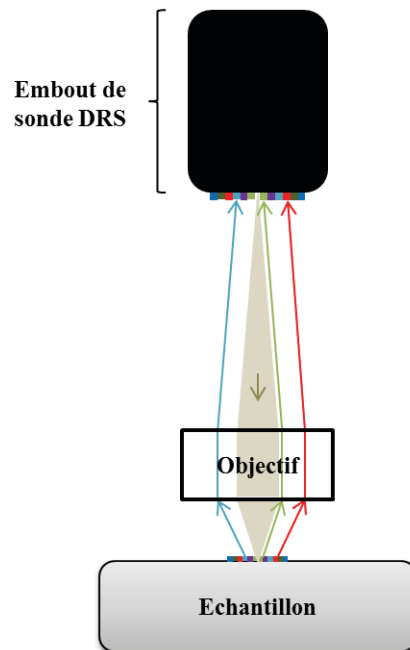


Figure 4-1 : Schéma de principe de la mise en œuvre de la Micro-DRS

Le principe de la Micro-DRS est d'utiliser un élément optique comme un objectif de microscope pour projeter l'image de l'extrémité de la sonde sur l'échantillon à caractériser (voir Figure 4-1). La projection effectuée s'accompagne d'une réduction de la taille de l'image projetée. Par exemple, si les fibres optiques ont un diamètre de 130 μm et sont réparties avec

un espacement de 400 μm , un facteur de réduction de 10 permettra de sonder le matériau avec l'équivalent d'une sonde équipée de fibres de 13 μm de diamètre et 40 μm d'espacement.

Comme pour la DRS standard, l'échantillon est illuminé en lumière blanche, de façon ponctuelle, avec une tache d'illumination dont la dimension est la dimension mécanique de la fibre divisée par le facteur de réduction R du système de projection (voir définition au paragraphe suivant). Les photons rétrodiffusés élastiquement par l'échantillon sont collectés par les fibres de collection de la sonde mais proviennent de distances source-détecteur réduites par le facteur de réduction du système de projection.

En fin de compte, par cette approche instrumentale, nous réalisons une mesure de DRS non standard : l'échelle de parcours des photons est réduite et la mesure est réalisée sans contact. On constitue l'équivalent optique d'une sonde de taille plus petite. Nous donnons à cette configuration de DRS le nom de Micro-DRS. Cette idée a fait l'objet d'un dépôt de brevet ("Dispositif de mesure d'un signal optique rétrodiffusé par un échantillon", 15 50981).

4.1.2 Calcul du facteur de réduction

Les éléments constitutifs du système de projection peuvent être un objectif de microscope O corrigé à l'infini associé à une lentille de tube L (Figure 4-2). Cet ensemble permet de former l'image réduite (ou agrandie) sur l'échantillon à analyser d'une sonde DRS macroscopique. Nous conservons ici le vocabulaire utilisé en microscopie (objectif, lentille de tube).

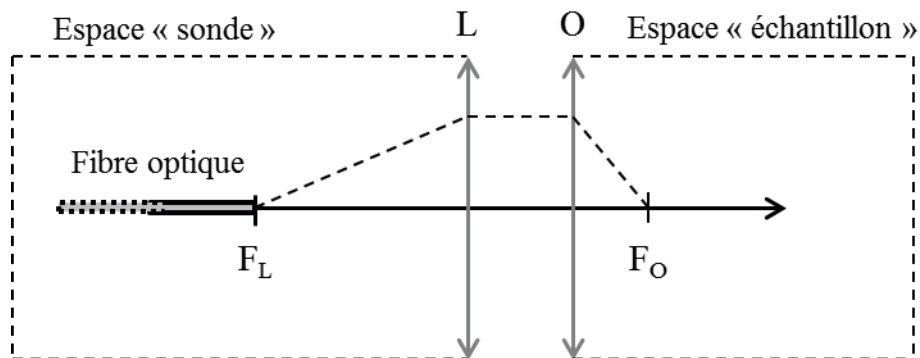


Figure 4-2 : Définition des éléments constitutifs du système de projection

Le facteur de réduction R de l'espace "sonde" à l'espace "échantillon" correspond au facteur de grandissement G du système de projection de l'espace "échantillon" à l'espace "sonde" et vaut :

$$R = G = \frac{f_L}{f_O} \quad (4-1)$$

où f_L est la distance focale de la lentille de tube L et f_O est la distance focale de l'objectif de microscope O .

4.1.3 Avantages

Cette configuration instrumentale de la DRS est adaptable à un microscope conventionnel et permet d'ajouter un mode de caractérisation DRS à tous ceux déjà existants sur ce type

d'instrument. Prenons l'exemple d'un microscope Raman confocal ou d'une sonde Raman confocale dédiée aux mesures *in vivo* : son cœur instrumental est toujours le même (voir Figure 4-3). En plus de la voie de mesure Raman (rayons verts et pointillés rouges sur le schéma), une voie de visualisation par caméra est en général installée (source de lumière blanche et caméra) pour positionner l'échantillon sous le faisceau du laser d'excitation (trajet optique représenté en jaune sur le schéma).

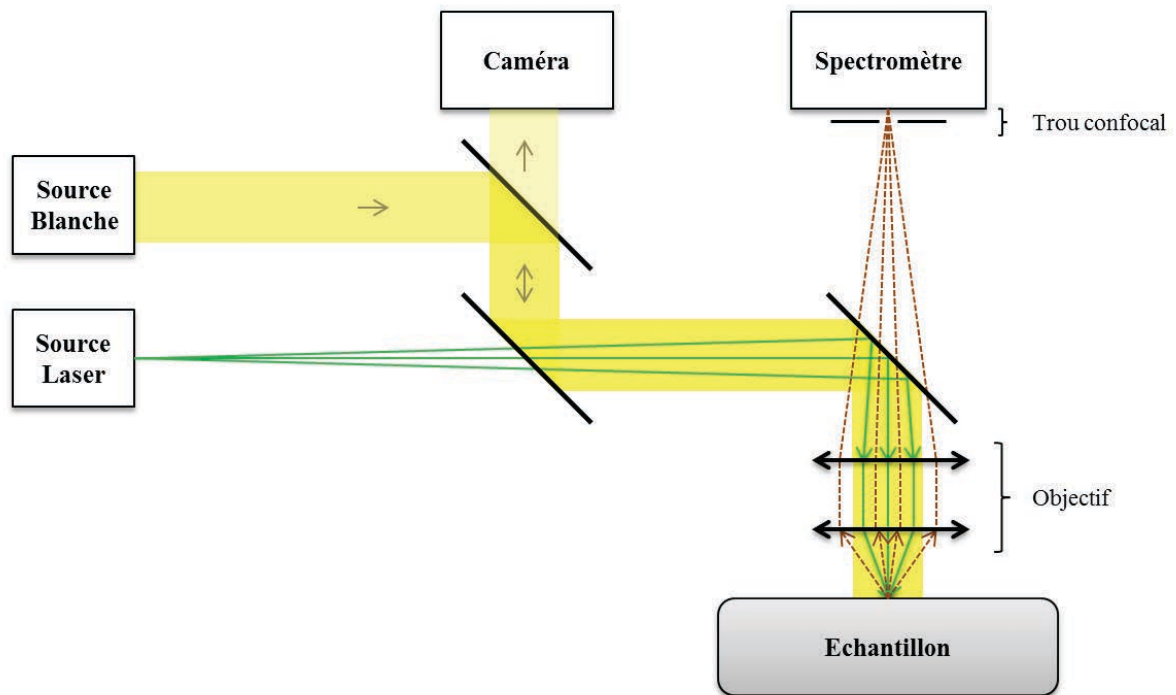


Figure 4-3 : Schéma de principe d'un système Raman confocal. Les fonctions de filtrage n'apparaissent pas pour ne pas alourdir le schéma. L'attention est portée sur le trajet optique de la lumière et l'agencement des différents éléments.

Afin d'associer une mesure de DRS à ce genre de système, l'idée est d'utiliser la voie caméra. Le plan de la caméra et le plan focal de l'objectif étant conjugués, si on remplace la caméra par l'embout de détection de la sonde DRS (voir Figure 4-4), une image nette de sa surface est obtenue dans le plan focal de l'objectif. La Micro-DRS est donc réalisable dans ce type d'instrument en tant que deuxième modalité de caractérisation. La voie caméra peut aussi être conservée. Dans ce cas, une troisième voie dédiée à la Micro-DRS doit être ajoutée.

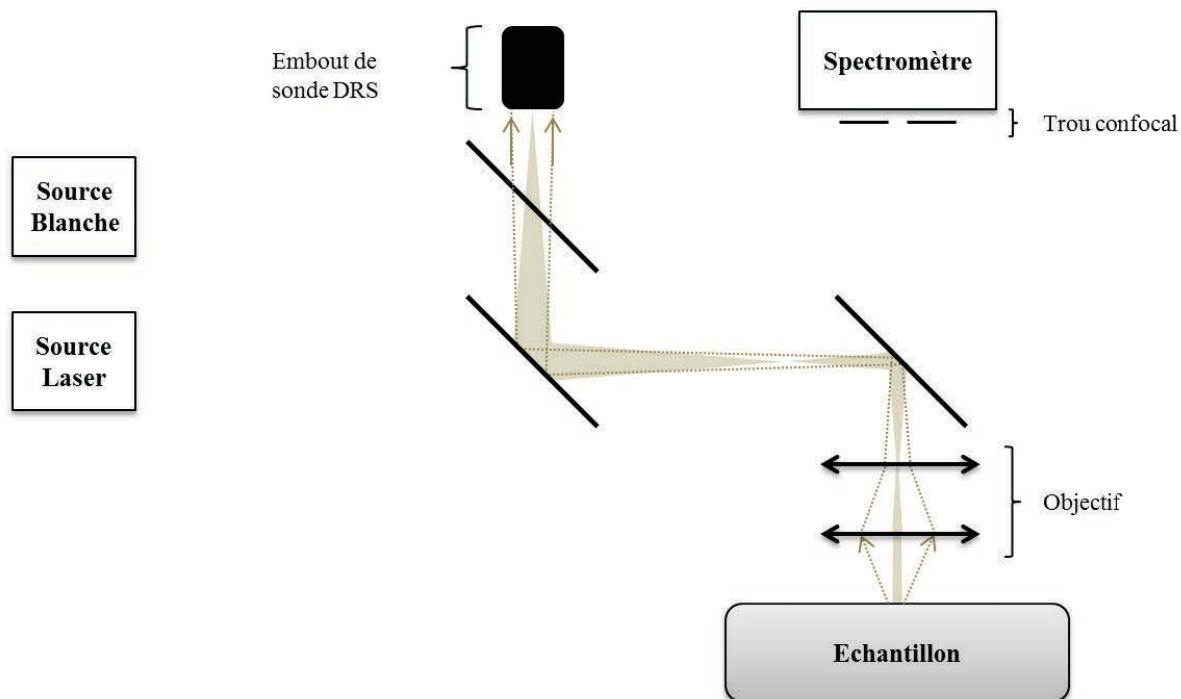


Figure 4-4 : Couplage de la Micro-DRS à un microscope Raman confocal

4.2 Dispositif expérimental

Dans cette partie, le montage expérimental mis au point pour l'étude de faisabilité, son dimensionnement, ses évolutions et leurs justifications seront présentés.

4.2.1 Montage

Nous avons mis en œuvre un dispositif de Micro-DRS à des fins de validation de la méthode. Dans notre cas, la sonde DRS est couplée à un microscope Olympus PROVIS via son port caméra. Ce port caméra constitue la troisième sortie de la tête trinoculaire du microscope. Il n'y a pas d'instrumentation Raman confocale dans ce dispositif expérimental qui se ramène donc à celui de la Figure 4-1. Le couplage avec des mesures Raman peut cependant se faire "off line".

Un assemblage constitué de deux pièces mécaniques spécialement conçues a été développé et est affiché en Figure 4-5. La première pièce est composée d'un embout permettant son insertion dans le port caméra du microscope Olympus sur l'une de ses faces. Sur la face opposée, quatre trous ont été usinés pour y coupler un support dit "cage" de la marque THORLABS. La deuxième pièce est un cylindre creux permettant la mise en position et l'alignement de l'embout de sonde DRS. À une de ses extrémités, cette pièce est épaulée, filetée et assemblée à la cage THORLABS par une monture C.

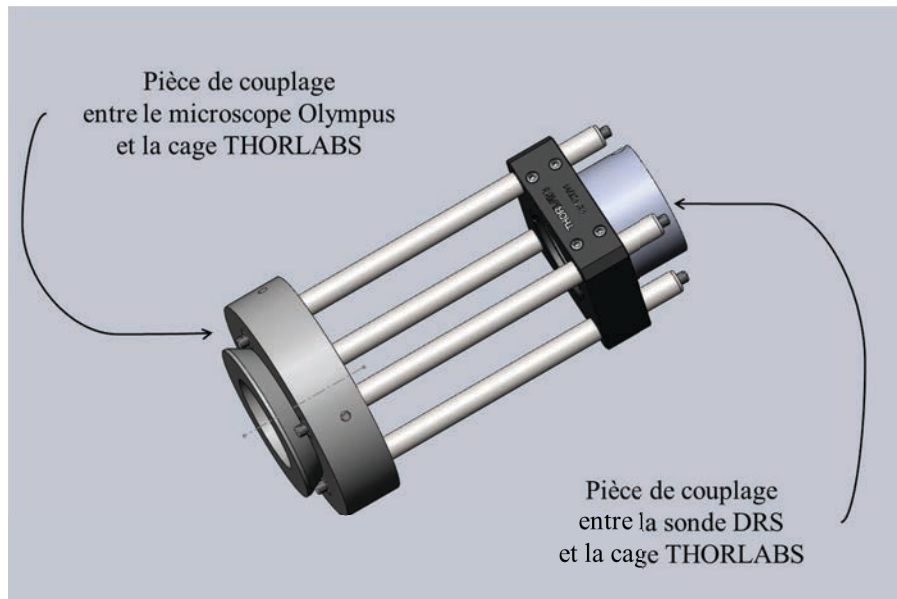


Figure 4-5 : Assemblage permettant le couplage de la sonde DRS avec le microscope Olympus PROVIS

4.2.2 Choix d'un objectif

Le choix de l'objectif est un paramètre clef en vue d'utiliser la Micro-DRS couplée à de la spectroscopie Raman confocale. En ce qui concerne le mode Raman, l'ouverture numérique de l'objectif doit être suffisamment grande pour garantir un bon sectionnement optique et collecter un maximum de photons diffusés inélastiquement.

En ce qui concerne la DRS, le facteur de grandissement du système de projection (et donc la focale de l'objectif) dimensionne les distances source-détecteur et, par conséquent, la profondeur de tissu sondée. Pour que ce mode de spectroscopie ait un intérêt dans la correction des spectres Raman, l'épaisseur de l'épiderme doit être visée.

Nous avons utilisé un objectif Zeiss corrigé à l'infini de grandissement $G_O = 20$, d'ouverture numérique $NA_O = 0,8$ et conçu pour être associé à une lentille de tube de focale $f_{LO} = 165 \text{ mm}$. Par son ouverture numérique, il satisfait les critères de collection du mode Raman. Du point de vue de la DRS, en supposant que l'objectif est associé à la lentille de tube pour laquelle il a été conçu, la sonde optique constituée est 20 fois plus petite que la sonde réelle. On passe donc de distances source-détecteur comprises entre 355 et 2540 μm dans l'espace "sonde" à des distances source-détecteur comprises entre 18 et 127 μm dans l'espace "échantillon" (Figure 4-2). Les résultats de DRS standard indiquent que la profondeur sondée dans un échantillon aux propriétés optiques proches de la peau est environ la moitié de la distance source-détecteur. On estime donc la profondeur sondée en Micro-DRS avec ce système de projection comprise entre 10 et 60 μm . Ceci correspond globalement à une zone allant de la couche cornée aux premiers microns de la couche épineuse.

En pratique, comme expliqué dans le paragraphe suivant, une autre lentille de tube sera utilisée. Le facteur de réduction du nouveau système de projection sera calculé au paragraphe 4.2.4. Au paragraphe 4.3.1, des simulations Monte Carlo permettront de vérifier si ce système de projection permet effectivement de sonder l'épiderme.

4.2.3 Modifications du montage

Une première mesure a été effectuée dans cette configuration (avec la lentille de tube originale du microscope) et "à vide", c'est à dire sans échantillon ni aucun autre objet sous l'objectif. De cette façon, on accède aux signaux réfléchis par les différents éléments optiques situés entre la sonde et l'objectif du microscope. Les résultats de mesure sont donnés fibre par fibre en Figure 4-6 pour un temps d'intégration de 250 ms. La réflexion parasite est élevée (40000 counts) pour les longueurs d'onde supérieures à 600 nm. Le niveau de saturation du spectromètre étant à environ 60000 counts, cette réflexion atteint 65% de la dynamique du détecteur pour la deuxième fibre. Si on souhaite gagner en sensibilité sur les plus courtes longueurs d'onde tout en obtenant une mesure valide sur l'ensemble du spectre, cela signifie qu'on ne peut pas augmenter le temps d'intégration du spectromètre (ou très peu). Cela signifie aussi que de nombreux photons sont perdus et ne contribuent pas à l'illumination d'un échantillon : on perd en flux d'illumination avec ce système.

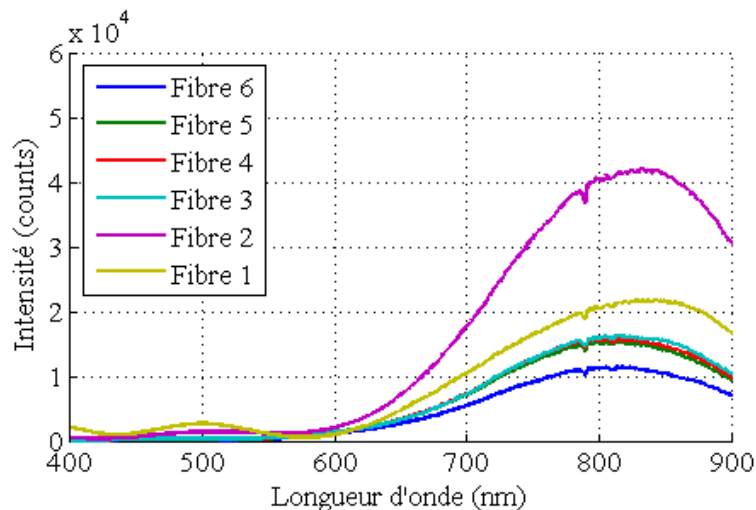


Figure 4-6 : Réflexions parasites mesurées dans le dispositif initial de la fibre la plus proche de l'excitation (Fibre 1) à la fibre la plus éloignée (Fibre 6) pour un temps d'intégration de 250 ms

Nous avons recherché l'élément optique dont provient la majeure partie des réflexions parasites. Il s'agit de la lentille de tube située à l'entrée de la tête trinoculaire. Nous l'avons donc ôtée du système pour la remplacer par une lentille au traitement antireflet adapté à notre intervalle spectral. Nous avons choisi un doublet achromatique avec un traitement de surface tel que le reflet ne dépasse pas 2% de l'intensité lumineuse incidente pour $400 \leq \lambda \leq 900$ nm (données constructeur). Pour l'insérer au dispositif, cette lentille a été montée sur une deuxième cage THORLABS (Figure 4-5) placée entre la pièce de couplage Microscope / système Thorlabs et la première cage déjà présente.

Afin de vérifier si cette modification instrumentale réduit efficacement les réflexions parasites, nous avons effectué une nouvelle mesure à vide, dans les mêmes conditions de temps d'intégration. Les résultats sont présentés en Figure 4-7. L'utilisation de cette nouvelle lentille est validée pour la réduction des réflexions parasites : elle les divise par un facteur 5 à 20 en fonction de la fibre considérée. La réflexion parasite ne prend plus que 10% de la dynamique du détecteur. Elle rend possible l'augmentation du temps d'intégration et augmente donc la sensibilité du système à des variations dans le signal de réflectance d'un échantillon à

l'autre. En outre, moins de photons sont perdus à cause de ces réflexions parasites, ils sont donc plus nombreux à contribuer à l'illumination de l'échantillon.

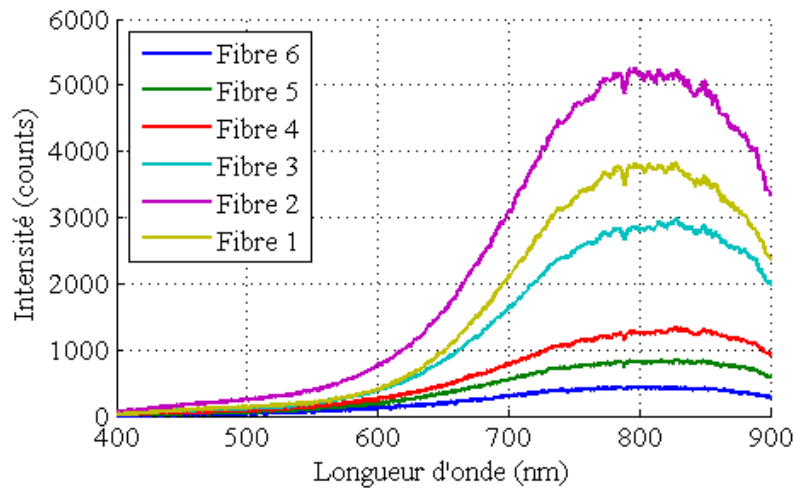


Figure 4-7 : Réflexions parasites mesurées sur le système modifié de la fibre la plus proche de l'excitation (Fibre 1) à la fibre la plus éloignée (Fibre 6) pour un temps d'intégration de 250 ms

4.2.4 Facteur de réduction

La distance focale du doublet achromatique jouant le rôle de lentille de tube vaut $f_L = 50 \text{ mm}$. La distance focale de l'objectif vaut $f_O = f_{LO}/G_O = 8,25 \text{ mm}$. Le facteur de réduction du système de projection développé est donc égal à $R = f_L/f_O = 50/8,25 = 6$.

Nous verrons l'ordre de grandeur des profondeurs sondées avec cette sonde Micro-DRS au paragraphe 4.3.1.

4.2.5 Dimensionnement photométrique

Dans ce paragraphe, nous cherchons à calculer les rendements de couplage photométrique qui ont lieu :

- de l'espace "sonde" vers l'espace "échantillon", soit le couplage entre la fibre optique d'illumination de la sonde DRS et le système de projection;
- de l'espace "échantillon" vers l'espace "sonde", soit le couplage entre les photons émergeant de l'échantillon et les fibres optiques de collection.

Pour cela, on définit les paramètres suivants (voir Figure 4-8) :

- u_1 est l'angle d'ouverture dans l'espace "sonde" et est relié à l'ouverture numérique NA_1 ;
- u_2 est l'angle d'ouverture dans l'espace "échantillon", relié à l'ouverture numérique de l'objectif de microscope NA_0 ;
- u_F est l'angle d'ouverture de la fibre optique, relié à l'ouverture numérique de la fibre optique NA_F ;
- f_L est la distance focale de la lentille de tube L;

- f_O est la distance focale de l'objectif de microscope O;
- r_p est le rayon de la pupille.

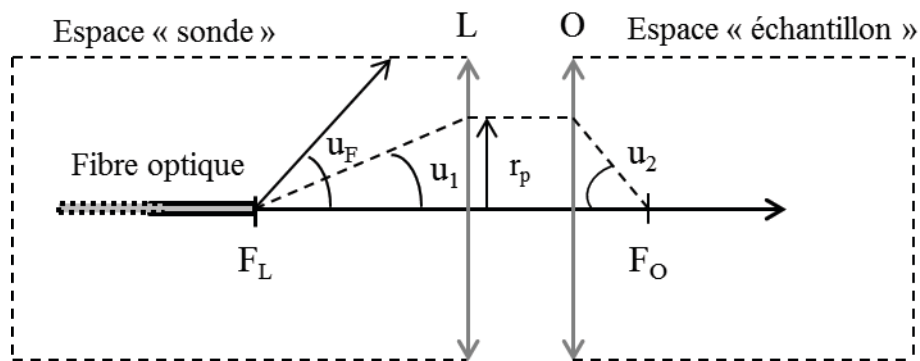


Figure 4-8 : Définition des grandeurs optiques caractéristiques des éléments constitutifs du système de projection

Rendement de couplage Sonde -> Système de projection -> Échantillon

Le rendement de couplage $\eta_{sonde \rightarrow \text{échantillon}}$ correspond au rapport des flux F_1 et F_F , où F_1 est le flux collecté par le système de projection et F_F est le flux sortant de la fibre optique. Il se calcule comme le rapport des angles solides Ω_F et Ω_1 de la fibre optique et du système de projection.

Si $u_F \leq u_1$, $\eta_{sonde \rightarrow \text{échantillon}} = 1$.

Sinon :

$$\eta_{sonde \rightarrow \text{échantillon}} = \frac{F_1}{F_F} = \frac{\Omega_1}{\Omega_F} = \frac{2\pi(1 - \cos u_1)}{2\pi(1 - \cos u_F)} \approx \frac{\pi (\sin u_1)^2}{\pi (\sin u_F)^2} = \frac{NA_1^2}{NA_F^2} \quad (4-2)$$

Dans notre application :

$$NA_F = 0,22 \quad (4-3)$$

Pour déterminer NA_1 , on calcule u_1 connaissant u_2 :

$$u_2 = \sin^{-1} NA_0 = 53,13^\circ \quad (4-4)$$

$$u_1 = \tan^{-1}\left(\frac{r_p}{f_L}\right) = \tan^{-1}\left(\frac{f_O}{f_L} \tan u_2\right) = 12,41^\circ \quad (4-5)$$

donc

$$NA_1 = \sin u_1 = 0,21 \quad (4-6)$$

Finalement, le rendement de couplage de la sonde au système de projection vaut :

$$\eta_{sonde \rightarrow \text{échantillon}} = 95\% \quad (4-7)$$

Dans cette configuration, il y a donc peu de perte lumineuse entre la sortie de fibre optique et la surface de l'échantillon.

Rendement de couplage Échantillon -> Système de projection -> Sonde

On fait l'hypothèse que la lumière qui émerge de l'échantillon diffusant est distribuée de façon isotrope dans l'espace de l'échantillon.

Le rendement de couplage de l'échantillon au système de projection est égal à l'ouverture numérique de l'objectif élevée au carré :

$$\eta_{\text{échantillon} \rightarrow \text{objectif}} = NA_0^2 \quad (4-8)$$

Ensuite, on calcule le rendement de couplage du système de projection dans la fibre optique de la sonde à partir de l'inverse de la relation (4-2):

$$\eta_{\text{objectif} \rightarrow \text{sonde}} = \frac{NA_F^2}{NA_1^2} \text{ si } u_F \leq u_1 \quad (4-9)$$

$$\eta_{\text{objectif} \rightarrow \text{sonde}} = 1 \text{ sinon.} \quad (4-10)$$

Le rendement de couplage de l'espace "échantillon" à l'espace "sonde" est le produit des deux précédents:

$$\eta_{\text{échantillon} \rightarrow \text{sonde}} = \left(\frac{NA_0 \times NA_F}{NA_1} \right)^2 \text{ si } u_F \leq u_1 \quad (4-11)$$

$$\eta_{\text{échantillon} \rightarrow \text{sonde}} = NA_0^2 \text{ sinon} \quad (4-12)$$

Dans notre cas, $u_F > u_1$ donc :

$$\eta_{\text{échantillon} \rightarrow \text{sonde}} = 64\% \quad (4-13)$$

Dans cette configuration, la perte lumineuse entre la lumière émergent de la surface de l'échantillon et une fibre optique de collection est faible elle aussi.

Rendement total

Le rendement photométrique global du système de projection vaut finalement :

$$\eta_{\text{global}} = \eta_{sonde \rightarrow \text{échantillon}} \times \eta_{\text{échantillon} \rightarrow \text{sonde}} = 61\% \quad (4-14)$$

La dépendance des rendements photométriques précédents à la distance focale de la lentille de tube est présentée en Figure 4-9. La lentille de tube utilisée ($f_L = 50 \text{ mm}$) est à l'optimum du rendement photométrique du système de projection constitué de l'objectif 20X/NA0.8 (Zeiss).

De la même manière, nous pouvons étudier d'autres configurations du système de projection en faisant varier l'ouverture numérique de l'objectif utilisé, tout en maintenant le facteur de

réduction à $R = f_L/f_0 = 6$. D'après les résultats affichés en Figure 4-10, l'ouverture numérique de l'objectif constituant notre système de projection fournit aussi le maximum du rendement photométrique.

Le système de Micro-DRS ainsi constitué est donc optimal pour obtenir un rapport signal sur bruit maximal lors des acquisitions sur échantillons.

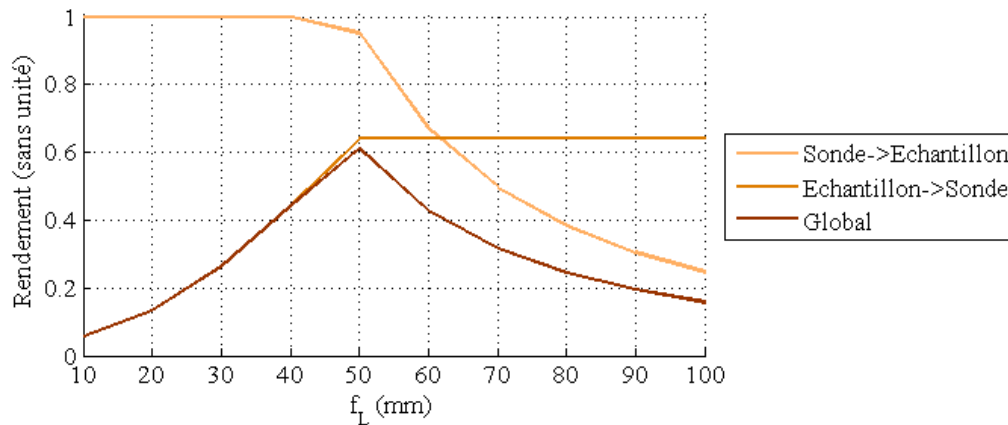


Figure 4-9 : Rendements photométriques $\eta_{sonde \rightarrow \text{échantillon}}$, $\eta_{\text{échantillon} \rightarrow sonde}$ et η_{global} en fonction de la distance focale f_L de la lentille de tube lorsque l'objectif 20X/NA0.8 est utilisé.

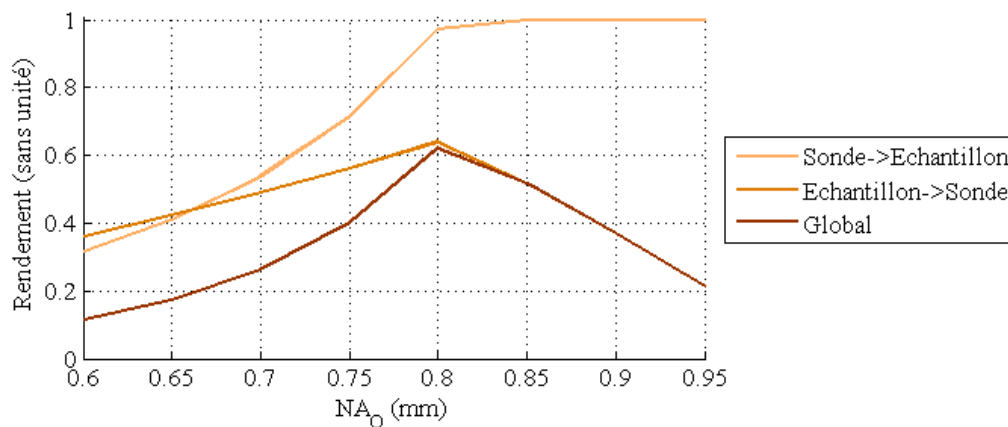


Figure 4-10 : Rendements photométriques $\eta_{sonde \rightarrow \text{échantillon}}$, $\eta_{\text{échantillon} \rightarrow sonde}$ et η_{global} en fonction de l'ouverture numérique NA_0 de l'objectif de microscope lorsque le facteur de réduction vaut $R = \frac{f_L}{f_0} = 6$

4.3 Résultats de simulation

Dans un premier temps, nous évaluons la profondeur sondée par chaque distance source-détecteur de la Micro-DRS pour une comparaison avec la DRS standard. Ensuite, nous étudions la dépendance des signaux de réflectance calculés aux propriétés optiques g , μ_a et μ_s simulées.

4.3.1 Ordre de grandeur de la profondeur sondée

Simulations Monte Carlo

La profondeur de peau sondée par chacune des distances source-détecteur de l'instrumentation Micro-DRS est estimée grâce à des simulations Monte Carlo 3D (se référer à l'Annexe 1 pour une description succincte de l'algorithme). À l'issue de ces simulations, les trajectoires des photons détectés par chaque fibre sont enregistrées. Pour une comparaison directe avec les résultats obtenus en DRS au paragraphe 3.1.2, nous simulons la propagation des photons dans un milieu identique, à savoir :

- $n = 1,4$ pour l'indice de réfraction du milieu de propagation des photons, similaire à celui de la peau;
- $g = 0,8$ pour le coefficient d'anisotropie, similaire à celui de la peau;
- $\mu_a = 2 \text{ cm}^{-1}$;
- $\mu_s = 150 \text{ cm}^{-1}$;

$N = 1 \times 10^6$ photons ont été simulés.

Résultats

Dans la Figure 4-11, pour chaque distance source-détecteur, une projection 2D des trajectoires des photons est affichée avec une résolution de $30 \mu\text{m} \times 30 \mu\text{m}$. L'objectif est de mettre en valeur les trajectoires privilégiées des photons dans le milieu (zone de plus grande densité de photons) pour chacune des configurations de collection. Elles ont une forme de banane conformément à la Figure 1-24.

À partir de ces vues 2D, une projection 1D (calcul de la somme des photons détectés pour une même coordonnée axiale) selon l'axe orthogonal à la surface du milieu est mise en œuvre. Ils sont ensuite normalisés par rapport au maximum de signal détecté (Figure 4-12) qui provient de la fibre $i=1$.

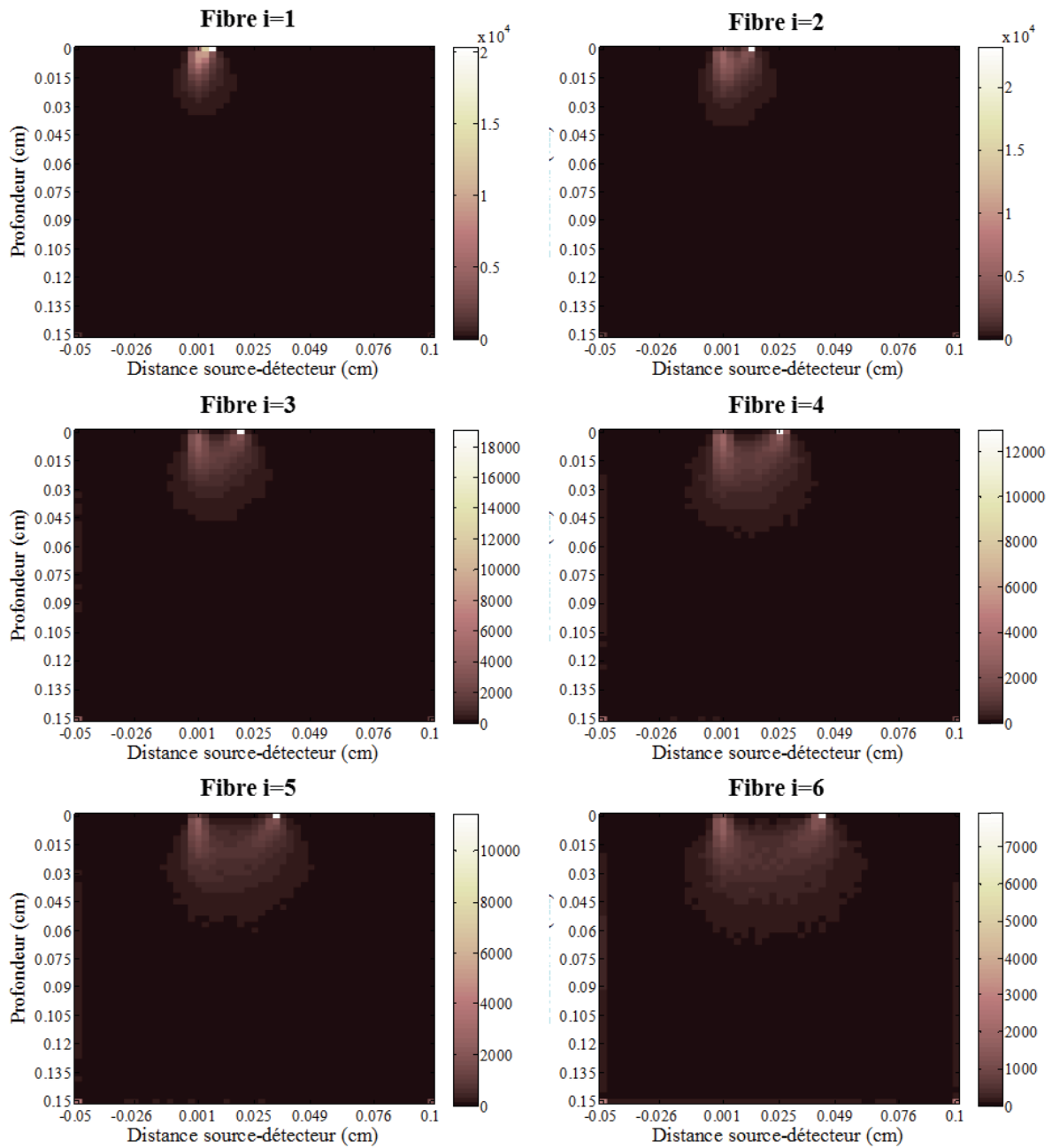


Figure 4-11 : Répartition 2D de la densité de photons dans le milieu en nombre de photons. Le nombre total de photons simulés est $N = 1 \times 10^6$

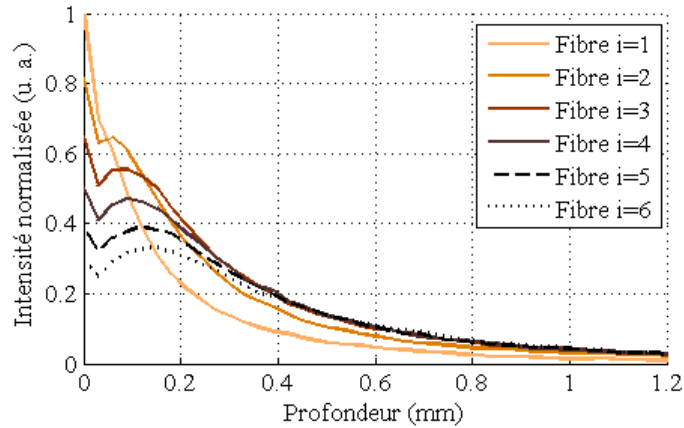


Figure 4-12 : Profils d'intensité lumineuse en fonction de la profondeur

De façon similaire au paragraphe 3.1.2, nous calculons :

- la "profondeur privilégiée" : coordonnée axiale où la probabilité qu'un photon l'atteigne est maximale. Cela correspond aux profondeurs pour lesquelles l'intensité normalisée est maximale sur la Figure 4-12. On ne tient pas compte de la coordonnée $Profondeur = 0 \text{ mm}$ dont le résultat systématiquement élevé est interprété comme un effet de bord.
- la "profondeur maximale sondée" : coordonnée axiale dont l'intensité normalisée est égale à 0,2.
- la "résolution axiale" de chaque couple source-détecteur : distance entre la "profondeur maximale sondée" et la "profondeur privilégiée".

Ces définitions sont arbitraires et sont introduites pour comparer les résultats de Micro-DRS aux résultats de DRS. Nous donnons les valeurs de ces quantités pour chaque fibre dans le Tableau 4-1.

Fibre	Profondeur privilégiée (mm)	Profondeur maximale sondée (mm)	Résolution axiale (mm)
$i = 1$	0,00	0,24	0,24
$i = 2$	0,06	0,33	0,27
$i = 3$	0,09	0,39	0,30
$i = 4$	0,09	0,39	0,30
$i = 5$	0,12	0,39	0,27
$i = 6$	0,15	0,36	0,21

Tableau 4-1 : Valeur des profondeurs privilégiées et maximales sondées pour chaque distance source-détecteur simulée

Nous retiendrons que la profondeur maximale sondée dans ce milieu par la Micro-DRS est d'environ 400 μm et que la "profondeur privilégiée" par la fibre 6 est de 150 μm sous la surface. Ceci indique que le système de projection mis en place permet de sonder de manière préférentielle l'épaisseur de l'épiderme (entre 100 et 200 μm). En comparaison avec la DRS standard, l'échelle de propagation des photons est environ divisée par 4. On ne retrouve pas exactement le facteur de réduction $R = 6$. Ce facteur dimensionne la propagation de la lumière en optique géométrique mais, sous la surface de la peau, c'est l'optique diffuse qui dicte sa propagation. De plus, l'ouverture numérique de collection a changé, ce changement de paramètre peut aussi participer à la différence entre les deux facteurs.

4.3.2 Étude du signal de réflectance

Pour avoir une idée de la dépendance de la réflectance d'un échantillon en fonction de ses paramètres d'absorption, de diffusion élastique et d'anisotropie, des simulations Monte Carlo (voir Annexe 2) ont été effectuées en réduisant la géométrie d'illumination et de collection de la sonde DRS d'un facteur 6 correspondant au facteur de réduction du système de projection utilisé. L'ouverture numérique des fibres de collection a aussi été modifiée : en DRS standard, elle était de 0,22; en Micro-DRS, elle correspond à l'ouverture numérique de l'objectif de microscope et vaut 0,8.

Simulations Monte Carlo

Ces simulations ont permis de construire une nouvelle LUT (*Look-Up Table*) dont les gammes de variation des différents paramètres optiques sont les suivantes:

- $n = 1,4$ pour l'indice de réfraction du milieu de propagation des photons;
- g varie de 0,5 à 0,9 avec un pas de 0,01;
- μ_a varie de 0 cm^{-1} à 9 cm^{-1} avec un pas de 0,05 cm^{-1} ;
- μ_s varie de 10 cm^{-1} à 510 cm^{-1} avec un pas de 2 cm^{-1} ;
- $N = 1 \times 10^6$ photons simulés.

Résultats

Nous verrons successivement quelle est l'influence des paramètres optiques g , μ_a et μ_s sur le signal de réflectance simulé en fonction de la distance source-détecteur (Fibre 1 à Fibre 6). Ces observations nous seront utiles dans l'élaboration d'un algorithme de reconstruction de ces trois propriétés optiques.

Influence de g

Dans ce paragraphe, on souhaite mettre en évidence la dépendance de l'intensité rétrodiffusée en fonction de g , le paramètre d'anisotropie.

Remarque 1-1 : la réflectance est donnée pour quatre valeurs de g en fonction de μ_a et μ'_s en Figure 4-13. Contrairement aux résultats obtenus en DRS standard au paragraphe 3.2.1, les nappes de réflectance $R_{LUT}^i(\mu_a, \mu'_s)$ obtenues n'apparaissent pas parfaitement superposées. Ceci signifie que μ_a et μ'_s ne suffisent plus à décrire le parcours de la lumière dans les milieux diffusants de propriétés optiques proches de la peau et sondés par la Micro-DRS. En effet,

l'hypothèse de l'approximation de la diffusion selon laquelle la lumière parcourt une distance très supérieure à $1/\mu'_s$ peut ne plus être satisfaite.

Remarque 1-2 : nous l'observons plus précisément en Figure 4-14. Pour $\mu'_s = 30 \text{ cm}^{-1}$ et pour tout μ_a , l'influence de g est notable sur les deux premières distances source-détecteur. En revanche, plus μ'_s augmente, plus l'effet de g est faible. Pour $\mu'_s \geq 70 \text{ cm}^{-1}$, les fibres 2 à 6 sont insensibles aux variations de g . L'épiderme ayant un coefficient de diffusion réduit globalement inférieur à 70 cm^{-1} (voir Tableau 1-4), les quatre plus grandes distances source-détecteur pourront donc être dédiées à la détermination du paramètre μ'_s dans l'algorithme de reconstruction, ceci indépendamment des valeurs de g et μ_s .

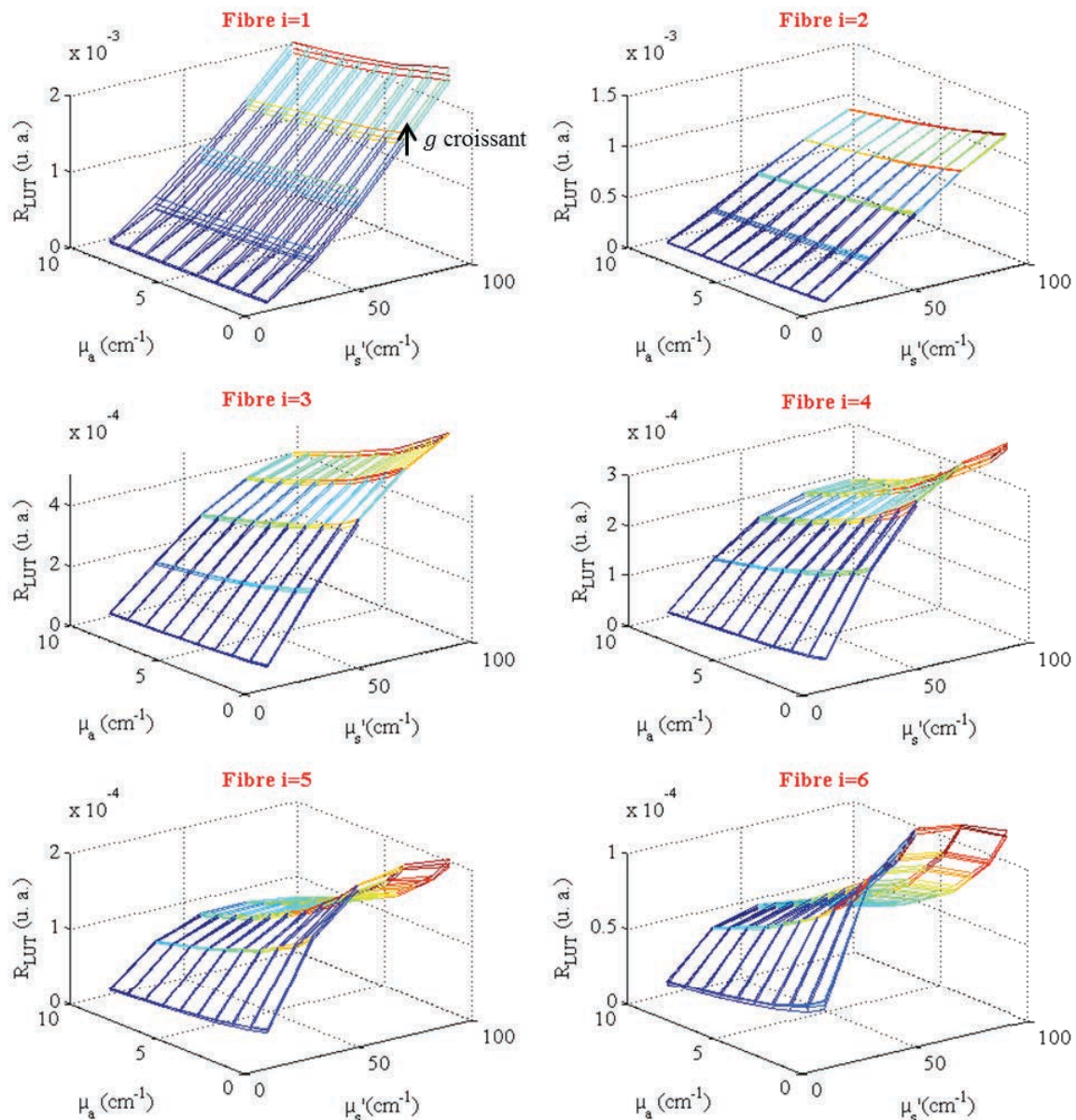


Figure 4-13 : Cartographie des réflectances $R_{LUT}^i(\mu_a, g, \mu'_s)$ obtenues par des simulations Monte Carlo sur les six distances source-détecteur. La réflectance est représentée en fonction de (μ_a, μ'_s) pour différentes valeurs de g (de 0,5 à 0,8 avec un pas de 0,1).

