



**HAL**  
open science

# Tomographie optique multimodale pour le diagnostic des cancers cutanés

Léna Waszczuk

► **To cite this version:**

Léna Waszczuk. Tomographie optique multimodale pour le diagnostic des cancers cutanés. Imagerie médicale. Université Paris-Saclay, 2023. Français. NNT : 2023UPAST002 . tel-04386737

**HAL Id: tel-04386737**

**<https://theses.hal.science/tel-04386737v1>**

Submitted on 11 Jan 2024

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Tomographie optique multimodale pour le  
diagnostic des cancers cutanés  
*Multimodal optical tomography for skin cancer diagnosis*

**Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay**

École doctorale n° 575 : electrical, optical, bio : physics and engineering  
(EOBE)

Spécialité de doctorat : Electronique et Optoélectronique, Nano- et  
Microtechnologies

Graduate School : Sciences de l'ingénierie et des systèmes. Référent :  
Institut d'Optique

Thèse préparée au **Laboratoire Charles Fabry (Université Paris-Saclay,  
Institut d'Optique Graduate School, CNRS)**,  
sous la direction d'**Arnaud DUBOIS**, professeur des universités et le  
co-encadrement de **Jonas OGIEN**, docteur

**Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 9 janvier 2023, par**

**Léna WASZCZUK**

**Composition du jury**

Membres du jury avec voix délibérative

**Ali TFAYLI**

Professeur des Universités, Laboratoire de Chimie Analytique, Faculté de Pharmacie, Université Paris-Saclay

Président

**Marie-Claire SCHANNE-KLEIN**

Directrice de recherche CNRS, Laboratoire d'Optique et Biosciences, Ecole Polytechnique

Rapporteur & Examinatrice

**Olivier PIOT**

Professeur des Universités, UFR de Pharmacie, Université de Reims Champagne-Ardenne

Rapporteur & Examineur

**Amir NAHAS**

Maitre de conférences, Laboratoire ICUBE, Université de Strasbourg

Examineur

**Titre :** Tomographie optique multimodale pour le diagnostic des cancers cutanés

**Mots clés :** Microscopie, Spectroscopie, OCT, Interférométrie, Dermatologie

**Résumé :** Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, 1/3 des cancers est un cancer de la peau. Actuellement, le diagnostic des cancers cutanés est basé sur un examen clinique suivi d'une biopsie et d'une analyse histologique. Cependant cette procédure est invasive et chronophage. De plus, la biopsie étant décidée à partir d'une inspection visuelle en surface de la peau, de nombreux cancers sont manqués à un stade précoce alors qu'ils sont encore curables.

La tomographie par cohérence optique focale à balayage de ligne (LC-OCT) est une technique d'imagerie interférométrique inventée au Laboratoire Charles Fabry à l'Institut d'Optique, et développée par l'entreprise DAMAE Medical. La LC-OCT permet de réaliser des biopsies optiques *in vivo* en fournissant des images à l'échelle cellulaire des lésions cutanées de façon non invasive. Cependant, la LC-OCT apporte uniquement une informa-

tion morphologique, là où l'histologie apporte une information fonctionnelle complémentaire grâce à l'application de colorants, se fixant sélectivement sur certaines structures de l'échantillon.

Dans ce manuscrit, nous présentons les développements menés pour apporter des informations complémentaires à l'imagerie LC-OCT, en suivant deux approches différentes. Dans une première approche, nous investiguons l'apport d'informations complémentaires à partir d'images existantes, en extrayant les propriétés optiques de diffusion (coefficient de diffusion et facteur d'anisotropie de diffusion) des échantillons imagés, à une échelle macroscopique. Dans une seconde approche, nous présentons le couplage de la LC-OCT à la microscopie Raman confocale, une technique basée sur l'analyse des vibrations des liaisons chimiques, permettant d'apporter des informations moléculaires locales au sein d'une image 3D de LC-OCT.