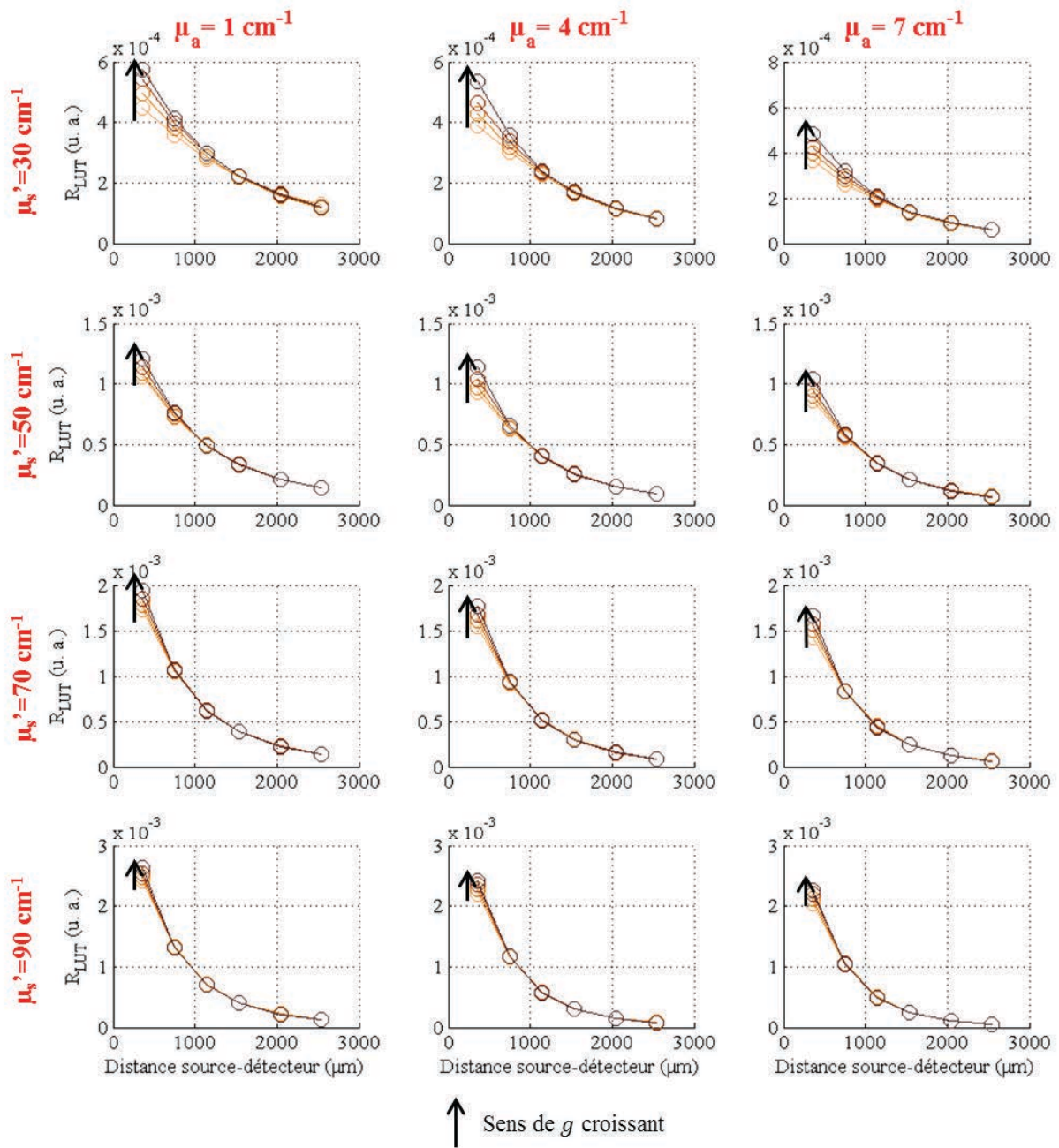


Figure 4-14 : Courbes de réflectance diffuse issues de la LUT en fonction de la distance-source-détecteur pour différents couples (μ_a, μ_s') . g croît de 0,5 à 0,8 avec un pas de 0,1.

Remarque 1-3 : dans la Figure 4-15, on affiche la dépendance de l'intensité rétrodiffusée en fonction de g mais cette fois pour différents couples (μ_a, μ_s) . Les courbes sont normalisées par rapport à la courbe de réflectance de plus faible niveau de signal ($g = 0,9$). Nous retiendrons que la réflectance diminue lorsque g augmente, c'est-à-dire lorsque la direction de diffusion privilégiée est de plus en plus orientée vers l'avant. Cette tendance s'inverse sur les distances source-détecteur les plus grandes lorsque $\mu_s > 200 \text{ cm}^{-1}$. Ceci semble logique car plus les photons seront diffusés vers l'avant, plus ils voyageront profondément dans le tissu, donc plus ils seront détectés à une grande distance source-détecteur. Il est alors normal que la réflectance décroisse avec g sur les faibles distances.

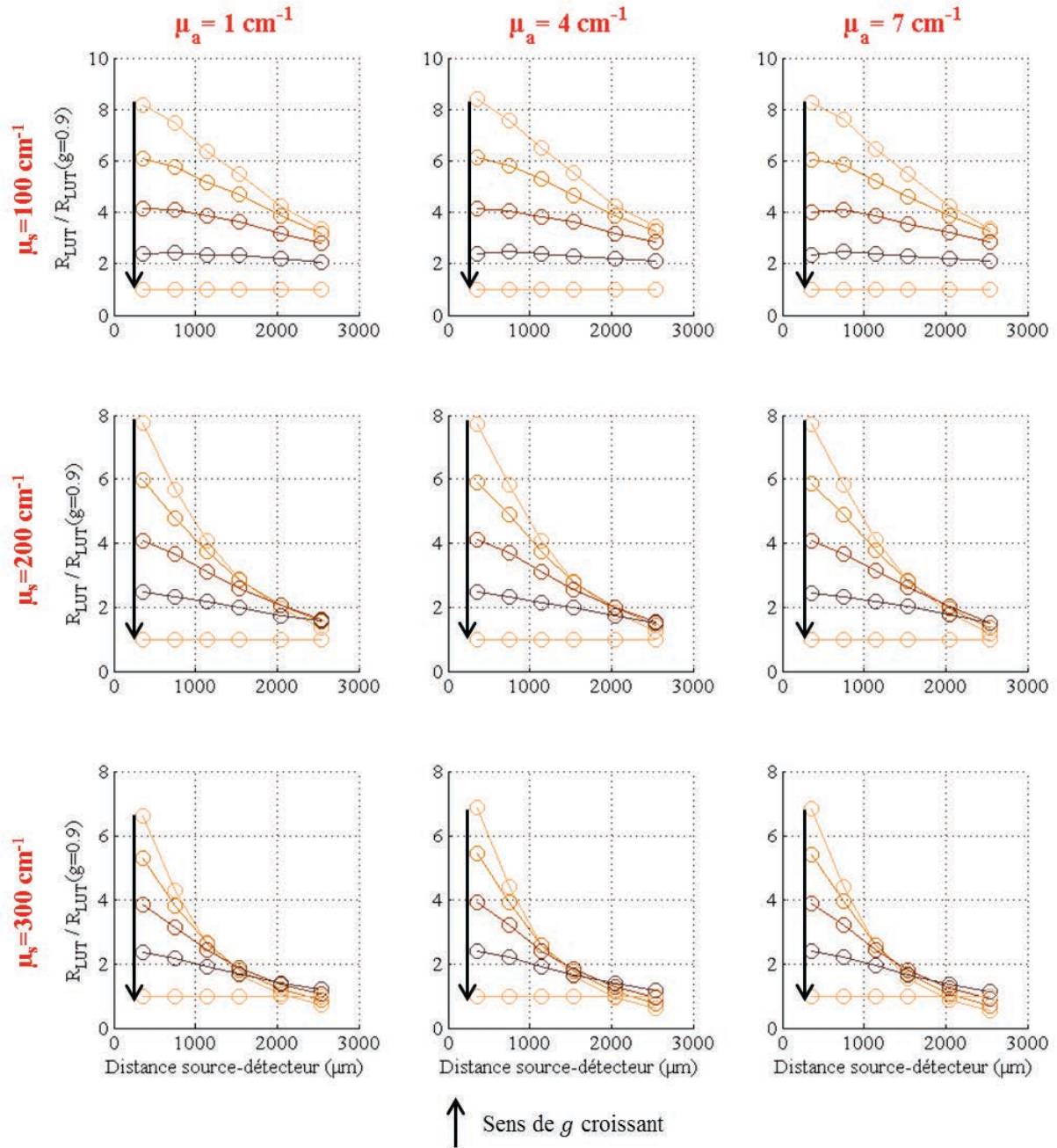


Figure 4-15: Courbes de réflectance diffuse issues de la LUT et normalisées par $R_{LUT}^i(\mu_a, g = 0,9, \mu_s)$ en fonction de la distance-source-détecteur pour différents couples (μ_a, μ_s) . g croît de 0,5 à 0,9 avec un pas de 0,1

Influence de μ_a

Dans ce paragraphe, on souhaite mettre en évidence la dépendance de l'intensité rétrodiffusée en fonction du coefficient d'absorption μ_a . Nous affichons en Figure 4-16 les nappes de réflectance $R_{LUT}^i(g, \mu_s)$ pour des valeurs de μ_a allant de 0 à 3 cm^{-1} .

Remarque 2-1: μ_a semble n'avoir qu'un effet d'homothétie sur l'intensité rétrodiffusée puisque la forme des nappes est conservée quelle que soit la valeur du coefficient d'absorption.

Remarque 2-2 : en toute logique, la sensibilité de la réflectance au coefficient d'absorption augmente avec la distance source-détecteur. Pour développer un algorithme de reconstruction des propriétés optiques, on privilégiera donc les fibres les plus éloignées pour calculer μ_a .

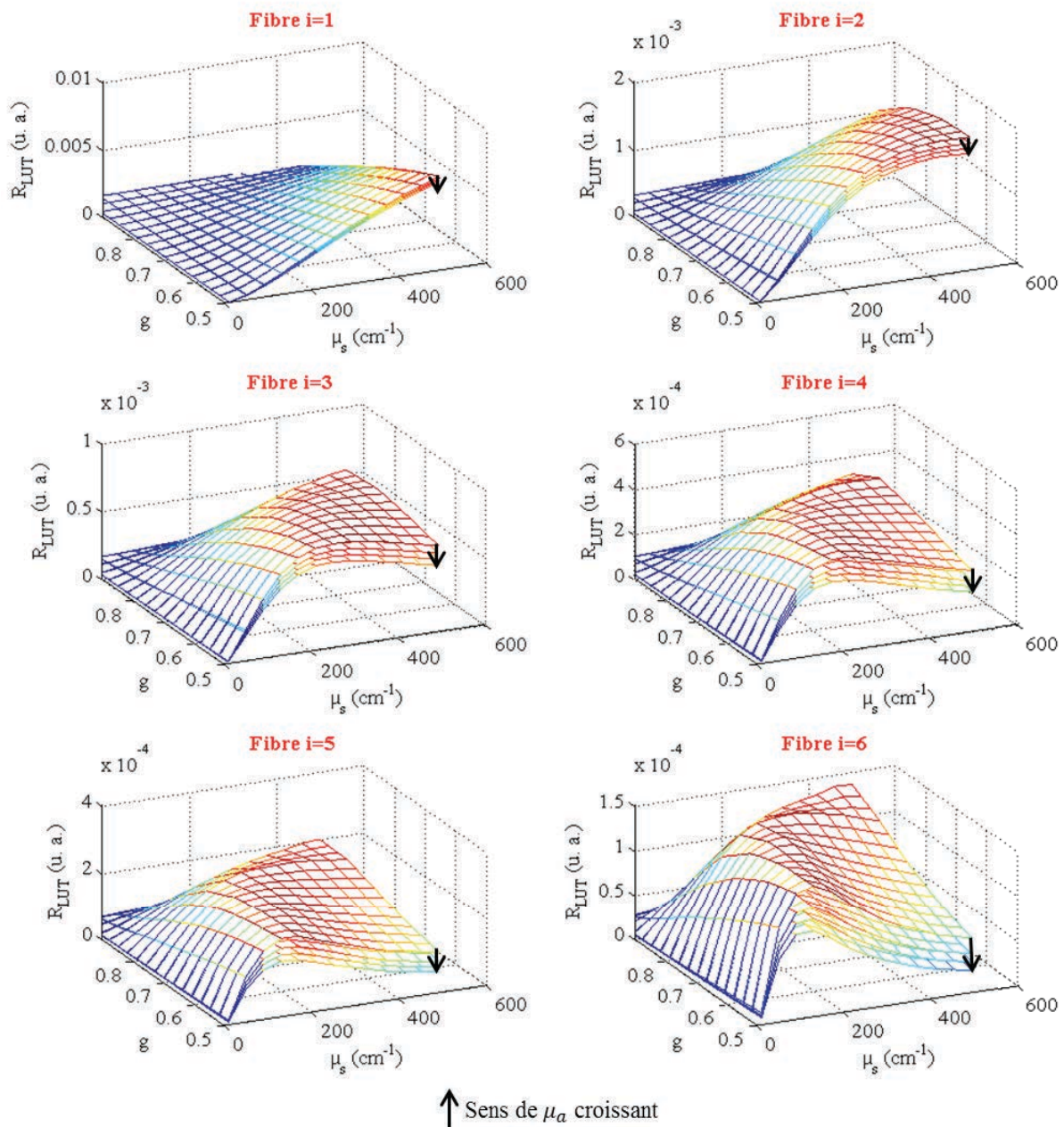


Figure 4-16 : Cartographie des réflectances $R_{LUT}^i(\mu_a, g, \mu_s)$ obtenues par des simulations Monte Carlo sur les six distances source-détecteur. La réflectance est représentée en fonction de (μ_s, g) . μ_a croît de 0 à 3 cm^{-1} avec un pas de 1 cm^{-1} .

Influence de μ_s

Nous analyserons l'effet du coefficient de diffusion à partir de la Figure 4-16.

Remarque 3-1 : Pour les valeurs de μ_s comprise entre 0 et 200 cm^{-1} , la tendance est toujours la même, quel que soit g et quelle que soit la distance source-détecteur : la réflectance

augmente lorsque μ_s augmente. Pour des valeurs de coefficient de diffusion plus importantes qui sont bien au-delà des valeurs rencontrées avec les fantômes, la tendance s'inverse à partir de la fibre $i=5$. Nous verrons au Chapitre 5 que ces valeurs du coefficient de diffusion ne seront pas non plus atteintes sur des peaux naturelles.

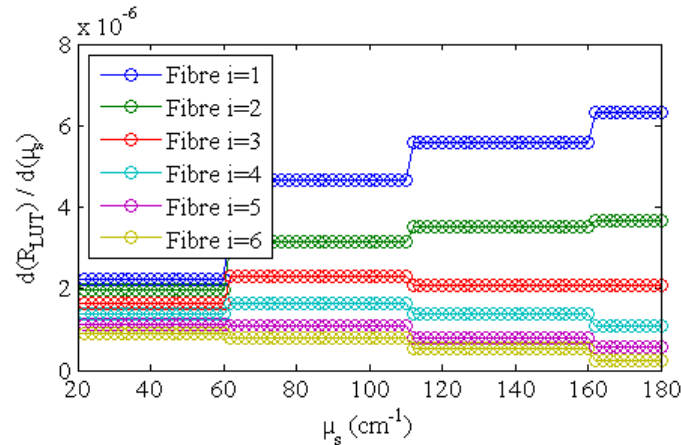


Figure 4-17 : Dérivée de $R_{LUT}^i(\mu_a = 0,5 \text{ cm}^{-1}, g = 0,8, \mu_s)$ selon μ_s

Remarque 3-2 : Nous donnons en Figure 4-17 l'évolution de la dérivée du signal simulé de réflectance en fonction de μ_s dans le cas où $g = 0,8$ et $\mu_a = 0,5 \text{ cm}^{-1}$. Cette donnée permet de contrôler la sensibilité de la méthode au coefficient de diffusion en fonction de la distance source-détecteur. Nous observons que cette sensibilité décroît avec la distance source-détecteur.

Remarque 3-3 : Notons aussi que pour les fibres 3 à 6, lorsque $\mu_s \geq 100 \text{ cm}^{-1}$, la sensibilité décroît lorsque le coefficient de diffusion augmente.

4.4 Résultats obtenus sur fantômes

Nous montrerons, dans cette partie, que les résultats expérimentaux obtenus sur fantômes démontrent bien la capacité de notre instrumentation de Micro-DRS à détecter des variations de propriétés optiques. Au premier paragraphe, nous décrirons les protocoles d'acquisition et de prétraitement des signaux de Micro-DRS. Nous proposerons, de plus, un algorithme de reconstruction des propriétés optiques μ_a , μ_s' , μ_s et g . Nous montrerons dans le deuxième paragraphe que les résultats de prétraitement sont en accord avec les résultats de simulation Monte Carlo (paragraphe 4.3.2). Enfin, nous verrons que les propriétés optiques extraites à partir de l'algorithme sont conformes aux attentes et très encourageantes sur les capacités de la méthode à caractériser l'épiderme.

4.4.1 Matériels et méthodes

Des mesures de Micro-DRS ont été effectuées sur des fantômes solides et liquides dont nous rappellerons les caractéristiques. Nous décrirons les étapes expérimentales nécessaires à l'acquisition des signaux de réflectance diffuse dans cette configuration. Ensuite, les différentes étapes de prétraitement seront listées. Enfin, nous présenterons l'algorithme d'extraction des propriétés optiques qui a été développé spécifiquement suite aux résultats de simulation du paragraphe 4.3.2.

Fantômes analysés

Nom	Intra 1	Intra 2
$\mu_a(532nm)$	0,58	0,54
$\mu'_s(532 nm)$	15,9	28,8

Tableau 4-2 : Valeur des propriétés optiques des fantômes liquides fabriqués mesurées par DRS (cm^{-1})

Coefficients de diffusion	Coefficients d'absorption
$\mu'_{s1}(532 nm) = 24,0 cm^{-1}$	$\mu_{a1N}(532nm) = 0,83 cm^{-1}$
$\mu'_{s2}(532 nm) = 31,1 cm^{-1}$	$\mu_{a2N}(532nm) = 0,84 cm^{-1}$
$\mu'_{s3}(532 nm) = 53,6 cm^{-1}$	$\mu_{a3N}(532nm) = 1,21 cm^{-1}$
$\mu'_{s4}(532 nm) = 70,5 cm^{-1}$	$\mu_{a4N}(532nm) = 1,45 cm^{-1}$
	$\mu_{a0}(532nm) = 0,61 cm^{-1}$

Tableau 4-3 : Rappel des coefficients de diffusion réduits et d'absorption mesurés au Chapitre 3 par DRS en fonction de la dénomination des fantômes.

Cette étude a été réalisée sur deux fantômes d'Intralipide de caractéristiques optiques mesurées par DRS décrites dans le Tableau 4-2 et sur des fantômes solides en PDMS monocouches dopés au TiO_2 . Nous présenterons les résultats en respectant les groupes de fantômes solides suivants, rassemblés en fonction de leurs propriétés optiques mesurées par DRS au Chapitre 3 (voir Tableau 4-3 pour rappel) :

- quatre fantômes de coefficient d'absorption μ_{a0} et de coefficient de diffusion réduit variable allant de μ'_{s1} à μ'_{s4} ;
- quatre fantômes de coefficient de diffusion réduit μ'_{s2} et de coefficient d'absorption variable allant de μ_{a1N} à μ_{a4N} .

Mode opératoire

Nous utilisons le même formalisme qu'au Chapitre 3 pour représenter les différentes quantités mesurées et prétraitées.

1. Le noir du détecteur *offset* est acquis (obturateur de la source lumineuse fermé), sans échantillon.
2. La réflexion parasite *reflexionⁱ* est acquise fibre par fibre (obturateur de la source lumineuse ouvert), sans échantillon.
3. L'échantillon à analyser est ensuite posé sur la platine de translation, sous l'objectif. Cette étape consiste à positionner la surface de l'échantillon dans le plan focal de l'objectif. Suite aux modifications effectuées sur le microscope (voir paragraphe 4.2.3), nous ne disposons plus de la vision oculaire pour le faire. L'évolution de la projection de la fibre d'illumination sur l'embout de sonde DRS (de l'espace "échantillon" vers l'espace "sonde") et l'évolution du signal de réflectance sur la fibre 2 en fonction de la position axiale de tout échantillon diffusant autour de la

distance de travail de l'objectif ont été simultanément examinées. Nous avons observé que l'image nette de la fibre d'illumination sur elle-même coïncidait avec un maximum de signal sur la seconde fibre. C'est cette position de l'échantillon que nous définissons comme la position de sa surface au plan focal de l'objectif.

4. Une fois cette position déterminée, les acquisitions de Micro-DRS sont effectuées fibre par fibre avec un temps d'intégration $TI(i)$ du spectromètre ajusté au niveau de signal. Le signal mesuré est appelé I^i .

Prétraitement des données

Nous présentons les étapes successives de prétraitement des signaux à l'aide du schéma-bloc de la Figure 4-18. Le noir du détecteur *offset* est d'abord soustrait aux signaux de réflexion parasite *reflexionⁱ* et aux signaux obtenus sur échantillon I^i . Les signaux de réflexion parasite ainsi que les signaux obtenus sur échantillon sont ensuite normalisés par rapport au temps d'intégration $TI(i)$ et par rapport au retour d'excitation I^0 . Enfin, les signaux de réflexion parasite résultants sont soustraits aux signaux obtenus sur échantillon.

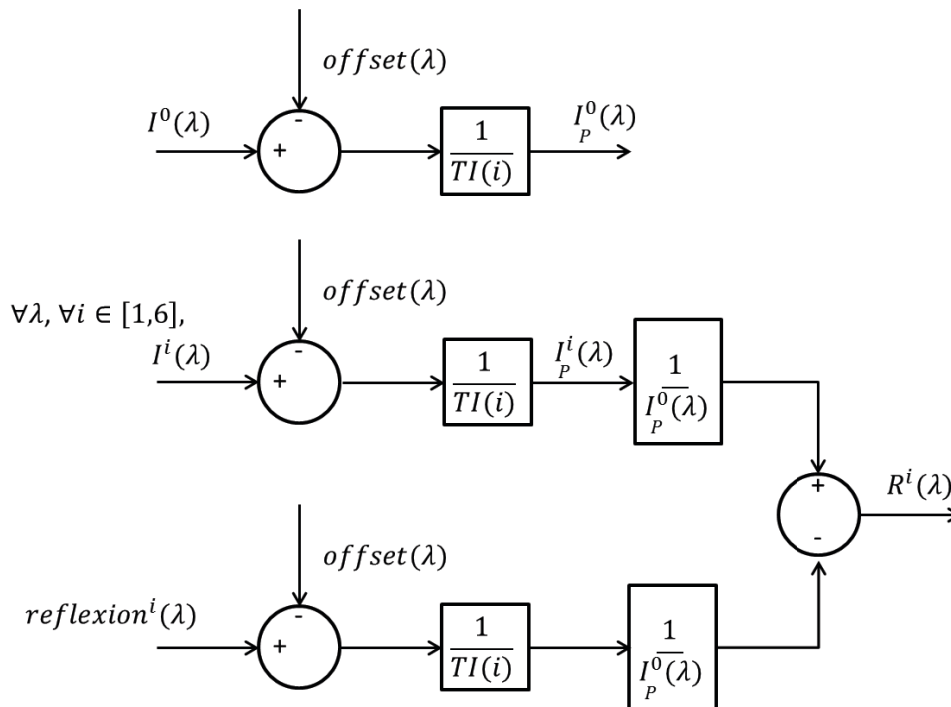


Figure 4-18 : Schéma-bloc décrivant les étapes successives du prétraitement des signaux de Micro-DRS.

Méthodes d'extraction des propriétés optiques

Nous proposons un algorithme de reconstruction des propriétés optiques μ_a , μ'_s , μ_s et g fortement inspiré de l'algorithme utilisé en DRS standard et décrit aux paragraphes 3.1.3 et 3.2.1. Cet algorithme a été adapté suite aux observations des résultats de simulation Monte Carlo (paragraphe 4.3.2). Dans le périmètre de ces travaux de thèse, l'objectif n'est pas de calculer les propriétés optiques de façon absolue. Nous souhaitons démontrer la faisabilité de l'utilisation d'une instrumentation de Micro-DRS pour détecter des variations de propriétés optiques existant d'un échantillon à un autre.

Etalonnage

On note R_{ref}^i la valeur de réflectance obtenue par la mesure sur fantôme de référence suite aux étapes de prétraitement décrites en Figure 4-18. Pour étalonner l'instrument et s'affranchir des fonctions de transfert optiques de chacun de ses constituants, nous utilisons la LUT préalablement construite et nous calculons :

$$\forall \lambda, \forall i \in [1,6], R_{inc,calib}^i(\lambda) = R_{inc}^i(\lambda) \times \frac{R_{LUT}^i(\mu_a(\lambda), g(\lambda), \mu_s(\lambda))_{ref}}{R_{ref}^i(\lambda)} \quad (4-15)$$

avec $(\mu_a(\lambda), g(\lambda), \mu_s(\lambda))_{ref}$ la valeur théorique des propriétés optiques du fantôme de référence et $R_{inc}^i(\lambda)$ la réflectance prétraitée obtenue sur l'échantillon à caractériser, ceci à la longueur d'onde λ considérée.

Etape 1 : Calcul de $(\mu_{a,inc}, \mu'_{s,inc})$

On cherche en premier lieu à déterminer $(\mu_{a,inc}, \mu'_{s,inc})$ en utilisant les distances source-détecteur où l'approximation de la diffusion est encore valide, c'est-à-dire où la réflectance est totalement décrite par les deux paramètres (μ_a, μ'_s) . Les fibres utilisées sont donc les fibres $i=3$ à $i=6$ (voir Figure 4-14).

Pour chaque longueur d'onde λ , l'algorithme développé minimise ensuite par la méthode des moindres carrés la quantité :

$$Diff_{norm}^{\mu'_s}(\lambda) = \sqrt{\sum_{i=3}^6 (Diff^i(\lambda))^2} \quad (4-16)$$

où $Diff^i(\lambda) = R_{LUT}^i(\mu_a, \mu'_s) - R_{inc,calib}^i(\lambda)$.

La valeur de μ'_s minimisant $Diff_{norm}^{\mu'_s}$ est prise pour $\mu'_{s,inc}$. Dans le deuxième temps, on cherche à affiner la valeur de μ_a correspondante.

Pour chaque longueur d'onde λ , l'algorithme développé minimise par la méthode des moindres carrés la quantité :

$$Diff_{norm}^{\mu_a}(\lambda) = \sqrt{\sum_{i=4}^6 (Diff^i(\lambda))^2} \quad (4-17)$$

où $Diff^i(\lambda) = R_{LUT}^i(\mu_a, \mu'_{s,inc}) - R_{inc,calib}^i(\lambda)$.

La valeur de μ_a minimisant $Diff_{norm}^{\mu_a}$ est prise pour $\mu_{a,inc}$.

Etape 2 : Calcul de $(\mu_{s,inc}, g_{inc})$ connaissant $\mu_{a,inc}$ calculé à l'étape 1

Une fois le coefficient d'absorption $\mu_{a,inc}(\lambda)$ déterminé, pour chaque longueur d'onde λ , l'algorithme développé minimise par la méthode des moindres carrés la quantité :

$$Diff_{norm}^{\mu_s, g}(\lambda) = \sqrt{\sum_{i=1}^6 (Diff^i(\lambda))^2} \quad (4-18)$$

où $Diff^i(\lambda) = R_{LUT}^i(\mu_{a,inc}, g, \mu_s) - R_{inc,calib}^i(\lambda)$.

La valeur du couple (μ_s, g) minimisant $Diff_{norm}^{\mu_s, g}$ est prise pour $(\mu_{s,inc}, g_{inc})$.

Simplification : a priori sur $g(\lambda)$

L'objectif principal de ce travail de thèse n'était pas de développer un algorithme exact pour la Micro-DRS mais de démontrer, en premier lieu, que cette nouvelle technique donne accès à une mesure sensible aux propriétés optiques de l'épiderme. La faisabilité de la Micro-DRS prouvée, il sera alors possible d'améliorer l'algorithme mis au point dans le cadre de la faisabilité. De plus, nous ne disposons d'aucune autre méthode pour caractériser le coefficient d'anisotropie des fantômes fabriqués. Nous n'avons donc pas de données de référence auxquelles comparer les résultats de reconstruction concernant g . Nous proposons donc de simplifier l'algorithme avec un *a priori* sur $g(\lambda)$ afin d'en réduire la complexité, quitte à perdre en exactitude.

Pour cela, nous supposons g constant quelles que soient les concentrations en TiO_2 et en Intralipide des fantômes. Nous avons peu d'informations issues de la littérature à ce sujet et cette hypothèse semble adaptée au premier ordre.

Concernant la variation de g avec la longueur d'onde, nous nous basons sur les travaux suivants : pour les fantômes d'Intralipide, nous supposons d'après (van Staveren, et al. 1991) :

$$g(\lambda) = 1,1 - 0,58 \times 10^{-3} \lambda \quad (4-19)$$

et pour les fantômes solides, nous supposons d'après (Montcel 2005) :

$$g(\lambda) = 0,78 - 1,07 \times 10^{-4} \lambda \quad (4-20)$$

avec λ en nm.

4.4.2 Résultats prétraités

Dans ce paragraphe, nous présentons les signaux prétraités obtenus sur les fantômes énumérés au paragraphe 4.4.1. Nous étudierons successivement la sensibilité de la mesure au niveau de diffusion et au niveau d'absorption des fantômes. Pour cela, nous afficherons pour chaque fibre de collection l'ensemble des signaux prétraités obtenus sur une gamme de fantôme ainsi que le contraste (quantité permettant de quantifier la différence d'intensité détectée entre les fantômes d'une même gamme).

Sensibilité au niveau de diffusion

Que les particules diffusantes soient de l'Intralipide (Figure 4-19) ou du TiO_2 (Figure 4-20), les signaux de réflectance mesurés sur les fibres 1 à 5 augmentent avec leur concentration.

Ceci est conforme aux résultats des simulations Monte Carlo concernant l'influence de μ_s (Remarque 3-1).

En ce qui concerne les deux fantômes les plus diffusants (fantômes solides μ'_{s3} et μ'_{s4}), leurs signaux de réflectance sont quasi-confondus pour les fibres 5 et 6. Ce résultat rejoint une autre observation faite en Remarque 3-3 : la sensibilité de la méthode sur les fibres les plus éloignées diminue lorsque μ_s augmente. Nous avons donc atteint la limite de sensibilité de la fibre $i=6$ à ces niveaux de diffusion.

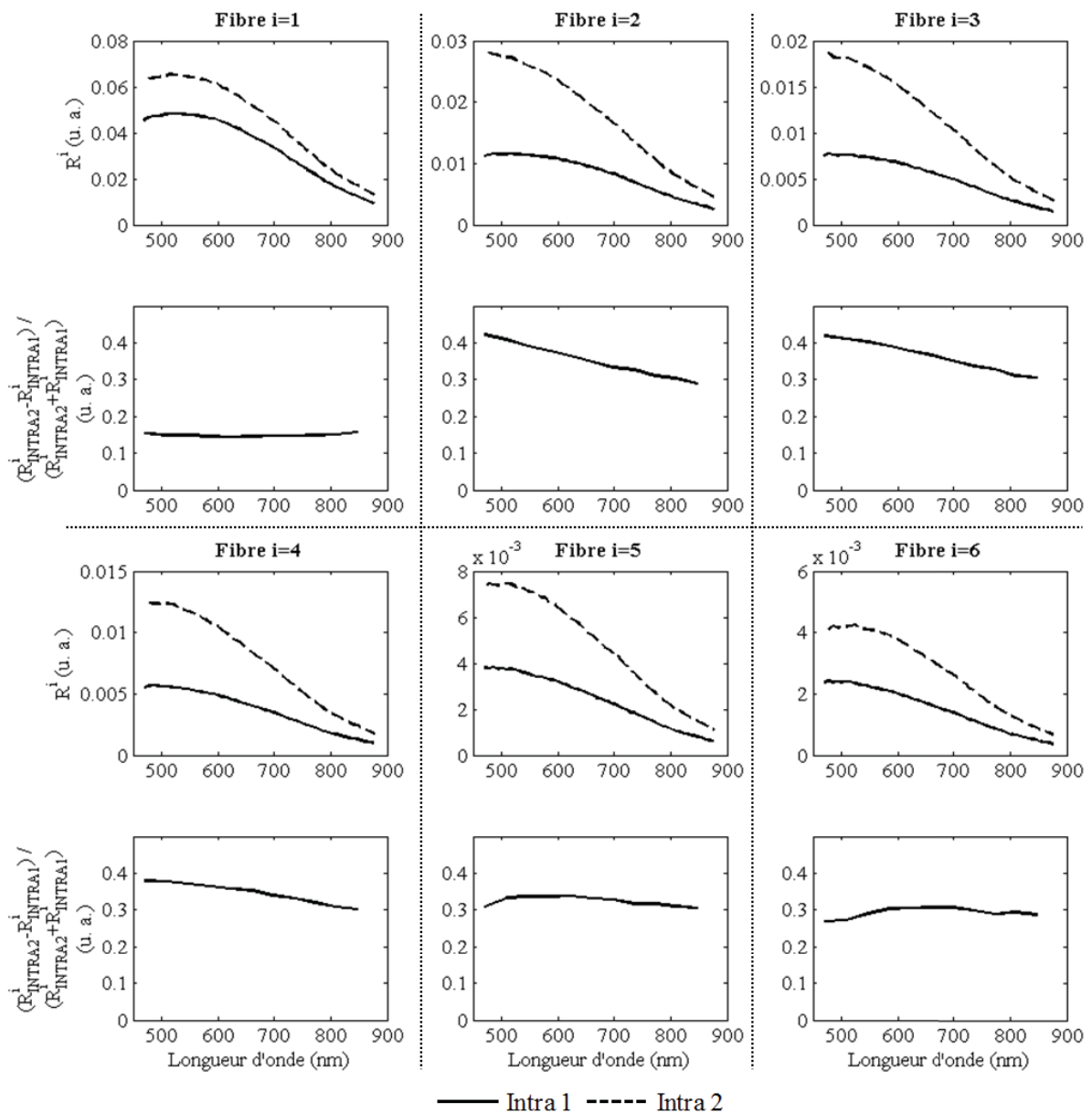


Figure 4-19 : Signaux de réflectance prétraités et contraste obtenus sur les fantômes d'Intralipide Intra 1 et Intra 2 (μ_a constant et μ_s variable)

Enfin, il avait été observé en Remarque 3-2 que la sensibilité au coefficient de diffusion diminuait avec la distance source-détecteur. Cela est confirmé pour les fibres 2 à 6 : le contraste de signal par rapport au fantôme le plus diffusant diminue effectivement avec l'éloignement du point d'illumination. En revanche, ce contraste augmente de la fibre 1 à la fibre 2. On atteint peut-être ici une limite à l'hypothèse mentionnée ci-dessus selon laquelle g serait constant avec la concentration des fantômes en particules diffusantes. Ce résultat pourrait être expliqué par une augmentation du coefficient d'anisotropie avec la concentration (Remarque 1-3) qui aurait tendance à atténuer le signal de réflectance des fibres 1 et 2 pour un même coefficient de diffusion.

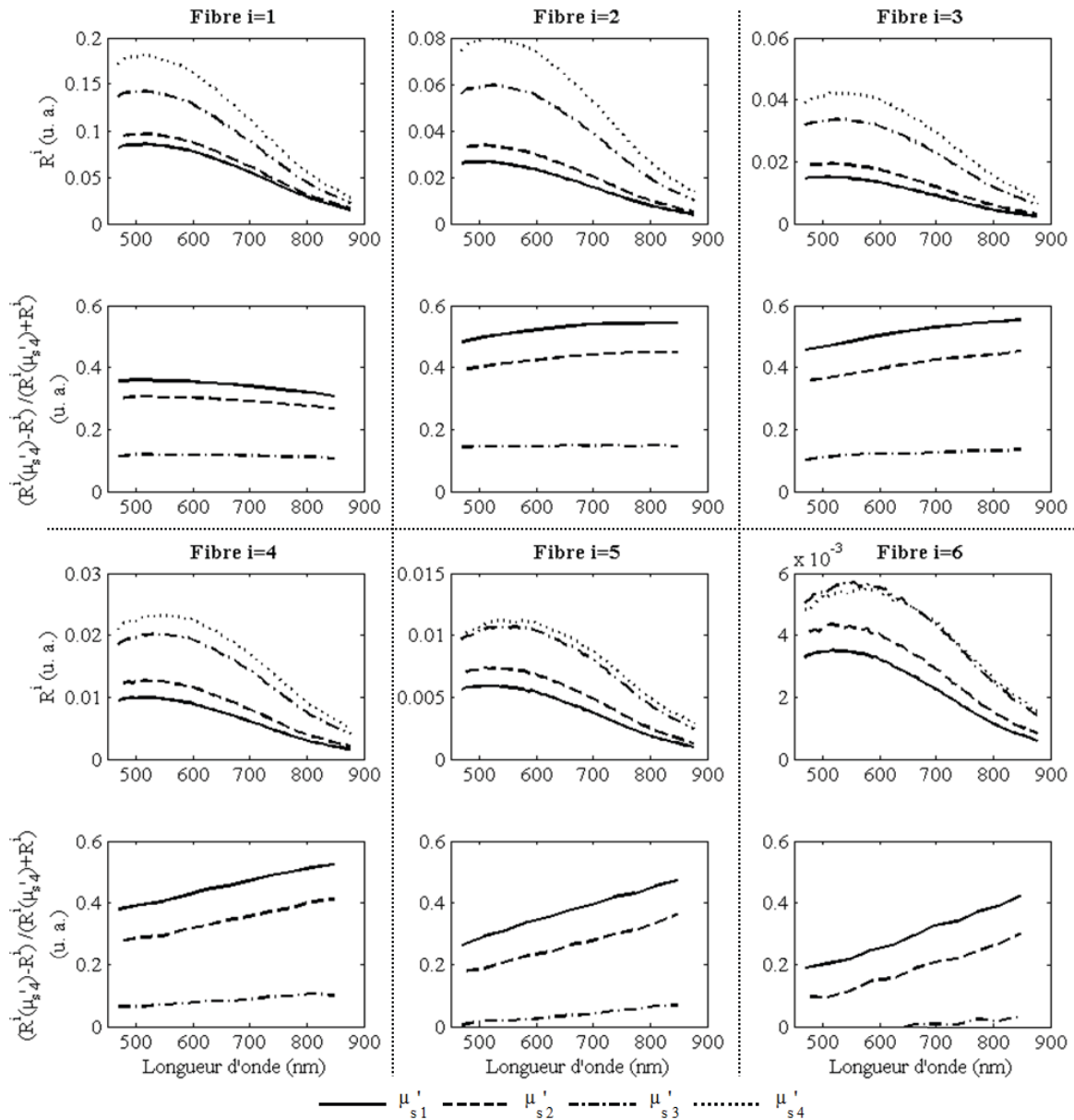


Figure 4-20 : Signaux de réflectance prétraités et contraste obtenus sur les fantômes solides en PDMS de la gamme μ'_{s1} à μ'_{s4} (μ_a constant et μ_s variable)

Sensibilité au niveau d'absorption

L'ensemble des résultats présentés en Figure 4-21 fait écho à la Remarque 2-2. En effet, les signaux de réflectance pour de faibles distances source-détecteur (Fibres 1 et 2) sont quasi-confondus alors que le coefficient d'absorption n'est pas le même d'un fantôme à l'autre. En revanche, les variations d'absorption sont visibles sur la réflectance collectée par les fibres les plus éloignées de la fibre d'illumination (Fibres 5 et 6). C'est à ces distances source-détecteur que le contraste par rapport au fantôme le moins absorbant est le meilleur.

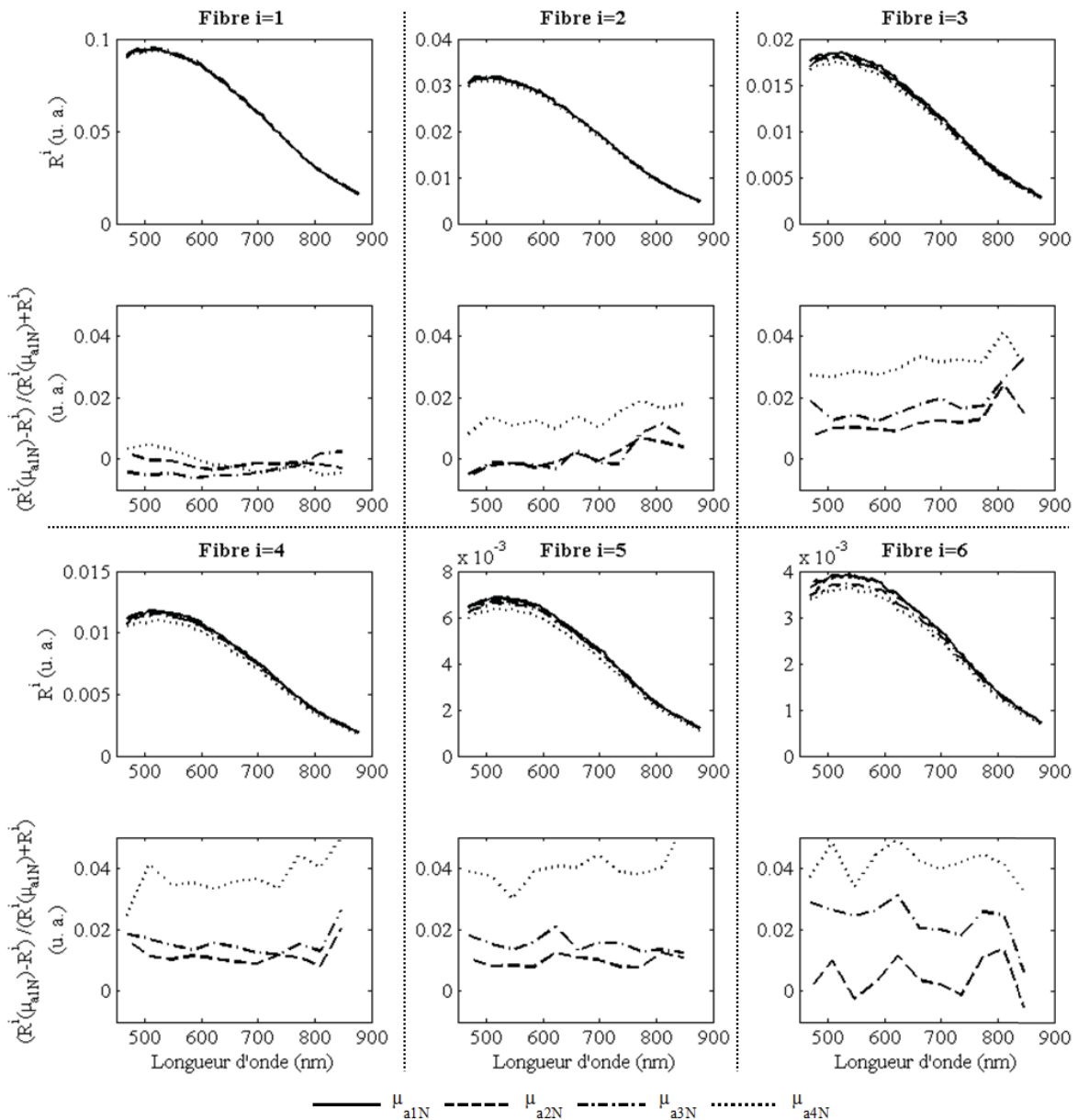


Figure 4-21 : Signaux de réflectance prétraités obtenus et contraste sur les fantômes solides en PDMS de la gamme μ_{a1N} à μ_{a4N} (μ_s constant et μ_a variable)

Conclusion

De manière générale, ces résultats expérimentaux sont cohérents avec les résultats de simulation du paragraphe 4.3.2.

4.4.3 Extraction des propriétés optiques

L'algorithme décrit au paragraphe 4.4.1 avec simplification est utilisé pour calculer les propriétés optiques des fantômes à partir des résultats prétraités présentés au paragraphe 4.4.2. Le fantôme de référence utilisé est Intra 2. Nous comparerons les propriétés reconstruites à l'issue de l'étape 1 (μ_a et μ'_s) aux propriétés optiques mesurées par la DRS pour vérifier que les tendances sont reproduites avec la Micro-DRS à la longueur d'onde de 532 nm. Pour analyser les résultats de l'étape 2, nous comparerons l'allure spectrale du coefficient μ_s reconstruit aux modèles identifiés dans la littérature ((Montcel 2005) pour le TiO_2 et (van Staveren, et al. 1991) pour l'Intralipide).

Résultats de l'étape 1 : calcul de μ_a et μ'_s

Fantômes d'Intralipide

Puisque le fantôme de référence utilisé est Intra 2, ses propriétés d'absorption et de diffusion sont estimées avec justesse. En revanche, le coefficient d'absorption extrait à 532 nm pour Intra 1 est de 0 cm^{-1} et est donc sous-estimé (voir Tableau 4-2). Pourtant, l'algorithme extrait des coefficients de diffusion réduits proches des valeurs obtenus par DRS standard pour Intra 1 et Intra 2 (Figure 4-22).

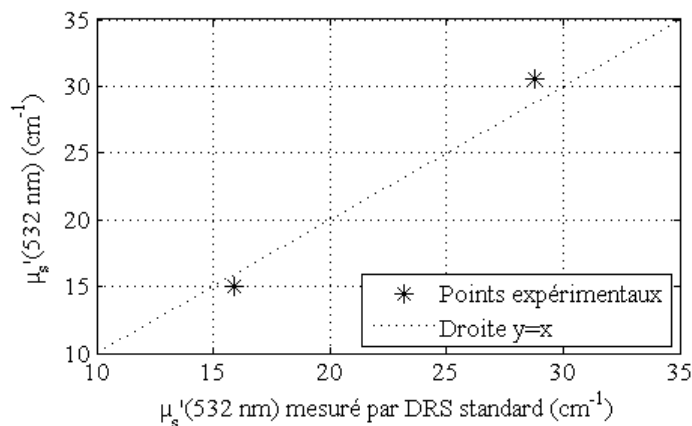


Figure 4-22 : Coefficients de diffusion réduit extraits à 532 nm par Micro-DRS sur les fantômes d'Intralipide en fonction du résultat obtenu par DRS standard.

Fantômes solides à μ'_{s2} constant et de coefficient d'absorption variable

Quant aux coefficients d'absorption des fantômes solides, ils sont surestimés par rapport aux résultats de DRS standard (Figure 4-23). Cependant, la tendance montrant un niveau d'absorption croissant de μ_{a1N} à μ_{a4N} est conservée; comme ce que l'on souhaitait démontrer.

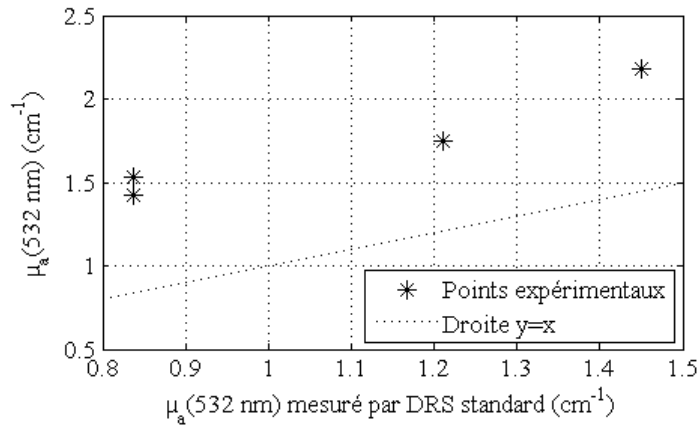


Figure 4-23 : Coefficients d'absorption extraits à 532 nm par Micro-DRS sur les fantômes solides en PDMS en fonction du résultat obtenu par DRS standard.

Fantômes solides à μ_{a0} constant et de coefficient de diffusion réduit variable

L'algorithme extrait des coefficients de diffusion réduits proches des valeurs obtenues par DRS standard sur toute la gamme allant de μ'_{s1} à μ'_{s4} (Figure 4-24). La tendance selon laquelle le niveau de diffusion est croissant de μ'_{s1} à μ'_{s4} est conservée.

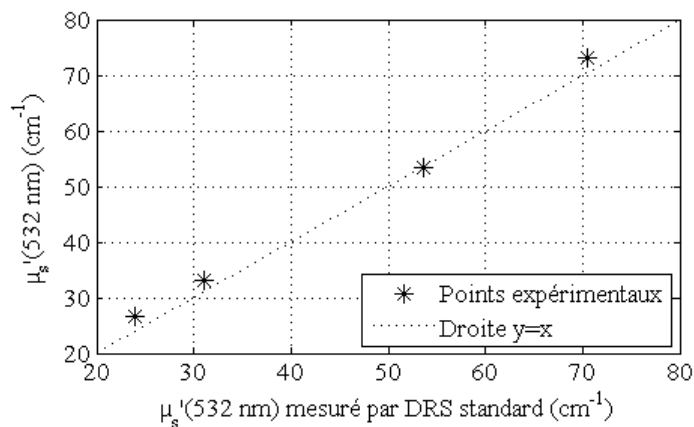


Figure 4-24 : Coefficients de diffusion réduit extraits à 532 nm par Micro-DRS sur les fantômes solides en PDMS en fonction du résultat obtenu par DRS standard.

Résultats de l'étape 2 : calcul de μ_s

Les spectres de diffusion extraits à l'issue de l'étape 2 sont conformes en termes de allure aux modèles issus de la littérature sur leurs domaines de validité. Ceci est observé quelle que soit la nature des particules diffusantes et quelle que soit la concentration des fantômes (Intralipide en Figure 4-25 ou TiO_2 en Figure 4-26).

Fantômes d'Intralipide

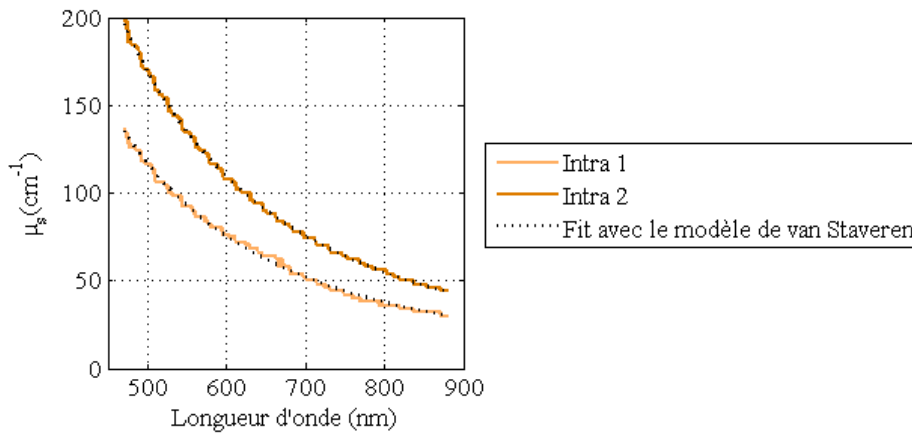


Figure 4-25 : Spectre de diffusion extrait par Micro-DRS sur les fantômes d'Intralipide et ajustement par le modèle de (van Staveren, et al. 1991)

Fantômes solides à μ_{a0} constant et de coefficient de diffusion réduit variable

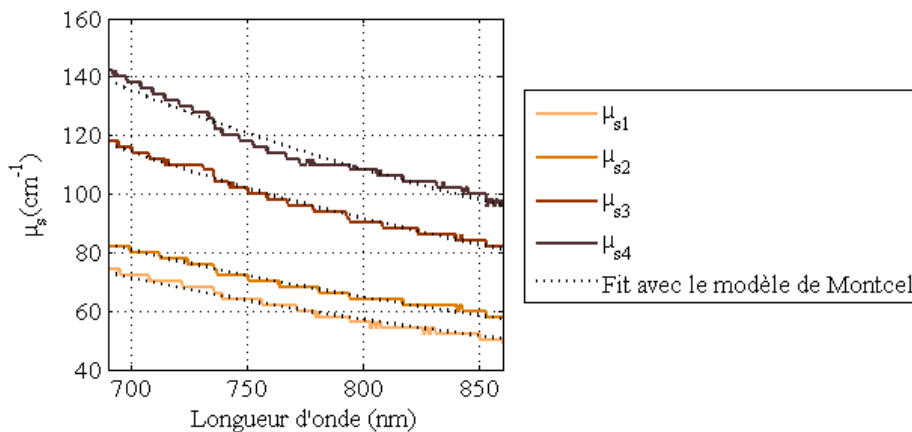


Figure 4-26 : Spectre de diffusion extrait par Micro-DRS sur les fantômes solides en PDMS et ajustement par le modèle de (Montcel 2005) sur son intervalle de validité

4.4.4 Conclusion

Grâce aux résultats issus de l'étape 1, on démontre que l'algorithme de reconstruction sait relier la baisse de signal de μ_{a1N} à μ_{a4N} sur les fibres 4 à 6 (Figure 4-21) à l'augmentation de l'absorption des fantômes. De même, il permet d'interpréter la hausse de signal de μ'_{s1} à μ'_{s4} comme une augmentation du niveau de diffusion des fantômes.

Le spectre d'anisotropie des fantômes analysés étant imposé, l'extraction du spectre de diffusion conserve la tendance observée à l'étape 1 en termes de niveau de signal et fournit une dépendance de μ_s en fonction de λ conforme aux modèles issus de la littérature.

4.5 Résumé

Le dispositif expérimental développé dans ce chapitre pour l'étude de faisabilité de la Micro-DRS permet d'atteindre un optimum de rendement optique pour le facteur de réduction

considéré. De ce fait, nous avons pu démontrer la faisabilité de la caractérisation séparée des coefficients μ_a , μ'_s , μ_s et g de l'épiderme avec ce type d'instrument. Nous disposons d'une sonde de Micro-DRS, de la *LUT* associée et d'un algorithme permettant de détecter les variations des paramètres μ_a , μ'_s et μ_s d'un échantillon à l'autre avec un *a priori*, issu de la littérature, sur la dépendance spectrale du coefficient g .

Chapitre 5 : Diffusion de la lumière dans la peau : variabilité en fonction de la zone de mesure et du vieillissement cutané

L'objectif de ce chapitre est de démontrer l'intérêt de la mesure des propriétés optiques de la peau en vue de corriger les profils expérimentaux Raman acquis au même endroit. Nous nous intéresserons plus particulièrement au phénomène de diffusion de la lumière, prépondérant sur le phénomène d'absorption dans la peau. Dans la première partie, des résultats de DRS *in vivo* obtenus sur un panel de 50 femmes seront présentés. Nous étudierons la sensibilité de la sonde standard à différentes variations physiologiques (zone anatomique de la mesure et vieillissement cutané). Ensuite, des résultats de Micro-DRS obtenus sur un échantillon de ce panel seront exposés et comparés aux résultats de DRS standard dans la deuxième partie. Les variations physiologiques et structurelles auxquelles est sensible la DRS sont potentiellement une source de distorsion des profils Raman, influençant le caractère quantitatif des données vibrationnelles. Dans la dernière partie, nous nous intéresserons au réseau de collagène, constituant prépondérant de la peau affectant le niveau de diffusion de la lumière et connu pour subir des altérations structurales au cours du vieillissement.

5.1 DRS *in vivo* : influence du site et du vieillissement cutané

Dans cette partie, le premier paragraphe décrit les matériels et méthodes employés dans l'étude de données *in vivo* obtenues par DRS standard. Dans le deuxième paragraphe, nous nous intéressons dans un premier temps aux variations du niveau de diffusion mais aussi à l'allure des spectres en fonction des zones de mesures. Ensuite, nous étudions l'effet du vieillissement cutané sur le niveau de diffusion de la peau ; l'évaluation objective du vieillissement étant réalisée par des mesures de cutométrie.

5.1.1 Matériels et méthodes

Instrument

Le système de DRS présenté au Chapitre 3 est utilisé pour caractériser optiquement la peau des panélistes. Le fantôme en PDMS de propriété de diffusion μ'_{s2} et de propriété d'absorption μ_{a1N} est utilisé en tant que fantôme de référence avec le résultat de caractérisation obtenu par DRS standard (partie 3.3). En considérant le signal prétraité moyen obtenu sur les 6 jours de cette étude (avec 2 à 3 mesures sur le fantôme de référence par jour).

Panélistes

Un groupe de 50 femmes en bonne santé, de phototype II ou III, ne présentant aucune maladie de peau a été sélectionné pour participer à cette étude. Leurs âges étaient uniformément distribués entre 20 et 70 ans (voir Figure 5-1).

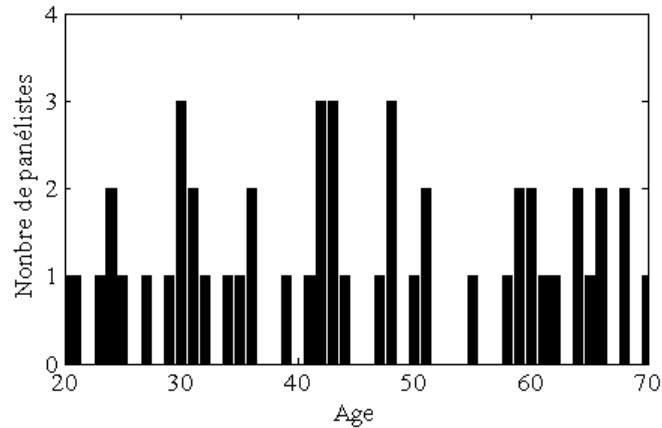


Figure 5-1 : Distribution de l'âge des panélistes

Les critères d'exclusion de cette étude étaient les suivants :

- exposition longue durée aux rayonnements ultra-violets (soleil ou cabines de bronzage) datant de moins d'un mois à la date des mesures;
- consommation régulière de tabac.

Durant les 48 heures précédant la mesure, le nettoyage de la peau ainsi que l'application de produits cosmétiques étaient interdits.

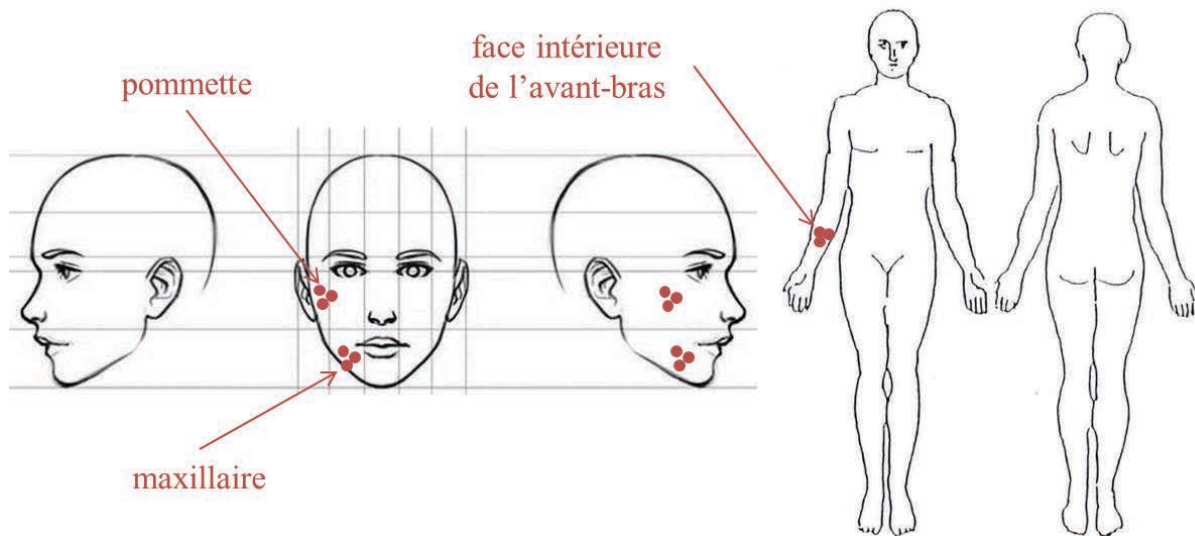


Figure 5-2 : Les zones de mesure (pommette, maxillaire et face intérieure de l'avant-bras). Chaque zone comprend trois points d'acquisition.

Les mesures de DRS sont effectuées en trois zones différentes : la pommette, l'os maxillaire et la face intérieure de l'avant-bras. En chacune de ces zones, trois acquisitions en trois points de mesure distants de moins de 5 mm sont enregistrées puis moyennées pour la suite de l'étude.

Cutométrie

Les propriétés mécaniques de la peau sont évaluées au niveau de la face intérieure de l'avant-bras (zone non exposée) avec le Cutometer[®] MPA580 (Courage & Khazaka Electronic GmbH, Cologne, Germany). Cette sonde applique une déformation verticale à la peau par aspiration (300 mbar) au travers d'une ouverture de 6 mm. La mesure consiste en cinq cycles consécutifs répétant une succion pendant 1 s suivie d'un temps de relaxation de 1 s (voir Figure 5-3). Cette mesure est reproduite trois fois pour tenir compte des variations physiologiques. Les paramètres U_f (élongation de la peau au premier cycle), U_r (relaxation à court-terme), U_a (relaxation maximale au premier cycle), U_{f5} (élongation de la peau au dernier cycle) et U_{a5} (relaxation maximale au dernier cycle) sont calculés comme indiqué dans la Figure 5-3. Ils sont utilisés pour déterminer le facteur de relaxation élastique ou fermeté $R_7 = U_r/U_f$ et le facteur de fatigue mécanique $R_8 = (U_{f5} - U_{a5}) - (U_f - U_a)$.

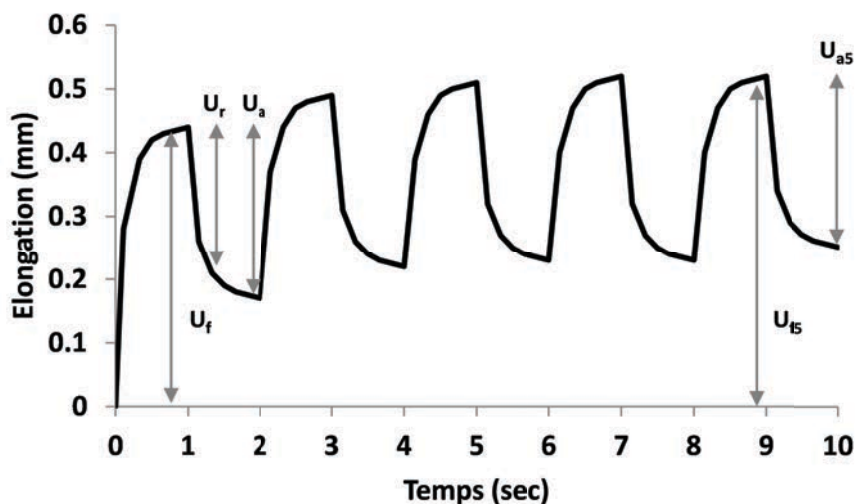


Figure 5-3 : Courbe de déformation typique de la peau obtenue avec le Cutometer[®]. Ce graphe est extrait de (Eklouh-Molinier, et al. 2015). La courbe est analysée via les paramètres U_f (élongation de la peau au premier cycle), U_r (relaxation à court-terme), U_a (relaxation maximale au premier cycle), U_{f5} (élongation de la peau au dernier cycle) et U_{a5} (relaxation maximale au dernier cycle).

Analyse du spectre de diffusion

Nous nous inspirons des travaux publiés dans (S. Jacques 2013, Bashkatov, Genina et Kochubey, et al. 2005, Zonios et Dimou 2009) pour analyser le spectre de diffusion $\mu'_s(\lambda)$ et en extraire des paramètres reliés à la structure de la peau. Rappelons que les caractéristiques de cette diffusion varient avec la taille et la forme des microstructures de la peau. Cela se traduit par différents types de régimes permettant de décrire analytiquement le phénomène lorsque la microstructure est assimilée à un ensemble de particules sphériques :

- le régime de Rayleigh lorsque la dimension des particules est très petite devant la longueur d'onde dont l'intensité du spectre résultant varie en λ^{-4} ;

- le régime de Mie (dont Rayleigh est un cas particulier) lorsque la dimension des particules est de l'ordre de grandeur de la longueur d'onde dont l'intensité du spectre résultant varie en λ^{-b} ;

Premièrement, nous déterminons la valeur du spectre de diffusion à la longueur d'onde de 500 nm : $\mu'_s(500 \text{ nm})$.

Ensuite, nous l'interprétons comme un spectre issu d'une diffusion de type Mie en déterminant le paramètre b tel que :

$$\mu'_s(\lambda) = \mu'_s(500 \text{ nm}) \times \left(\frac{\lambda}{500}\right)^{-b} \quad (5-1)$$

Le spectre est aussi interprété comme la superposition d'une diffusion de type Mie et d'une diffusion de type Rayleigh via les paramètres $f_{Rayleigh}$ et b_{Mie} tels que :

$$\mu'_s(\lambda) = \mu'_s(500 \text{ nm}) \times \left[f_{Rayleigh} \left(\frac{\lambda}{500}\right)^{-4} + (1 - f_{Rayleigh}) \left(\frac{\lambda}{500}\right)^{-b_{Mie}} \right] \quad (5-2)$$

b et b_{Mie} caractérisent la dépendance à la longueur d'onde du spectre de diffusion. Ces paramètres sont indépendants de la concentration en centres diffuseurs de la peau, mais dépendent de la taille moyenne de ces centres diffuseurs (Bashkatov, Genina et Kochubey, et al. 2005, Zonios et Dimou 2009) et donnent donc une valeur quantitative caractérisant sa structure. D'après la Figure 5-4, il apparaît que les paramètres de diffusion diminuent lorsque la taille moyenne des centres diffuseurs augmente. $f_{Rayleigh}$ indique la part de diffusion de type Rayleigh contenue dans le spectre alors que $(1 - f_{Rayleigh})$ indique la part de diffusion de type Mie.

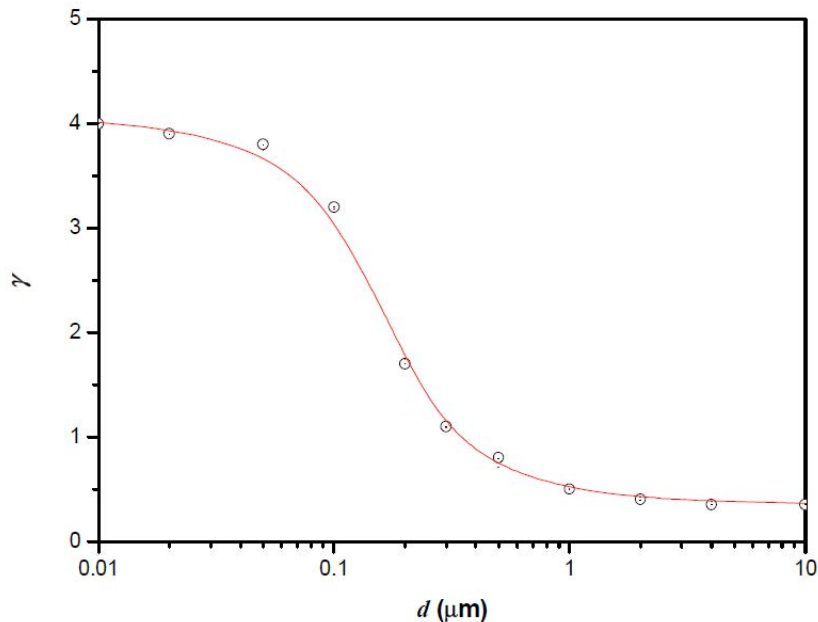


Figure 5-4 : Dépendance du paramètre b (correspondant à γ dans cet article) en fonction de la taille moyenne des centres diffuseurs (Zonios et Dimou 2009).

5.1.2 Résultats

Tests de reproductibilité

Nous avons déterminé la reproductibilité de notre sonde DRS *in vivo* en effectuant une répétition de 30 mesures sur une peau saine et en veillant à reproduire la mesure toujours au même point. Ce résultat est affiché sous la forme du coefficient de variation des signaux prétraités (issus de l'équation (3-2) de la partie 3.1.3) à $\lambda=500$ nm en Figure 5-5 (étoiles). La fibre de collection la plus proche de la fibre d'illumination présente un coefficient de variation inférieur à 2%, et le maximum de variabilité est atteint sur la fibre la plus éloignée et vaut environ 4%.

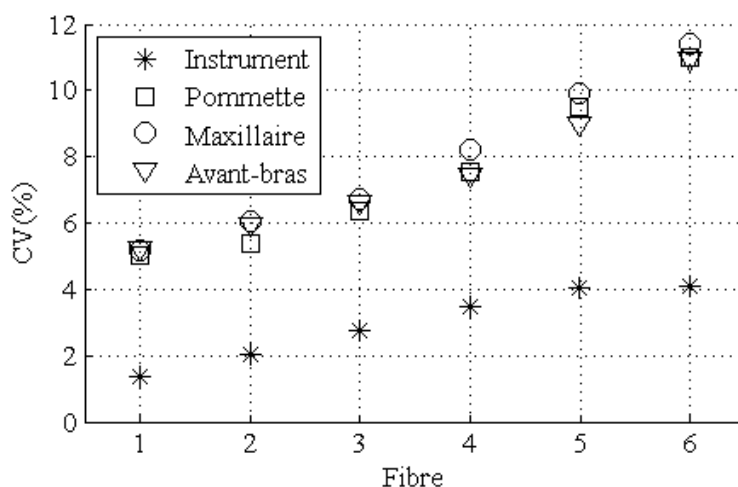


Figure 5-5 : Coefficient de variation "Instrument" de la sonde DRS à $\lambda=500$ nm obtenu sur chaque fibre (étoiles) et coefficients de variation obtenus sur la zone de la pommette (carrés), zone maxillaire (ronds) et la zone de l'intérieur de l'avant-bras (triangles) sur les 50 panélistes à $\lambda=500$ nm.

Nous comparons ensuite ces valeurs aux coefficients de variation obtenus sur les signaux prétraités de la gamme de panélistes pour chacune des trois zones de mesure (carrés, ronds et triangles de la Figure 5-5). Quelles que soient la zone de mesure et la fibre, le coefficient de variation obtenu est deux à trois fois supérieur à celui de l'instrument. Ceci signifie que la variabilité des mesures est due à la variabilité physiologique inter-panéliste et n'est pas juste due à la variabilité de la mesure de notre instrument. Notre instrument est donc sensible aux variations biologiques et structurelles de la peau inter-panélistes.

Etude des zones de mesure

La totalité des coefficients de diffusion réduits à $\lambda=500$ nm acquis sur le panel de volontaires a été moyennée pour chaque zone de mesure. Le résultat est présenté en Figure 5-6. Notons que, dans ce graphe et les trois graphes suivants, la barre d'erreur correspond à l'intervalle de confiance de l'estimation de la moyenne à 99,7%. Elle est calculée de la façon suivante :

$$\left[\bar{X} - 3 \frac{s(X)}{\sqrt{n}} ; \bar{X} + 3 \frac{s(X)}{\sqrt{n}} \right] \quad (5-3)$$

où X est un échantillon à distribution normale (c'est le cas des paramètres étudiés ici), $s(X)$ est son écart-type, \bar{X} la moyenne calculée et n la taille de l'échantillon. Ici, $n=50$.

En Figure 5-6, on observe donc une différence significative entre le niveau de diffusion des zones du visage (pommette et maxillaire) et celle de la face intérieure de l'avant-bras. En revanche, on ne peut pas distinguer les mesures faites sur la pommette et l'os maxillaire.

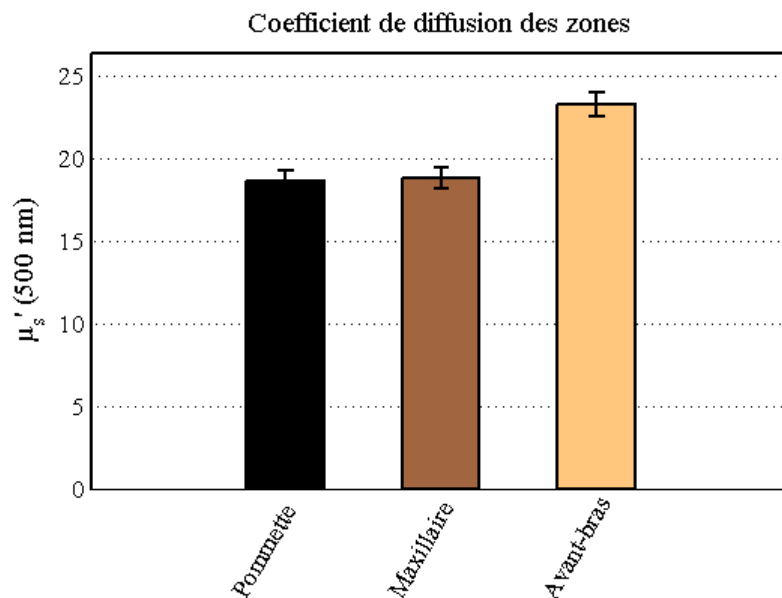


Figure 5-6 : Coefficient de diffusion réduit (cm^{-1}) moyenné par zones de mesures sur l'ensemble des 50 panélistes. La barre d'erreur affichée est l'intervalle de confiance de la moyenne à 99,7%.

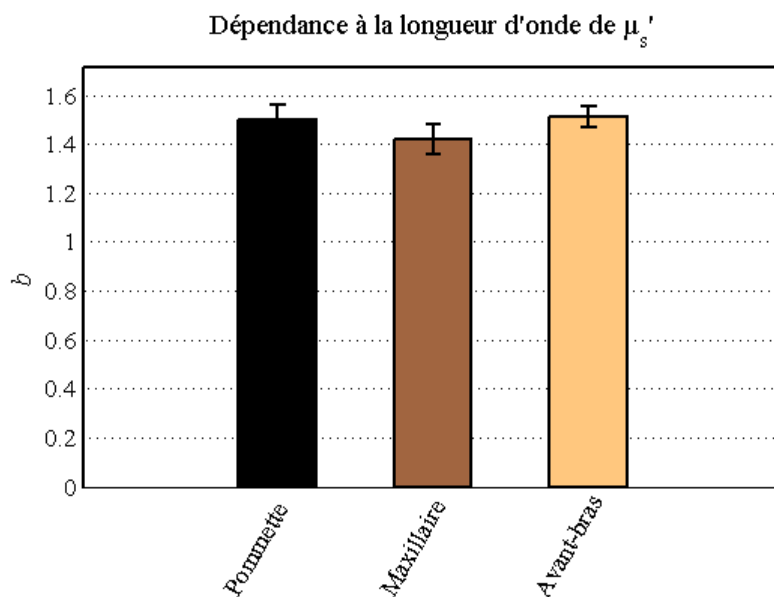


Figure 5-7 : Paramètre b moyenné par zones de mesures sur l'ensemble des 50 panélistes. La barre d'erreur affichée est l'intervalle de confiance de la moyenne à 99,7%.

Ensuite, pour étudier la variabilité de la dépendance à la longueur d'onde du spectre de diffusion, reportons-nous aux résultats présentés de la Figure 5-7 à la Figure 5-9. A priori, d'après la Figure 5-7, il n'y a pas de différence significative entre les zones de ce point de vue. Cependant, quand on cherche à séparer l'influence d'un régime de diffusion de type Rayleigh

et celle d'un régime de type Mie, des différences sont encore notables entre les zones du visage et la zone de la face intérieure de l'avant-bras.

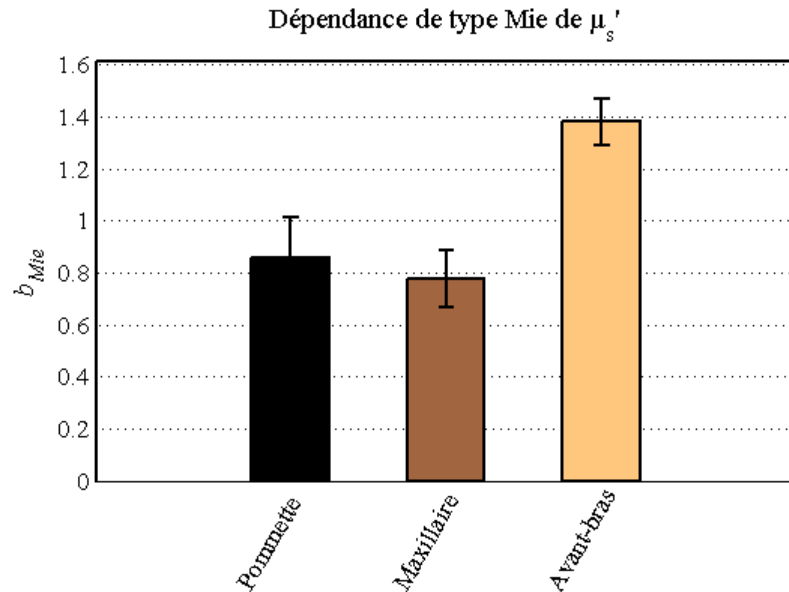


Figure 5-8 : Paramètre b_{Mie} moyenné par zones de mesures sur l'ensemble des 50 panélistes. La barre d'erreur affichée est l'intervalle de confiance de la moyenne à 99,7%.

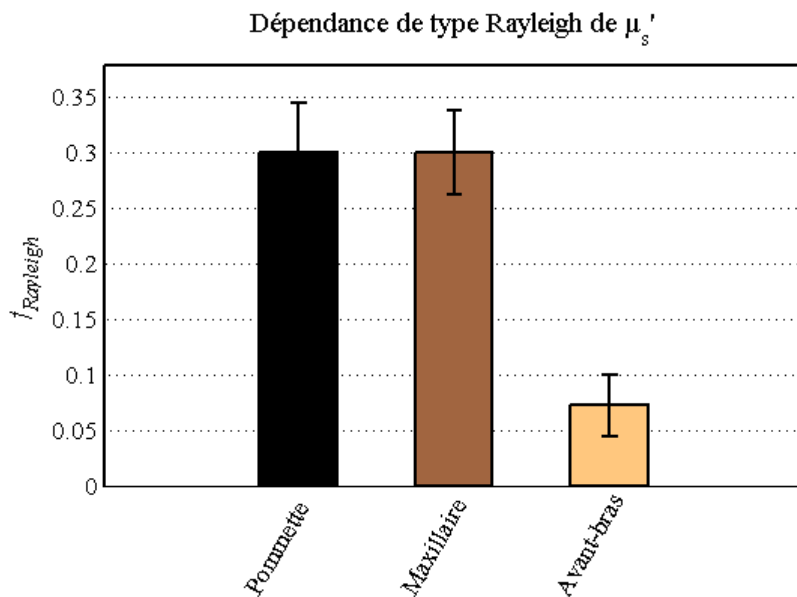


Figure 5-9 : Paramètre $f_{Rayleigh}$ moyenné par zones de mesures sur l'ensemble des 50 panélistes. La barre d'erreur affichée est l'intervalle de confiance de la moyenne à 99,7%.

Premièrement, le paramètre b_{Mie} est significativement plus faible pour les zones du visage que pour la zone de l'avant-bras. En termes structurels, ceci indique que les centres diffuseurs de type Mie de la peau sont en moyenne de dimension plus faible sur la face interne de l'avant-bras que sur le visage.

Deuxièmement, le paramètre $f_{Rayleigh}$ est significativement plus élevé pour les zones du visage que pour la zone de l'avant-bras, indiquant un plus grand nombre de centre diffuseurs de type Rayleigh dans la peau du visage.

Etude du vieillissement cutané

Dans ce paragraphe, nous nous intéressons aux variations des propriétés de diffusion de la peau en fonction de l'âge des panélistes et du vieillissement cutané. Pour cela, nous nous concentrons sur les résultats obtenus sur la face intérieure de l'avant-bras. En effet, cette zone du corps humain ne subit que du vieillissement dit intrinsèque (ou chronologique). Au contraire, d'autres zones telles que le visage subissent un vieillissement extrinsèque et plus particulièrement du photo-vieillissement lié à une exposition aux rayons ultra-violets (El-Domyati, et al. 2002, Jenkins 2002). Le vieillissement extrinsèque étant un paramètre aléatoire non contrôlé sur le groupe de panélistes, nous préférons étudier le vieillissement chronologique sur la face intérieure de l'avant-bras pour tenter de dégager des tendances qui seraient liées à la diffusion de la lumière dans la peau.

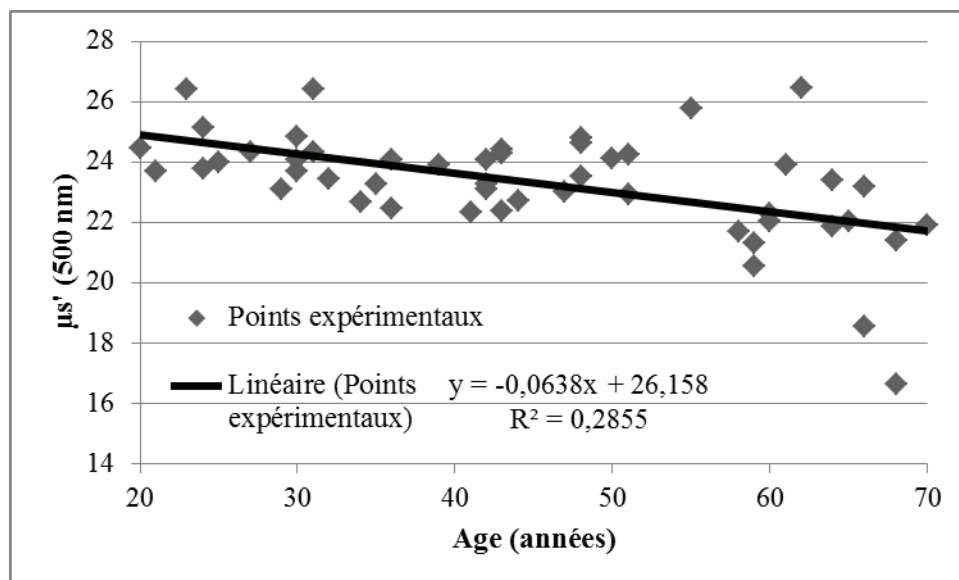


Figure 5-10 : Variation du coefficient de diffusion réduit (cm^{-1}) à $\lambda=500\text{ nm}$ obtenu par DRS standard en fonction de l'âge des panélistes.

D'après les résultats présentés en Figure 5-10, on ne peut mettre en évidence une simple tendance de diminution du coefficient de diffusion réduit avec l'âge chronologique. En effet, le résidu de la régression linéaire est faible ($R^2 = 0,28$), avec une très grande variabilité des mesures pour le même âge.

Bien que la face interne de l'avant-bras subisse très peu de photo-vieillissement, une grande variabilité persiste : deux individus d'un même âge peuvent ne pas avoir subi le même vieillissement cutané. C'est la raison pour laquelle des mesures de cutométrie ont été effectuées pour avoir une évaluation objective de l'âge, basée sur les propriétés mécaniques de la peau. Les paramètres R_7 (facteur de fermeté) et R_8 (facteur de fatigue mécanique) constituent dans la suite nos mesures de références.

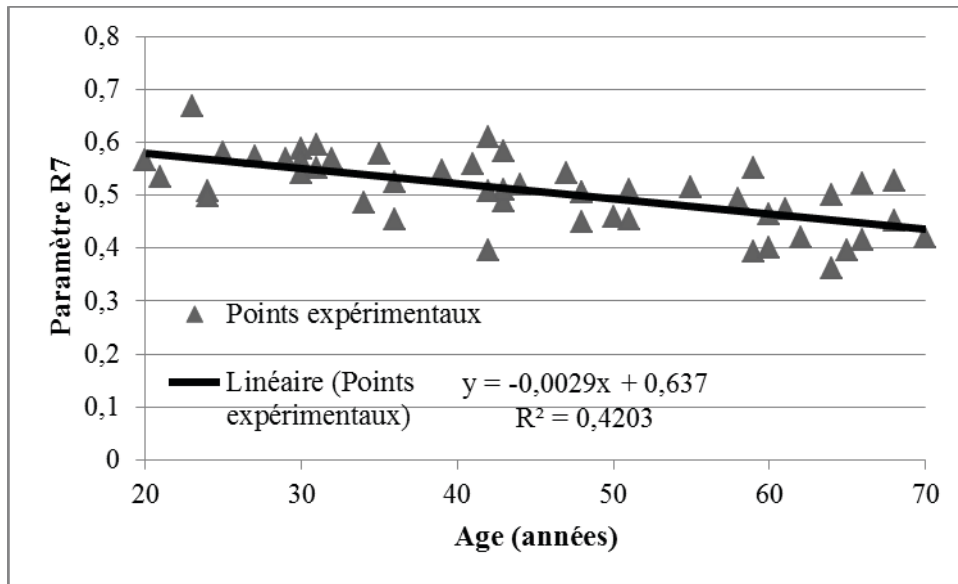


Figure 5-11 : Variation du paramètre R_7 en fonction de l'âge des panélistes.

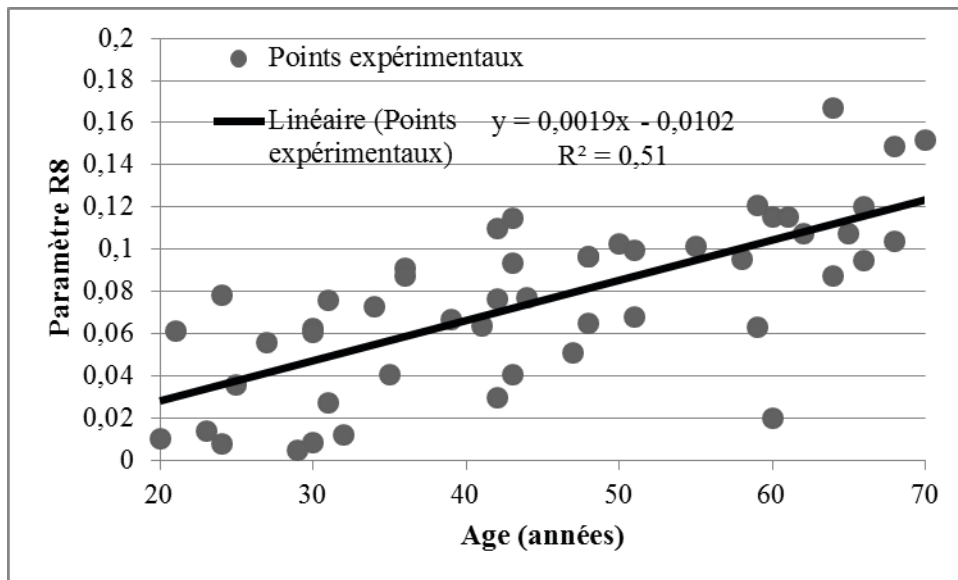


Figure 5-12 : Variation du paramètre R_8 en fonction de l'âge des panélistes.

Le paramètre R_7 permet de mesurer la capacité de la peau à retrouver son état morphologique initial après élongation. Les résultats présentent une corrélation linéaire entre le paramètre R_7 et l'âge des panélistes ($R^2 = 0,42$ en Figure 5-11). Comme attendu et conformément aux résultats des travaux (Ryu, et al. 2008, Krueger, et al. 2011, Eklouh-Molinier, et al. 2015), l'élasticité de la peau diminue avec l'âge.

Ensuite, le paramètre R_8 a été calculé pour évaluer la fatigabilité mécanique de la peau. Nous observons une tendance croissante de ce paramètre avec l'âge (Figure 5-12). Cependant, nos résultats présentent une corrélation linéaire plus élevée de R_8 avec l'âge que dans les articles (Ryu, et al. 2008, Krueger, et al. 2011, Eklouh-Molinier, et al. 2015).

La variabilité des résultats présentés en Figure 5-11 et Figure 5-12 et la valeur modérée des coefficients de corrélation montrent à quel point l'âge chronologique des panélistes peut être différent de l'âge biologique de leurs peaux.

Pour aller plus loin, nous avons constitué 3 groupes de $n=5$ panélistes, sélectionnés en fonction des résultats de cutométrie :

- groupe de peau dite "jeune" dont l'âge chronologique est compris entre 22 et 35 ans, le facteur de fermeté est supérieur à 0,55 et le facteur de fatigue mécanique est inférieur à 0,06;
- groupe de peau dite "intermédiaire" dont l'âge chronologique est compris entre 41 et 52 ans, le facteur de fermeté est compris entre 0,48 et 0,52 et le facteur de fatigue mécanique est compris entre 0,06 et 0,10;
- groupe de peau dite "âgée" dont l'âge chronologique est compris entre 58 et 71 ans, le facteur de fermeté est inférieur à 0,46 et le facteur de fatigue mécanique est supérieur à 0,12.

Ces groupes sont donc construits à partir de critères objectifs du vieillissement cutané. Nous n'observons pas de différence notable entre les niveaux de diffusion des peaux jeunes et des peaux intermédiaires (Figure 5-13 et Figure 5-14). En revanche, le niveau de diffusion des peaux âgées est bien inférieur à celui des deux autres groupes.

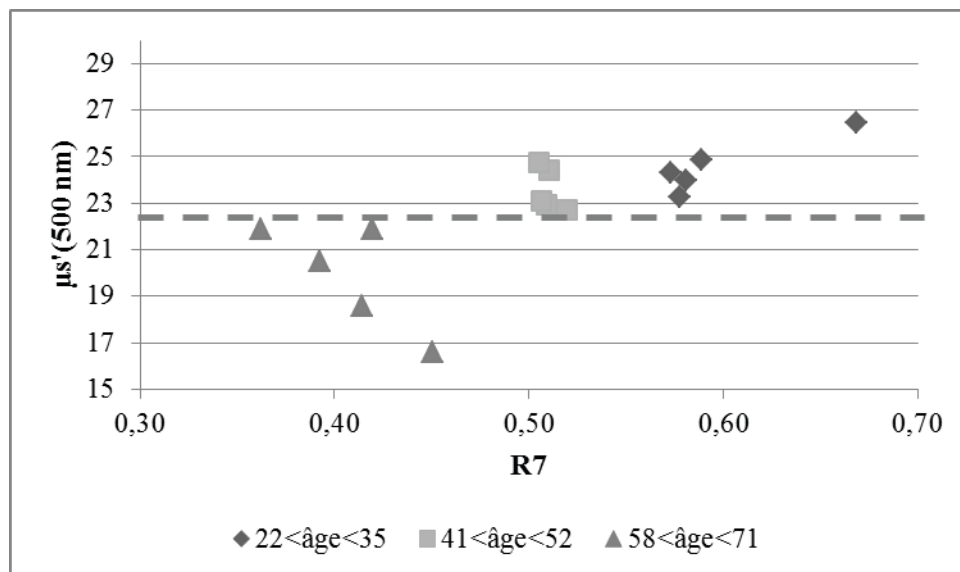


Figure 5-13 : Coefficient de diffusion réduit (cm^{-1}) à $\lambda=500 \text{ nm}$ obtenu par DRS standard en fonction du paramètre R_7 .

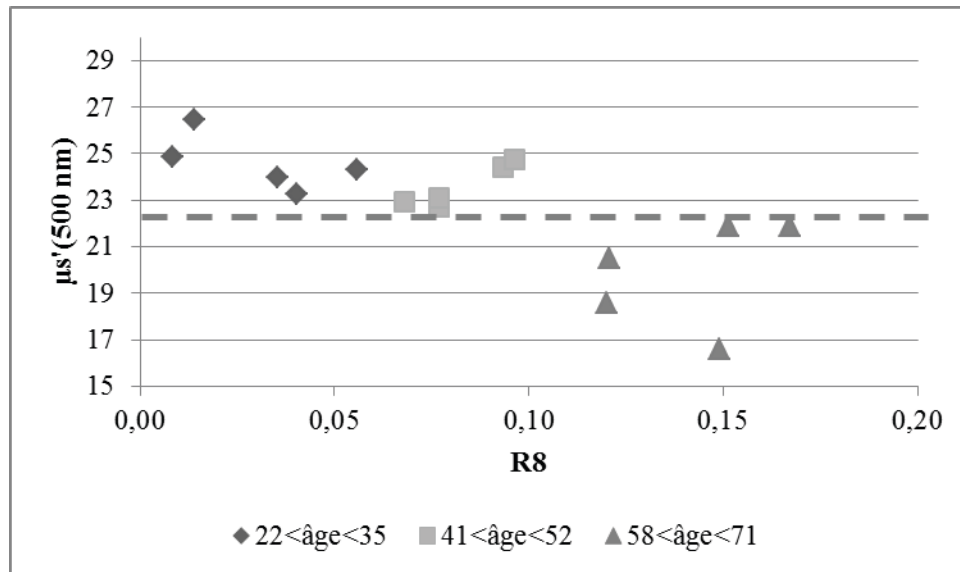


Figure 5-14 : Coefficient de diffusion réduit (cm^{-1}) à $\lambda=500 \text{ nm}$ obtenu par DRS standard en fonction du paramètre R_8 .

5.1.3 Conclusions et discussion

Cette étude, réalisée sur différentes zones du corps humain, a permis de révéler des changements de niveau de diffusion associés à des différences de structure en fonction du site de mesure. Ces différences de structure entre zones sont connues (Bernengo, Adhoute et Mougin 2015). Par exemple, la peau du visage est plus épaisse que celle de l'avant-bras. De plus, nous avons observé des tendances avec le vieillissement cutané sur la face interne de l'avant-bras bien que la variabilité biologique reste prédominante dans les résultats. D'où l'importance de corriger les mesures Raman en caractérisant précisément les propriétés optiques de la peau au point d'acquisition. Pour cela, il convient d'avoir une colocalisation latérale et axiale des mesures Raman et DRS, ce que nous avons cherché à développer avec une sonde originale de Micro-DRS.

5.2 Micro-DRS *in vivo* : étude des propriétés optiques superficielles

Dans cette partie, le premier paragraphe décrit les matériels et méthodes employés dans l'étude de données *in vivo* obtenues par Micro-DRS. Dans le deuxième paragraphe, nous comparons dans un premier temps les spectres de diffusion obtenus par Micro-DRS et DRS standard sur la même zone de mesure d'une panéliste. Ensuite, nous étudions la corrélation entre le vieillissement cutané et les résultats fournis par cette nouvelle méthode de caractérisation.

5.2.1 Matériels et méthodes

Sonde Micro-DRS *in vivo*

La configuration instrumentale présentée au Chapitre 4 a été adaptée pour cette étude de manière à constituer une sonde Micro-DRS utilisable *in vivo* (voir Figure 5-15 et Figure 5-16). Le système de projection (lentille + objectif) est aligné et positionné par rapport à l'embout de sonde DRS par des montures mécaniques installées sur des tiges métalliques. Afin de garantir le positionnement de la surface de la peau au foyer de l'objectif, un hublot

transparent a été installé devant l'objectif. La réfraction engendrée par ce dispositif a été prise en compte dans son positionnement.

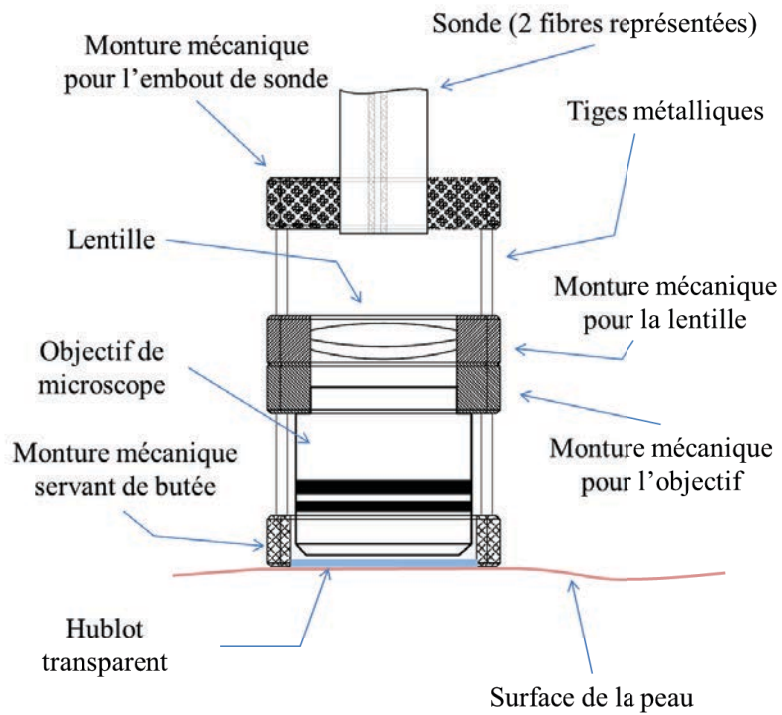


Figure 5-15 : Schéma du montage de la sonde Micro-DRS in vivo.

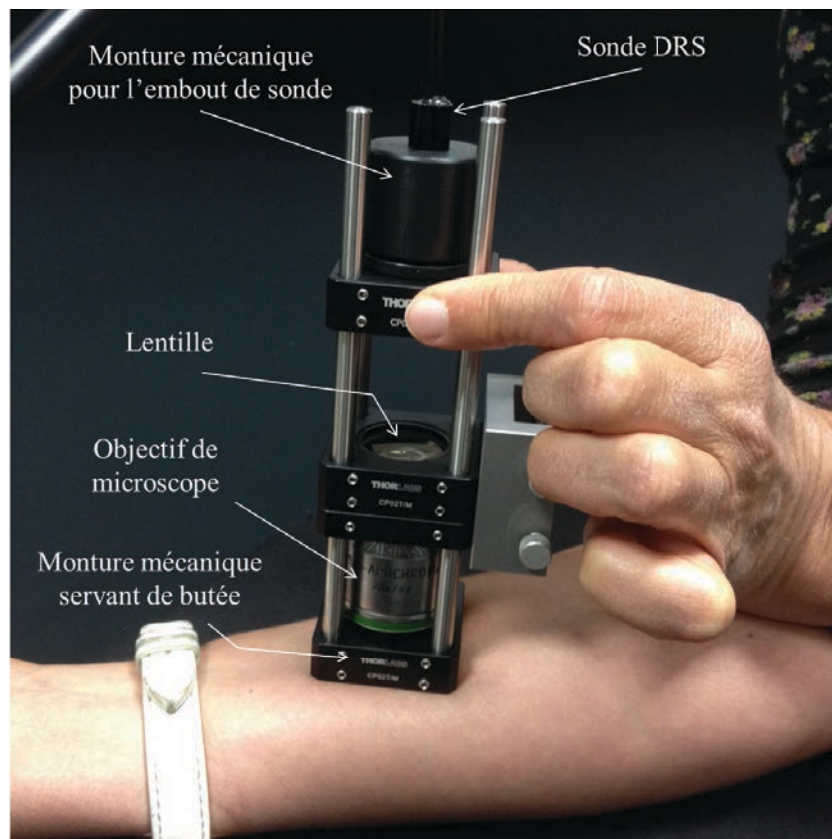


Figure 5-16 : Photo de la sonde Micro-DRS in vivo

Panélistes

Pour cette étude, nous avons sélectionné les 15 panélistes qui ont servi à constituer les 3 groupes de peau jeune, intermédiaire et âgée (page 148). Les mesures de Micro-DRS ont été réalisées sur la face intérieure de l'avant-bras au niveau de la même zone que pour l'acquisition par DRS.

Prétraitement des données

Les réflexions parasites de ce système sont causées par la présence de la lentille (même doublet achromatique qu'au Chapitre 4), de l'objectif (identique au Chapitre 4) et du hublot sur le parcours de la lumière. Ici, elles ne peuvent plus être évaluées par une simple mesure "à vide" (sans échantillon) car elles dépendent du changement d'indice à l'interface hublot/échantillon. Or, la mesure "à vide" crée une interface hublot/air ($n=1$) dont le coefficient de réflexion de Fresnel est différent d'une interface hublot/peau ($n \approx 1,4$). C'est pourquoi nous mesurons cette réflexion parasite, fibre par fibre, sur un fantôme de PDMS seul (non diffusant et non absorbant) dont l'indice de réfraction est très proche de celui de la peau.

Méthode d'extraction des propriétés optiques

Les propriétés optiques sont calculées d'après l'algorithme décrit dans la partie 4.4. Nous ne présenterons que les résultats donnant μ'_s à l'issue de l'étape 1.

Le fantôme en PDMS de propriété de diffusion μ'_{s1} et de propriété d'absorption μ_{a1N} est utilisé en tant que fantôme de référence avec le résultat de caractérisation obtenu par Micro-DRS (partie 4.4). Nous prenons le signal prétraité moyen obtenu sur les 6 jours qu'a duré cette étude (avec 2 à 3 mesures sur le fantôme de référence par jour).

5.2.2 Résultats

Différences entre la DRS et la Micro-DRS

Les spectres de diffusion obtenus par Micro-DRS sur la face intérieure de l'avant-bras sont donnés à titre d'exemple en Figure 5-17 pour trois panélistes (1 panéliste par groupe) et sont comparés aux spectres de diffusion qui avaient été obtenus pour ces panélistes sur la même zone de mesure par DRS standard.

Quelle que soit la panéliste, le spectre de diffusion extrait par Micro-DRS est systématiquement supérieur à celui obtenu par DRS standard. Or, il a été montré au Chapitre 4 que la Micro-DRS sondait une zone plus superficielle que la DRS standard, à savoir l'épiderme ; reflétant que l'épiderme présente un niveau de diffusion supérieur à celui du derme. Ceci est conforme aux résultats obtenus dans (Salomatina, et al. 2006).

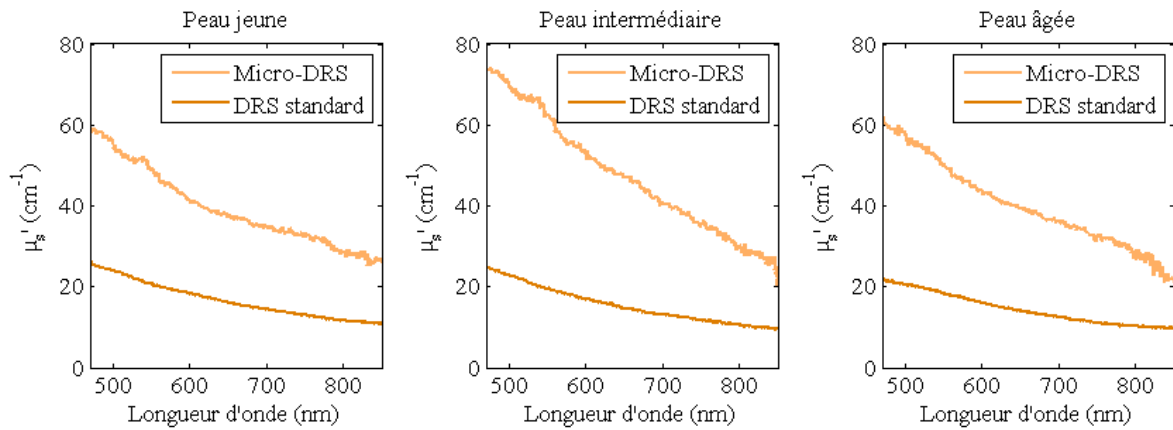


Figure 5-17 : Spectres de diffusion obtenus par DRS et Micro-DRS sur la face intérieure de 3 panélistes : une panéliste avec une peau jeune, une panéliste avec une peau intermédiaire et une panéliste avec une peau âgée.

Etude du vieillissement cutané

Contrairement aux résultats obtenus en DRS standard sur les trois groupes de panélistes, nous n'observons pas de différence notable entre les niveaux de diffusion des peaux jeunes, intermédiaires et âgées (Figure 5-18 et Figure 5-19). Il semblerait donc qu'il n'y ait pas de variation du niveau de diffusion de l'épiderme avec le vieillissement cutané.

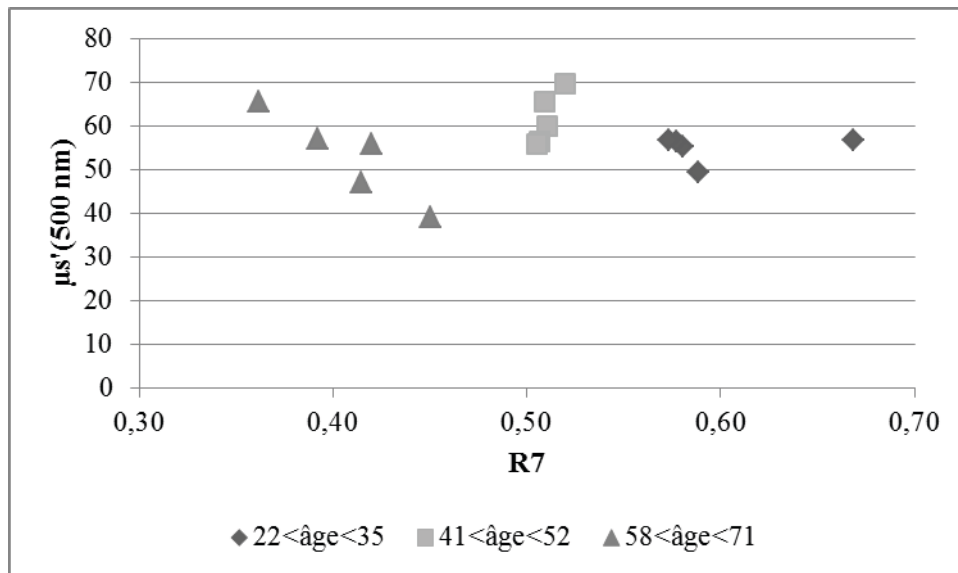


Figure 5-18 : Coefficient de diffusion réduit (cm^{-1}) à $\lambda=500\text{ nm}$ obtenu par Micro-DRS en fonction du paramètre R_7 .

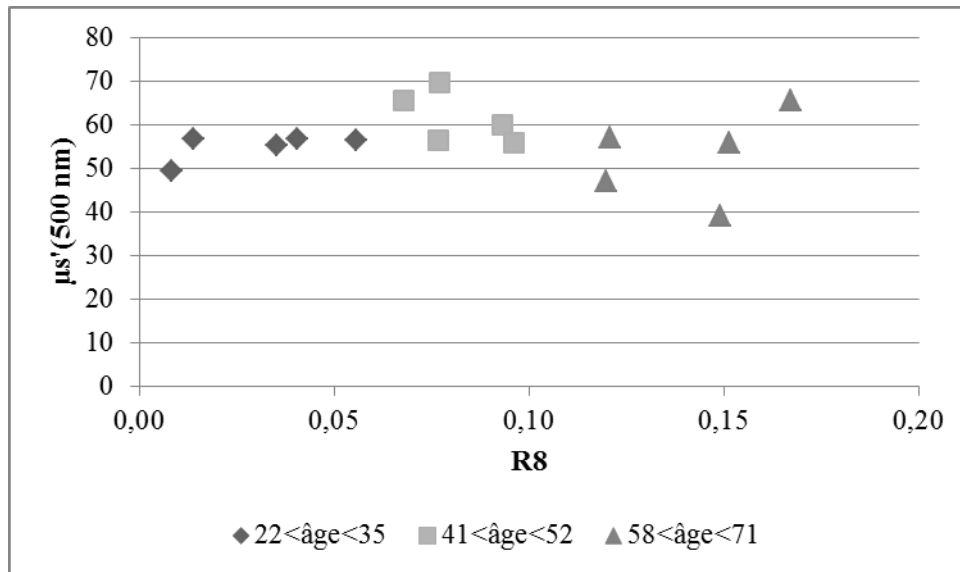


Figure 5-19 : Coefficient de diffusion réduit (cm^{-1}) à $\lambda=500\text{ nm}$ obtenu par Micro-DRS en fonction du paramètre R_8 .

5.2.3 Conclusions et discussion

Cette étude, réalisée sur la face intérieure de l'avant-bras de quinze panélistes, a permis de révéler des changements de niveau de diffusion en fonction de la zone sondée par le système de mesure. Le niveau de diffusion obtenu n'est pas le même entre une mesure localisée dans l'épiderme et une mesure atteignant le derme. Ce qui confirme l'intérêt de caractériser avec précision les propriétés optiques de la peau de façon à pouvoir corriger les données brutes Raman et les rendre quantitatives.

5.3 Origine moléculaire des variations de propriétés optiques liées au vieillissement cutané : le réseau de collagène

Nous nous proposons ici de chercher les origines moléculaires des différences observées par DRS sur les panélistes de différents âges. Dans cette partie, le premier paragraphe décrit les matériels et méthodes employés dans la caractérisation optique de matrices 3D de collagènes d'âges différents. Le collagène utilisé est de type I, comme celui constituant le derme. Dans le deuxième paragraphe, les variations de niveaux de diffusion de ces structures avec l'âge sont présentées.

5.3.1 Matériels et méthodes

Extraction du collagène de type I

Les collagènes d'âges différents sont préparés à partir de tendons de queues de rats âgés de quelques jours (dits nouveau-nés), de deux mois (dits jeunes adultes) et de deux ans (dits adultes âgés). Ce protocole permet de considérer un vieillissement physiologique du collagène chez un modèle animal plus pertinent qu'un éventuel vieillissement chimique *in vitro*. Les tendons de rats de même âge sont mélangés pour garantir une bonne homogénéité dans chaque groupe d'âge. Ensuite, le collagène est extrait selon la procédure décrite dans (Millerot-Serruot, et al. 2010). Cette dernière permet d'obtenir des collagènes de type I fibrillaires et purifiés en solution acide.

Préparation des matrices 3D

C'est en ramenant le pH des solutions à un pH neutre que le collagène polymérise et que les gels 3D sont formés. Dans ce but, de l'hydroxyde de sodium (NaOH) est utilisé. Les détails des composés utilisés et leurs concentrations sont décrits dans (Millerot-Serrurot, et al. 2010). Pour notre part, la solution finale au pH neutre a une concentration en collagène de type I de 2,5 mg/mL. Un volume de 1,5 mL de cette solution est déposé dans des puits de plaques 24-puits (3 puits de chaque âge). Pour activer la polymérisation, les plaques sont incubées 30 minutes à 37°C.

DRS

La sonde DRS, maintenue par une potence de laboratoire, est placée à la surface des matrices de collagène. Après analyse des signaux prétraités, nous n'utilisons que les fibres 3 à 5 pour le calcul des propriétés optiques, et ceci en supposant le coefficient d'absorption des gels de collagène nul sur tout le spectre. Cette hypothèse est réaliste en regard de la concentration en collagène des matrices (Taroni, et al. 2009).

Le fantôme en PDMS de propriété de diffusion μ'_{s2} et de propriété d'absorption μ_{a1N} est utilisé en tant que fantôme de référence avec le résultat de caractérisation obtenu par DRS (partie 3.3).

Caractérisation des collagènes par différentes techniques

Les collagènes extraits ont été contrôlés avant polymérisation par électrophorèse et fluorescence à 440 nm pour vérifier que leurs propriétés biochimiques sont en accord avec leur âge. La cinétique de formation des gels (fibrillogénèse) a ensuite été enregistrée par spectrophotométrie à 400 nm. Pour caractériser la structure des gels finaux, des images de microscopie de réflectance confocale ont été acquises à 488 nm. Puis des mesures de microspectroscopie IR (en mode ATR) ont été effectuées pour une caractérisation biochimique des collagènes à l'état polymérisé. Le détail de mise en œuvre et les résultats de ces caractérisations successives sont présentés dans un article soumis à la revue *Aging* (Guilbert, et al.).

5.3.2 Résultats

Le spectre de diffusion issus des mesures de DRS effectuées sur les matrices de collagène sont affichés en Figure 5-20 pour chaque âge. Une différence significative est observée dans le niveau de diffusion de ces modèles matriciels reconstitués avec des collagènes d'âge différent. Le collagène "jeunes adultes" présente le plus haut niveau de diffusion alors que le collagène "nouveau-nés" diffuse la lumière à un niveau intermédiaire. Ces résultats sont cohérents avec les résultats de caractérisation obtenus par d'autres techniques (spectrophotométrie en cours de fibrillogénèse et images réflectance confocales des matrices) (Guilbert, et al.). Celles-ci montrent des variations de structure du réseau de collagène avec l'âge et notamment une dégradation du réseau de collagène "adultes âgés".

Nous ne disposons pas de données *in vivo* auxquelles comparer le niveau de diffusion des matrices de collagène "nouveau-nés". En revanche, le niveau de diffusion des matrices de collagène décroît entre le collagène "jeunes adultes" et le collagène "adultes âgés". Ceci est cohérent avec les résultats *in vivo* du paragraphe 5.1.2. Notons qu'*in vivo*, l'altération de la

structure de collagène n'est pas la seule caractéristique du vieillissement cutané ayant potentiellement une influence sur les propriétés de diffusion de la peau. Les modifications du réseau vasculaire, du réseau d'élastine et de l'épaisseur de l'épiderme y participent aussi.

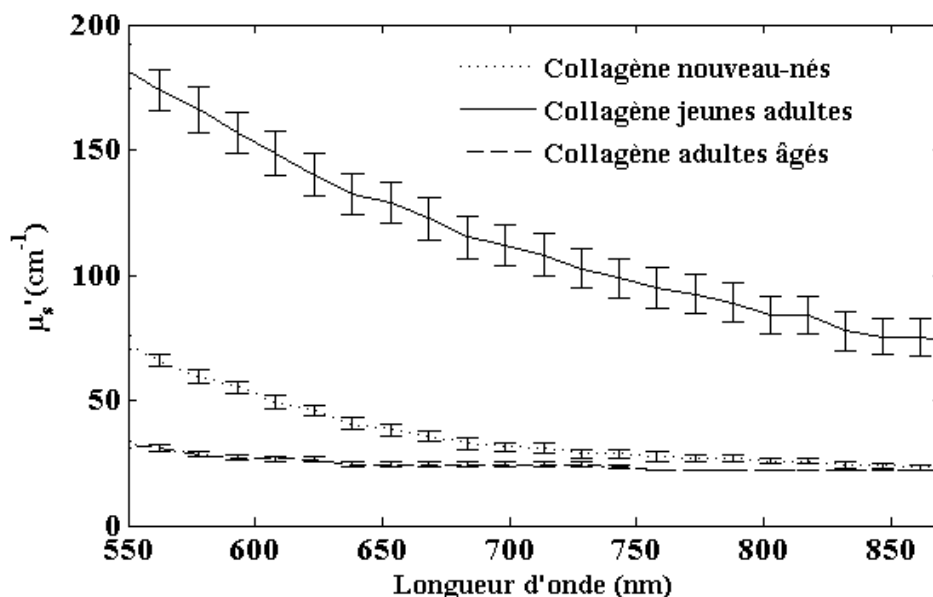


Figure 5-20 : Spectre de diffusion obtenu par DRS standard sur des matrices de collagènes d'âges différents.

5.4 Résumé

Par des mesures de DRS standard et de Micro-DRS, nous avons constaté une grande variabilité des propriétés de diffusion de la peau d'un individu à l'autre. Cette variabilité dépend de la zone analysée (visage ou avant-bras, épiderme ou derme+épiderme) mais aussi des variations structurelles et physiologiques inter-individus. Parmi les sources potentielles de ces variations, nous avons identifié le vieillissement cutané et plus particulièrement la dégradation avec l'âge du réseau de collagène du derme sondé par DRS.

Dans l'hypothèse où les mesures Raman confocales sont biaisées par le phénomène de diffusion de la lumière, l'ensemble de ces résultats démontre l'intérêt de coupler instrumentalement la Micro-DRS à la microspectroscopie Raman dans le but de corriger cette dernière modalité et d'obtenir des données biochimiques quantitatives.

Chapitre 6 : Développement d'un modèle de correction des spectres Raman

Dans la première partie de ce chapitre seront présentés les matériels et méthodes mis en œuvre pour l'acquisition des spectres Raman par microspectroscopie confocale, la constitution des profils d'intensité Raman en fonction de la profondeur et l'étude respective des fonctions de localisation et de quantification. Nous verrons dans la deuxième partie que l'influence de la diffusion est observable, mais que d'autres biais connus de la littérature doivent être évalués et supprimés en premier lieu : ils concernent la fonction de localisation et ceci fera l'objet de la troisième partie. La quatrième partie porte sur l'établissement du modèle reliant les propriétés optiques d'un échantillon à la manière dont l'intensité Raman décroît dans ce milieu. Nous relierons ce phénomène de décroissance au coefficient de diffusion élastique. Un protocole de correction des spectres est proposé et testé dans la dernière partie.

6.1 Matériel et méthodes

6.1.1 Instrumentation

L'instrument utilisé pour obtenir les profils d'intensité Raman de nos matériaux est un microspectromètre Raman confocal de la marque Horiba Jobin Yvon, modèle LabRam ARAMIS (Figure 6-1), contrôlé par le logiciel LabSpec 5.

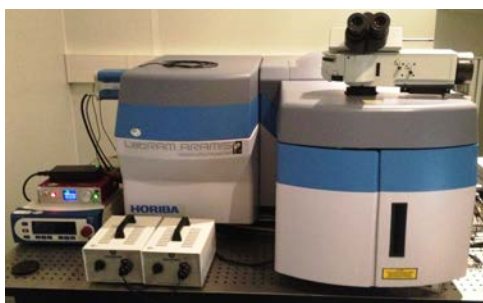


Figure 6-1 : Microscope Raman confocal

Nous choisissons, pour le moment, de travailler avec une source laser émettant à $\lambda_0=532\text{nm}$ (Laser Quantum) afin d'obtenir des spectres Raman sur une gamme spectrale où nos fantômes sont caractérisés par la DRS (voir Chapitre 3). Bien que les sources d'autofluorescence et d'absorption soient nombreuses dans les tissus biologiques à cette longueur d'onde, nous privilégions cette radiation lumineuse pour laquelle la sensibilité de notre instrumentation DRS, dans son état actuel, est optimale pour cette preuve de concept. Par ailleurs, les méthodes mises au point ici ne sont pas dépendantes de la longueur d'onde et pourront être appliquées à d'autres domaines spectraux.

D'après les données du constructeur, la résolution spectrale de l'appareil à cette longueur d'onde est inférieure à $5,7\text{ cm}^{-1}$ avec un réseau de 600 tr/mm (ce qui correspond à $0,16\text{ nm}$).

Nous nous plaçons dans une configuration à sec pour satisfaire notre objectif final : utiliser le protocole de correction sur des acquisitions *in vivo*. En effet, l'utilisation d'objectifs à

immersion, et donc de liquide à immersion, est trop contraignante à mettre en œuvre sur sujets.

L'instrument est actuellement équipé avec des objectifs de marque Olympus, à sec, de grossissements et d'ouvertures numériques suivants :

- 10X/NA 0.25 MPlanN
- 50X/NA 0.75 MPlanN
- 100X/NA 0.90 MPlanN

L'ajustement de la taille physique du trou confocal de ce système est motorisé et programmable dans une gamme allant de 0 à 1100 μm . Le trou confocal est de forme carrée.

Nous jouons sur ces deux paramètres (dimension du trou confocal et ouverture numérique de l'objectif) afin d'obtenir un sectionnement optique (ou résolution axiale) optimal pour notre application. La résolution axiale du système en mode Raman peut être mesurée en focalisant le faisceau laser juste au-dessus de la surface d'un wafer de silicium et en mesurant l'intensité Raman de la raie de nombre d'onde 521 cm^{-1} , raie d'émission Raman caractéristique du silicium, au fur et à mesure que la distance objectif-silicium diminue (Figure 6-2). En effet, la surface du wafer se comporte comme une couche d'épaisseur infinitésimale (de la Paz Miguel et Tomba 2013) car le silicium est très fortement absorbant à longueur d'onde 532 nm. La largeur à mi-hauteur *FWHM* (*Full Width at Half Maximum*) du signal obtenu donne une mesure de la résolution axiale.

Nous appelons dans la suite "profils" ces courbes d'intensité Raman centrée sur une raie, fonction de la distance objectif-échantillon.

Pour mieux se rendre compte de l'effet combiné des deux paramètres, les profils obtenus sur silicium pour six combinaisons de trous confocaux et objectifs sont représentés en Figure 6-3 et Figure 6-4.

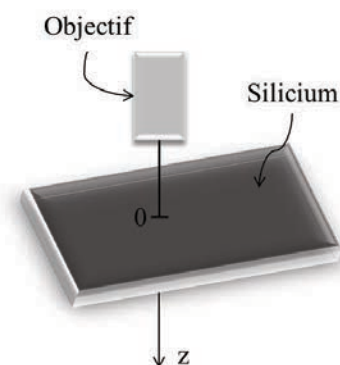


Figure 6-2 : Acquisition de la réponse confocale du système obtenue sur wafer de silicium

Les profils obtenus sur silicium sont légèrement asymétriques. Ceci est dû au caractère très absorbant du silicium qui fait que la lumière incidente pénètre peu profondément dans ce matériau (Bruneel, Lassègues et Sourisseau 2002). C'est pourquoi, la résolution axiale est

estimée en prenant le double de la largeur à mi-hauteur côté air. La configuration choisie est l'association de l'objectif 100X avec un trou confocal de 50 μm donnant une résolution axiale d'environ 2 μm (voir Figure 6-4), la plus étroite dans les configurations testées.

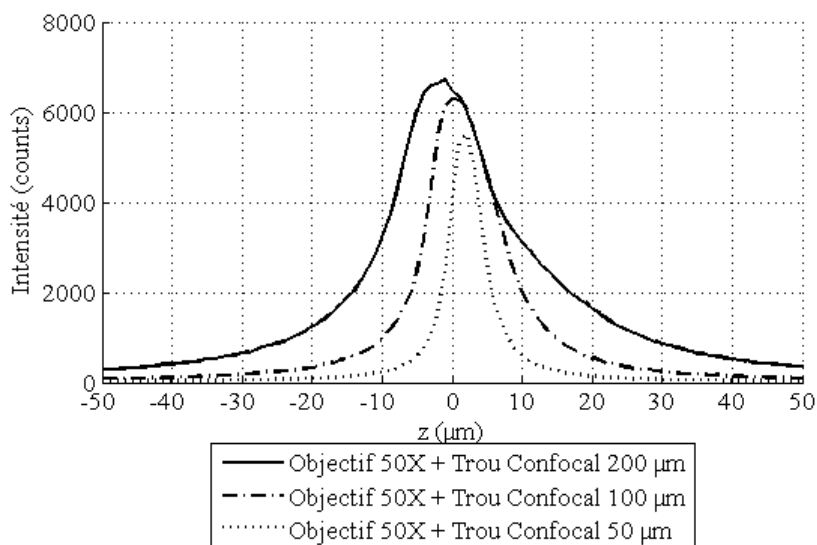


Figure 6-3 : Réponse confocale du système à 532 nm obtenue sur wafer de silicium pour un objectif 50X/NA 0.75 et différentes dimensions du trou confocal.

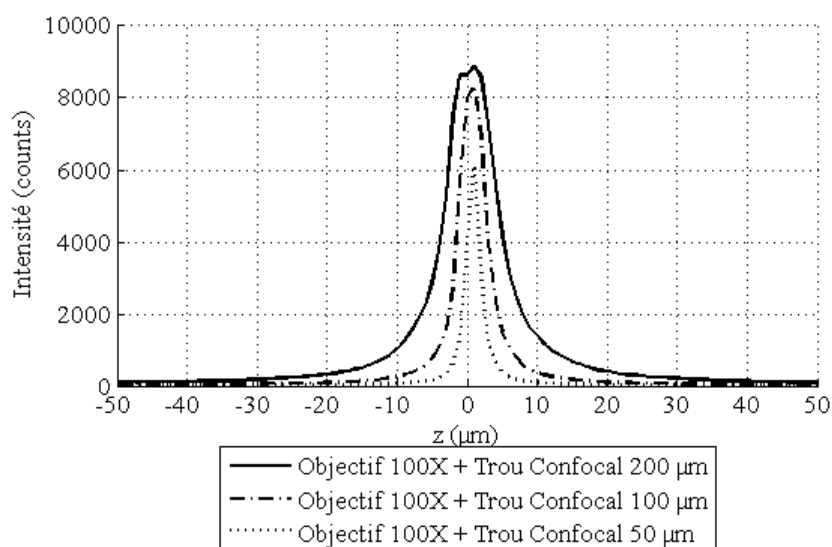


Figure 6-4 : Réponse confocale du système à 532 nm obtenue sur wafer de silicium pour un objectif 100X/NA 0.90 et différentes dimensions du trou confocal.

6.1.2 Protocole d'acquisition d'un profil Raman

Pour un fantôme donné, six profils d'intensité Raman sont mesurés en six points (x, y) différents. Plus précisément, les profils sont obtenus en six points formant une ligne (balayage en x à y constant) et séparés selon x de 10 μm chacun. La convention de signe pour les déplacements le long de l'axe optique z est :

- $z < 0$ lorsque le *waist* du laser est au-dessus de la surface de l'échantillon;
- $z = 0$ la position de l'échantillon telle que le *waist* du laser soit à la surface de celui-ci;
- $z > 0$ lorsque le *waist* du laser est dans la matière.

Pour chaque point (x, y) , les spectres Raman sont acquis pour une position de la surface de l'échantillon allant de $z = -20 \mu\text{m}$ à $z = 100 \mu\text{m}$, avec un pas de $2 \mu\text{m}$, avec le réseau positionné de façon à ce que les spectres Raman soient centrés autour de $\sigma_R = 2000 \text{ cm}^{-1}$. Les spectres obtenus s'étendent ainsi de 575 à 3205 cm^{-1} . Ce qui correspond, en unité de longueur d'onde, à un spectre couvrant la gamme $548,8 \leq \lambda_R \leq 641,4 \text{ nm}$, soit une centaine de nanomètres.

La consigne de puissance de sortie du laser est de 60 mW . Cette puissance est atténuée dans le système par l'utilisation d'une densité optique de $0,6$. Chaque spectre obtenu à une profondeur z donnée est la moyenne de trois spectres acquis avec un temps d'intégration de 2 secondes. Le calcul de la moyenne est fait de façon automatique par le logiciel LabSpec.

6.1.3 Construction des Profils

Plusieurs bandes spectrales peuvent être choisies pour afficher le profil d'intensité Raman des fantômes en fonction de la profondeur de pénétration du *waist* laser dans le matériau. Les fantômes étant constitués de PDMS et de TiO_2 , nous devons étudier les spectres Raman de chacun de ces deux éléments afin de définir les bandes spectrales (ou raies Raman) d'intérêt.

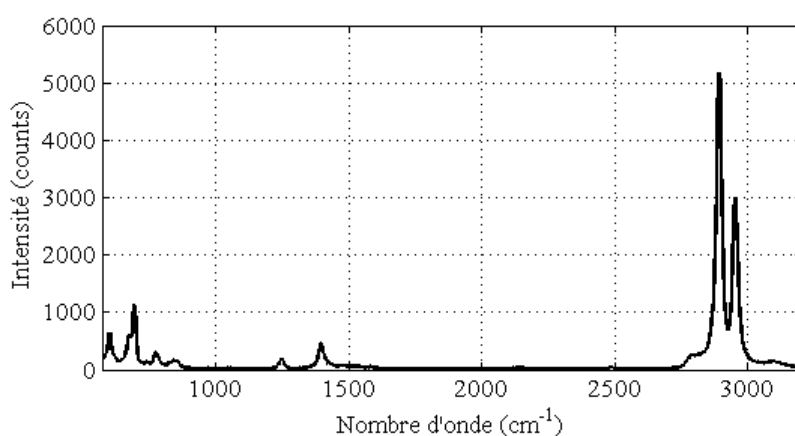


Figure 6-5 : Spectre Raman PDMS mesuré

Le spectre Raman du PDMS a été obtenu (voir Figure 6-5) en focalisant la source laser à 532 nm à la surface d'un échantillon en PDMS non dopé.

Quant au spectre Raman du TiO_2 , il était préférable de le trouver dans la littérature (Choi, Jung et Kim 2004, Ohsaka 1980) car cette espèce est électrostatiquement instable et nous évitons ainsi de contaminer le microscope Raman. Dans la fenêtre $575\text{-}3205 \text{ cm}^{-1}$, un seul mode de vibration Raman du TiO_2 est répertorié et il se situe à 639 cm^{-1} (voir Figure 6-6).

La bande spectrale $619\text{-}659 \text{ cm}^{-1}$ centrée autour de la raie propre au TiO_2 est donc sélectionnée parmi les raies Raman d'intérêt, mais nous savons doré –et –déjà que, sur cette

gamme de nombres d'onde, certains modes vibratoires du PDMS sont aussi actifs. Les profils ainsi obtenus porteront donc à la fois l'information du TiO_2 et du PDMS. Pour le PDMS, nous choisissons les raies $1380\text{-}1440\text{ cm}^{-1}$ et $2870\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ où cette fois, seul le PDMS contribuera à l'intensité Raman mesurée. Pour exemple, nous affichons en Figure 6-7 un spectre Raman obtenu à la surface d'un des fantômes en PDMS contenant du TiO_2 . Nous y indiquons le positionnement des bandes spectrales utilisées pour étudier l'évolution de l'intensité Raman avec la profondeur de matériau sondée (ou profils Raman).

Le calcul de ces profils est effectué en moyennant l'intensité Raman mesurée sur la bande spectrale d'intérêt.

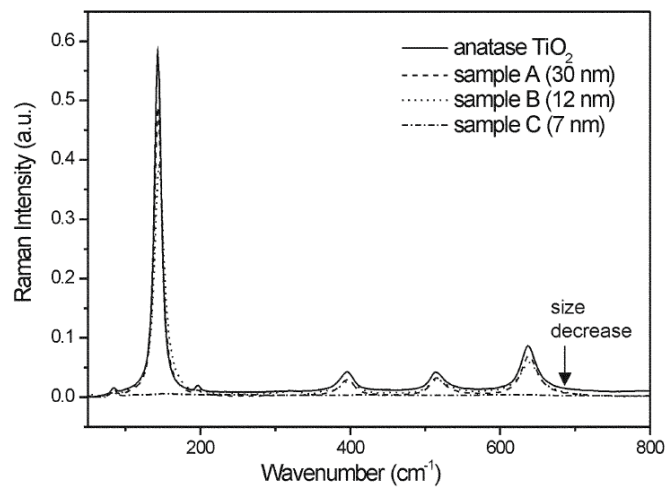


Figure 6-6 : Spectre Raman du dioxyde de titane (Choi, Jung et Kim 2004).

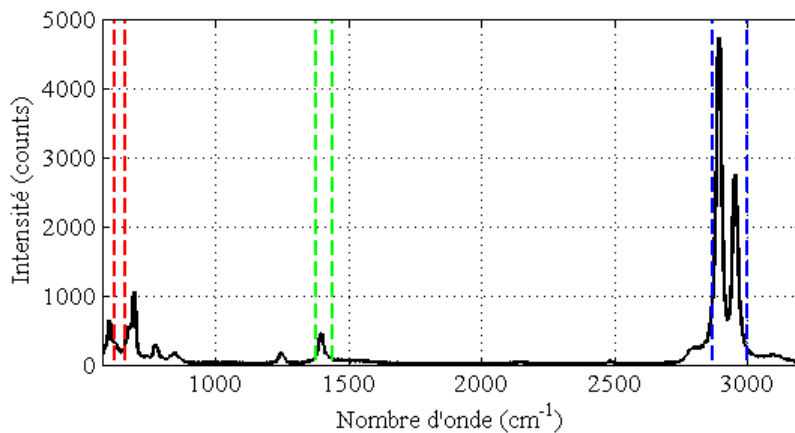


Figure 6-7: Positionnement des bandes spectrales sélectionnées pour le calcul des profils d'intensité Raman sur fantômes (mélanges de PDMS et de TiO_2): la bande rouge contient l'information du PDMS et du TiO_2 ; la bande verte et la bande bleue, PDMS seul.

6.1.4 Etude de la fonction de localisation

En théorie, on attend de la microspectroscopie Raman confocale d'améliorer la résolution axiale de données volumiques par rapport à un système non confocal. Cependant, lorsqu'un objectif à sec est utilisé, l'interface air/échantillon perturbe les propriétés confocales du

système à cause du phénomène de réfraction. Il est simple de focaliser le spot laser à la surface d'un échantillon, les positions physiques de la surface de l'échantillon et du spot sont faciles à corrélérer. Cependant, lorsqu'on focalise le spot sous la surface, le faisceau laser est réfracté à la surface de l'échantillon et le *waist* laser est localisé plus profondément dans la matière (voir Figure 6-8-a)). De plus, le faisceau laser étant focalisé par un objectif conçu pour fournir une image à une interface air/matériau, une aberration sphérique dilate l'étendue du point focal à mesure que la distance objectif-échantillon diminue (voir Figure 6-8-b)). Il devient ainsi plus difficile de définir la coordonnée z et l'étendue de la région sondée.

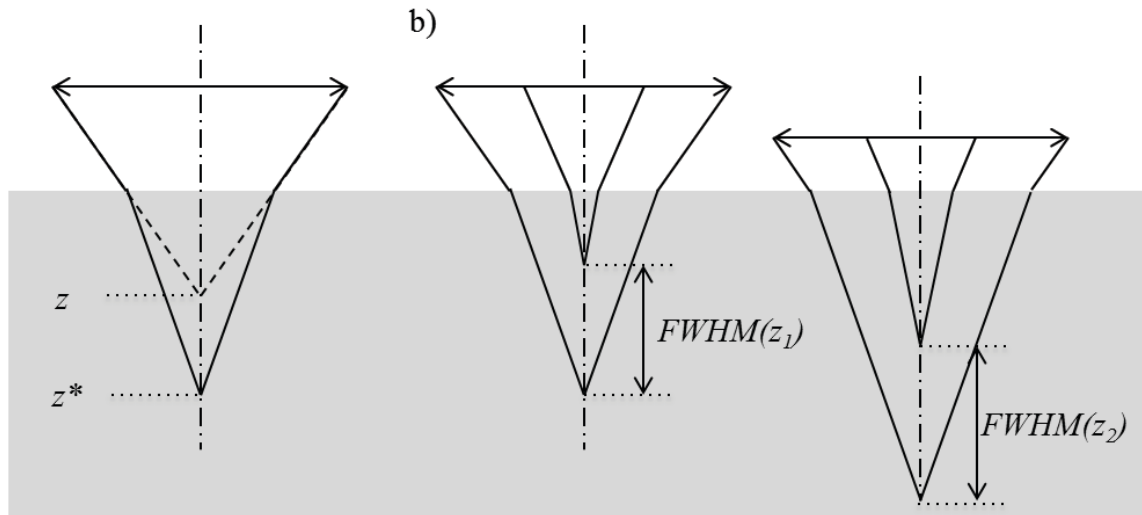


Figure 6-8 : a) Phénomène de réfraction à l'interface air/échantillon et b) Aberrations sphériques

Dans ce paragraphe, nous présentons les méthodes utilisées pour déterminer la position réelle du *waist* laser z^* ainsi que la résolution axiale $FWHM$ du système dans un fantôme en PDMS non diffusant, c'est-à-dire sans TiO_2 , en fonction du déplacement mécanique de la surface de l'échantillon selon l'axe optique. Dans une première approximation, ce seront ces valeurs que nous considérerons pour corriger les profils Raman obtenus sur fantômes diffusants.

Nous considérons donc, pour le moment, que la diffusion n'a pas d'incidence sur ces deux paramètres. Cela pourra être une perspective au travail de thèse de le vérifier. L'outil de simulation Monte Carlo modélisant une configuration confocale de l'équipe *Biophotonics & Biomedical Imaging Research Group* de l'université d'Otago (Nouvelle-Zélande) pourra éventuellement le permettre (Meglinski et Doronin).

Dans la suite, deux voies seront empruntées pour évaluer z^* et $FWHM$ en fonction de z dans notre configuration optique : l'une ne considérant que la fonction d'illumination PSF (*Point Spread Function*) dans l'échantillon via des résultats de simulations fournis par un outil numérique tenant compte des effets de réfraction et de diffraction, l'autre étant expérimentale.

Simulation de la PSF

Afin d'obtenir la PSF dans un échantillon de PDMS non diffusant lorsque celui-ci est illuminé avec un microscope confocal dans la configuration décrite au paragraphe 6.1.1, nous utilisons l'outil de simulations numériques PSF Lab (Nasse et Woehl 2010). Cet outil utilise un formalisme vectoriel pour décrire la manière dont l'intensité lumineuse est distribuée dans un

matériau stratifié lorsque la source est monochromatique, gaussienne et mise en forme par un objectif de grande ouverture numérique.

Voici une capture d'écran des paramètres saisis avant simulation:

Illumination Setup			
Objective NA:	0.9	λ [μm]:	0.532
β_G :	1		
Depth a [μm]:	0		
Coverslip thickness [μm]			
Design value (t*):	0	Actual (t):	0
Refractive indices			
Medium 1, design (n1*):	1	Actual (n1):	1
Medium 2, design (n2*):	1	Actual (n2):	1
		Actual (n3):	1.417

Figure 6-9 : Paramètres saisis sous PSF Lab avant simulation

On y retrouve l'ouverture numérique NA ainsi que la longueur d'onde λ d'illumination. β_g correspond au facteur de limitation laser par la pupille du microscope et vaut 1 pour notre instrument, c'est-à-dire que le faisceau laser n'est pas limité par la pupille, c'est donc un faisceau gaussien qui illumine le matériau sondé. L'observation est faite sans lame couvre objet : son épaisseur est donc réduite à zéro (*coverslip thickness*=0 μm , $n_1=1$). Le milieu de propagation du faisceau est, par conséquent, un milieu bicouche : la première couche étant de l'air ($n_2=1$); la deuxième couche étant le PDMS ($n_3=1,417$).

Les simulations sont effectuées pour des valeurs de z allant de 0 à 160 μm , avec un pas de 5 μm pour les points proches de la surface, puis des pas de 20 μm jusqu'à $z=100$ μm . Les résultats sont présentés dans la partie 6.3.

Méthode expérimentale

Afin de déterminer expérimentalement la conversion $z^*(z)$ ainsi que l'évolution de la résolution axiale du système au fur et à mesure de la pénétration du *waist* laser dans le PDMS, un fantôme constitué d'un film de PDMS sur une lame de silicium a été spécifiquement développé: après avoir recouvert une partie de la lame de silicium d'un ruban de scotch Kapton, un film de PDMS est déposé à la tournette (*spin-coating*) comme décrit au paragraphe 2.4.2 du Chapitre 2 et dans la Figure 6-10a). Plusieurs vitesses de rotation ont été testées de manière à avoir une épaisseur de film comprise entre 20 et 100 μm . Une fois le PDMS recuit, le ruban de scotch est décollé de la lame, retirant aussi sur sa surface une partie du film de PDMS déposé. On dispose ainsi d'un fantôme constitué de silicium nu sur une

première surface (Zone 1) et de deux couches (PDMS sur Si) sur une deuxième surface (Zone 2). Il est à noter que l'épaisseur de PDMS n'est pas uniforme et ceci pour deux raisons: d'une part, à cause du surplus de matière induit par le bord de scotch Kapton; d'autre part, à cause du mode de dépôt dit tournant alors que le substrat de silicium est de géométrie rectangulaire (les conditions de vitesse linéaire aux bords du substrat sont donc différentes, *a contrario* d'une géométrie circulaire). Nous transformons ce défaut en avantage pour notre étude.

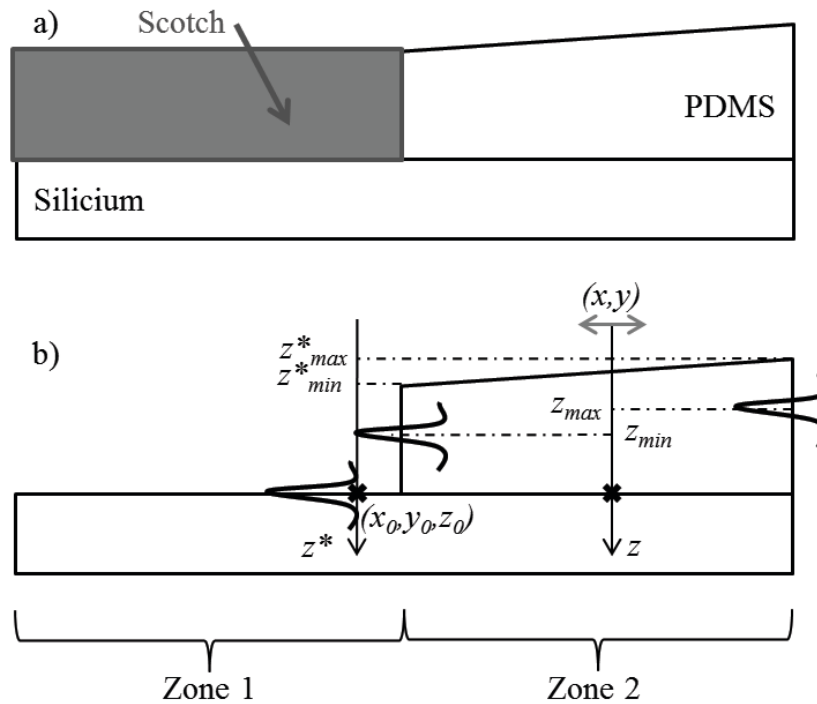


Figure 6-10 : (a) Acquisition de la réponse confocale sur wafer de Silicium; (b) Acquisition de la réponse confocale sur wafer de Silicium sous un film d'épaisseur constante; (c) Acquisition de la réponse confocale sur wafer de Silicium sous un film d'épaisseur variable

La manière de procéder pour obtenir une estimation expérimentale de la loi $z^*(z)$ a été décrite dans (de la Paz Miguel et Tomba 2013). On se réfère à la Figure 6-10b) pour une vue schématique du procédé. On réalise une première acquisition d'un profil selon z^* sur la partie du fantôme sans PDMS (Zone 1). À partir de ces mesures, on définit l'origine (x_0, y_0, z_0) des axes z et z^* comme la position axiale pour laquelle l'intensité Raman à 521 cm^{-1} est maximale. Grâce à la mesure optique dans l'air de la hauteur de PDMS des points (x, y) , on accède aux épaisseurs mécaniques de la couche de PDMS variant de z^*_{min} à z^*_{max} .

Ensuite, on acquiert de nouveau le profil Raman à 521 cm^{-1} en différents points (x, y) de la partie du fantôme constituée des deux couches (Zone 2), en faisant attention à ne pas trop s'éloigner point (x_0, y_0, z_0) . De nouveau, la valeur de z pour laquelle l'intensité Raman est maximale est enregistrée. Cette information nous permet d'accéder à la conversion $z \rightarrow z^*$. Et par le calcul de la largeur à mi-hauteur du profil Raman à 521 cm^{-1} , on accède à la fonction $FWHM(z)$ ou $FWHM(z^*)$.

6.1.5 Etude de la fonction de quantification

Fantômes utilisés

Les fantômes utilisés pour l'analyse de la dégradation de la fonction de quantification sont les fantômes monocouches, sans colorant, suivants:

- PDMS transparent (sans TiO_2) tel que $\mu'_{s0}(532 \text{ nm}) = 0,0 \text{ cm}^{-1}$;
- PDMS dopé en TiO_2 de coefficient de diffusion réduit mesuré par la DRS $\mu'_{s1}(532 \text{ nm}) = 24,0 \text{ cm}^{-1}$;
- PDMS dopé en TiO_2 de coefficient de diffusion réduit mesuré par la DRS $\mu'_{s2}(532 \text{ nm}) = 31,1 \text{ cm}^{-1}$;
- PDMS dopé en TiO_2 de coefficient de diffusion réduit mesuré par la DRS $\mu'_{s3}(532 \text{ nm}) = 53,6 \text{ cm}^{-1}$;
- PDMS dopé en cm^{-1} , de coefficient de diffusion réduit mesuré par la DRS $\mu'_{s4}(532 \text{ nm}) = 70,5 \text{ cm}^{-1}$.

Lissage par ACP

Les profils d'intensité Raman bruts obtenus sur fantômes sont bruités à cause de l'existence d'agrégats de TiO_2 dans la matrice. En effet, on observe que les profils Raman obtenus sur la bande spectrale $619\text{-}659 \text{ cm}^{-1}$ présentent parfois des sauts d'intensité importants (voir Figure 6-11 et paragraphe 6.2.1). Pour rappel, cette bande spectrale contient des modes vibratoires du TiO_2 et du PDMS. Ces "pics" d'intensité correspondent à la présence d'agrégats de TiO_2 dont la dimension est de l'ordre de grandeur du spot laser (entre $0,5$ et $2 \mu\text{m}$). Ceci a été vérifié grâce à la caméra du microscope confocal (voir Figure 6-12).

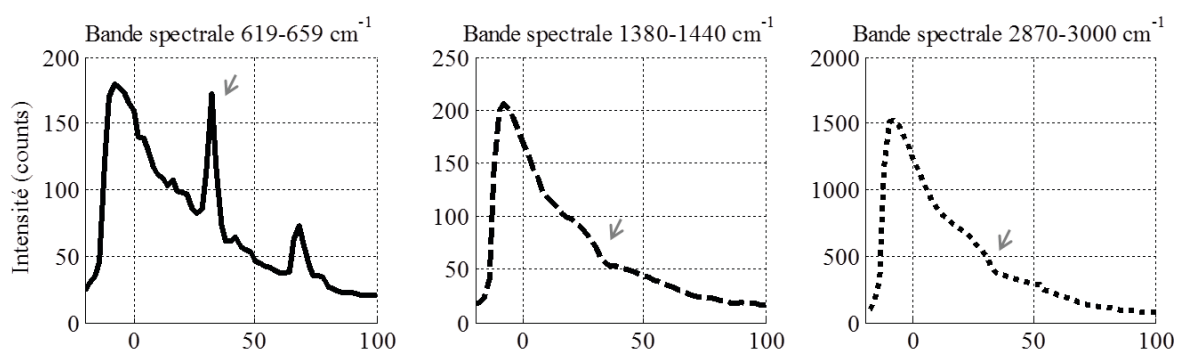


Figure 6-11 : Exemples de profils Raman obtenus.

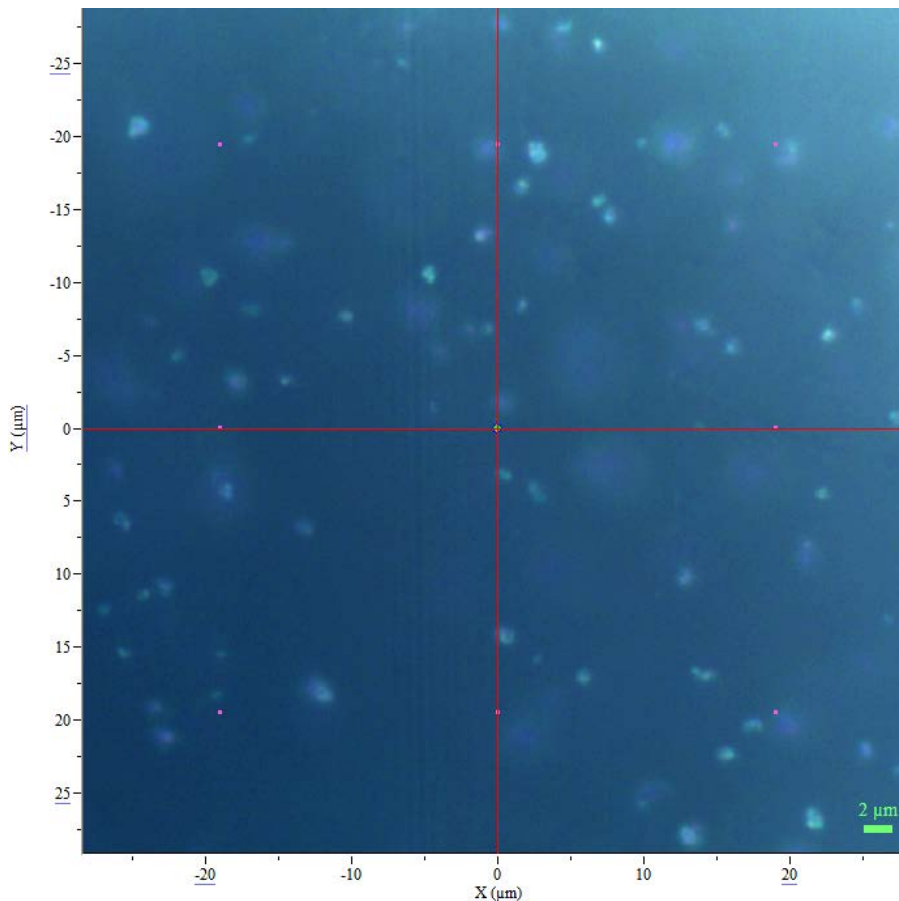


Figure 6-12 : Image CCD de la surface d'un fantôme de PDMS dopé au TiO_2 obtenue au microscope

On peut se demander quelle incidence peuvent avoir ces agrégats sur la diffusion. Bien que les fantômes apparaissent homogènes, en termes de répartition des particules, lors de la caractérisation par tomographie X dont la résolution était de $10 \mu\text{m}$ (paragraphe 2.4.3), certaines particules de TiO_2 sont agglomérées. Mais cela n'exclut pas qu'à l'échelle macroscopique, la distribution en nanoparticules de TiO_2 soit homogène dans le fantôme et que le coefficient de diffusion le soit aussi.

En outre, on remarque que l'incidence de ces "pics" d'intensité sur les profils de l'intervalle $619\text{-}659 \text{ cm}^{-1}$ concorde avec l'occurrence de "creux" dans les profils Raman obtenus sur les gammes spectrales propres aux modes vibratoires du PDMS. Ceci est logique car un élément de volume contenant un agrégat de TiO_2 contient moins de PDMS qu'un élément de volume où la concentration en TiO_2 est homogène (où le TiO_2 est sous sa forme de nanoparticule non-agglomérée). Ainsi, le spectre Raman de cet élément de volume présente une intensité Raman liée au PDMS affaiblie, alors que celle liée au TiO_2 est augmentée.

Ce bruit risque de perturber la détection des interfaces entre les différentes couches lorsque nous étudierons les fantômes multicouches au Chapitre 7. C'est la raison pour laquelle une méthode a été mise au point pour éliminer ces artefacts. Pour cela, nous utilisons les six points de mesures (x, y) avec l'idée que, sur ces six profils, si agrégat de TiO_2 il y a, alors ils ne se produisent pas tous au même z . Malgré tout, un traitement par le calcul d'une moyenne ou médiane de ces six profils ne suffit pas à s'affranchir de ce bruit.

Une Analyse en Composantes Principales (ACP) s'avère plus efficace. L'ACP est une méthode d'analyse de données puissante tenant compte de leur caractère multidimensionnel (Saporta 2006). Elle consiste à réduire l'espace des variables en un sous-espace de dimension plus faible constitué de vecteurs principaux pour en simplifier l'analyse. Nous la mettons en œuvre de la manière suivante :

- L'intensité Raman $I_{\sigma_R}(z)$ représente l'espace des variables. Elles sont au nombre de $n = N_{x,y} \times N_{\sigma_R}$ où N_{σ_R} est la quantité de nombres d'onde σ contenus dans la bande spectrale d'intérêt (il dépend donc du nombre de pixels du détecteur sur cet intervalle spectral), et $N_{x,y}$ est le nombre de positions de mesures dans le plan (x, y) . Ici, $N_{x,y} = 6$.
- Les coordonnées de profondeur z constituent l'espace des individus. Puisque les profils axiaux sont acquis pour $-20 \mu m \leq z \leq 100 \mu m$, avec un pas de $2 \mu m$ cela génère 61 individus.

Nous espérons pouvoir réduire l'espace des n variables à une unique dimension par bande spectrale d'intérêt. Ainsi, l'ACP fournirait une composante principale sur laquelle la projection des 61 individus serait le profil d'intensité Raman global. La projection des individus sur les autres composantes constituerait le bruit de mesure. Ceci à condition que l'inertie de projection des individus sur la première composante soit grande, et celle des autres composantes très faible. Cette inertie est calculée comme le rapport de la variance des composantes du vecteur (dans l'espace de base) sur la somme des variances des composantes des n vecteurs. Elle sera indiquée au paragraphe 6.2.2 sous forme de pourcentage.

6.2 Profils obtenus sur fantômes solides monocouches

6.2.1 Profils bruts

Comme expliqué précédemment, les spectres Raman sont acquis en six points de mesure (x, y) sur chaque fantôme. Ici, pour alléger le rapport, nous ne présenterons les profils obtenus pour les trois bandes spectrales choisies, qu'en un point de mesure. Les résultats sont présentés en Figure 6-13.

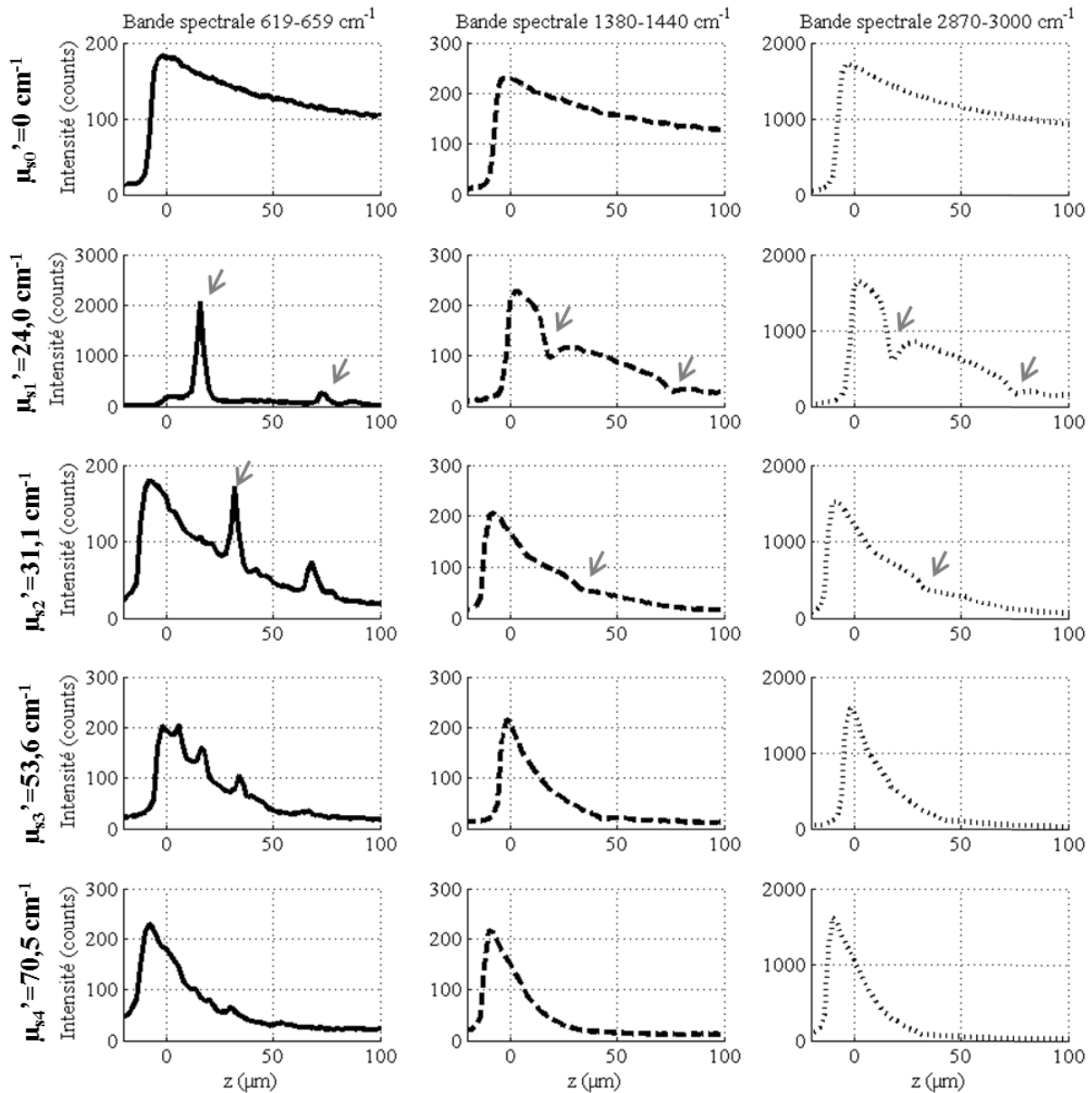


Figure 6-13 : Profils Raman obtenus sur les cinq fantômes avec un coefficient de diffusion réduit variant de μ'_{s0} à μ'_{s4} (affichés ligne par ligne) à 532 nm. Chaque colonne correspond au profil d'une bande spectrale particulière.

Remarque 1

La première remarque concerne le fantôme constitué de PDMS uniquement (μ'_{s0}). Ce fantôme est homogène et non diffusant. La décroissance de l'intensité Raman observée est un phénomène connu et est dû, entre autres, aux aberrations sphériques engendrées par le changement d'indice de réfraction entre l'air et l'échantillon (Figure 6-8-b)). Plus l'objectif est proche de l'échantillon, plus le *waist* laser est axialement étendu et plus la densité d'éclairement est faible au volume focal.

Remarque 2

D'un échantillon à l'autre, la position du maximum de signal n'est pas toujours la même bien qu'elle soit toujours proche de $z = 0$. Ceci est dû aux aléas de manipulation et de définition de

la coordonnée $z = 0$ d'un échantillon à l'autre. Une procédure de recalage sera mise en œuvre pour que l'analyse des profils puisse s'affranchir de ce biais de manipulation (paragraphe 6.3.4).

Remarque 3

Dans la Figure 6-13, nous symbolisons par des flèches l'occurrence des "pics" d'intensité dus aux agrégats de TiO_2 sur les profils de la bande spectrale $619\text{-}659\text{ cm}^{-1}$. Ils concordent, comme expliqué au paragraphe 6.1.5, avec l'apparition de "creux" sur les profils calculés pour les deux autres bandes spectrales indépendantes du TiO_2 .

6.2.2 Profils après ACP

Dans ce paragraphe, nous présentons les profils Raman obtenus après ACP (Figure 6-14) et les valeurs d'inertie des composantes principales associées dans le Tableau 6-1.

Bande spectrale (cm^{-1})	619-659	1380-1440	2870-3000
Fantôme μ'_{s0}	99,8%	99,8%	99,9%
Fantôme μ'_{s1}	75,3%	98,9%	99,1%
Fantôme μ'_{s2}	70,4%	98,8%	98,8%
Fantôme μ'_{s3}	79,3%	98,4%	98,5%
Fantôme μ'_{s4}	79,1%	97,2%	98,6%

Tableau 6-1 : Inerties de composantes principales obtenues sur chaque fantôme en PDMS et données pour chaque bande spectrale en pourcentage.

Comme espéré, l'inertie de projection des individus (coordonnées axiales z) sur la première composante est très élevée : elle est supérieure à 70% pour les profils obtenus sur la bande spectrale $619\text{-}659\text{ cm}^{-1}$ et supérieure à 97% sur les deux autres intervalles spectraux. Ceci signifie que les profils bruts obtenus sur les bandes spectrales $1380\text{-}1440$ et $2870\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ peuvent être ramenés à un unique signal, ceux affichés en Figure 6-14. Les 0,1 à 2,8% d'inertie restants ne représentent que le bruit de mesure. Les profils lissés par ACP sont donc moins bruités et les "creux" dus aux agglomérats mentionnés précédemment sont supprimés sur les bandes spectrales $1380\text{-}1440$ et $2870\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$. Nous les utiliserons dans l'évaluation de la dégradation de la fonction de quantification. En revanche, les profils obtenus sur la bande spectrale $619\text{-}659\text{ cm}^{-1}$, dont l'inertie donnée par ACP était plus faible et correspondant à la raie Raman caractéristique du TiO_2 , présentent toujours des "pics". Cette bande spectrale ne sera pas prise en compte dans l'analyse au paragraphe 6.4. Nous identifions une autre bande spectrale de travail et nous la remplaçons par la bande spectrale $680\text{-}720\text{ cm}^{-1}$.

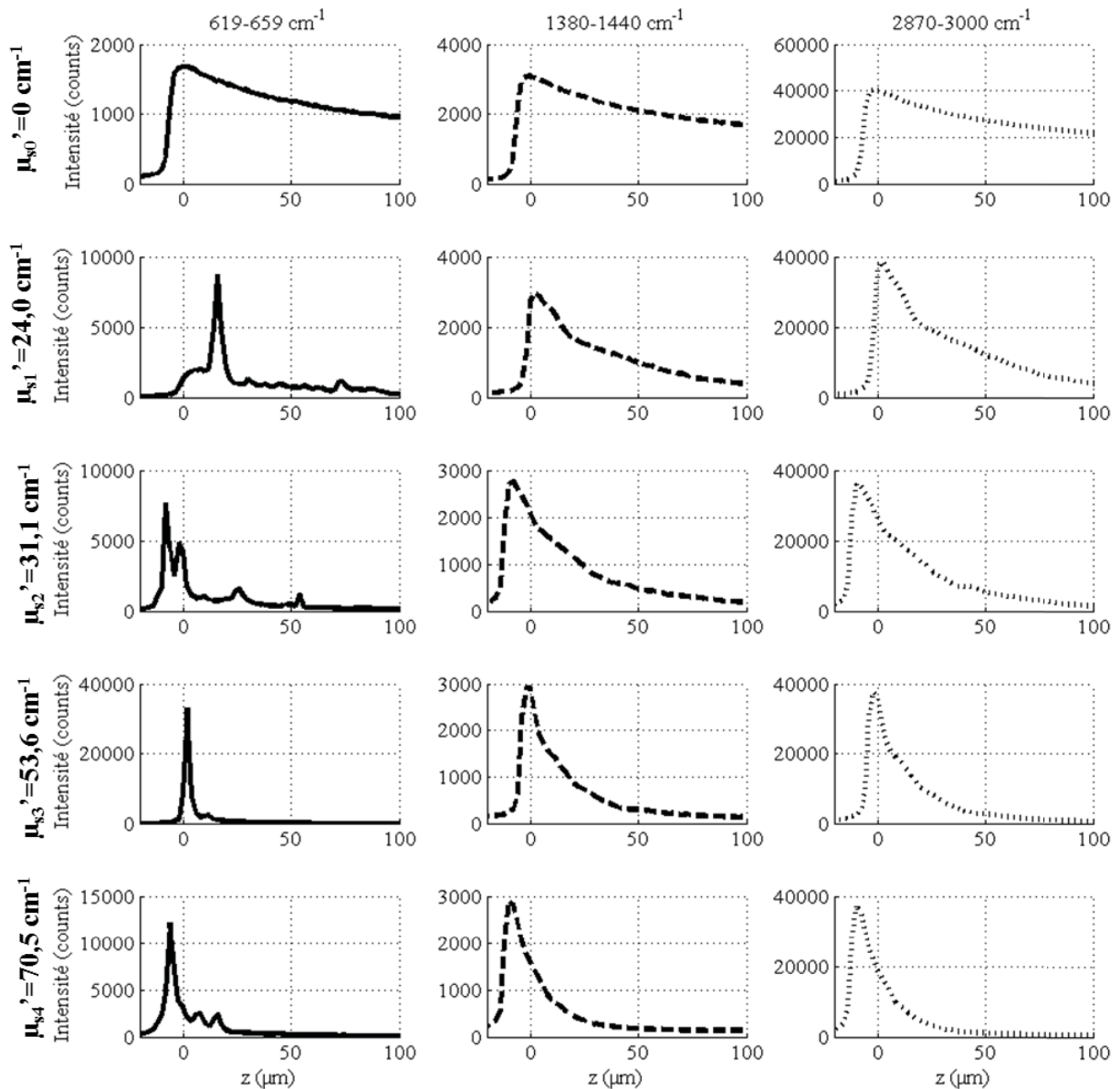


Figure 6-14 : Profils Raman obtenus après ACP tenant compte des six points de mesure (x,y). Les résultats des cinq fantômes (de μ'_{s0} à μ'_{s4}) sont affichés ligne par ligne. Chaque colonne correspond au profil d'une bande spectrale particulière.

6.3 Evaluation de la dégradation de la fonction de localisation

Dans cette partie, nous avons pour objectif de déterminer la conversion de l'échelle axiale $z^*(z)$ et l'évolution de la résolution axiale de la mesure avec la profondeur $FWHM(z^*)$. Nous les obtiendrons en suivant une approche de modélisation et une approche expérimentale comme expliqué au paragraphe 6.1.4.

6.3.1 Etat de l'art

Pour évaluer l'effet de la réfraction, les auteurs de (Xiao, et al. 2004) ont utilisé un matériau multicouche constitué de plusieurs films en polymère avec des indices de réfraction proche de celui de la peau. Ils ont estimé que la distorsion induite conduisait à sous-estimer la

profondeur sondée de 15 à 20 %. Ces valeurs ont été utilisées dans de précédents travaux de suivis d'actifs dans la peau (A. Tfayli, et al. 2007-a).

Ceci a été complètement formalisé en microscopie confocale de fluorescence, technique analogue à la microspectroscopie Raman. La théorie de Hell (Hell, et al. 1993) concorde très bien avec des résultats expérimentaux obtenus jusqu'à 50 μm de profondeur. Elle démontre qu'en plus de cette compression d'échelle, les aberrations engendrées par la réfraction provoquent une perte de résolution axiale et une baisse de l'intensité lumineuse. Booth propose de corriger ces effets par une connaissance *a priori* des aberrations engendrées par le milieu analysé et par une modulation adaptée du faisceau incident (Booth, Neil et Wilson 1998). Dans ce travail de thèse, nous n'avons pas entrepris d'adapter ces théories à la microspectroscopie Raman et proposons plutôt de considérer des modèles dont l'utilisation est plus directe pour notre problématique.

Everall a été le premier à pointer du doigt l'erreur d'interprétation des profils Raman que pouvait engendrer un oubli de ce phénomène de réfraction (N. J. Everall 2000-a, N. J. Everall 2000-b). Il a proposé un modèle pour convertir la position mécanique z en position réelle z^* (équation (6-1)) et pour calculer la résolution axiale $FWHM$ (équation (6-3)) du système au sein du matériau. Ces quantités dépendent de trois paramètres:

- NA l'ouverture numérique de l'objectif;
- m est le facteur de recouvrement de l'objectif par le faisceau laser ($m = 0$ pour un objectif très faiblement couvert, $m = 1$ pour un recouvrement parfait). C'est l'équivalent du paramètre β_G utilisé avec PSF Lab;
- n_r le rapport entre l'indice de réfraction du matériau sondé et l'indice de réfraction du milieu dans lequel l'objectif est immergé.

$$z^* = \frac{\int_0^1 m \times Z(m) \times I(m) dm}{\int_0^1 m \times I(m) dm} \quad (6-1)$$

avec :

$$Z(m) = z \times \sqrt{m^2 \times \frac{NA^2 \times (n_r^2 - 1)}{1 - NA^2} + n_r^2} \quad (6-2)$$

et où $I(m) = I_0 \times e^{-2m^2/\phi^2}$ est la fonction de distribution de l'intensité laser le long de l'axe z avec ϕ le facteur troncature du faisceau par la pupille de l'objectif. $\phi = 1$ lorsque le recouvrement est optimal. $\phi > 1$ lorsque le *waist* laser est tronqué par l'objectif.

La résolution axiale en fonction de z en découle :

$$\begin{aligned}
FWHM_{Everall}(z) &= Z(m = 1, z) - Z(m = 0, z) \\
&= z \times \left[\sqrt{\frac{NA^2 \times (n_r^2 - 1)}{1 - NA^2}} + n_r^2 - n_r \right]
\end{aligned} \tag{6-3}$$

D'après cette relation, la résolution axiale est proportionnelle au déplacement mécanique. Cependant, ces travaux ne tiennent compte ni de la diffraction, ni de l'effet du filtrage confocal (N. Everall 2010). Dans (Batchelder et Baldwin 2001), les auteurs ont adapté le modèle décrit par Everall en incluant le filtrage confocal dans la détermination de la résolution du système. Certaines études montrent une déviation entre ce modèle et des résultats expérimentaux (Bruneel, Lassègues et Sourisseau 2002, Tomba, Arzondo et Pastor 2007, Tfayli, Piot et Manfait 2008). Nous choisissons donc de ne pas tenir compte de ce modèle dans les travaux qui suivent.

Parmi les travaux tenant compte de la diffraction et de l'ouverture confocale (Bruneel, Lassègues et Sourisseau 2002, Tomba, Arzondo et Pastor 2007, Sourisseau et Maraval 2003), les auteurs de (Sourisseau et Maraval 2003) proposent une expression analytique simple pour la résolution axiale (équation (6-4)) avec a , b et c des paramètres d'ajustement. Ils écartent toute relation de proportionnalité entre la résolution axiale et le déplacement mécanique.

$$FWHM_{Sourisseau}(z) = a \times [1 - e^{-b \times z}] + c \tag{6-4}$$

Dans les deux paragraphes suivants, nos résultats de simulations et expérimentaux seront analysés en regard des expressions (6-3) et (6-4).

6.3.2 Changement d'échelle

Les méthodes numérique et expérimentale décrites au paragraphe 6.1.4 donnent exactement le même profil de conversion entre z et z^* (voir Figure 6-15). On observe une déviation entre le modèle proposé par Everall et les résultats de simulation. Notre utilisation du modèle de Everall semble surestimer la profondeur réellement sondée par rapport aux résultats fournis par PSF Lab qui fait office de référence, très certainement parce que ce modèle est calculé par optique géométrique et ne tient pas compte de la diffraction. Nous choisissons donc d'écarter ce modèle pour la suite de l'analyse.

La régression linéaire effectuée sur les points expérimentaux donne la loi de changement d'échelle suivante :

$$z^*(z) = 1,4774 \times z \tag{6-5}$$

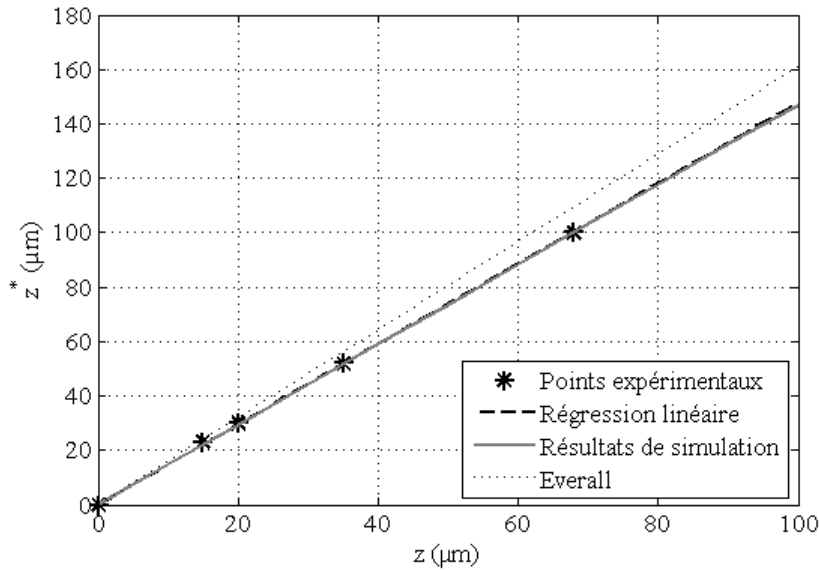


Figure 6-15 : z^* en fonction de z obtenu expérimentalement, par simulations sous PSF Lab et d'après le modèle de (N. J. Everall 2000-b) soit l'équation (6-1). La régression linéaire est effectuée sur les points expérimentaux.

6.3.3 Augmentation de la résolution axiale

Les lois $FWHM_{Exp}(z^*)$ et $FWHM_{Comp}(z^*)$ déduites, respectivement, expérimentalement et numériquement (*Comp* pour *Computed*, simulé en français) sont affichées en Figure 6-16. Elles sont obtenues grâce au modèle de (Sourisseau et Maraval 2003) donné par l'équation (6-4). Les paramètres a , b et c sont utilisés comme variables d'ajustement. Leurs valeurs pour chacune des deux lois sont données au Tableau 6-2. La relation de proportionnalité (6-3) n'est pas adaptée pour modéliser nos résultats expérimentaux.

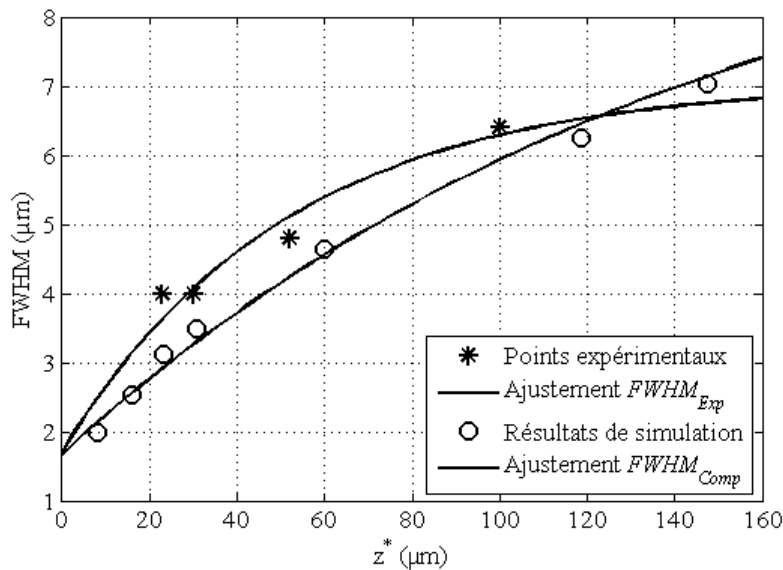


Figure 6-16 : $FWHM$ en fonction de z obtenue expérimentalement (*Exp*) et par simulations sous PSF Lab (*Comp*). Les paramètres a , b et c du modèle de (Sourisseau et Maraval 2003) donné par l'équation (6-4) sont utilisés comme variables d'ajustement pour décrire ces deux lois.

$FWHM_{Exp}(z^*)$	$a_{Exp} = 5,36$	$b_{Exp} = 0,019$	$c_{Exp} = 1,70$
$FWHM_{Comp}(z^*)$	$a_{Comp} = 8,75$	$b_{Comp} = 0,007$	$c_{Comp} = 1,67$

Tableau 6-2 : Résultats d'ajustement des points expérimentaux et simulés pour FWHM.

La différence entre les lois $FWHM_{Exp}(z^*)$ et $FWHM_{Comp}(z^*)$ s'explique par le fait que L'outil de simulation PSF Lab ne modélise pas l'ouverture confocale. $FWHM_{Comp}(z^*)$ correspond donc à l'élargissement du *waist* laser avec la profondeur et non à la véritable résolution axiale du système. L'effet du trou confocal sur la limitation de l'élargissement de la résolution axiale est observable pour $z > 120 \mu\text{m}$.

Nous retiendrons donc :

$$FWHM_{Exp}(z^*) = a_{exp} \times [1 - e^{-b_{Exp} \times z^*}] + c_{Exp} \quad (6-6)$$

6.3.4 Protocole de prétraitement des profils

Avant d'aboutir au modèle décrivant la dégradation de la fonction de quantification en fonction de z^* dans un échantillon diffusant en fonction de ses propriétés optiques, un certain nombre d'étapes de prétraitement est nécessaire, notamment en ce qui concerne la conversion de l'échelle spatiale. Nous les décrivons ici successivement.

1. En tout premier lieu, une ACP (Analyse en Composantes Principales) a été effectuée pour réduire le bruit lié à la présence d'agrégats de particules de TiO_2 dans les profils donnés au paragraphe 6.2.1. Ce traitement est décrit au paragraphe 6.1.3 et les résultats donnés au paragraphe 6.2.2;
2. Dans un deuxième temps, on recalcule l'échelle de la coordonnée z de manière à ce que la valeur médiane du maximum d'intensité Raman des profils obtenue sur chacune des bandes spectrales d'intérêt soit en $z = 0$; ceci n'est pas vrai physiquement car, en général, l'intensité maximale correspond à une pénétration du *waist* laser d'environ une demi-FWHM, mais cette approximation est idéale pour le calage du modèle;
3. Enfin, la coordonnée z est convertie en coordonnée z^* par la loi obtenue expérimentalement (équation (6-5)).

Nous présentons en Figure 6-17 les courbes prétraitées obtenues sur les fantômes monocouches pour les bandes spectrales 680-720, 1380-1440 et 2870-3000 cm^{-1} .

Ces étapes de prétraitement permettent de s'affranchir d'aléas de mesures, d'avoir une idée de la profondeur réellement sondée, et surtout de pouvoir observer l'effet de la diffusion élastique et de l'augmentation du coefficient de diffusion sur la décroissance de l'intensité Raman en fonction de la profondeur. Il se caractérise par un signal diminuant de façon plus prononcée au fur et à mesure que le niveau de diffusion dans le matériau augmente.

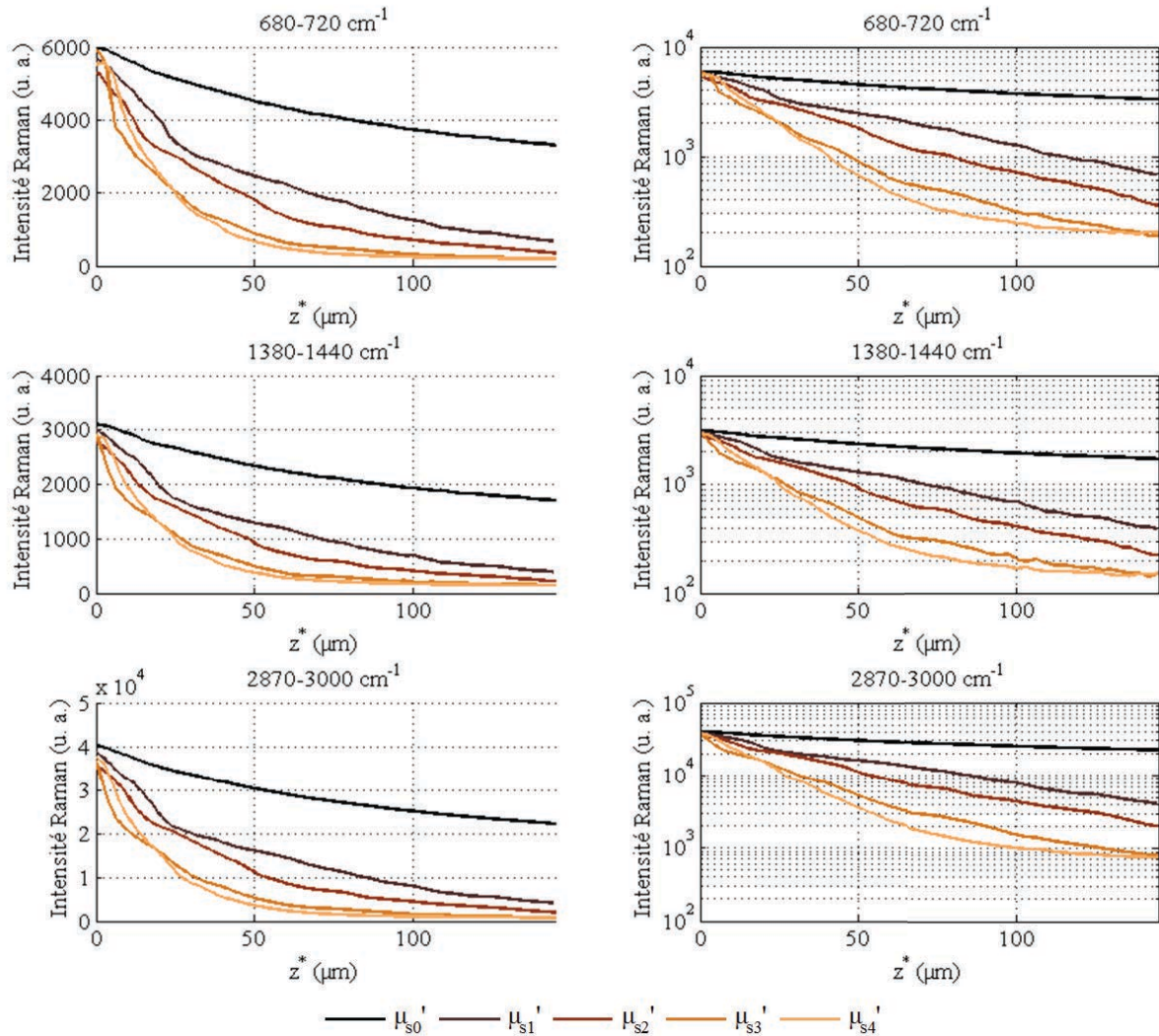


Figure 6-17 : Profils d'intensité Raman prétraités obtenus sur les fantômes monocouches de μ'_{s0} à μ'_{s4} pour les bandes spectrales 680-720, 1380-1440 et 2870-3000 cm^{-1} . Gauche : échelle linéaire. Droite : échelle logarithmique.

L'affichage des résultats en échelle semi-logarithmique permet de révéler que l'intensité Raman diminue telle une exponentielle décroissante. En effet, dans cette représentation nous obtenons des droites dont la pente augmente avec le coefficient de diffusion. On peut cependant observer que les courbes représentatives des deux échantillons les plus diffusants s'assimilent bien à des droites pour $z^* < 80 \mu\text{m}$ dans l'échelle logarithmique mais qu'elles ne suivent plus une courbe linéaire au-delà de cette coordonnée axiale.

Ce bilan comportemental est important pour envisager la suite du travail : définir un modèle R_{λ_R} décrivant I_{σ_R} l'intensité Raman mesurée en fonction de z^* , des propriétés optiques de l'échantillon à λ_0 et λ_R et d'autres paramètres instrumentaux pouvant intervenir tels que la dimension du trou confocal Φ , l'ouverture numérique de l'objectif NA , ou plus simplement, la résolution axiale du système $FWHM(z^*)$. Nous procéderons par étape pour définir l'importance de chacun de ces paramètres dans le modèle dans la partie suivante.

6.4 Evaluation de la dégradation de la fonction de quantification

Dans un premier paragraphe, nous ferons un bref rappel des travaux publiés concernant la correction des spectres Raman des distorsions créées par les phénomènes d'absorption et de diffusion élastique. Au deuxième paragraphe, des modèles sont proposés en tenant compte des conclusions obtenues sur les paramètres spatiaux de la partie 6.3. Nous verrons comment leurs paramètres pourront être raccordés aux propriétés optiques des échantillons dans le troisième paragraphe. Enfin, les résultats d'ajustement de ces modèles aux profils expérimentaux sont présentés dans le dernier paragraphe. Cela nous permet d'identifier un modèle optimal.

6.4.1 Etat de l'art

Stratégie 1 : Utilisation du coefficient d'extinction et d'une loi de Beer-Lambert

À notre connaissance, le premier article rapportant et modélisant la dépendance de la réponse axiale de la spectroscopie Raman en géométrie confocale avec la diffusion élastique date de 1996 (Brenan et Hunter 1996). Dans cette étude, les fantômes utilisés ont pour vocation de mimer les propriétés de diffusion élastique et de diffusion Raman des tissus biologiques. Ils sont constitués d'un film de cire de 110 μm d'épaisseur immergé dans du lait dilué à différentes concentrations. L'objectif est de vérifier expérimentalement un modèle théorique basé sur la théorie de la diffusion simple et décrivant le processus de formation des images Raman confocales dans un milieu turbide en termes de résolution spatiale et de contraste. Le modèle en question prévoit que l'intensité Raman détectée au nombre d'onde σ_R (ou longueur d'onde λ_R) est proportionnelle à $e^{-(\mu_{t0} + \mu_{tR})z/2}$ où μ_{t0} et μ_{tR} sont, respectivement, les coefficients d'extinction du milieu à la longueur d'onde d'excitation λ_0 et d'émission Raman λ_R . Pour rappel, le coefficient d'extinction est défini comme la somme des coefficients d'absorption et de diffusion. La linéarité obtenue expérimentalement entre le logarithme du maximum d'intensité Raman mesurée et $(\mu_{t0} + \mu_{tR})z$ leur permet de valider ce modèle.

Très récemment, une étude similaire a évalué expérimentalement l'effet de la diffusion sur la résolution axiale et sur l'intensité Raman détectée (Yamamoto, Itoh, et al. 2014). Les fantômes développés dans cette étude sont stratifiés (voir Figure 6-18). Le matériau diffusant utilisé est de l'Intralipide dont la concentration varie de 0,1 à 1% et dont l'épaisseur de couche z varie entre 50 et 800 μm (couche B) selon les fantômes. Dans cette étude, c'est l'évolution du profil d'intensité Raman du Silicium (couche A) à 519 cm^{-1} qui est observée en fonction de l'épaisseur d'Intralipide : l'affaiblissement de son intensité maximale I_{max} est analysé en fonction de l'épaisseur de couche diffusante z (voir Figure 6-19) et est exprimé par une loi de Beer-Lambert :

$$I_{max}(z) = I_{max}(z = 0) \times e^{-\mu_t z} \quad (6-7)$$

où μ_t est le coefficient d'extinction déterminé à partir des travaux de van Staveren sur l'Intralipide 10% (van Staveren, et al. 1991). Ce modèle est donc équivalent à celui décrit dans (Brenan et Hunter 1996), à ceci près que la variation du coefficient d'extinction entre λ_0 et λ_R est négligée. Une déviation entre les courbes ainsi simulées et les points expérimentaux est observée lorsque la concentration d'Intralipide, et donc la diffusion élastique, diminue. Il est à noter que ce système est confocal mais avec un faible sectionnement optique : la résolution axiale est d'environ 200 μm .

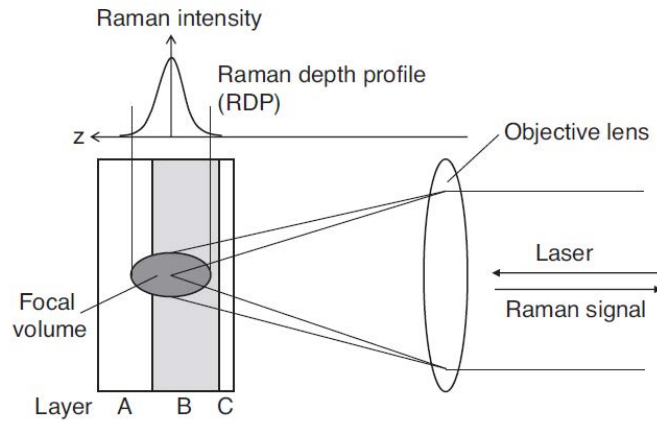


Figure 6-18 : Représentation schématique de la mesure Raman d'un milieu diffusant stratifié (Yamamoto, Itoh, et al. 2014). Couche A : Silicium. Couche B : Intralipide. Couche C : Verre en silice.

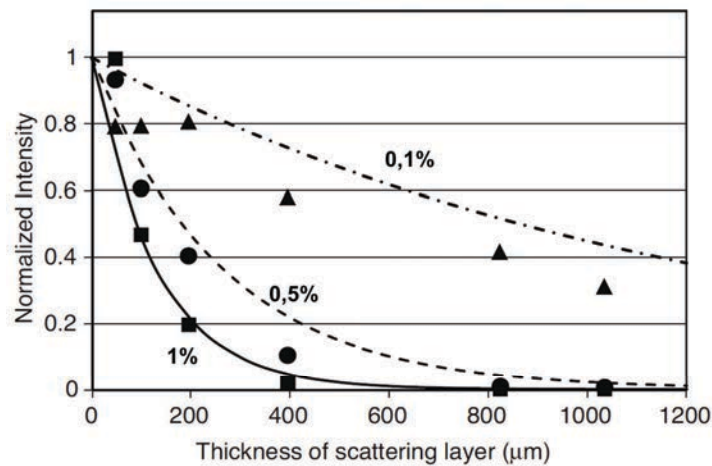


Figure 6-19 : Profil du maximum d'intensité Raman à 519 cm^{-1} du silicium sous une couche d'Intralipide de concentration variable (donnée en pourcentage) et d'épaisseur variable (donnée en abscisse). Les courbes issues de la loi de Beer-Lambert sont affichées pour comparaison.

Les travaux de Macdonald et Vaughan complexifient le modèle. Dans (Macdonald et Vaughan 2007), des simulations des profils Raman profonds sont effectuées à partir d'un modèle numérique développé par cette équipe avec une approche d'optique diffuse. Ce modèle repose sur trois hypothèses :

- La génération de photons Raman, donc de photons ayant changé de longueur d'onde par rapport à l'illumination, n'est pas limitée au *waist* laser, mais a lieu dans un volume plus étendu situé autour du point focal. Ce volume étendu est l'équivalent de deux cônes ayant pour origine ce point focal (Figure 6-20-b).
- Tout au long de leur parcours dans l'échantillon, aussi bien les photons de l'illumination que les photons diffusés Raman subissent les phénomènes de diffusion élastique et d'absorption, responsables de l'atténuation du signal.

- La probabilité qu'un photon diffusé Raman passe le trou confocal et contribue au spectre mesuré dépend de son lieu de génération dans le volume d'illumination défini ci-dessous (Figure 6-20-a).

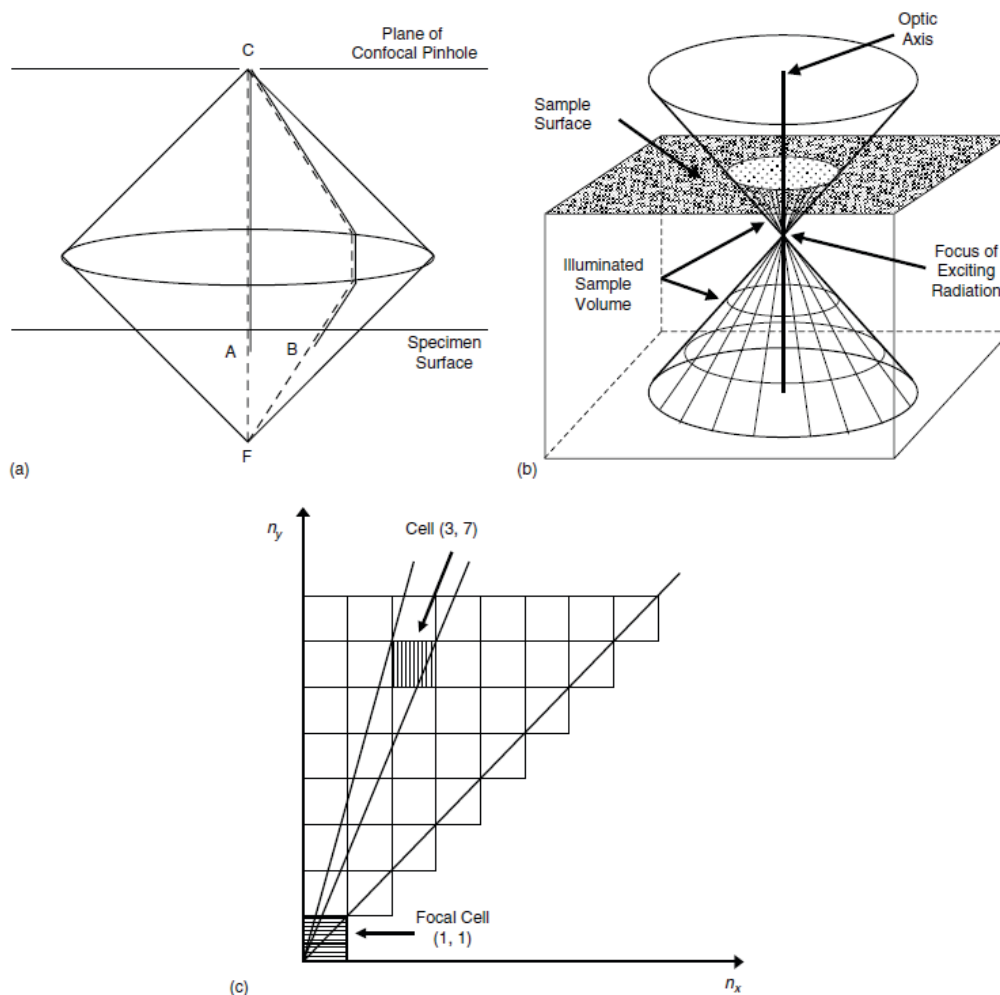


Figure 6-20 : Caractéristiques du modèle numérique développé dans (Macdonald et Vaughan 2007)

Le milieu considéré a deux dimensions et le modèle est développé sous MS Excel. Dans chaque cellule du tableau est calculé un "taux de production" $R_{r,z}$ de photons Raman dépendant des coefficients d'extinction aux longueurs d'onde d'émission Raman μ_{tR} et d'illumination μ_{t0} , de la position de la cellule (n_r, n_z) (donnant la probabilité que le photon Raman passe le trou confocal) et l'efficacité Raman A du matériau à la longueur d'onde d'émission Raman considérée (voir équation (6-8)). C'est la somme des "taux" calculés dans chacune des cellules, modulés par la puissance laser, qui permet d'obtenir le signal Raman détecté.

$$R_{r,z} = A \times \frac{1}{n_z^2} e^{-(\mu_{t0} + \mu_{tR})z} \times \left[\cos(\tan^{-1} \frac{n_r}{n_z}) - \cos(\tan^{-1} \frac{n_r - 1}{n_z}) \right] \quad (6-8)$$

Le modèle est inexact d'un point de vue quantitatif car les simulations s'ajustent aux mesures pour des valeurs de $\mu_{t0} \approx \mu_{tR}$ éloignées des valeurs trouvées dans la littérature pour ces matériaux.

Les résultats de (Yamamoto, Itoh, et al. 2014) et (Macdonald et Vaughan 2007) nous indiqueraient donc qu'il n'est pas valide d'utiliser le coefficient d'extinction du matériau diffusant en facteur de l'exponentielle.

Stratégie 2 : Utilisation d'un objet mimant les propriétés optiques de la peau

Dans (Franzen, et al. 2013), les auteurs présentent un milieu chimique semi-solide simulant les propriétés optiques de la peau. Une expression mathématique $D(z)$ décrivant l'atténuation du signal Raman dans ce milieu est établie (équation (6-9)) puis utilisée pour corriger les profils Raman $f(z)$ obtenus sur des échantillons de peau (équation (6-10)). La fonction de correction est la même quel que soit l'échantillon de peau analysé. Ces travaux négligent donc les variations de propriétés optiques d'un échantillon à l'autre.

$$D(z) = 0,9997 \times e^{-z/15,7581} + (1 - 0,9997) \quad (6-9)$$

$$R(z) = f(z) + 1 - D(z) \quad (6-10)$$

En revanche, ces travaux indiquent qu'une constante superposée à une exponentielle décroissante intervient dans la description du phénomène. Cela rejoint nos observations, notamment sur le profil obtenu sur le fantôme le plus diffusant.

Stratégie 3 : Le modèle de réflectance confocale

Nous nous intéressons aux travaux de Jacques et Gareau sur la microscopie confocale en mode de réflectance (S. Jacques 2013, Gareau 2006), dite rCSLM pour "Reflectance-mode Scanning Laser Microscopy". Cette méthode utilise le même principe que la microspectroscopie Raman confocale mais en réglant le spectromètre de l'appareil de façon à laisser passer la longueur d'onde d'excitation laser λ_0 . Ainsi, le signal mesuré est la fraction de la radiation incidente rétrodiffusée par le tissu dans le volume focal (complété par quelques photons minoritaires ayant subi une diffusion multiple et qui, par hasard, atteignent le détecteur malgré la présence du trou confocal). Pour alléger le discours, nous nommerons cette mesure "réflectance confocale" dans la suite du document. Le signal mesuré est normalisé en unité de réflectance par rapport au signal pris sur une interface eau/verre de réflectivité connue.

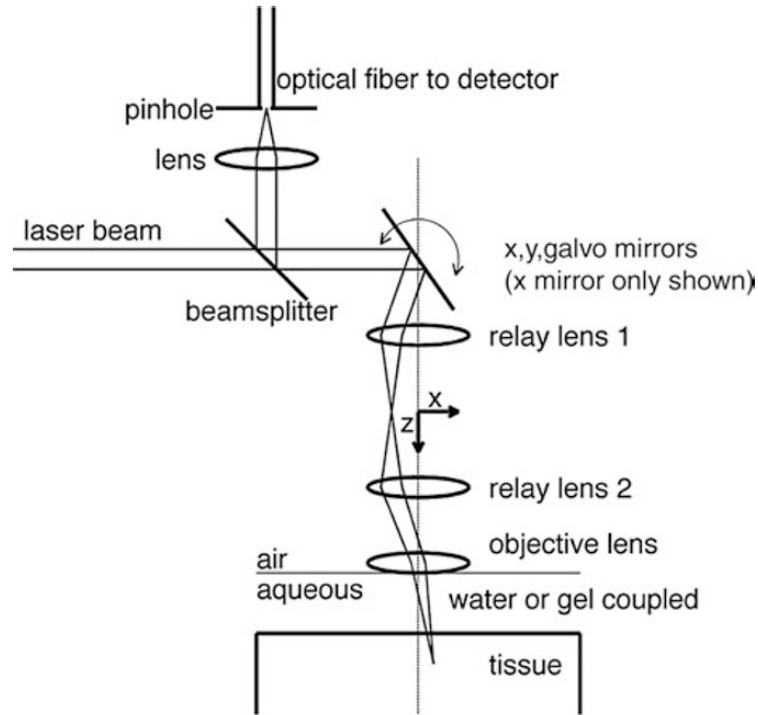


Figure 6-21 : Dispositif de Réflectance Conocale (S. Jacques 2013)

Pour réduire la réflexion spéculaire provenant de l'interface air/échantillon à son minimum, l'objectif est couplé optiquement au tissu par un liquide d'immersion (voir Figure 6-21), typiquement du sérum physiologique.

Pour relier cette mesure aux paramètres physiques, un certain nombre de grandeurs sont définies :

- T_{in} la fonction de transfert décrivant le trajet des photons depuis l'objectif vers le point focal dans le tissu;
- ρ la fraction des photons diffusés au point focal avec une trajectoire dirigée vers l'objectif;
- T_{out} la fonction de transfert décrivant le trajet des photons dans le tissu depuis le point focal et vers l'objectif.

Or, $T_{in} = T_{out}$ car la capacité d'un faisceau collimaté à être focalisé par une lentille d'objectif est la même que la capacité de photons diffusés au point focal d'une lentille d'objectif à être re-collimatés (principe du retour inverse de la lumière). La réflectance confocale est donc exprimée ainsi:

$$R(z^*) = \alpha T_{in}^2 = \alpha e^{-\beta z^*} \quad (6-11)$$

où

$$\beta = (a\mu_s + \mu_a)2G \approx 2Ga\mu_s \quad (6-12)$$

$$\alpha = \mu_s \times FWHM \times b \quad (6-13)$$

Dans la plupart des travaux utilisant cette méthode (Jacques, Wang et Samatham 2012, Samatham 2012), le rôle de μ_a est négligé.

a dépend de g le coefficient d'anisotropie: cette constante décrit la capacité des photons diffusés à être rétrodiffusés. $a \rightarrow 0$ lorsque $g = 1$ et que les photons sont majoritairement diffusés vers l'avant; à l'inverse, $a \approx 1$ lorsque la diffusion est anisotrope et que $g = 0$.

G dépend de NA l'ouverture numérique de l'objectif. Il tient compte des trajets d'illumination et de collection obliques qui augmentent le trajet optique moyen des photons pour atteindre le point focal.

b dépend de g et NA . Ce paramètre correspond à la fraction de lumière diffusée au volume focal qui atteint l'objectif.

En résumé, α traduit les phénomènes de diffusion ayant lieu au volume focal et β ceux ayant lieu entre l'objectif et le volume focal en sens aller et en sens retour.

Bien que ce modèle décrive la réflectance confocale sans changement de longueur d'onde au volume focal, il est intéressant pour notre problème puisqu'il introduit une dépendance aux propriétés optiques plus complexe que les modèles précédents. Et surtout, il tient compte des paramètres physiques de l'instrumentation tels que l'ouverture numérique de l'objectif et la résolution axiale du système. Nous verrons comment adapter ce modèle à notre problématique Raman dans le paragraphe suivant.

6.4.2 Modèles testés

Plusieurs modèles ont été testés pour modéliser les courbes d'intensité Raman présentées en Figure 6-17 en fonction de la profondeur et décrire au mieux leur décroissance. Ces modèles, sont inspirés de la littérature (voir paragraphe précédent) et de nos propres observations sur les profils expérimentaux.

En nous inspirant de la **stratégie 1**, nous testerons le modèle suivant :

$$R_1(\lambda_R, z^*) = \alpha_1(\lambda_R)e^{-\beta_1(\lambda_R)z^*} \quad (6-14)$$

Cependant, nous avons observé que les profils ne tendaient pas vers zéro quand z^* tend vers l'infini et ce résultat est cohérent avec le modèle utilisé en **stratégie 2**. Nous proposons donc de tester le modèle :

$$R_2(\lambda_R, z^*) = \alpha_2(\lambda_R)e^{-\beta_2(\lambda_R)z^*} + \gamma(\lambda_r) \quad (6-15)$$

Il superpose à une exponentielle décroissante une constante $\gamma(\lambda_r)$. Cela permet de tenir compte de l'intensité Raman détectée lorsque z^* est très grand. Elle est estimée sur le fantôme

le plus diffusant (μ'_{s4}) pour chaque bande spectrale d'intérêt. Nous supposons que, si la distance de travail de l'objectif utilisé le permettait, les courbes obtenues sur les fantômes moins diffusants tendraient vers cette même valeur. Nous avons calculé :

- $\gamma(680 - 720 \text{ cm}^{-1}) = 197,0$ pour les profils d'intensité Raman entre 680 et 720 cm^{-1} ;
- $\gamma(1380 - 1440 \text{ cm}^{-1}) = 149,4$ pour les profils d'intensité Raman entre 1380 et 1440 cm^{-1} ;
- $\gamma(2870 - 3000 \text{ cm}^{-1}) = 737,8$ pour les profils d'intensité Raman entre 2870 et 3000 cm^{-1} .

Nous cherchons maintenant, par analogie, à adapter le modèle décrit en **stratégie 3** à la microscopie Raman confocale. Cette technique est similaire à la réflectance confocale à quelques exceptions près.

Premièrement, un changement de longueur d'onde intervient au volume focal. Nous supposons donc que α ne dépend plus du coefficient de diffusion élastique μ_s mais de μ_{λ_R} , le coefficient de diffusion Raman proportionnel à la section efficace de diffusion Raman de l'échantillon à λ_R . On suppose donc la diffusion élastique négligeable devant la diffusion Raman au volume focal. De même, à cause de ce changement de longueur d'onde, β est théoriquement dépendant de $\mu_s(\lambda_0)$ et $\mu_s(\lambda_R)$. Nous tenterons de le déterminer.

Deuxièmement, en réflectance confocale, l'objectif de microscope est couplé optiquement aux échantillons via un liquide d'immersion. De cette manière, la réfraction à la surface de l'échantillon est faible et négligée. $FWHM$ est donc indépendante de z^* . Ce n'est pas le cas de notre système puisque nous utilisons un objectif à sec. C'est la raison pour laquelle deux autres modèles seront testés prenant en compte ce paramètre, soit calculé, soit expérimental :

$$R_{Comp}(\lambda_R, z^*) = \alpha_{Comp}(\lambda_R) \times FWHM_{Comp}(z^*) \times e^{-\beta_{Comp}(\lambda_R)z^*} \quad (6-16)$$

$$R_{Exp}(\lambda_R, z^*) = \alpha_{Exp}(\lambda_R) \times FWHM_{Exp}(z^*) \times e^{-\beta_{Exp}(\lambda_R)z^*} \quad (6-17)$$

Nous essayons aussi de superposer la constante $\gamma(\lambda_r)$ aux modèles inspirés de la réflectance confocale.

$$R_{Comp2}(\lambda_R, z^*) = \alpha_{Comp2}(\lambda_R) \times FWHM_{Comp}(z^*) \times e^{-\beta_{Comp2}(\lambda_R)z^*} + \gamma(\lambda_r) \quad (6-18)$$

$$R_{Exp2}(\lambda_R, z^*) = \alpha_{Exp2}(\lambda_R) \times FWHM_{Exp}(z^*) \times e^{-\beta_{Exp2}(\lambda_R)z^*} + \gamma(\lambda_r) \quad (6-19)$$

Finalement, ces modèles contiennent tous une exponentielle décroissante et tiennent compte, ou non, de l'évolution de la résolution axiale du système $FWHM$.

6.4.3 Investigations sur la dépendance aux propriétés optiques

Chacun des six modèles ((6-14) à (6-19)) comporte deux paramètres $\alpha_{modèle}$ et $\beta_{modèle}$.

Par analogie avec le modèle de réflectance confocale, le paramètre $\beta_{\text{modèle}}$ est potentiellement dépendant du coefficient d'absorption μ_a du milieu. Or $\mu_a \ll \mu_s$ dans notre étude et pour les tissus biologiques de façon générale. Nous supposons donc son rôle négligeable dans la décroissance de l'intensité Raman en milieu diffusant. Nous n'en tiendrons pas compte dans l'analyse des résultats. C'est d'autant plus vrai que l'épaisseur du milieu analysé est faible (la centaine de microns).

De plus, en réflectance confocale, les paramètres $\alpha_{\text{modèle}}$ et $\beta_{\text{modèle}}$ sont tous deux dépendants du coefficient d'anisotropie g . N'ayant pas caractérisé la valeur de cette propriété optique de nos fantômes, nous maintenons comme au Chapitre 4 l'hypothèse d'un coefficient g constant avec la concentration en TiO_2 des fantômes. Nous n'avons donc pas la possibilité d'étudier son influence sur la dégradation de la fonction de quantification.

Finalement, la dépendance des modèles testés aux propriétés optiques des fantômes se résume à l'étude de $\beta_{\text{modèle}}$ en fonction du coefficient de diffusion μ_s . Ce coefficient a été caractérisé au Chapitre 4 par Micro-DRS mais avec un *a priori* sur g . La DRS (Chapitre 3) et la Micro-DRS (Chapitre 4) ayant donné des valeurs très proches du coefficient de diffusion réduit sans *a priori*, nous préférons donc étudier l'évolution de $\beta_{\text{modèle}}$ en fonction de $\mu'_s = (1 - g)\mu_s$.

6.4.4 Résultats

Résultats d'ajustement

Pour ne pas surcharger le manuscrit, nous présentons uniquement les résultats obtenus sur la bande spectrale 2870-3000 cm^{-1} car les conclusions sont les mêmes sur les autres bandes spectrales.

Les modèles sont testés sur trois gammes de profondeurs afin d'étudier l'étendue axiale de la validité de ces modèles. Pour chaque gamme de profondeurs, nous présentons l'erreur d'ajustement obtenue sur chacun des modèles en pourcentage (Figure 6-22-d)e)f)) et ceci pour tous les fantômes. Nous affichons en Figure 6-22-a)b)c) un exemple de résultat d'ajustement sur le fantôme de coefficient de diffusion réduit μ'_{s3} .

Remarque 1

Quelle que soit la gamme de profondeurs considérée pour effectuer l'estimation des paramètres $\alpha_{\text{modèle}}$ et $\beta_{\text{modèle}}$, les modèles R_{Comp} , R_{Exp} , $R_{\text{Comp}2}$ et $R_{\text{Exp}2}$ sont ceux dont l'erreur d'ajustement est la plus grande. Il semble que ces modèles, tenant compte de l'évolution de la résolution axiale avec la profondeur, ne soient pas les plus adaptés pour décrire la décroissance de l'intensité Raman en milieux diffusants. Ou bien l'évolution de la résolution axiale doit être prise en compte différemment dans ces modèles, ou bien l'estimation de $FWHM_{\text{Comp}}(z^*)$ et $FWHM_{\text{Exp}}(z^*)$ effectuée en milieu non diffusant est erronée.

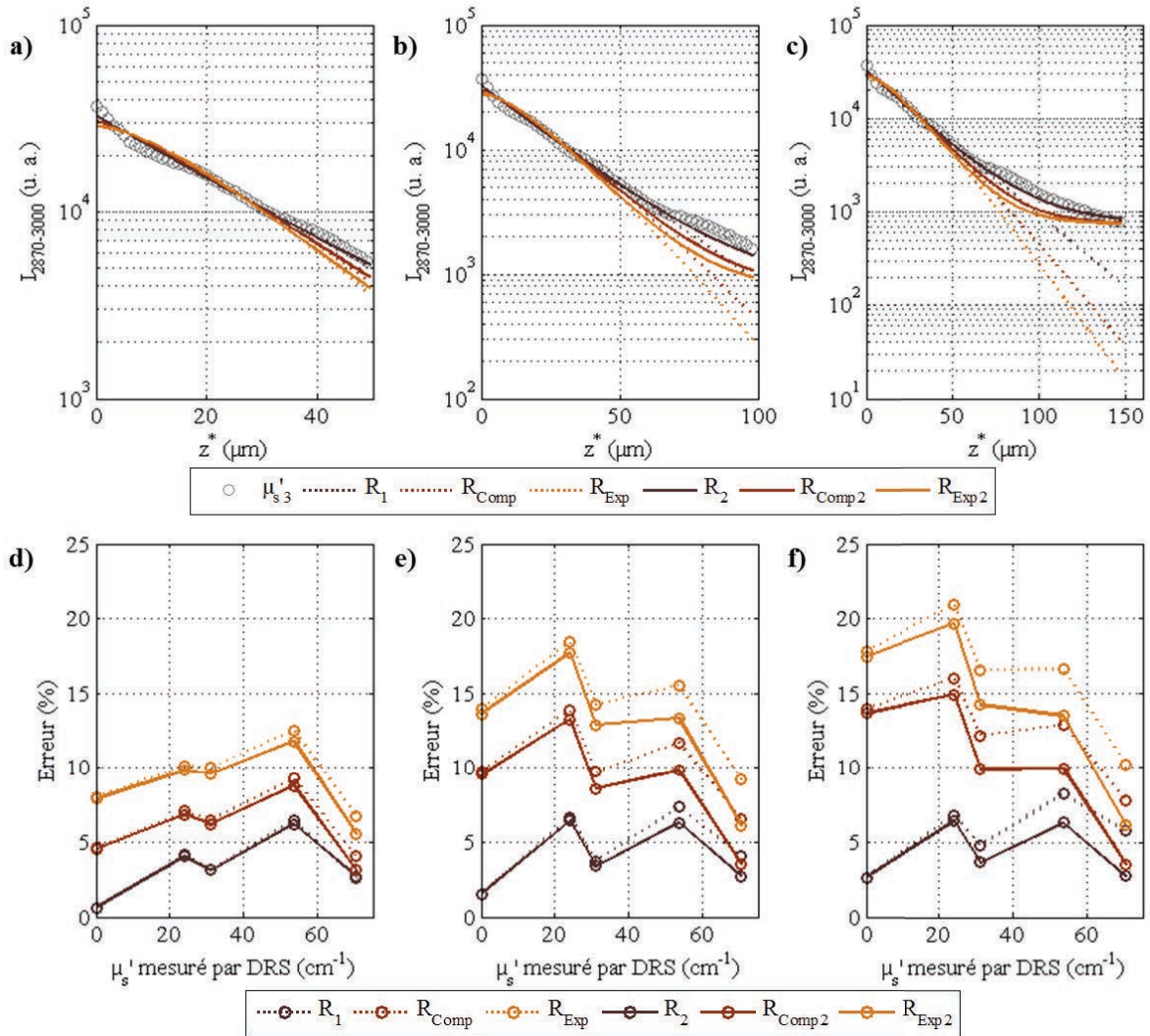


Figure 6-22 : Résultats d'ajustement des différents modèles testés sur le fantôme μ'_{s3} sur la bande spectrale $2870-3000 \text{ cm}^{-1}$ pour différents intervalles de profondeur : (a) $0 < z^* < 50 \text{ }\mu\text{m}$ (b) $0 < z^* < 100 \text{ }\mu\text{m}$ (c) $0 < z^* < 150 \text{ }\mu\text{m}$ et les erreurs de fit associées (d, e, f) pour les cinq fantômes sur la même bande spectrale

Remarque 2

Pour la gamme de profondeurs allant de 0 à $50 \text{ }\mu\text{m}$, les modèles R_1 et R_2 sont équivalents en terme d'erreur. On note d'ailleurs que celle-ci est faible (environ 5%) quel que soit le fantôme, indiquant que ces modèles sont adaptés pour décrire la décroissance de l'intensité Raman sur cette zone peu profonde.

Cependant, on observe que l'erreur calculée reste stable pour R_2 lorsque la profondeur sondée augmente, alors que l'erreur du modèle R_1 augmente progressivement. Cela s'explique par la prise en compte de la constante $\gamma(\lambda_r)$. En effet, les Figure 6-22-e) et f) indiquent que si l'estimation est faite au-delà de $50 \text{ }\mu\text{m}$ de profondeur, le modèle R_1 ne suit plus le profil mesuré I_{σ_R} , alors que R_2 reste adapté.

Nous sélectionnons donc le modèle R_2 qui semble le plus adapté pour étudier l'influence du coefficient de diffusion sur la décroissance de l'intensité Raman avec la profondeur.

Dans ce modèle, $\alpha_2(\lambda_R) + \gamma(\lambda_r)$ correspond à l'intensité Raman $I_{\sigma_R}(z^* = 0)$ mesurée en surface des échantillons. La constante (λ_r), déterminée pour chaque bande spectrale d'intérêt sur le fantôme le plus diffusant, dépend logiquement de la composition de l'échantillon lorsque $z^* \rightarrow \infty$. Dans notre étude, les fantômes sont homogènes donc $I_{\sigma_R}(z^* \rightarrow \infty)$ est censé être proportionnel à $I_{\sigma_R}(z^* = 0)$. Ceci est vérifié en Figure 6-23 avec une régression linéaire effectuée sur la moyenne de $I_{\sigma_R}(z^* = 0)$ des cinq fantômes.

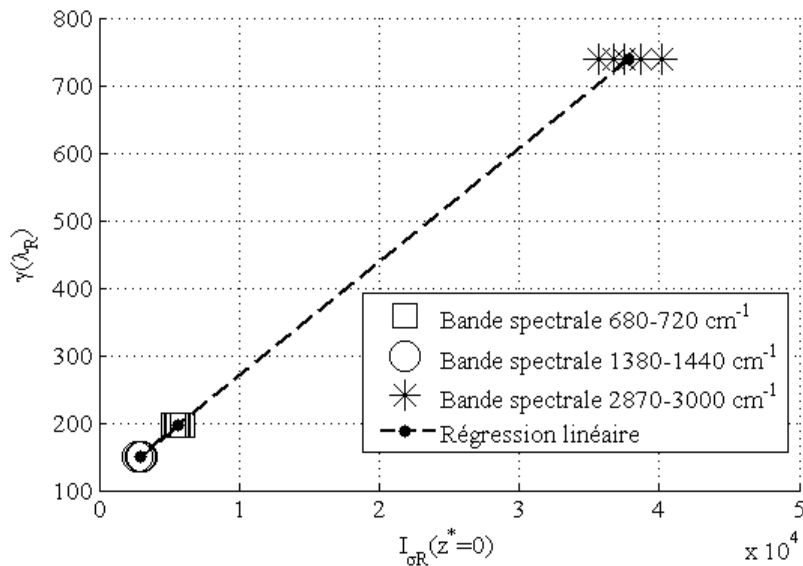


Figure 6-23 : Constante $\gamma(\lambda_r)$ en fonction de $I_{\sigma_R}(z^* = 0)$

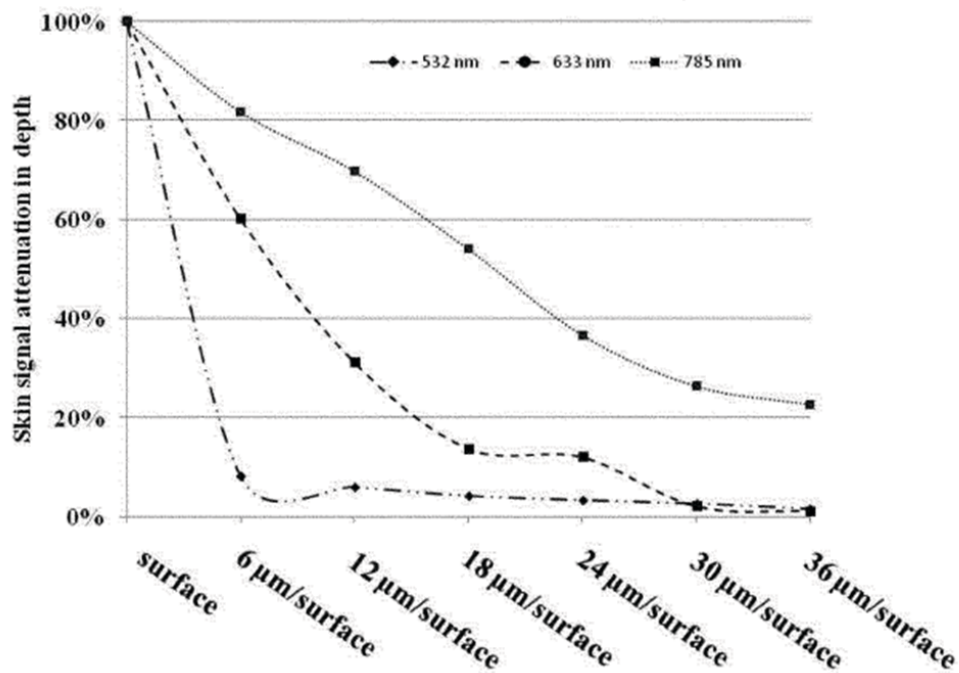


Figure 6-24 : Atténuation du signal Raman observée sur peau de cochon pour trois excitations laser différentes (Tfaily, Josse et Gobinet, et al. 2012)

La constante $\gamma(\lambda_r)$ doit donc être évaluée pour chaque échantillon analysé. Cela est possible si la distance de travail de l'objectif utilisé est suffisante pour atteindre cette valeur seuil sur l'échantillon en question.

Dans le cas d'un échantillon de peau, ceci sera possible avec le système tel que nous l'utilisons aujourd'hui. En effet, une étude (Tfaily, Josse et Gobinet, et al. 2012) réalisée avec un système confocal de résolution axiale inférieure à 3 μm (équivalente à la nôtre) montre la décroissance de l'intensité Raman à 1450 cm^{-1} acquise sur une peau de cochon pour trois longueurs d'onde différentes (Figure 6-24). L'atténuation est très prononcée : on peut estimer la valeur seuil atteinte à $z=36 \mu\text{m}$ pour $\lambda_0=532 \text{ nm}$ et $\lambda_0=633 \text{ nm}$, et qu'elle sera atteinte aux alentours de $z=60 \mu\text{m}$ pour $\lambda_0=785 \text{ nm}$.

Influence de la diffusion élastique via le paramètre β_2

Le paramètre β_2 , coefficient de l'exponentielle décroissante du modèle R_2 , est affiché en fonction de $\mu'_s(532 \text{ nm})$ mesuré par DRS en Figure 6-25 pour les trois bandes spectrales étudiées.

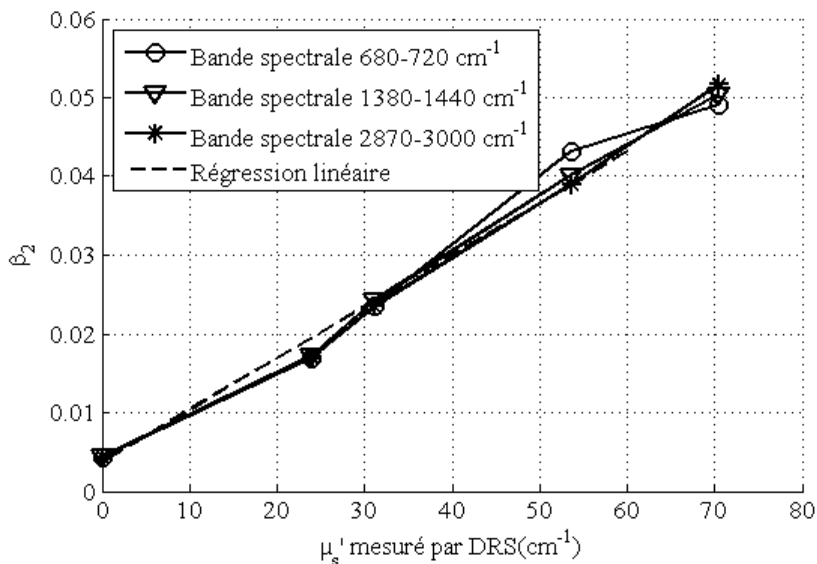


Figure 6-25 : Régression linéaire de la constante β en fonction de $\mu'_s(532 \text{ nm})$ pour différentes raies Raman d'intérêt

En théorie, le coefficient β_2 devrait dépendre de $\mu'_s(\lambda_0)$ et de $\mu'_s(\lambda_R)$. En effet, le parcours des photons est affecté par le niveau de diffusion à λ_0 sur leur trajet de la surface vers le volume focal, et par le niveau de diffusion à λ_R sur le trajet du volume focal vers la surface. Or, d'après l'équation (6-20) et le Tableau 6-3, la différence entre $\mu'_s(\lambda_0)$ et $\mu'_s(\lambda_R)$ est faible d'une extrémité à l'autre du spectre Raman acquis.

$$\mu'_s(\lambda_R) - \mu'_s(\lambda_0) = \delta\mu'_s(\lambda_R) \quad (6-20)$$

Fantômes	μ'_{s1}	μ'_{s2}	μ'_{s3}	μ'_{s4}
$\mu'_s(\lambda_0 = 532 \text{ nm})$ en cm^{-1}	24,0	31,1	53,6	70,5
$\delta\mu'_s(\lambda_R = 641 \text{ nm})$ en cm^{-1}	-4,3	-5,4	-7,6	-9,3

Tableau 6-3 : Différences de coefficient de diffusion réduit entre $\lambda_0=532 \text{ nm}$ et $\lambda_R=641 \text{ nm}$ (extrémité du spectre Raman acquis) sur chaque fantôme diffusant

D'après la Figure 6-25, notre instrumentation semble ne pas y être sensible. En effet, on ne détecte pas de tendance décroissante de β_2 avec la longueur d'onde de la raie Raman observée. Physiquement, cela signifie que l'intensité Raman générée et détectée à une profondeur z^* est déterminée de façon prépondérante par le transport T_{in} des photons d'excitation, et que le système n'est pas assez sensible pour détecter les variations dans le transport T_{out} des photons dues au décalage de longueur d'onde. Nous avons donc choisi d'exprimer β_2 en fonction de $\mu'_s(\lambda_0)$ et de négliger $\delta\mu'_s(\lambda_R)$ mais ce coefficient pourrait être pris en compte avec un système Raman plus sensible.

Nous recherchons donc maintenant la loi donnant β_2 en fonction de $\mu'_s(\lambda_0)$ dans cette configuration instrumentale. La régression linéaire affichée en Figure 6-25 est effectuée sur les trois réalisations de β_2 c'est-à-dire que les trois bandes spectrales d'intérêt sont prises en compte dans cette estimation. Cependant, chaque réalisation de β_2 est pondérée par l'erreur d'ajustement *Erreur* du profil $I_{\sigma_R}(z^*)$ correspondant. Pour cela, l'expression suivante est minimisée :

$$\text{Norme}(\beta_2 - (\eta \times \mu'_s(\lambda_0) + \varepsilon), \frac{1}{\text{Erreur}}) / \text{Norme}(\beta_2, \frac{1}{\text{Erreur}}) \quad (6-21)$$

où

$$\text{Norme}(X, W) = \sqrt{\sum w_i x_i^2} \quad (6-22)$$

Nous obtenons $\eta = 8,12 \times 10^{-4}$ et $\varepsilon = 0,0034$ soit :

$$\beta_2(\lambda_0, \lambda_R) = 0,0038 + 6,56 \times 10^{-4} \times \mu'_s(\lambda_0) \quad (6-23)$$

6.5 Proposition d'un protocole de correction des spectres

En tenant compte des résultats précédents, nous pouvons proposer un protocole permettant de corriger les spectres Raman profonds des biais liés à la diffusion élastique. Cette correction est applicable pour des spectres obtenus sur un échantillon quelconque, avec un système confocal quelconque.

6.5.1 Protocole

Supposons que le système Raman confocal soit dans une configuration donnée (ouverture numérique de l'objectif de microscope NA , distance de travail de l'objectif WD , trou confocal de dimension Φ , longueur d'onde d'excitation λ_0). Alors le protocole de mesures et de traitement affiché en Figure 6-26 peut être suivi pour mener à la correction des spectres Raman.

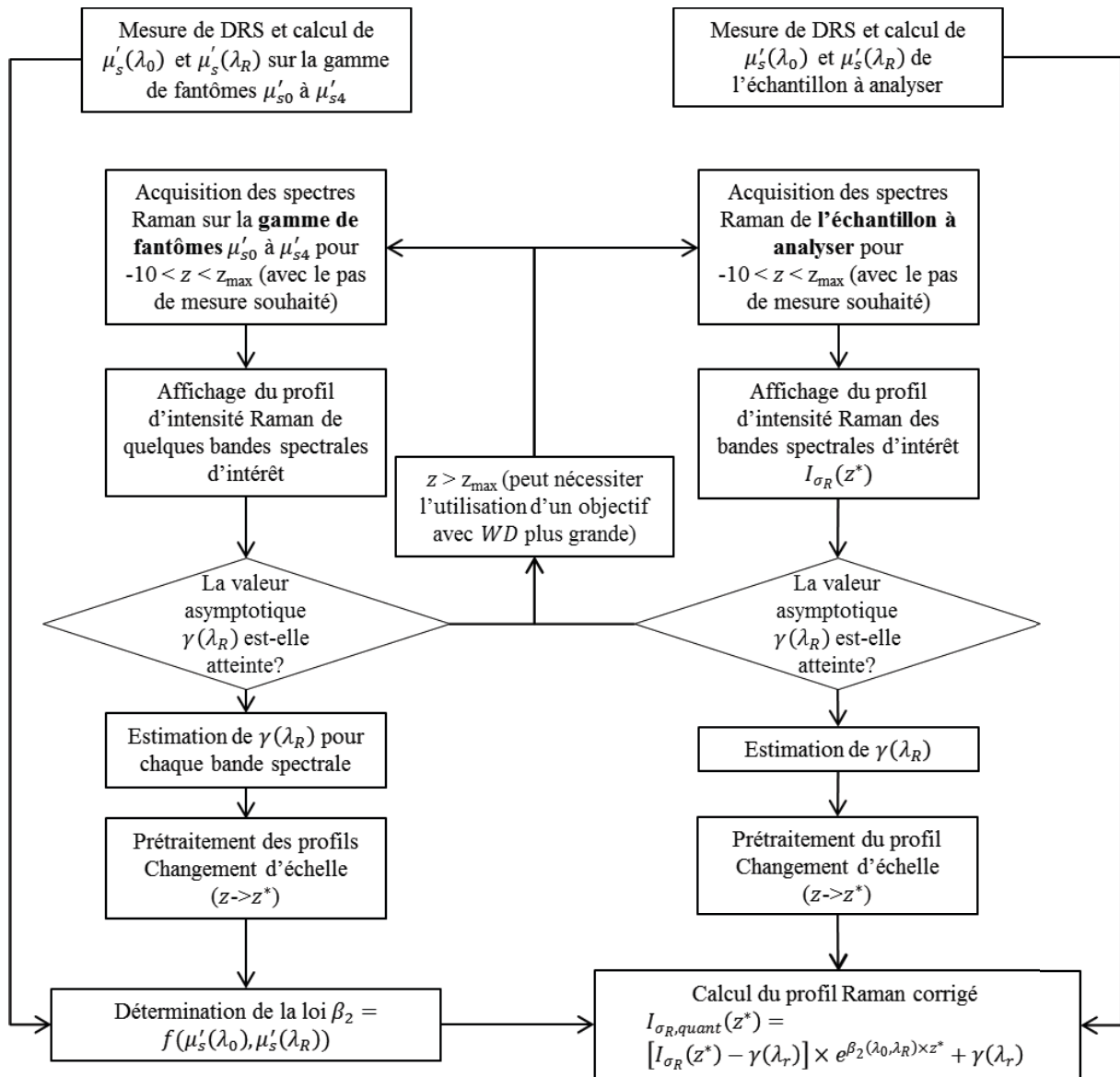


Figure 6-26 : Proposition d'un protocole de correction des spectres Raman

Dans ce protocole, on appelle $I_{\sigma_R,quant}$ la mesure Raman quantitative, corrigée du phénomène de diffusion élastique, au nombre d'onde σ_R . Elle est calculée en supposant que, pour un fantôme homogène en composition chimique et propriété optique, sa valeur est uniforme dans le fantôme et vaut $I_{\sigma_R}(z^* = 0)$.

$$I_{\sigma_R,quant}(z^*) = [I_{\sigma_R}(z^*) - \gamma(\lambda_r)] \times e^{\beta_2(\lambda_0, \lambda_R) \times z^*} + \gamma(\lambda_r) \quad (6-24)$$

6.5.2 Exemples de spectres corrigés

Nous affichons dans la Figure 6-27 à gauche un ensemble de spectres bruts acquis sur les différents fantômes pour $0 < z^* < 75 \mu\text{m}$ avec un pas de $15 \mu\text{m}$ entre 2800 et 3050 cm^{-1} . A droite sont affichés les résultats de correction de ces spectres en suivant le protocole décrit en Figure 6-26 associé à la loi (6-23).

Quel que soit le fantôme, les spectres acquis à différentes profondeurs sont nettement moins dispersés après correction et tendent à rejoindre la valeur du spectre superficiel.

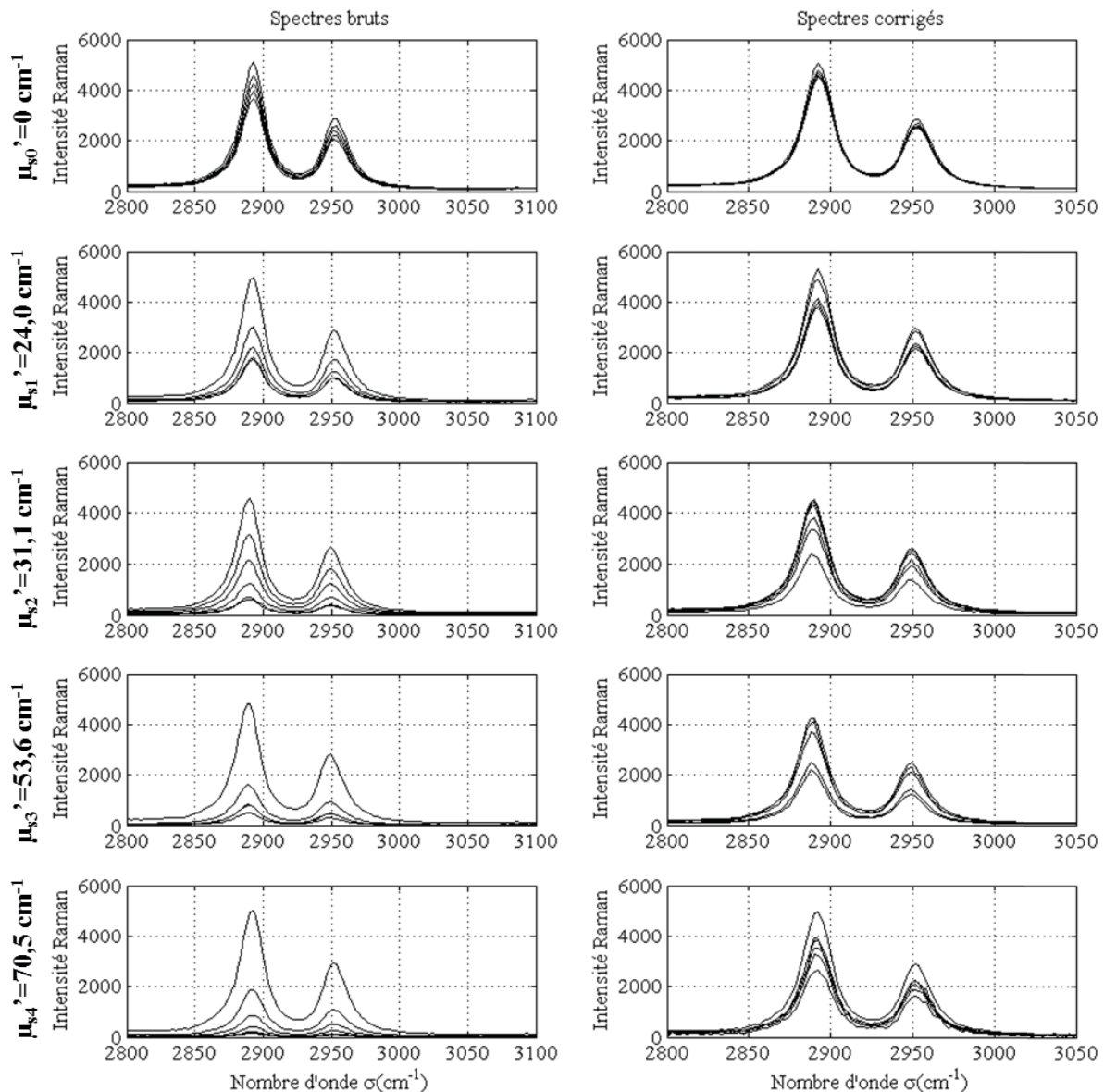


Figure 6-27 : Spectres Raman bruts (à droite) acquis entre 2800 et 3050 cm^{-1} sur les cinq fantômes de l'étude et ces mêmes spectres corrigés de la diffusion (à gauche)

6.6 Résumé

Dans ce chapitre, les profils Raman obtenus sur des échantillons aux coefficients de diffusion variés et estimés par la DRS ont été présentés. Nous avons mis en évidence l'effet de la diffusion élastique sur les spectres profonds acquis avec un système confocal.

L'évolution de la résolution axiale de cet instrument ainsi que la compression de l'échelle axiale au sein de nos échantillons a été évaluée. Elle sera similaire dans la peau puisque celle-ci possède un indice de réfraction proche de celui du PDMS. Ceci nous a permis d'établir un

protocole de prétraitement des profils, préalable à la correction des spectres Raman du phénomène de diffusion élastique.

Un modèle reliant les profils expérimentaux au niveau de diffusion des fantômes a été choisi. Il est ensuite utilisé dans le protocole proposé et testé pour corriger les spectres Raman profonds acquis sur la peau.

Chapitre 7 : La peau, un milieu stratifié

Ce chapitre prospectif porte sur la caractérisation multicouche de la peau. Nous mettons en avant la prise en compte de son caractère stratifié au travers de résultats préliminaires obtenus en spectroscopie Raman et en DRS. Dans un premier temps, nous présentons des résultats obtenus sur fantômes multicouches, ces résultats, en cohérence avec ceux obtenus sur fantômes homogènes (citer le chapitre) montrent tout l'intérêt de raisonner en couches. Dans un deuxième temps, nous présentons quelques résultats préliminaires obtenus sur la peau offrant des perspectives d'étude à ces travaux.

7.1 Profils Raman de fantômes multicouches

Dans cette partie seront présentés les matériels et méthodes puis les résultats obtenus dans l'acquisition de profils Raman sur des objets multicouches simulant la peau, fantômes dont le procédé de fabrication a été explicité au Chapitre 2.

7.1.1 Matériels et méthodes

Fantômes

Les profils Raman sont acquis sur les fantômes tricouches F et G présentés au Chapitre 2. Pour rappel, leurs propriétés optiques et dimensionnelles visées étaient les suivantes :

	Couche 1, $e \geq 2 \text{ mm}$		Couche 2, $e \cong 80 \text{ }\mu\text{m}$		Couche 3, $e \cong 20 \text{ }\mu\text{m}$	
Nom	μ'_s	μ_a	μ'_s	μ_a	μ'_s	μ_a
F	μ'_{s1}	μ_{a1B}	μ'_{s2}	μ_{a2N}	μ'_{s3}	μ_{a0}
G	μ'_{s1}	μ_{a1B}	μ'_{s2}	μ_{a2N}	μ'_{s4}	μ_{a0}

Tableau 7-1 : Tableau descriptif des propriétés optiques des fantômes tricouches F et G

Les couches 1 (mimant le derme) et 2 (mimant l'épiderme viable) de ces deux fantômes ont les mêmes propriétés optiques. Ils diffèrent uniquement par le niveau de diffusion de la couche 3 (couche superficielle mimant la couche cornée); le fantôme F ayant une couche cornée moins diffusante que le G.

Dans cette étude nous nous intéressons à l'effet de la diffusion des différentes couches sur le profil Raman global. On rappelle qu'au Chapitre 3 nous avons mesuré :

- $\mu'_{s1}(532 \text{ nm}) = 24,0 \text{ cm}^{-1}$;
- $\mu'_{s2}(532 \text{ nm}) = 31,1 \text{ cm}^{-1}$;
- $\mu'_{s3}(532 \text{ nm}) = 53,6 \text{ cm}^{-1}$;
- $\mu'_{s4}(532 \text{ nm}) = 70,5 \text{ cm}^{-1}$.

Protocole de mesure

L'instrumentation et le protocole de mesure sont quasi-identiques à ceux décrits aux paragraphes 6.1.1 et 6.1.2 du Chapitre 6. Le premier changement concerne la géométrie des

fantômes. Ici, chaque fantôme possède trois zones distinctes : une couche, deux couches ou trois couches. Ces trois zones seront désignées comme trois "positions" (1, 2 et 3) d'acquisition (voir Figure 7-1). La deuxième évolution concerne le nombre de points de mesure. Pour une "position" donnée, 11 profils d'intensité Raman sont mesurés en 11 points (x, y) différents et séparés de 10 μm chacun, tel qu'expliqué au paragraphe 6.1.2.

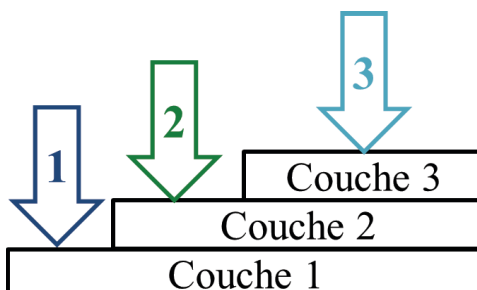


Figure 7-1 : Positions des points d'acquisition

Prétraitement des profils

Les profils obtenus sont prétraités en suivant les étapes successives du paragraphe 6.3.4 : ils sont lissés par ACP puis l'échelle axiale est convertie. Les inerties des composantes principales sont affichées dans le Tableau 7-2. Elles sont supérieures à 97%, indiquant que les profils lissés obtenus sont représentatifs des 11 profils mesurés.

Bande spectrale (cm^{-1})	680-720	1380-1440	2870-3000
Position 1 – Fantôme G	98,46%	97,61%	98,20%
Position 2 – Fantôme F	99,08%	98,74%	98,89%
Position 2 – Fantôme G	98,37%	98,17%	98,22%
Position 3 – Fantôme F	98,99%	98,64%	98,97%
Position 3 – Fantôme G	98,10%	97,66%	97,87%

Tableau 7-2 : Inerties des composantes principales obtenues en chaque position des fantômes tricouches en pourcentage.

7.1.2 Résultats

Nous présentons en Figure 7-2 les profils obtenus sur la bande spectrale 2870-3000 cm^{-1} aux différentes positions d'acquisition. La position 1 présentant les mêmes caractéristiques pour les fantômes F et G, nous n'affichons que le profil obtenu sur le fantôme G (celui obtenu sur le fantôme F est identique). La position 2 présente les mêmes caractéristiques optiques pour les fantômes F et G. Cependant, l'épaisseur de la couche 2 peut légèrement différer entre les deux fantômes. C'est pourquoi les profils acquis en position 2 sont affichés de façon dissociée

pour les deux fantômes. Enfin, les profils obtenus en position 3 sont affichés : nous observons ainsi l'effet de la variation du coefficient de diffusion réduit de la couche 3.

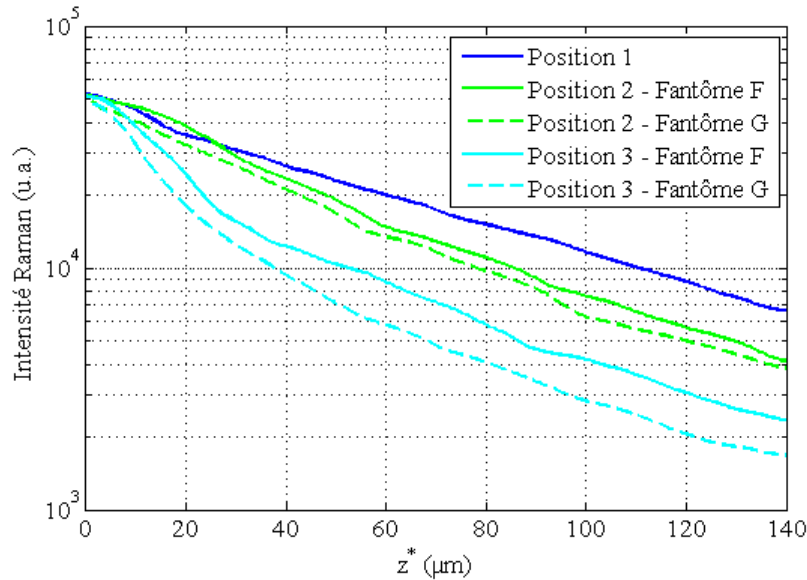


Figure 7-2 : Profils Raman obtenus après prétraitement à $2870\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ sur les fantômes tricouches F et G aux positions d'acquisition 1, 2 et 3.

Effet du niveau de diffusion de la première couche

En Figure 7-3, nous symbolisons les pentes de ces courbes (en échelle semi-logarithmique) en $z^*=0\text{ }\mu\text{m}$ par des droites en pointillés pour faciliter l'interprétation de ces profils. Sur les premiers microns sondés, la pente des profils dépend comme attendu du niveau de diffusion de la première couche traversée. En effet, les deux profils acquis en position 2 démarrent avec la même pente. Cette pente correspondant à $\mu'_{s2}(532\text{ nm}) = 31,1\text{ cm}^{-1}$ est plus prononcée que la pente du profil acquis en position 1 correspondant à $\mu'_{s1}(532\text{ nm}) = 24,0\text{ cm}^{-1}$. Les pentes observées en positions 3-F et 3-G augmentent aussi avec le niveau de diffusion de la couche 3 : le profil acquis sur le fantôme F dont le niveau de diffusion de la couche 3 est $\mu'_{s3}(532\text{ nm}) = 53,6\text{ cm}^{-1}$ présente une pente moins importante que le profil acquis sur le fantôme G dont le niveau de diffusion de la couche 3 est $\mu'_{s4}(532\text{ nm}) = 70,5\text{ cm}^{-1}$.

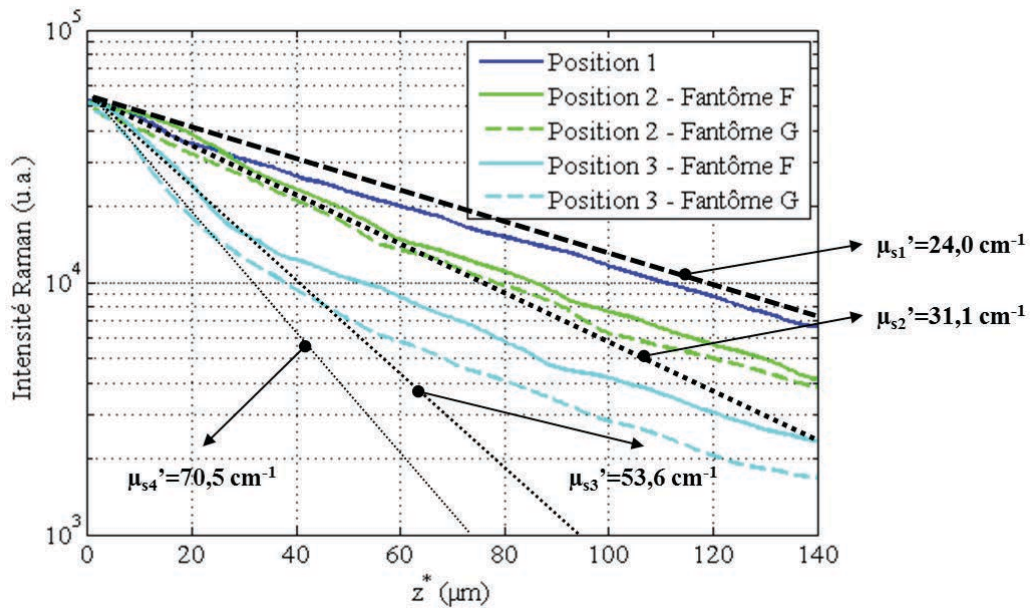


Figure 7-3 : Profils Raman obtenus après prétraitement à $2870\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ sur les fantômes tricouches F et G aux positions d'acquisition 1, 2 et 3. Les pentes en $z^*=0\text{ }\mu\text{m}$ sont symbolisées par des droites en pointillés.

Effet du niveau de diffusion des couches suivantes

En Figure 7-4, nous symbolisons par des droites en pointillés les changements de pente observables sur les profils complets. Les styles et épaisseurs de trait ainsi que la pente de ces droites correspondent aux niveaux de diffusion décrits en Figure 7-3.

Quel que soit le fantôme, le profil acquis en position 2 présente une rupture de pente en échelle semi-logarithmique située entre 60 et $80\text{ }\mu\text{m}$ de profondeur selon le fantôme. Physiquement, cette position d'acquisition correspond à une première couche diffusante telle que $\mu'_{s2}(532\text{ nm}) = 31,1\text{ cm}^{-1}$ sur environ $80\text{ }\mu\text{m}$ (couche 2) et la couche plus profonde possède un coefficient de diffusion réduit $\mu'_{s1}(532\text{ nm}) = 24,0\text{ cm}^{-1}$ identique à la position 1 (couche 1). Ceci vient donc conforter l'observation associée.

D'autre part, quel que soit le fantôme, le profil acquis en position 3 présente deux ruptures de pente en échelle semi-logarithmique : la première située entre 20 et $30\text{ }\mu\text{m}$ de profondeur dont la pente est parallèle à la pente acquise en position 2 pour $\mu'_{s2}(532\text{ nm}) = 31,1\text{ cm}^{-1}$; la deuxième située entre 70 et $90\text{ }\mu\text{m}$ de profondeur dont la pente est parallèle à la pente acquise en position 2 pour $\mu'_{s1}(532\text{ nm}) = 24,0\text{ cm}^{-1}$. Or, à cette position d'acquisition, l'épaisseur visée pour la couche superficielle par le procédé de fabrication était d'une vingtaine de microns et de $80\text{ }\mu\text{m}$ pour la couche 2. Ces observations concordent donc avec les propriétés physiques ciblées au Chapitre 2 et avec les propriétés optiques physiques des couches.

Il semblerait donc que la résolution axiale du système soit suffisante pour détecter les changements de régime de diffusion élastique entre les couches sondées. La microspectroscopie Raman peut donc être utilisée comme une méthode de caractérisation des fantômes permettant de mesurer les épaisseurs des couches déposées.

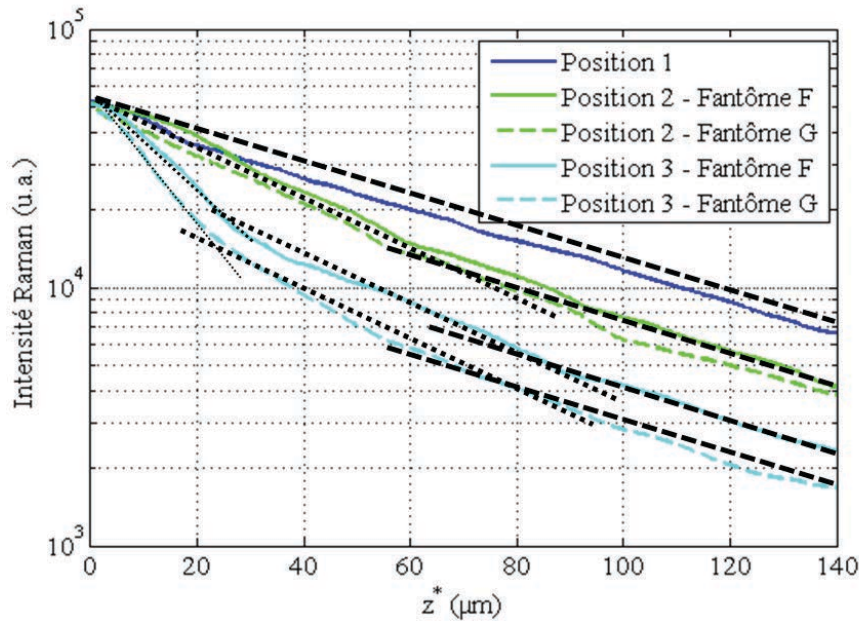


Figure 7-4 : Profils Raman obtenus après prétraitement à $2870-3000\text{ cm}^{-1}$ sur les fantômes tricouches F et G aux positions d'acquisition 1, 2 et 3. Les changements de pentes des profils sont symbolisés par des droites en pointillés.

7.1.3 Perspectives

Ces résultats expérimentaux orientent le travail vers un modèle de correction des signaux Raman multicouche et à minima bicouche pour distinguer la couche cornée du reste de l'épiderme. Ceci ne sera évidemment possible que si la méthode de DRS est modifiée pour donner μ'_s de façon distincte sur ces deux couches. Les prémices de cette approche sont présentées au paragraphe suivant.

7.2 Sectionnement en profondeur des propriétés optiques obtenues par DRS

Dans cette partie, une proposition d'évolution de la méthode de traitement des signaux de DRS est présentée pour orienter la détermination des propriétés optiques de la peau de manière stratifiée. Quelques résultats préliminaires sont exposés.

7.2.1 Méthode

Pour cette première proposition d'évolution, l'objectif est d'améliorer la quantification du coefficient d'absorption en profondeur en éliminant l'influence de l'absorption des couches supérieures. Pour la peau, on souhaite par exemple obtenir le spectre d'absorption du derme (oxy- et deoxy-hémoglobine) non parasité par l'absorption de l'épiderme (mélanine).

Pour cela, l'idée est de modifier les distances source-détecteur utilisées dans l'algorithme de minimisation pour le calcul des propriétés optiques (paragraphe 3.1.3) et notamment l'étape 2 qui consiste à extraire μ_a . La méthode standard utilise les signaux rétrodiffusés collectés par les fibres 2 à 6 dans l'algorithme de minimisation pour obtenir μ_a de façon macroscopique sur toute l'épaisseur de peau sondée (Figure 7-5).

De façon simplifiée, les trajectoires les plus probables empruntées par les photons entre une fibre d'illumination et une fibre de collection sont schématisées par une "banane". Les couches du derme et de l'épiderme sont représentées à l'échelle, d'après les résultats de simulation des trajectoires obtenus au paragraphe 3.1.2. On observe qu'au fur et à mesure que la distance source-détecteur augmente, la distance parcourue par les photons dans le derme augmente alors que la distance parcourue par les photons dans l'épiderme varie très peu. Ceci signifie que pour les distances source-détecteur les plus grandes, le signal rétrodiffusé porte majoritairement l'information du derme.

Pour diminuer l'influence de l'épiderme dans la quantification des propriétés d'absorption en profondeur, l'évolution proposée consiste donc à n'utiliser que les signaux collectés par les fibres 4 à 6 dans l'algorithme de minimisation de l'étape 2 (Figure 7-6).

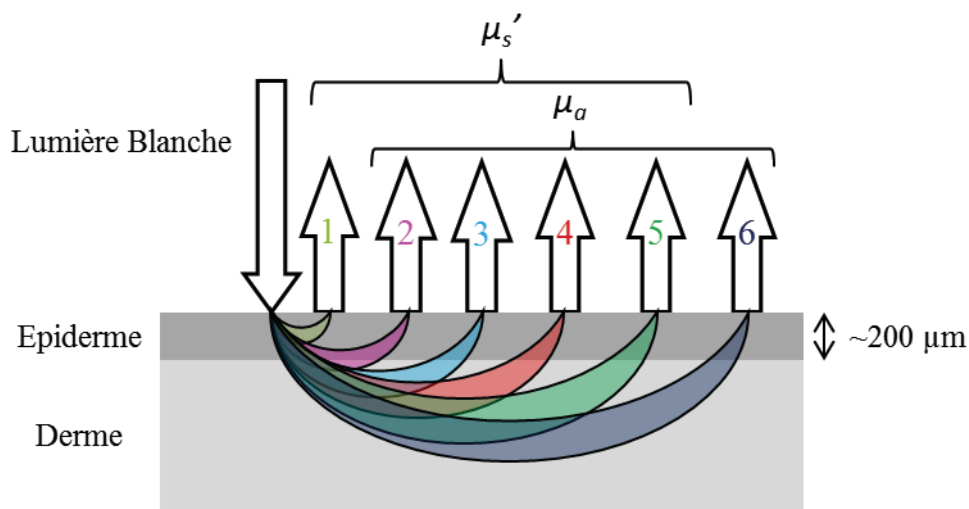


Figure 7-5 : Vue schématique des profondeurs sondées par chacune des six distances source-détecteur de la sonde DRS. Pour la méthode de traitement standard, μ_a est calculé en utilisant les signaux rétrodiffusés détectés sur les fibres 2 à 6.

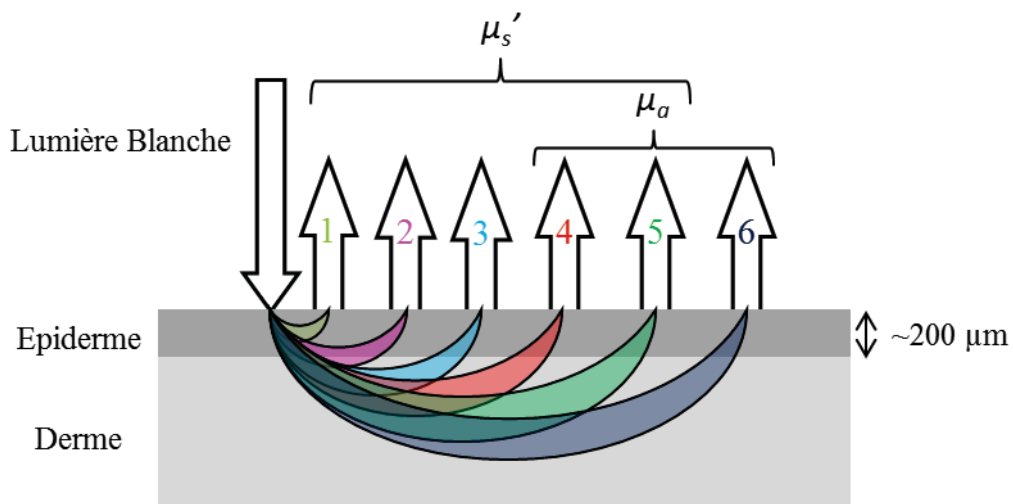


Figure 7-6 : Vue schématique des profondeurs sondées par chacune des six distances source-détecteur de la sonde DRS. L'évolution proposée consiste à calculer μ_a en utilisant les signaux rétrodiffusés détectés sur les fibres 4 à 6.

7.2.2 Résultats

J'ai mis en œuvre cette méthode sur les fantômes multicouches développés au Chapitre 2 dont, on le rappelle, l'épaisseur d'épiderme visée était d'une centaine de microns. Le colorant utilisé dans l'épiderme est de l'encre noire et celui utilisé dans le derme est un colorant bleu. La structure des fantômes (voir Figure 7-1) a permis d'effectuer les acquisitions sur le derme seul et sur les zones derme + épiderme pour comparaison. L'utilisation de cette méthode fournit un spectre d'absorption dont la contribution du spectre de l'encre noire est affaiblie par rapport à la méthode standard en position 3. Une étude complémentaire serait nécessaire pour quantifier l'apport de la méthode, mais ces résultats préliminaires ont permis de valider l'approche.

C'est ainsi que cette méthode a ensuite été appliquée sur des acquisitions *in vivo* réalisées sur des volontaires atteints de rosacée. Elle a permis de révéler des différences d'absorption en profondeur entre zones saines et zones rouges pour les pathologies aussi bien légères que sévères. L'intérêt de cette méthode serait alors de pouvoir diagnostiquer la pathologie sans signes visibles en surface.

La description de ces études ainsi que leurs résultats ont fait l'objet d'une communication orale accompagnée d'un *proceedings* à la conférence ECBO 2015 (voir Annexe 3).

7.2.3 Perspectives

Ce type de sectionnement du calcul des propriétés optiques peut aussi être appliqué au calcul du spectre de diffusion et généralisé à l'algorithme de traitement de la Micro-DRS.

D'un point de vue applicatif, le modèle de correction des spectres Raman pourra alors être décomposé en 2 ou 3 couches pour affiner la quantification en profondeur des composés biochimiques de la peau.

Conclusions et Perspectives

Afin de mieux comprendre les phénomènes d'interaction lumière-matière dans le cadre de la microspectroscopie Raman et de la DRS, un protocole de fabrication de fantômes solides aux propriétés d'absorption et de diffusion ajustables a été défini. Ce protocole comprend la constitution d'objets multicouches aux propriétés optiques différenciées couche par couche pour être au plus près des caractéristiques de la peau.

Grâce à ces fantômes, nous avons pu proposer un protocole de correction des spectres Raman permettant de mieux estimer la profondeur sondée, en supposant le milieu transparent dans une première approche, et permettant d'éliminer l'effet de la diffusion élastique sur l'intensité des spectres.

Pour pouvoir utiliser ce protocole dans la correction des spectres Raman acquis sur la peau, une configuration instrumentale de Micro-DRS a été développée. La finalité de ce travail de thèse est de disposer d'un instrument couplant Micro-DRS et microspectroscopie Raman pour obtenir l'information bimodale en une acquisition. La configuration optique de l'instrumentation de Micro-DRS a été imaginée pour permettre ce couplage puisqu'elle peut associer la sonde utilisée en routine au LISA à un microscope ou à une sonde Raman confocale utilisable *in vivo*. Contrairement à la DRS standard, la Micro-DRS rend possible la séparation des coefficients μ_a , μ_s et g .

Enfin, ces travaux ont débouché sur des résultats préliminaires tenant compte du caractère stratifié de la peau. L'effet de la variation du niveau de diffusion dans un fantôme multicouche a été observé en spectroscopie Raman confocale. De plus, nous avons proposé d'orienter la DRS vers l'extraction des propriétés optiques couche par couche. En conservant notre instrumentation standard, les propriétés d'absorption du derme ont été isolées des propriétés d'absorption du volume total sondé couvrant à la fois derme et épiderme grâce à une adaptation de la méthode de traitement.

Perspectives

Les perspectives qui s'ouvrent après ces travaux de thèse portent sur l'amélioration des algorithmes de traitement de la DRS et de la Micro-DRS, sur l'amélioration de la méthode de correction des spectres Raman, mais aussi sur l'application clinique de ces méthodes.

Nous avons étudié la résolution axiale du système confocal en supposant le milieu sondé transparent à défaut de disposer des outils nécessaires à l'étude de l'effet de la diffusion élastique sur ce paramètre. Cependant, il serait intéressant de pouvoir le faire car l'effet de la diffusion sur la décroissance de l'intensité Raman pourrait être expliqué par son effet sur la résolution axiale du système. On disposerait ainsi d'une information supplémentaire aidant à l'interprétation des profils Raman obtenus sur fantômes, sur la peau ou tout autre échantillon

diffusant. Concernant la fonction de quantification de la microspectroscopie Raman, notre étude ne tient pas compte du coefficient d'anisotropie g des objets analysés. Afin d'étudier l'effet de g , nous proposons de remplacer le TiO_2 des fantômes en PDMS par des billes de latex de diamètre calibré. Les propriétés optiques de ces fantômes pourraient être déterminées par la théorie de Mie. La fabrication de fantômes contenant différents types de billes générerait des fantômes aux coefficients de diffusion et d'anisotropie variables.

L'usage de billes de latex présenterait aussi d'autres bénéfices. En ce qui concerne les propriétés de diffusion, le TiO_2 présente un indice de réfraction très différent de la matrice de PDMS. De ce point de vue, nos fantômes sont éloignés de la peau puisque les variations d'indice de ses constituants sont faibles. De plus, nous avons identifié l'agglomération des particules de TiO_2 comme gênante pour l'étude des profils d'intensité Raman. Ces deux défauts pourraient être contournés par l'emploi des billes de latex.

Concernant la Micro-DRS, nous avons montré qu'il était possible de calculer séparément les trois coefficients g , μ_a et μ_s d'un échantillon. L'algorithme actuel peut encore être amélioré pour lever *a priori* sur la valeur de g .

Une étude de validation biologique *ex vivo* du modèle de correction des spectres Raman peut aussi être envisagée. Cela pourrait être mis en œuvre par une étude de suivi d'un actif tel que la caféine. Les profils d'intensité de raies Raman de la caféine pourraient être acquis sur une peau excisée après dépôt de l'actif à sa surface. Une mesure de Micro-DRS serait aussi effectuée afin d'en mesurer les propriétés optiques et d'utiliser le protocole de correction. Enfin, sur des coupes transversales de cet échantillon de peau, il pourrait être vérifié que le spectre Raman corrigé à une profondeur donnée est équivalent au spectre Raman mesuré dans la couche correspondante. Cette étude permettrait de répondre aux aspects quantitatif et spatial de la problématique dans le cadre du suivi d'un actif.

Dans l'hypothèse où une méthode de calcul des propriétés optiques résolue en profondeur à partir des spectres de réflectance diffuse serait développée, l'étude des fonctions de localisation et de quantification de la spectroscopie Raman confocale pourraient être reprise avec une analyse sur modèles (numériques et fantômes) multicouches. Le protocole de correction des spectres Raman pourrait évoluer avec une fonction de correction spécifique à chaque couche des échantillons analysés.

Enfin, toute la démarche suivie durant ce travail de thèse peut être appliquée à l'évaluation de l'effet de la diffusion élastique et de l'absorption sur des mesures de fluorescence endogène ou exogène. Les fantômes développés ne fluorescent pas ; le PDMS pourrait être dopé avec des composés choisis en ce sens.

Bibliographie

- Ainla, A. (-). http://www.ims.ut.ee/~alar/microtech/Ch1_5/.
- Alex, A., Povazay, B., Bernd, H., Popov, S., Glittenberg, C., Binder, S., & Drexler, W. (2010). Multispectral in vivo three-dimensional optical coherence tomography of human skin. *Journal of Biomedical Optics*, 15(2).
- Alvarez-Roman, R., Naik, A., Kalia, Y., Fessi, H., & Guy, R. (2004). Visualization of skin penetration using confocal laser scanning microscopy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 58(2), 301-316.
- Amouroux, M., Diaz-Ayil, G., Blondel, W., Bourg-Heckly, G., Leroux, A., & Guillemin, F. (2009). Classification of ultraviolet irradiated mouse skin histological stages by bimodal spectroscopy: Multiple excitation autofluorescence and diffuse reflectance. *Journal of Biomedical Optics*, 14(1).
- Andree, S., Helfmann, J., & Gersonde, I. (2011). Determination of chromophore concentrations from spatially resolved skin measurements., 8087.
- Andree, S., Reble, C., Helfmann, J., Gersonde, I., & Illing, G. (2010). Evaluation of a novel noncontact spectrally and spatially resolved reflectance setup with continuously variable source-detector separation using silicone phantoms. *Journal of Biomedical Optics*, 15(6).
- Ayers, F., Grant, A., Kuo, D., Cuccia, D., & Durkin, A. (2008). Fabrication and characterization of silicone-based tissue phantoms with tunable optical properties in the visible and near infrared domain., 6870.
- Barman, I., Singh, G., Dasari, R., & Feld, M. (2009). Turbidity-corrected Raman spectroscopy for blood analyte detection. *Analytical Chemistry*, 81(11), 4233-4240.
- Bashkatov, A., Genina, E., & Tuchin, V. (2011). Optical properties of skin, subcutaneous, and muscle tissues: A review. *Journal of Innovative Optical Health Sciences*, 4(1), 9-38.
- Bashkatov, A., Genina, E., Kochubey, V., & Tuchin, V. (2005). Optical properties of human skin, subcutaneous and mucous tissues in the wavelength range from 400 to 2000 nm. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 38(15), 2543-2555.
- Batchelder, D. N., & Baldwin, K. J. (2001). Confocal Raman microspectroscopy through a planar interface. *Applied Spectroscopy*, 55(5), 517-524.
- Bernengo, J.-C., Adhoute, H., & Mougin, D. (2015). Measurement of the time of flight of photons into the skin: Influence of site, age and gender, correlation with other skin parameters. *Skin Research and Technology*, 21(1), 25-34.

- Bevilacqua, F., & Depeursinge, C. (1999). Monte Carlo study of diffuse reflectance at source-detector separations close to one transport mean free path. *Journal of the Optical Society of America A: Optics and Image Science, and Vision*, 16(12), 2935-2945.
- Bigio, I., & Bown, S. (2004). Spectroscopic sensing of cancer and cancer therapy: Current status of translational research. *Cancer Biology and Therapy*, 3(3), 259-267.
- Boncheva, M., Sterke, J. d., Caspers, P., & Puppels, G. (2009). Depth profiling of stratum corneum hydration in vivo: A comparison between conductance and confocal raman spectroscopic measurements. *Experimental Dermatology*, 18(10), 870-876.
- Booth, M., Neil, M., & Wilson, T. (1998). Aberration correction for confocal imaging in refractive-index- mismatched media. *Journal of Microscopy*, 192(2), 90-98.
- Brancaleon, L., Durkin, A., Tu, J., Menaker, G., Fallon, J., & Kollias, N. (2001). In vivo fluorescence spectroscopy of nonmelanoma skin cancer. *Photochemistry and Photobiology*, 73(2), 178-183.
- Brenan, C., & Hunter, I. (1996). Volumetric Raman microscopy through a turbid medium. *Journal of Raman Spectroscopy*, 27(8), 561-570.
- Bruin, D. D., Bremmer, R., Kodach, V., Kinkelder, R. D., Marle, J. V., Van, T. d., & Faber, D. (2010). Optical phantoms of varying geometry based on thin building blocks with controlled optical properties. *Journal of Biomedical Optics*, 15(2).
- Bruneel, J., Lassègues, J., & Sourisseau, C. (2002). In-depth analyses by confocal Raman microspectrometry: Experimental features and modeling of the refraction effects. *Journal of Raman Spectroscopy*, 33(10), 815-828.
- Buckley, K., & Matousek, P. (2011). Non-invasive analysis of turbid samples using deep Raman spectroscopy. *Analyst*, 136, 3039-3050.
- Cabrera, M., Alfano, O., & Cassano, A. (1996). Absorption and scattering coefficients of titanium dioxide particulate suspensions in water. *Journal of Physical Chemistry*, 100(51), 20043-20050.
- Cai, D. (2008). *Optical and Mechanical Aspects on Polysiloxane Based Electrical-Optical-Circuits-Board*. Ph.D. dissertation, Fakultät für Elektrotechnik und Informationstechnik der Technische Universität Dortmund.
- Caspers, P., Lucassen, G., Bruining, H., & Puppels, G. (2000). Automated depth-scanning confocal Raman microspectrometer for rapid in vivo determination of water concentration profiles in human skin. *Journal of Raman Spectroscopy*, 31(8-9), 813-818.

- Caspers, P., Lucassen, G., Carter, E., Bruining, H., & Puppels, G. (2001). In vivo confocal raman microspectroscopy of the skin: Noninvasive determination of molecular concentration profiles. *Journal of Investigative Dermatology*, 116(3), 434-442.
- Centers for Disease and Prevention. (2015, juin). <http://www.cdc.gov/niosh/ipcsnfrn/nfrn0338.html>.
- Chen, X., Grégoire, S., Formanek, F., Galey, J.-B., & Rigneault, H. (2015). Quantitative 3D molecular cutaneous absorption in human skin using label free nonlinear microscopy. *Journal of Controlled Release*, 200, 78-86.
- Choi, H., Jung, Y., & Kim, S. (2004). Characterization of raman spectra of size-selected TiO₂ nanoparticles by two-dimensional correlation spectroscopy. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 25(3), 426-428.
- Chrit, L., Hadjur, C., Morel, S., Sockalingum, G., Lebourdon, G., Leroy, F., & Manfait, M. (2005). In vivo chemical investigation of human skin using a confocal Raman fiber optic microprobe. *Journal of Biomedical Optics*, 10(4).
- Dam, J., Pedersen, C., Dalgaard, T., Fabricius, P., Aruna, P., & Andersson-Engels, S. (2001). Fiber-optic probe for noninvasive real-time determination of tissue optical properties at multiple wavelengths. *Applied Optics*, 40(7), 1155-1155.
- de la Paz Miguel, M., & Tomba, J. P. (2013). Determination of one-dimensional spherically aberrated point spread function in depth profiling by confocal Raman microscopy. *Journal of Raman Spectroscopy*, 44, 447-452.
- Ding, H., Lu, J., Wooden, W., Kragel, P., & Hu, X.-H. (2006). Refractive indices of human skin tissues at eight wavelengths and estimated dispersion relations between 300 and 1600 nm. *Physics in Medicine and Biology*, 51(6), 1479-1489.
- Dixon, J., M., T., & Lindsey, J. S. (2005). PhotochemCAD 2. A Refined Program with Accompanying Spectral Databases for Photochemical Calculations. *Photochem. Photobiol.*, 81, 212-213.
- Doornbos, R., Lang, R., Aalders, M., Cross, F., & Sterenborg, H. (1999). The determination of in vivo human tissue optical properties and absolute chromophore concentrations using spatially resolved steady-state diffuse reflectance spectroscopy. *Physics in Medicine and Biology*, 44(4), 967-981.
- Dow Corning. (-). SYLGARD 184 Silicone Elastomer Kit.
- Du, H., Fuh, R.-C. A., Li, J., Corkan, L. A., & Lindsey, J. S. (1998). PhotochemCAD: A computer-aided design and research tool in photochemistry and photobiology. *Photochem. Photobiol.*, 68, 141-142.

- Eklouh-Molinier, C., Gaydou, V., Froigneux, E., Barlier, P., Couturaud, V., Manfait, M., & Piot, O. (2015). In vivo confocal Raman microspectroscopy of the human skin: highlighting of spectral markers associated to aging via a research of correlation between Raman and biometric mechanical measurements. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 1-10.
- El-Domyati, M., Attia, S., Saleh, F., Brown, D., Birk, D., Gasparro, F., . . . Uitto, J. (2002). Intrinsic aging vs. photoaging: A comparative histopathological, immunohistochemical, and ultrastructural study of skin. *Experimental Dermatology*, 11(5), 398-405.
- Esmonde-White, F., Esmonde-White, K., Kole, M., Goldstein, S., Roessler, B., & Morris, M. (2011). Biomedical tissue phantoms with controlled geometric and optical properties for Raman spectroscopy and tomography. *Analyst*, 136(21), 4437-4446.
- Everall, N. (2010). Confocal Raman microscopy: Common errors and artefacts. *Analyst*, 135(10), 2512-2522.
- Everall, N. J. (2000-a). Confocal Raman microscopy: why the depth resolution and spatial accuracy can be much worse than you think. *Applied Spectroscopy*, 54(10), 1515-1520.
- Everall, N. J. (2000-b). Modeling and measuring the effect of refraction on the depth resolution of confocal Raman microscopy. *Applied Spectroscopy*, 54(6), 773-782.
- Farrell, T., Patterson, M., & Wilson, B. (1992). A diffusion theory model of spatially resolved, steady-state diffuse reflectance for the noninvasive determination of tissue optical properties in vivo. *Medical Physics*, 19(4), 879-888.
- Fine, S., & Hansen, W. (1971). Optical second harmonic generation in biological systems. *Applied Optics*, 10(10), 2350-2353.
- Firbank, M., Oda, M., & Delpy, D. (1995). An improved design for a stable and reproducible phantom material for use in near-infrared spectroscopy and imaging. *Physics in Medicine and Biology*, 40(5), 955-961.
- Flach, C., & Zhang, G. (2010). *Emerging Raman applications and techniques in biomedical and pharmaceutical fields - Chapter 15: Raman microscopy and imaging: Applications to skin pharmacology and wound healing*. (M. D. Morris, Éd.) Springer.
- Foerster, M., Bolzinger, M.-A., Montagnac, G., & Briancon, S. (2011). Confocal raman microspectroscopy of the skin. *European Journal of Dermatology*, 21(6), 851-863.

- Franzen, L., Selzer, D., Fluhr, J. W., Schaefer, U. F., & Windbergs, M. (2013). Towards drug quantification in human skin with confocal Raman microscopy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 84(2), 437-444.
- Freund, I., Deutsch, M., & Sprecher, A. (1986). Connective tissue polarity. Optical second-harmonic microscopy, crossed-beam summation, and small-angle scattering in rat-tail tendon. *Biophysical Journal*, 50(4), 693-712.
- Galderma. (France). *Galderma*. Sofia Antipolis.
- Gareau, D. S. (2006). *In Vivo Confocal Microscopy In Turbid Media*. Ph.D. dissertation, Oregon Health & Science University.
- Gonzalez, S., & Tannous, Z. (2002). Real-time, in vivo confocal reflectance microscopy of basal cell carcinoma. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 47(6), 869-874.
- Groenhuis, R., Ferwerda, H., & Ten Bosch, J. (1983). Scattering and absorption of turbid materials determined from reflection measurements. 1: Theory. *Applied Optics*, 22(16), 2456-2462.
- Groenhuis, R., Ten Bosch, J., & Ferwerda, H. (1983). Scattering and absorption of turbid materials determined from reflection measurements. 2: Measuring method and calibration. *Applied Optics*, 22(16), 2463-2467.
- Guilbert, M., Roig, B., Terryn, C., Garnotel, R., Jeannesson, P., Sockalingum, G. D., . . . Piot, O. (s.d.). Label-free investigation of type I collagen aging in 3D matrix using confocal reflectance microscopy and diffuse reflectance spectroscopy. *Aging, Article soumis*.
- Haka, A., Volynskaya, Z., Gardecki, J., Nazemi, J., Lyons, J., Hicks, D., . . . Feld, M. (2006). In vivo margin assessment during partial mastectomy breast surgery using Raman spectroscopy. *Cancer Research*, 66(6), 3317-3322.
- Hale, G. M., & Querry, M. R. (1973). Optical constants of water in the 200nm to 1200nm wavelength region. *Applied Optics*, 12, 555-563.
- Hell, S., Reiner, G., Cremer, C., & Stelzer, E. (1993). Aberrations in confocal fluorescence microscopy induced by mismatches in refractive index. *Journal of Microscopy*, 169(3), 391-405.
- Huang, Z., Zeng, H., Hamzavi, I., McLean, D., & Lui, H. (2001). Rapid near-infrared Raman spectroscopy system for real-time in vivo skin measurements. *Optics Letters*, 26(22), 1782-1784.
- Ishimaru, A. (1978). *Wave propagation and scattering in random media* (Vol. 1). Academic press New York.

- Jacques, S. (1989). Time-resolved reflectance spectroscopy in turbid tissues. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 36(12), 1155-1161.
- Jacques, S. (1996). Origins of tissue optical properties in the UVA, Visible, and NIR regions. *Advances in Optical Imaging and Photon Migration*, 2, 364-369.
- Jacques, S. (2013). chapter Confocal Laser Scanning Microscopy Using Scattering as the Contrast Mechanism. Dans *Handbook of Coherent-Domain Optical Methods*. Springer Science.
- Jacques, S. (2013). Optical properties of biological tissues: A review. *Physics in Medicine and Biology*, 58(11), R37-R61.
- Jacques, S. L. (1998, January). <http://omlc.org/news/jan98/skinoptics.html>. *Skin Optics*.
- Jacques, S. L. (2006, February). Spectroscopic determination of tissue optical properties using optical fiber spectrometer.
- Jacques, S. L. (2008, April). Spectroscopic determination of tissue optical properties using optical fiber spectrometer.
- Jacques, S., Wang, B., & Samatham, R. (2012). Reflectance confocal microscopy of optical phantoms. *Biomedical Optics Express*, 3(6), 1162-1172.
- Jenkins, G. (2002). Molecular mechanisms of skin ageing. *Mechanisms of Ageing and Development*, 123(7), 801-810.
- Keller, M., Vargis, E., De Matos Granja, N., Wilson, R., Mycek, M.-A., Kelley, M., & Mahadevan-Jansen, A. (2011). Development of a spatially offset Raman spectroscopy probe for breast tumor surgical margin evaluation. *Journal of Biomedical Optics*, 16(7).
- Kienle, A., & Patterson, M. (1997). Improved solutions of the steady-state and the time-resolved diffusion equations for reflectance from a semi-infinite turbid medium. *Journal of the Optical Society of America A: Optics and Image Science, and Vision*, 14(1), 246-254.
- Kim, J., Roy, M., Dadani, F., & Wilson, B. (2010). A fiberoptic reflectance probe with multiple source-collector separations to increase the dynamic range of derived tissue optical absorption and scattering coefficients. *Optics Express*, 18(6), 5580-5594.
- Koenig, A., Roig, B., Digabel, J. L., Josse, G., & Dinten, J.-M. (2015). Accessing deep optical properties of skin using diffuse reflectance spectroscopy . *Proceedings of SPIE 9537*, 95370E-95370E-8.
- Kollias, N., Seo, I., & Bargo, P. (2010). Interpreting diffuse reflectance for in vivo skin reactions in terms of chromophores. *Journal of Biophotonics*, 3(1-2), 15-24.

- Krafft, C., & Sergo, V. (2006). Biomedical applications of Raman and infrared spectroscopy to diagnose tissues. *Spectroscopy*, 20(5-6), 195-218.
- Krueger, N., Luebberding, S., Oltmer, M., Streker, M., & Kerscher, M. (2011). Age-related changes in skin mechanical properties: A quantitative evaluation of 120 female subjects. *Skin Research and Technology*, 17(2), 141-148.
- LaPlant, F. (2010). *Emerging Raman applications and techniques in biomedical and pharmaceutical fields - Chapter 1: Lasers, Spectrographs, and Detectors*. (M. D. Morris, Éd.) Springer.
- Lasch, P., & Naumann, D. (2006). Spatial resolution in infrared microspectroscopic imaging of tissues. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1758(7), 814-829.
- Laurent, P. E. (2008). Intradermal vaccine delivery: Will new delivery systems transform vaccine administration? *Vaccine*.
- Lieber, C., Majumder, S., Billheimer, D., Ellis, D., & Mahadevan-Jansen, A. (2008). Raman microspectroscopy for skin cancer detection in vitro. *Journal of Biomedical Optics*, 13(2).
- Lieber, C., Wu, H., & Yang, W. (2013). Tissue measurement using 1064 nm dispersive Raman spectroscopy., 8572.
- Lilledahl, M. B., Chinga-Carrasco, G., & de Lange Davies, C. (2013). Confocal Laser Microscopy - Principles and Applications in Medicine, Biology, and the Food Sciences. Dans P. N. Lagali (Éd.).
- Lim, L., Nichols, B., Rajaram, N., & Tunnell, J. W. (2011). Probe pressure effects on human skin diffuse reflectance and fluorescence spectroscopy measurements. *Journal of Biomedical Optics*, 16(1), 011012.
- Lisenko, S., & Kugeiko, M. (2013). A method of online quantitative interpretation of diffuse reflection profiles of biological tissues. *Optics and Spectroscopy (English translation of Optika i Spektroskopiya)*, 114(2), 251-259.
- Lui, H., Zhao, J., McLean, D., & Zeng, H. (2012). Real-time raman spectroscopy for in vivo skin cancer diagnosis. *Cancer Research*, 72(10), 2491-2500.
- Ma, X., Lu, J. Q., Ding, H., & Hu, X.-H. (2005). Bulk optical parameters of porcine skin dermis at eight wavelength from 325 to 1557 nm. *Opt. Lett.*, 30, 412-414.
- Macdonald, A., & Vaughan, A. (2007). Numerical simulations of confocal Raman spectroscopic depth profiles of materials: A photon scattering approach. *Journal of Raman Spectroscopy*, 38(5), 584-592.

- MacDonald, A., Vaughan, A., & Wyeth, P. (2003). On confocal raman spectroscopy of semicrystalline polymers: The effect of optical scattering. *Applied Spectroscopy*, 57(12), 1475-1481.
- Magnain, C. (2009). *Modélisation de la couleur de la peau et sa représentation dans les oeuvres d'art*. Ph.D. dissertation, Université de Pierre et Marie Curie - Paris 6.
- Masters, B., So, P., & Gratton, E. (1997). Multiphoton excitation fluorescence microscopy and spectroscopy of in vivo human skin. *Biophysical Journal*, 72(6), 2405-2412.
- Matousek, P. (2007). Deep non-invasive Raman spectroscopy of living tissue and powders. *Chemical Society Reviews*, 36(8), 1292-1304.
- Meglinski, I., & Doronin, A. (s.d.). Monte Carlo modelling tool. <http://biophotonics.otago.ac.nz/MCOnline.aspx>.
- Meglinskii, I., A.N.and, E. B., Churmakov, D., & Tuchin, V. (2002). Study of the possibility of increasing the probing depth by the method of reflection confocal microscopy upon immersion clearing of near-surface human skin layers. *Quantum Electronics*, 32(10), 875-882.
- Millerot-Serrurot, E., Guilbert, M., Fourré, N., Witkowski, W., Said, G., Van Gulick, L., . . . Jeannesson, P. (2010). 3D collagen type I matrix inhibits the antimigratory effect of doxorubicin. *Cancer Cell International*, 10.
- Minsky, M. (1961). Microscopy apparatus. *Microscopy apparatus*. Google Patents US3013467
- Mo, J., Zheng, W., Low, J., Ng, J., Ilancheran, A., & Huang, Z. (2009). High wavenumber raman spectroscopy for in vivo detection of cervical dysplasia. *Analytical Chemistry*, 81(21), 8908-8915.
- Montcel, B. (2005). *Tomographie optique diffuse résolue en temps : Applications fonctionnelles en neurosciences*. Ph.D. dissertation, Université Louis Pasteur Strasbourg I.
- Motz, J., Hunter, M., Galindo, L., Gardecki, J., Kramer, J., Dasari, R., & Feld, M. (2004). Optical fiber probe for biomedical Raman spectroscopy. *Applied Optics*, 43(3), 542-554.
- Mourant, J., Bigio, I., Boyer, J., Johnson, T., Lacey, J., Bohorfoush, A., & Mellow, M. (1996). Elastic scattering spectroscopy as a diagnostic tool for differentiating pathologies in the gastrointestinal tract: Preliminary testing. *Journal of Biomedical Optics*, 1(2), 192-199.

- Murphy, B., Webster, R., Turlach, B., Quirk, C., Clay, C., Heenan, P., & Sampson, D. (2005). Toward the discrimination of early melanoma from common and dysplastic nevus using fiber optic diffuse reflectance spectroscopy. *Journal of Biomedical Optics*, *10*(6).
- Nasse, M. J., & Woehl, J. C. (2010, Feb). Realistic modeling of the illumination point spread function in confocal scanning optical microscopy. *J. Opt. Soc. Am. A*, *27*(2), 295-302.
- Nguyen, T., Gobinet, C., Feru, J., Pasco, S., Manfait, M., & Piot, O. (2012). Characterization of type I and IV collagens by Raman microspectroscopy: Identification of spectral markers of the dermo-epidermal junction. *Spectroscopy (New York)*, *27*(5-6), 421-427.
- Nguyen, T., Happillon, T., Feru, J., Brassart-Pascco, S., Angiboust, J.-F., Manfait, M., & Piot, O. (2013). Raman comparison of skin dermis of different ages: Focus on spectral markers of collagen hydration. *Journal of Raman Spectroscopy*, *44*(9), 1230-1237.
- Ohsaka, T. (1980). Temperature dependence of the Raman spectrum in anatase TiO₂. *Journal of the Physical Society of Japan*, *48*(5), 1661-1668.
- Palero, J., Bruijn, H. D., Der, A. V., Sterenborg, H., & Gerritsen, H. (2007). Spectrally resolved multiphoton imaging of in vivo and excised mouse skin tissues. *Biophysical Journal*, *93*(3), 992-1007.
- Park, J., Bae, Y., Bae, Y., Kang, H., Lee, K.-J., & Jung, B. (2013). Fabrication of double layer optical tissue phantom by spin coating method: Mimicking epidermal and dermal layer., 8583.
- Patterson, M. S., Chance, B., & Wilson, B. C. (1989). Time resolved reflectance and transmittance for the noninvasive measurement of tissue optical properties. *APPLIED OPTICS*, *28*(12), 2331-2336.
- Péry, E., Amouroux, M., Diaz-Ayil, G., Blondel, W., Bourg-Heckly, G., D'Hallewin, M.-A., . . . Guillemain, F. (2008). Multi-modality point spectroscopy: Interests, development and application to in vivo diagnosis of bladder and skin cancers., (pp. 1353-1358).
- Pogue, B., & Patterson, M. (2006). Review of tissue simulating phantoms for optical spectroscopy, imaging and dosimetry. *Journal of Biomedical Optics*, *11*(4).
- Pradana, A., Kluge, C., & Gerken, M. (2014, Feb). Tailoring the refractive index of nanoimprint resist by blending with TiO₂ nanoparticles. *Opt. Mater. Express*, *4*(2), 329-337.
- Prahl, S. A. (1988). *Light transport in tissue*. Ph.D. dissertation, University of Texas at Austin.
- Prahl, S. A. (2012, March). Bilirubin. *Bilirubin*.

- Qiu, W. (2012). *PDMS Based Waveguides for Microfluidics and EOCB*. Master's thesis, Graduate Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College.
- Rajadhyaksha, M., Grossman, M., Esterowitz, D., Webb, R., & Anderson, R. (1995). In vivo confocal scanning laser microscopy of human skin: Melanin provides strong contrast. *Journal of Investigative Dermatology*, *104*(6), 946-952.
- Randeberg, L. (2005). *Diagnostic applications of diffuse reflectance spectroscopy*. Ph.D. dissertation, Norwegian University of Science and Technology.
- Reble, C., Gersonde, I., Andree, S., Eichler, H., & Helfmann, J. (2010). Quantitative Raman spectroscopy in turbid media. *Journal of Biomedical Optics*, *15*(3).
- Reif, R., Amorosino, M. S., Calabro, K. W., Amar, O., Singh, S. K., & Bigio, I. J. (2008). Analysis of changes in reflectance measurements on biological tissues subjected to different probe pressures. *Journal of biomedical optics*, *13*(1), 10502-10502.
- Rossetti, F., Vieira Depieri, L., & Lopes Badra Bentley, M. V. (2013). Confocal Laser Microscopy - Principles and Applications in Medicine, Biology, and the Food Sciences. Dans P. N. Lagali (Éd.).
- Ryu, H., Joo, Y., Kim, S., Park, K., & Youn, S. (2008). Influence of age and regional differences on skin elasticity as measured by the Cutometer®. *Skin Research and Technology*, *14*(3), 354-358.
- Saager, R., Kondru, C., Au, K., Sry, K., Ayers, F., & Durkin, A. (2010). Multilayer silicone phantoms for the evaluation of quantitative optical techniques in skin imaging., 7567.
- Salomatina, E., Jiang, B., Novak, J., & Yaroslavsky, A. (2006). Optical properties of normal and cancerous human skin in the visible and near-infrared spectral range. *Journal of Biomedical Optics*, *11*(6).
- Samatham, R. (2012). *Determination of optical scattering properties of tissues using reflectance-mode confocal microscopy*. Ph.D. dissertation, Oregon Health & Science University.
- Saporta, G. (2006). Chapitre 7 - L'analyse en composantes principales. Dans *Probabilité, analyse des données, statistique*. Editions TECHNIP.
- SCANCO Medical. (). Brutisselen, Switzerland.
- Scepanovic, O., Fitzmaurice, M., Miller, A., Kong, C.-R., Volynskaya, Z., Dasari, R., . . . Feld, M. (2011). Multimodal spectroscopy detects features of vulnerable atherosclerotic plaque. *Journal of Biomedical Optics*, *16*(1).

- Schulmerich, M., Dooley, K., Morris, M., Vanasse, T., & Goldstein, S. (2006). Transcutaneous fiber optic Raman spectroscopy of bone using annular illumination and a circular array of collection fibers. *Journal of Biomedical Optics*, 11(6).
- Serpone, N., Lawless, D., & Khairutdinov, R. (1995). Size effects on the photophysical properties of colloidal anatase TiO₂ particles: Size quantization or direct transitions in this indirect semiconductor? *Journal of Physical Chemistry*, 99(45), 16646-16654.
- Shih, W.-C., Bechtel, K., & Feld, M. (2008). Intrinsic Raman spectroscopy for quantitative biological spectroscopy Part I: Theory and simulations. *Optics Express*, 16(17), 12726-12736.
- Solarte, E., & Ipus, E. (2013). Spectroscopic measurements and characterization of soft tissue phantoms., 8583.
- Sourisseau, C., & Maraval, P. (2003). Confocal Raman Microspectrometry: A Vectorial Electromagnetic Treatment of the Light Focused and Collected Through a Planar Interface and Its Application to the Study of a Thin Coating. *Applied Spectroscopy*, 57(11), 1324-1332.
- Stone, N. (2001). *Raman spectroscopy of biological tissue for application in optical diagnosis of malignancy*. Ph.D. dissertation, Cranfield University.
- Swartling, J., Dam, J., & Andersson-Engels, S. (2003). Comparison of spatially and temporally resolved diffuse-reflectance measurement systems for determination of biomedical optical properties. *Applied Optics*, 42(22), 4612-4620.
- Takatani, S., & Graham, M. D. (1987). Theoretical analysis of diffuse reflectance from a two-layer tissue model. *IEEE Trans. Biomed. Eng., BME* 26, 656-664.
- Taroni, P., Bassi, A., Comelli, D., Farina, A., Cubeddu, R., & Pifferi, A. (2009). Diffuse optical spectroscopy of breast tissue extended to 1100 nm. *Journal of Biomedical Optics*, 14(5).
- Tearney, G. (1995, November). Determination of the refractive index of highly scattering human tissue by optical coherence tomography. *OPTICS LETTERS*, 20(21).
- Tfaily, S. (2012). *Caractérisation par microspectroscopie confocale Raman de la diffusion cutanée d'actif : optimisation des paramètres instrumentaux et méthodologiques en vue d'applications in vivo*. Ph.D. dissertation, Université de Reims Champagne-Ardenne.
- Tfaily, S., Josse, G., Angiboust, J.-F., Manfait, M., & Piot, O. (2014). Monitoring caffeine and resveratrol cutaneous permeation by confocal Raman microspectroscopy. *Journal of Biophotonics*, 7(9), 676-681.

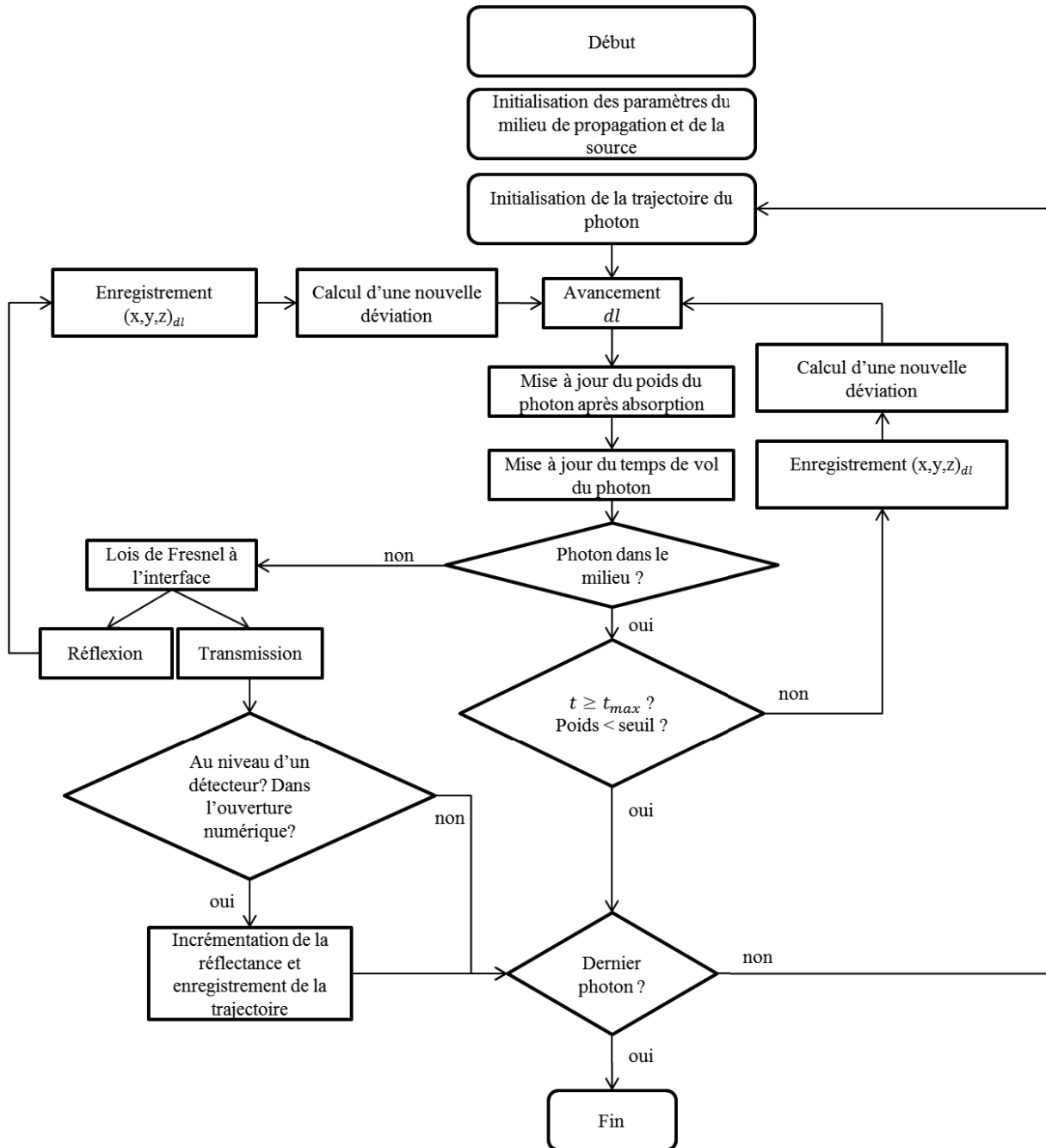
- Tfaily, S., Josse, G., Gobinet, C., Angiboust, J.-F., Manfait, M., & Piot, O. (2012). Shedding light on the laser wavelength effect in Raman analysis of skin epidermises. *Analyst*, *137*(18), 4241-4246.
- Tfayli, A., Piot, O., & Manfait, M. (2008). Confocal Raman microspectroscopy on excised human skin: uncertainties in depth profiling and mathematical correction applied to dermatological drug permeation. *Journal of biophotonics*, *1*(2), 140-153.
- Tfayli, A., Piot, O., Draux, F., Pitre, F., & Manfait, M. (2007-b, NOV). Molecular characterization of reconstructed skin model by Raman microspectroscopy: Comparison with excised human skin. *BIOPOLYMERS*, *87*(4), 261-274.
- Tfayli, A., Piot, O., Pitre, F., & Manfait, M. (2007-a). Follow-up of drug permeation through excised human skin with confocal Raman microspectroscopy. *Eur Biophys J*, *36*, 1049-1058.
- Ti, Y., & Lin, W.-C. (2008). Effects of probe contact pressure on in vivo optical spectroscopy. *Opt. Express*, *16*(6), 4250-4262.
- Tomba, J. P., Arzondo, L. M., & Pastor, J. M. (2007). Depth Profiling by Confocal Raman Microspectroscopy: Semi-empirical Modeling of the Raman Response. *Applied Spectroscopy*, *61*(2), 177-185.
- Tseng, S.-H., Grant, A., & Durkin, A. (2008). In vivo determination of skin near-infrared optical properties using diffuse optical spectroscopy. *Journal of Biomedical Optics*, *13*(1).
- Tseng, T.-Y., Chen, C.-Y., Li, Y.-S., & Sung, K.-B. (2011). Quantification of the optical properties of two-layered turbid media by simultaneously analyzing the spectral and spatial information of steady-state diffuse reflectance spectroscopy. *Biomed. Opt. Express*, *2*(4), 901-914.
- Tuchin, V. (1997). Light scattering study of tissues. *Uspekhi Fizicheskikh Nauk*, *167*(5), 537-539.
- Van Gemert, M., Jacques, S., Sterenborg, H., & Star, W. (1989). Skin optics. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, *36*(12), 1146-1154.
- van Staveren, H. J., Moes, C. J., van Marie, J., Prahl, S. A., & van Gemert, M. J. (1991, Nov). Light scattering in Intralipid-10% in the wavelength range of 400-1100 nm. *Appl. Opt.*, *30*(31), 4507-4514.
- Verkruyse, W., Zhang, R., Choi, B., Lucassen, G., Svaasand, L., & Nelson, J. (2005). A library based fitting method for visual reflectance spectroscopy of human skin. *Physics in Medicine and Biology*, *50*(1), 57-70.

- Vernon, M., Fr chet te, J., Painchaud, Y., Caron, S., & Beaudry, P. (1999). Fabrication and characterization of a solid polyurethane phantom for optical imaging through scattering media. *Applied Optics*, 38(19), 4247-4251.
- Wang, L., Jacques, S., & Zheng, L. (1995). MCML - Monte Carlo modeling of light transport in multi-layered tissues. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, 47(2), 131-146.
- Wang, Q., Yang, H., Agrawal, A., Wang, N., & Prefer, T. (2008). Measurement of internal tissue optical properties at ultraviolet and visible wavelengths: Development and implementation of a fiberoptic-based system. *Optics Express*, 16(12), 8685-8703.
- Wang, S., Zhao, J., Lui, H., He, Q., Bai, J., & Zeng, H. (2013). Monte Carlo simulation of in vivo Raman spectral Measurements of human skin with a multi-layered tissue optical model. *Journal of Biophotonics*.
- Welzel, J. (2001). Optical coherence tomography in dermatology: A review. *Skin Research and Technology*, 7(1), 1-9.
- Xiao, C., Flach, C. R., Marcott, C., & Mendelsohn, R. (2004). Uncertainties in depth determination and comparison of multivariate with univariate analysis in confocal Raman studies of a laminated polymer and skin. *Applied Spectroscopy*, 58(4), 382-389.
- Yamamoto, Y., Itoh, T., Sato, H., & Ozaki, Y. (2014). A simple method for evaluation of optical scattering effect on the Raman signal of a sample beneath an Intralipid layer. *Vibrational Spectroscopy*.
- Yamamoto, Y., Oshima, Y., Shinzawa, H., Katagiri, T., Matsuura, Y., Ozaki, Y., & Sato, H. (2008). Subsurface sensing of biomedical tissues using a miniaturized Raman probe: Study of thin-layered model samples. *Analytica Chimica Acta*, 619(1), 8-13.
- Zhang, Y., Chen, Y., Yu, Y., Xue, X., Tuchin, V. V., & Zhu, D. (2013). Visible and near-infrared spectroscopy for distinguishing malignant tumor tissue from benign tumor and normal breast tissues in vitro. *Journal of Biomedical Optics*, 18(7), 77003-77003.
- Zhao, J., Lui, H., Mclean, D., & Zeng, H. (2008). Integrated real-time Raman system for clinical in vivo skin analysis. *Skin Research and Technology*, 14(4), 484-492.
- Zonios, G., & Dimou, A. (2006). Modeling diffuse reflectance from semi-infinite turbid media: Application to the study of skin optical properties. *Optics Express*, 14(19), 8661-8674.
- Zonios, G., & Dimou, A. (2009). Light scattering spectroscopy of human skin in vivo. *Optics Express*, 17(3), 1256-1267.

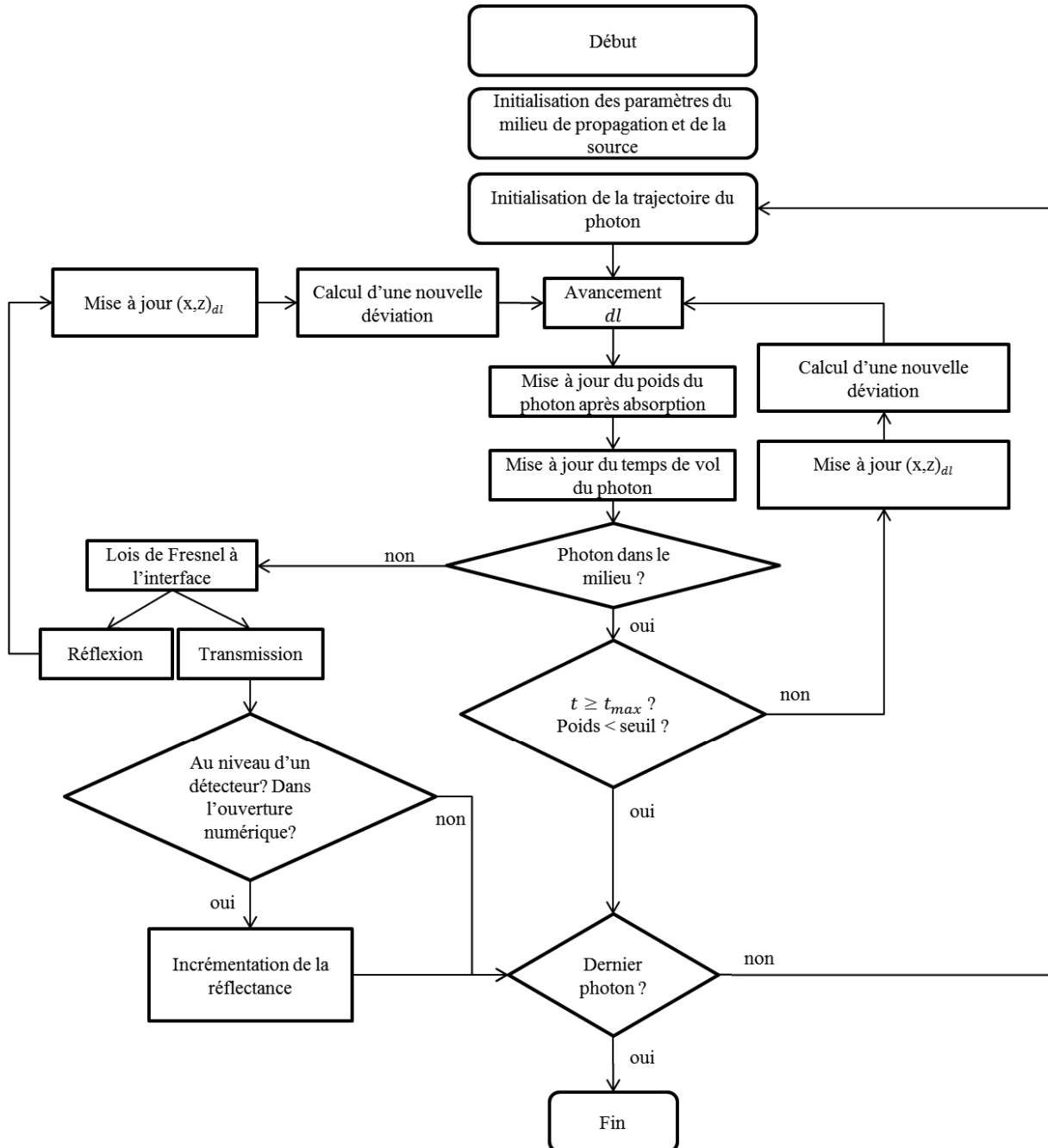
Zonios, G., & Dimou, A. (2011). Modeling diffuse reflectance from homogeneous semi-infinite turbid media for biological tissue applications: A Monte Carlo study. *Biomedical Optics Express*, 2(12), 3284-3294.

Annexes

Annexe 1 : Algorithme Monte Carlo 3D



Annexe 2 : Algorithme Monte Carlo 2D



Annexe 3 : Accessing deep optical properties of skin using Diffuse Reflectance Spectroscopy

Anne Koenig^{*a}, Blandine Roig^a, Jimmy Le Digabel^b, Gwendal Josse^b, Jean-Marc Dinten^a
^aCEA, LETI, Minatec campus, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble cedex 9, France;
^bPierre Fabre Dermo-Cosmétique, Centre de recherche sur la peau, Hôtel Dieu, Toulouse

ABSTRACT

Diffuse reflectance spectroscopy characterizes composition and structure of tissues by determining their scattering and absorption properties. We have developed in our laboratory a low-cost spatially resolved diffuse reflectance spectroscopy instrument. We present in this study some results showing how to adapt this technology on multi-layered tissues. First of all, a method enabling determination of scattering and absorption properties of multi-layered phantoms is described; the adaptation of the initial methodology to focus on deep layers is especially detailed. Then some preliminary results obtained on a panel of volunteer's redness faces are presented.

Keywords : Diffuse reflectance spectroscopy, optical properties, multilayered phantoms, skin characterization

INTRODUCTION

Diffuse reflectance spectroscopy (DRS) determines the optical properties of biological tissues by injecting light and detecting the reflected intensity after successive scattering and absorption events [1-3]. It provides information on the biochemical composition and on the structure of the tissues. We have developed a low-cost optical instrument based upon the spatially resolved diffuse reflectance spectroscopy [4] to detect *in vivo* delayed hypersensitivity reaction (occurrence of an erythema and an induration) either in a clinical environment or at a point of care. The first addressed application was tuberculosis skin tests reading [5].

As the temporal or frequency methods require an expensive and complex instrumentation, we chose to design a spatially resolved probe in order to measure diffuse reflectance at various wavelengths (400-900nm). Our objective here is to demonstrate the potential of DRS and of our instrument to analyze multilayered tissues such as skin. In this paper, we firstly introduce the system and the employed methodology. Then, we present results on homemade multilayered phantoms and show how we have adapted the processing method to analyze in depth layers. To conclude, *in vivo* skin measurements that were carried out with this methodology on volunteers exhibiting face redness or rosacea are presented.

MATERIALS AND METHODS

Experimental set up

To determine the absorption and scattering coefficients μ_a and μ_s' of the skin, a bundle-based spectroscopic system has been designed. The overall instrument is presented on Figure a. It consists of a tungsten halogen lamp with a large spectrum (400-900nm) as the source of excitation, a fibered probe for illumination and detection of light on the skin surface at several distances from the illumination. A fiber spectrometer Ocean Optics HR2000 is used for detection and records the spectra of light backscattered at the surface of the tissue. A motorized stage is used as an optical switch for reading each of the various sensing fibers *i.e.* at each distance from the illumination point. A PC controls measurement acquisition in less than five seconds and processes acquired data in order to extract absorption and scattering properties of the tissue according to a method described in next section. The system is portable and easy to use.

The probe ferrule placed over the area to be read (measurement ferrule) is made of an illumination fiber (500 μm diameter core) with white light and a network of optical fibers for detection (300 μm diameter core) located at six different distances (approximately every 50 μm) from the illumination fiber (figure 1 b).

*anne.koenig@cea.fr; phone 33(0)4 38 78 37 30; fax: 33(0)4 38 78 59 30

The geometry of collection, (distances and ring arrangement) is optimized for clinical measurements. On the detection ferrule of the probe (figure 1 c), the fibers belonging to the same ring, i.e. at the same distance of the illumination are gathered to form a bundle. The distance between the different bundles is chosen to assure no crosstalk between the different bundles measurements.

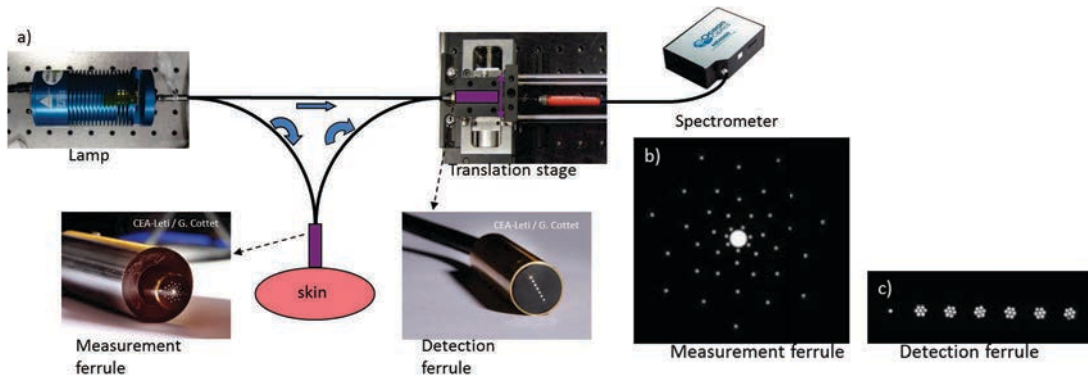


Figure 1: a) Schematic of the spatially resolved diffuse reflectance spectroscopy instrument and fibered probe ends, detail on the two probe ferrules b) measurement on the skin, c) detection on the spectrometer.

Method for data processing

To analyze the recorded spectra, in order to reconstruct local tissue optical characteristics, we developed a method based on the deconvolution of the spectra from diffusion and absorption [6]. In a first step, we record the spectra at the different distances from the excitation fiber thanks to the spatially resolved probe. Spectra are preprocessed by removing the baseline and normalizing them by the integration time and excitation spectrum. Secondly, for each wavelength, we compute the reflectance decay signal according to the distance to illumination. This decay is compared to a Look up table [7]. The Look up table is computed off line with a Monte Carlo algorithm to simulate photons travelling in the tissue, under the hypothesis of a semi-infinite medium. The ranges chosen for optical coefficients are representatives of biological tissues: $\mu_a \in [0.05 \text{ cm}^{-1}, 9 \text{ cm}^{-1}]$, $\mu_s' \in [10 \text{ cm}^{-1}, 400 \text{ cm}^{-1}]$. Then minimizing the error between simulation and acquisition at each wavelength λ , we obtain the optical coefficients spectra of absorption $\mu_a(\lambda)$ and scattering $\mu_s'(\lambda)$ of the examined tissue.

PHANTOMS EXPERIMENTS

Phantoms preparation

We developed a phantom preparation procedure combining the advantages of silicone [8] with the precision of spin coating [9] in order to obtain multilayered objects mimicking optical properties of skin tissue [10]. We chose to use polydimethylsiloxane (PDMS) as the base material for our multilayered phantoms. In order to create a material with tunable scattering and absorption coefficients, approaching skin optical properties, TiO_2 is added to this base material as scattering agent, and ink as absorption agent. The multilayered phantoms were designed to allow acquisition of reflectance for three distinct sample zones (zone 1 for layer 1 only, zone 2 for layers 2 and 1 or zone 3 for layers 3, 2 and 1), see Figure .

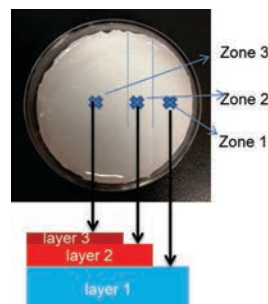


Figure 2: Tri layered phantom and acquisition zones.

Layer 3, with TiO_2 only mimics stratum corneum, layer 2 with TiO_2 and black ink mimics epidermis basal layer and layer 1 with TiO_2 and blue ink mimics dermis. Absorption spectra of these inks are presented on Figure . It is seen on this figure that the main influence of the blue ink is in the wavelength range of 450-700 nm, with a specific "two peaks" form around 600 nm as for oxyhaemoglobin, and that the absorption of the black ink is an exponential decrease over all the wavelength range (as for melanin).

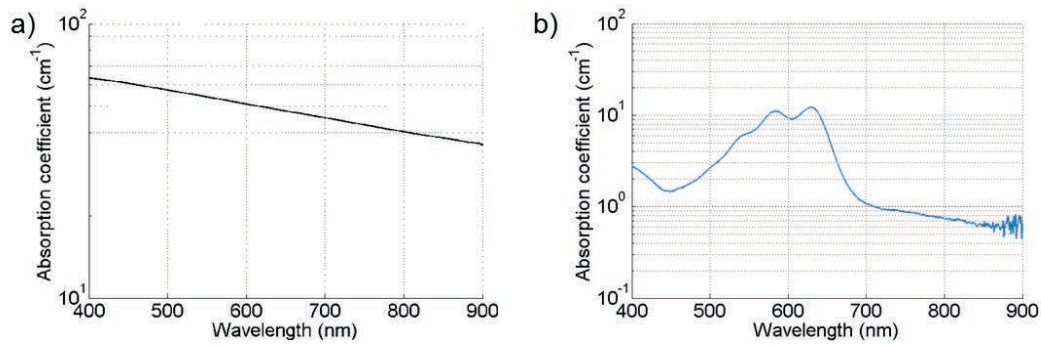


Figure 3: Absorption spectra of a) black and b) blue inks.

We used several phantoms in this study; the properties of their different layers are summarized onto table 1, table 2 and table 3 below. The difference between the phantoms lies in the scattering coefficient of the third layer, or in the absorption coefficient of the first and second layer.

Table 1. Phantoms properties.

		Phantoms
Layer 1 (mimicking dermis)	Thickness	$\approx 3\text{mm}$
	Reduce Scattering Coefficient	$\mu_{s'1}$
	Blue dye	μ_{a1} or μ_{a2}
Layer 2 (mimicking epidermis)	Thickness	$80\ \mu\text{m}$
	Reduce Scattering Coefficient	$\mu_{s'2}$
	Black ink	μ_{a3} or μ_{a4}
Layer 3 (mimicking stratum corneum)	Thickness	$20\ \mu\text{m}$
	Reduce Scattering Coefficient	$\mu_{s'3}$ or $\mu_{s'4}$
	Dye	No dye

Table 2. $\mu_{s'}$ obtained by "standard" DRS measurement on equivalent non absorbing phantoms.

	$\mu_{s'1}$	$\mu_{s'2}$	$\mu_{s'3}$	$\mu_{s'4}$
mg TiO₂/g of curing agent	21.0	36.7	73.3	94.3
$\mu_{s'} @ 532\ \text{nm}\ (\text{cm}^{-1})$	≈ 22	≈ 26	≈ 44	≈ 56

Table 3. targeted μ_a controlled before fabrication by a photospectrometer.

	μ_{a1}	μ_{a2}	μ_{a3}	μ_{a4}
Blue dye@ 584 nm (cm^{-1})	0.28	0.55	-	-
Black ink@ 532 nm (cm^{-1})	-	-	0.95	2

Acquisitions and first observations

We acquired data on these tri-layered phantoms. The acquisitions were done as said before on three distinct sample zones (zone 1, 2 and 3). The optical coefficients spectra of the phantoms are extracted from these acquisitions as presented above. The difference in the scattering level between the different zones is clearly seen on Figure a). The scattering coefficient increases when we go through upper layers which are indeed more diffusing.

On the absorption coefficient spectrum extracted from layer 1 only Figure b), i.e. on zone 1, the presence of blue ink is detected. This spectrum is corrupted by the upper layers (with black ink) when we are positioned on zone 2 and even more on zone 3, were the influence of black ink is really visible between 650 and 900 nm.

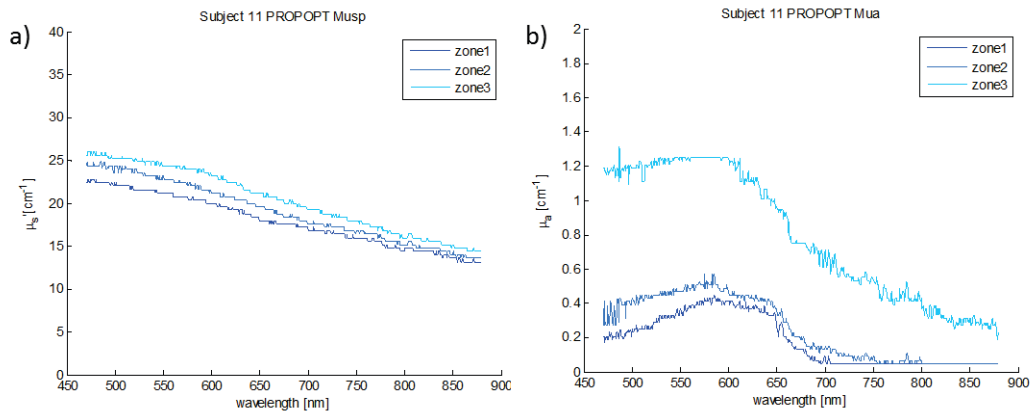


Figure 4: Optical coefficient spectra extracted for phantom on the three zones a) μ_s' b) μ_a

"Depth" method

The idea underlying the "depth" method is to use the most distant collection fibers to compute the error between simulation and acquisition for the absorption spectrum calculation. In fact, the most likely photon trajectories inside the medium take a "banana shape" as shown on Figure . Furthermore, the greater the distance to illumination, the deeper the "banana" goes. Thus, we favor photons having penetrated deeper into the tissue. Indeed, on our probe, only six distances are available to compute the exponential decay according to the distance. Favoring only the greatest ones (for example the three longest) means greater uncertainty on the decay computation. The signals are preprocessed as described before. Then, in compliance with the initial method, the scattering coefficient $\mu_s'(\lambda)$ is extracted using the five closest distances to the illumination.

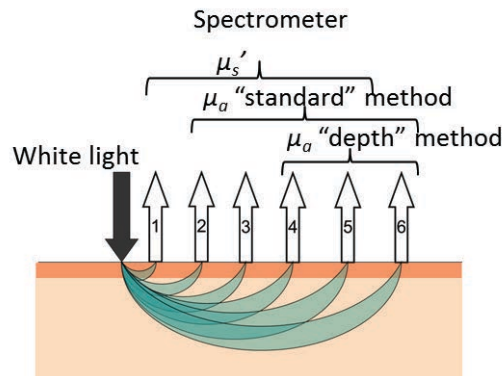


Figure 5: Schematic of the "banana shape" of photon trajectories inside the medium, according to distance to illumination.

Results

With less acquisition points to compute the decay, the absorption result is less accurate. This drawback is seen when comparing the computed μ_a on "zone 1" (layer 1 only) between Figure b) and Figure b). Whereas μ_a obtained by the "standard" method is close to the targeted value, this coefficient is minimized by the "depth" method.

However, using this "depth" method to extract the absorption coefficient, we obtain a better quantification for the dermis layer on zone 2 (approximately equal to the value extracted on zone 1) and a weaker influence of black ink on zone 3 as it is shown on Figure b). As a result, the assessment of in-depth layer properties is less sensitive to the absorption of the upper layers. Thus, by applying this method to skin characterization, one can scan the dermis with a diminished influence of the melanin contained in the epidermis.

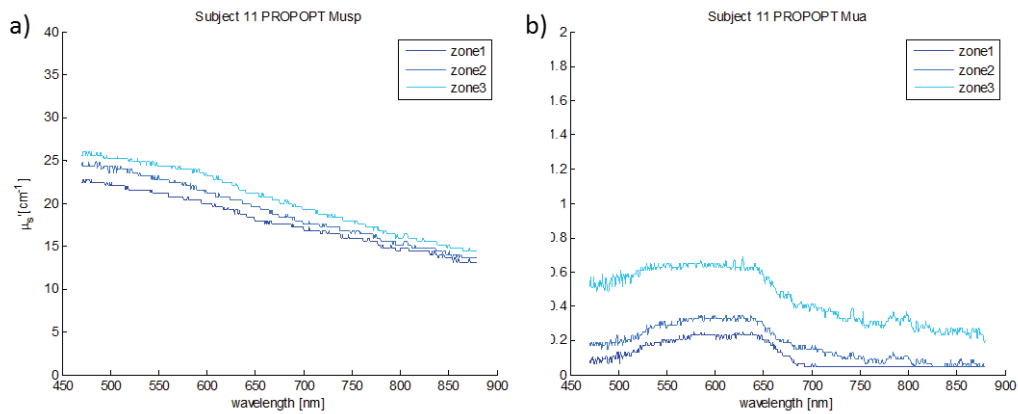


Figure 6: Optical coefficient spectra extracted with the so-called "depth method" for phantom on the three zones a) μ_s' b) μ_a

CLINICAL EXPERIMENTS

Clinical experimental protocol

This clinical study has been performed in agreement with the Declaration of Helsinki.

Clinical experiments were conducted in order to evaluate this method on biological tissues. For this purpose a panel of thirty volunteers presenting faces with redness was selected. The measurements were done on faces without any agent or product application. We acquired diffuse reflectance spectra with our instrument, color calibrated photos of acquired zones and chromameter data (Minolta CM-508i).

Furthermore, three images of the face were acquired with a standardized system: front view, left view and right view see Figure . The system allows us to acquire the images with a controlled framing and a color checker is used to perform a color calibration of the photos.



Figure 7: standardized photos of the face.

The severity of the erythema persistence on the face has been graded by a dermatologist. A simple graduation scale was used: "Absent", "Slight", "Moderate" and "Severe". To perform the graduation, a software has been used which presents the 3 images at the same time and the dermatologist can choose one of the four items according to the global redness of the face.

The patients have been classified in three groups according to graduation. Due to the low number of subjects with severe erythema, the grades "Moderate" and "Severe" have been assembled to form one group. The mean absorbance spectrum has then been calculated for each group with the "standard" method using all the fibers and is presented on Figure .

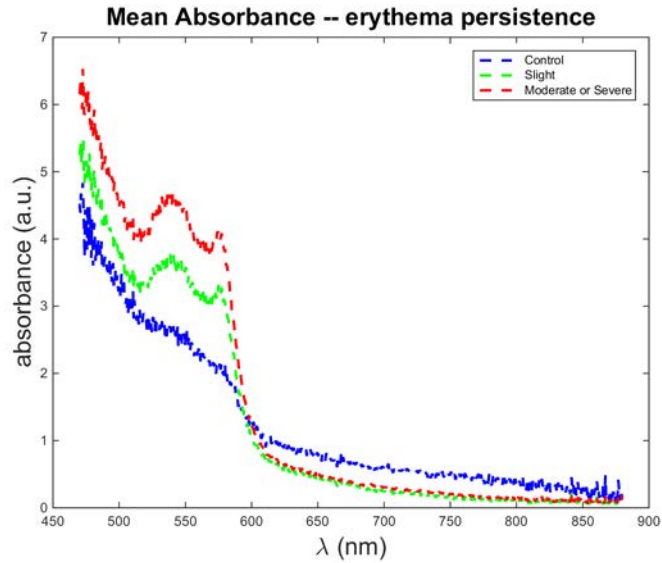


Figure 8: mean absorbance spectra of the skin according to the severity of the erythema

DRS results

The analysis of the optical properties obtained with the DRS instrument allows the observation of an increase of the absorption of the skin between 500 and 600 nm on the redness area, corresponding to the hemoglobin absorption range and together with an increase of the redness measured by the chromameter or the calibrated photographs see Figure .

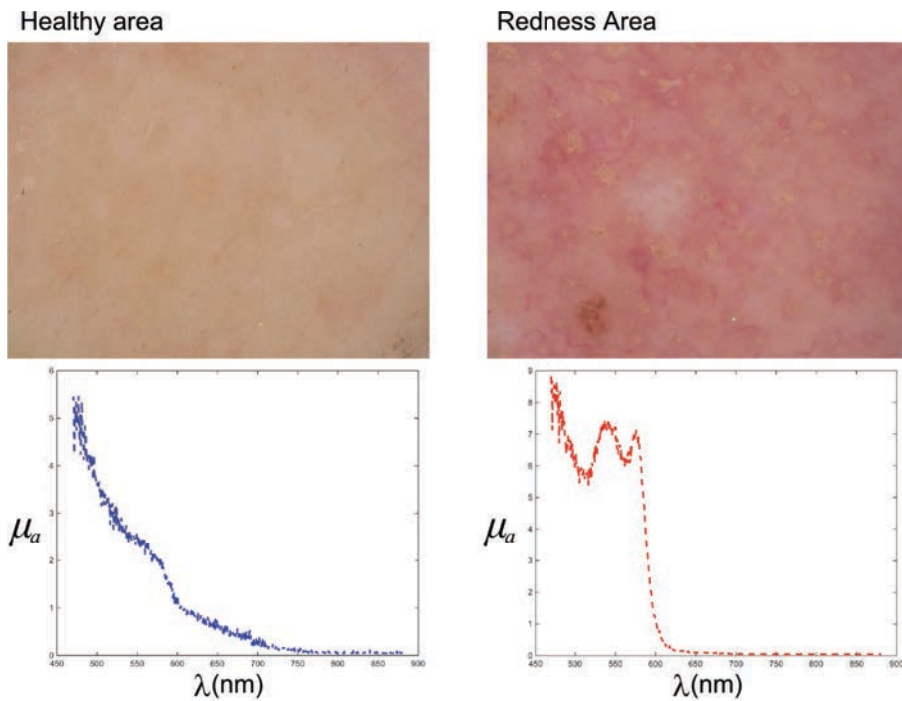


Figure 9: Comparison between a healthy area and a redness area. Color calibrated photos and absorption parameter μ_a

First results in depth

Furthermore, DRS highlights a phenomenon in depth for some subjects. The use of the so called "depth method" employed to analyze the tri-layered phantoms confirms these results. This is seen on Figure and Figure where we present the absorption coefficient extracted either with the standard method or the "depth" method for two subjects, a slight" one and a "severe" one.

For the "slight" subject, there is more or less no difference between absorption spectra of healthy or redness area when we use the standard method, see Figure a). Whereas on Figure b), a "redness" phenomenon is visible between 500-600 nm on the redness area compared to the healthy one. This is also visible on Figure for the "severe" subject where this phenomenon is further increased. Thanks to this "depth" method, one can think that redness begins for "slight" subjects by a phenomenon occurring in depth and not necessarily visible on the surface.

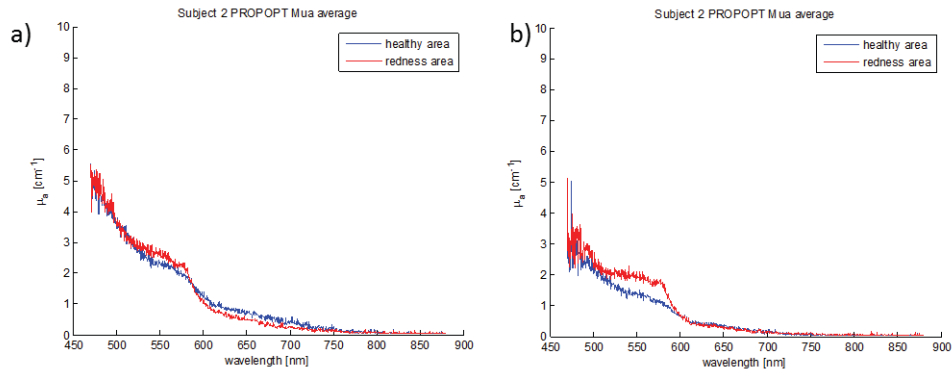


Figure 10: Comparison between a healthy area redness area absorption parameter μ_a extracted either with a) standard method or b) "depth" method for a "slight" subject.

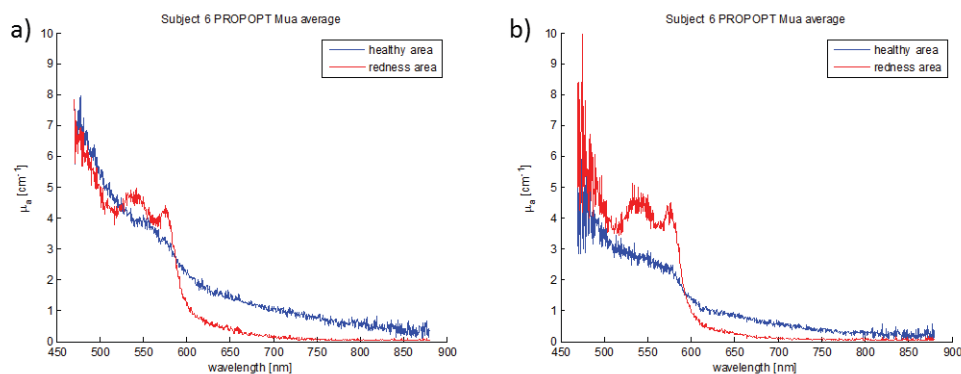


Figure 11: Comparison between a healthy area redness area absorption parameter μ_a extracted either with a) standard method or b) "depth" method for a "severe" subject.

CONCLUSION

A clinically optimized probe for reflectance spectroscopy was designed to read skin alterations. With this system we showed the possibility to access to different layers of a tissue either on phantoms or biological tissues. In fact, the extracted diffusion coefficient offers structural information that can be leveraged for other applications. Future works will concern development of a method dedicated to this DRS sectioning in depth. Other applications in skin disease diagnostics will be addressed.

ACKNOWLEDGEMENTS

We want to thank here Valerie Fontez, Anne-Lise Bardy and Christelle Carron from Pierre Fabre Dermo-Cosmétique, Toulouse, France, for having carried out the *in vivo* experiments.

REFERENCES

- [1] Bevilacqua, F. et al., "In vivo local determination of tissue optical properties: applications to human brain," *Applied optics* 38, 4939–4950 (1999).
- [2] Zonios, G. et al., "Diffuse reflectance spectroscopy of human adenomatous colon polyps in vivo," *Applied Optics* 38, p. 6628–6637 (1999).
- [3] Kollias, N. Stamatias, G., "Optical Non-Invasive Approaches to Diagnosis of Skin Diseases," *J Investig Dermatol Symp Proc* 7, 64-75 (2002).

- [4] Tseng, T.Y. et al., “Quantification of the optical properties of two layered turbid media by simultaneously analyzing the spectral and spatial information of steady-state diffuse reflectance spectroscopy,” *Biomedical Optics Express* 2(4), 901–914 (2011).
- [5] Koenig Anne, et al., “Diffuse reflectance spectroscopy: a clinical study of tuberculin skin tests reading.” *Proc. SPIE* 8592, 85920 (2013)
- [6] Jacques, S., “<http://omlc.orgi.edu/news/jan98/skinoptics.html>,” (1998).
- [7] Rajaram, N. et al., “Lookup table–based inverse model for determining optical properties of turbid media,” *Journal of biomedical optics* 13, 050501 (2008).
- [8] Ayers, F et al., “Fabrication and characterization of silicone-based tissue phantoms with tunable optical properties in the visible and near infrared domain” *Proc. SPIE* 6870, (2008)
- [9] Park, J et al., “Fabrication of double layer optical tissue phantom by spin coating method: Mimicking epidermal and dermal layer” *Proc. SPIE* 8583, (2013)
- [10] Roig Blandine, et al., “Multilayered phantoms with tunable optical properties for a better understanding of light/tissue interactions” *Proc. SPIE* 9325, 93250B (2015)

Liste des publications et communications

Participations à des congrès

Can spatially resolved diffuse reflectance spectroscopy emphasize skin collagen changes?

Roig Blandine, Guilbert Marie, Koenig Anne, Perraut François, Piot Olivier, Manfait Michel, Dinten Jean-Marc

Oral présenté en octobre 2013 à la conférence ISBS/SICC 1st JOINT INTERNATIONAL CONGRESS à Milan, Italie.

Etude du vieillissement cutané par Spectroscopie de Réflectance Diffuse appliquée au collagène

Roig Blandine, Guilbert Marie, Koenig Anne, Perraut François, Piot Olivier, Manfait Michel, Jeannesson Pierre, Dinten Jean-Marc

Poster présenté en mai 2014 à la conférence OPTDIAG à Paris, France.

Effect of elastic scattering in dry depth profiling of multi-layered phantoms with confocal Raman microspectroscopy

Roig Blandine, Koenig Anne, Perraut François, Piot Olivier, Vignoud Séverine, Manfait Michel, Jeannesson Pierre, Dinten Jean-Marc

Poster présenté en aout 2014 à la conférence ICORS (International Conference On Raman Spectroscopy) à Iena, Allemagne.

Micro-spectroscopie de réflectance diffuse appliquée à la correction de spectres Raman pour le diagnostic *in-vivo* de la peau

Roig Blandine, Perraut François, Koenig Anne, Dinten Jean-Marc, Piot Olivier, Manfait Michel

Poster présenté en juillet 2015 à la conférence Optique Bretagne (organisée par la Société Française d'Optique) à Rennes, France.

Oraux donnant lieu à proceedings

Multilayered phantoms with tunable optical properties for a better understanding of light/tissue interactions

Roig Blandine, Koenig Anne, Perraut François, Piot Olivier, Vignoud Séverine, Lavaud Jonathan, Manfait Michel, Dinten Jean-Marc

Proc. SPIE 9318, Optical Biopsy XIII: Toward Real-Time Spectroscopic Imaging and Diagnosis, 93180L (March 5, 2015)

Biophotonics of skin: method for correction of deep Raman spectra distorted by elastic scattering

Roig Blandine, Koenig Anne, Perraut François, Piot Olivier, Gobinet Cyril, Manfait Michel, Dinten Jean-Marc

Proc. SPIE 9318, Optical Biopsy XIII: Toward Real-Time Spectroscopic Imaging and Diagnosis, 93180L (March 5, 2015)

Accessing deep optical properties of skin using Diffuse Reflectance Spectroscopy

Koenig Anne, Roig Blandine, Le Digabel Jimmy, Josse Gwendal, Dinten Jean-Marc

Proc. SPIE 9537, Clinical and Biomedical Spectroscopy and Imaging IV, 95370E (July 15, 2015)

In vivo diffuse reflectance microspectroscopy for correction of Raman depth profiles acquired on skin

Roig Blandine, Koenig Anne, Perraut François, Piot Olivier, Manfait Michel, Dinten Jean-Marc

Accepté pour une présentation orale à la conférence SPIE Photonics Europe (le 6 avril 2016) à Bruxelles, Belgique.

Brevets déposés

Dispositif de mesure d'un signal optique rétrodiffusé par un échantillon

Blandine ROIG, Jean-Marc DINTEN, Anne KOENIG, François PERRAUT

Dépôt 15 50981

Procédé de caractérisation d'un échantillon par mesure d'un signal optique rétrodiffusé

Blandine ROIG, Jean-Marc DINTEN, Anne KOENIG, François PERRAUT

Dépôt 15 50982

Procédé de correction d'un signal rétrodiffusé par un échantillon et dispositif associé

Blandine ROIG, Jean-Marc DINTEN, Anne KOENIG, François PERRAUT

Dépôt 15 50983

Publications

Highlighting the impact of aging on type I collagen: label-free investigation using confocal reflectance microscopy and diffuse reflectance spectroscopy in 3D matrix model

Marie GUILBERT, Blandine ROIG, Christine TERRYN, Roselyne GARNOTEL, Pierre JEANNESSON, Ganesh D. SOCKALINGUM, Michel MANFAIT, François PERRAUT, Jean-Marc DINTEN, Anne KOENIG, Olivier PIOT

Article soumis à la revue *Aging*, en révision.

Contribution à d'autres travaux

Non-contact Quantitative Diffuse Reflectance Spectroscopy

Sorgato Veronica, Berger Michel, Emain Charlotte, Koenig Anne, Roig Blandine, Vever-Bizet Christine, Dinten Jean-Marc, Bourg-Heckly Genevieve, Planat-Chretien Anne

Proc. SPIE 9538, Diffuse Optical Imaging V, 95380U (July 16, 2015)

Caractérisation de tissus cutanés par spectroscopie bimodale : Réflectance Diffuse et Raman

L'objectif de cette thèse concerne l'association de deux techniques de mesure dans le cadre de la caractérisation *in vivo* de la peau. La première, nommée Spectroscopie de Réflectance Diffuse (DRS), permet la caractérisation des paramètres optiques de la peau analysée et quantifie les phénomènes d'absorption et de diffusion de la lumière. La deuxième est la microspectroscopie Raman. Elle fournit une identification chimique des composés analysés sans marquage. L'objet de cette thèse est d'évaluer l'effet de l'interaction lumière-matière sur les capacités de localisation et de quantification de la microspectroscopie Raman, lesquelles sont dégradées dans un milieu diffusant tel que la peau. Une approche *in vivo* bimodale (DRS et Raman) est proposée pour la caractérisation biochimique quantitative des tissus cutanés avec l'idée d'établir un protocole de correction des spectres Raman acquis, en exploitant les propriétés optiques fournies par la DRS. Elle est décomposée en trois axes de travail complémentaires : le développement d'une instrumentation DRS permettant la mesure des spectres de réflectance diffuse et le calcul des propriétés optiques dans la zone sondée par la spectroscopie Raman; le développement de fantômes optiques permettant une compréhension expérimentale des phénomènes d'absorption, de diffusion élastique et de diffusion Raman; le développement d'un protocole de correction des spectres Raman à partir des propriétés optiques obtenues par DRS.

Mots-clés : caractérisation de la peau, spectroscopie de réflectance diffuse, spectroscopie Raman, profils d'intensité Raman, fantômes optiques

Bimodal spectroscopy for *in vivo* skin characterization: Diffuse Reflectance Spectroscopy and Raman Spectroscopy

This thesis relates to the combination of two *in vivo* skin characterization techniques. On the one hand, Diffuse Reflectance Spectroscopy (DRS) enables skin optical properties characterization by quantifying light absorption and light elastic scattering. On the other hand, Raman microspectroscopy provides information on molecular compositions of tissues with no need of labeling. Localization and quantification functions of Raman microspectroscopy are both distorted in scattering media such as skin. Therefore, the aim of this thesis was to assess the effect of light-matter interactions on these functions. A bimodal method is proposed to achieve quantitative biochemical characterization of cutaneous tissues *in vivo*. The main idea is to develop a procedure of Raman spectra correction based on the quantified optical properties provided by DRS. This work was divided in three complementary approaches: the development of a system enabling diffuse reflectance and optical properties measurements in the same zone as Raman microspectroscopy; the fabrication of optical phantoms improving our knowledge on absorption, elastic scattering and Raman scattering phenomena; and the development of a Raman spectra correction model as function of the skin optical properties given by DRS measurements.

Keywords: skin characterization, diffuse reflectance spectroscopy, Raman spectroscopy, Raman depth profiling, optical phantoms

Discipline : Physique, spécialité Biophysique

MéDIAN Biophotonique et Technologies pour la Santé - UMR CNRS 7369 MEDyC
Faculté de Médecine, 51 rue Cognacq-Jay, 51096 Reims Cedex
Laboratoire d'Images et Systèmes d'Acquisition - CEA-LETI
17 rue des martyrs, F-38054 Grenoble Cedex