**Title :** Multimodal optical tomography for skin cancer diagnosis

**Keywords :** Microscopy, Spectroscopy, OCT, Interferometry, Dermatology

**Abstract :** According to the World Health Organization, 1/3 of all cancers are skin cancer. The diagnosis of skin cancers is based on a clinical examination followed by a biopsy and a histological analysis. Moreover, since the biopsy is decided on the basis of a visual inspection of the skin surface, many cancers are missed at an early stage when they are still curable.

Line-field confocal optical coherence tomography (LC-OCT) is an interferometric imaging technique invented at the Charles Fabry Laboratory at the Institut d'Optique, and developed by the company DAMAE Medical. LC-OCT allows to perform optical biopsies *in vivo*, providing cell-level images of skin lesions in a non-invasive manner. However, LC-OCT only provides morphological information, whereas histology provides complementary func-

tional information through the use of dyes, which selectively bind to specific structures in the sample.

In this manuscript, we present the developments carried out to bring complementary information to LC-OCT imaging, based on two different approaches. In a first approach, we investigate how complementary information can be obtained from existing images, by extracting the optical scattering properties (scattering coefficient and scattering anisotropy factor) from LC-OCT images at a macroscopic scale. In a second approach, we present the coupling of LC-OCT to confocal Raman microspectroscopy, a technique based on the analysis of chemical bond vibrations, allowing to provide local molecular information within a 3D LC-OCT image.

## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de thèse, Arnaud Dubois, et mon encadrant, Jonas Ogien, de m'avoir confié ce sujet de thèse et d'avoir encadré mon travail au cours de ces trois dernières années. Je vous remercie pour votre aide, votre disponibilité et votre bienveillance qui m'ont permis de mener à bien cette thèse. Votre expérience et votre recul ont toujours été d'une précieuse aide pour aiguiller mon travail et progresser.

Je remercie Marie-Claire Schanne-Klein et Olivier Piot d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit. Je remercie également Ali Tfayli et Amir Nahas d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse.

Je remercie l'entreprise DAMAE Medical qui a co-financé ma thèse et qui m'a permis de la réaliser dans d'excellentes conditions. Merci de m'avoir fourni les ressources techniques nécessaires à mes travaux de recherche, de m'avoir permis de les valoriser rapidement d'un point de vue applicatif et de m'avoir permis de communiquer mes travaux en conférences.

Je tiens à remercier l'ensemble des membres de DAMAE Medical pour leur aide au cours de ces trois années. Je remercie en particulier Olivier et Corentin pour leur travail et le temps qu'ils ont consacré à la conception de la sonde Raman, de la plateforme de co-localisation et de la sonde couplée LC-OCT/Raman. Je remercie également Alexis pour sa disponibilité et son aide sur tous les questionnements techniques que j'ai pu avoir sur la LC-OCT, ainsi que son aide pour le montage de la sonde Raman et de la sonde couplée LC-OCT/Raman. Je remercie Anthony pour son aide sur les problématiques liées au traitement d'images que j'ai rencontrées pendant ma thèse. Je remercie également Cyril pour son aide sur l'automatisation de la plateforme de co-localisation. Je remercie Mélanie pour son expertise sur les sujets cliniques et cosmétiques liés à ma thèse, ainsi que son aide pour me permettre de valoriser mes travaux dans les projets applicatifs de l'entreprise. Je remercie également Clara pour son soutien et son aide sur les questions cliniques que j'ai pu avoir au cours de ma thèse. Un grand merci également aux membres de la team « DeepPoz », Théo, Pierre, Flora et Kassandra pour le plaisir des discussions autour d'un café. En particulier, je remercie affectueusement Flora pour son aide et son soutien sans faille entre doctorantes de DAMAE.

Je remercie également tous les personnes avec qui j'ai pu travailler au cours de cette thèse au-delà de DAMAE. Je remercie chaleureusement Frédéric Pain de m'avoir permis d'utiliser son banc de sphères intégrantes et transmission collimatée au laboratoire, de m'avoir appris à fabriquer des échantillons fantômes et de m'avoir aidée face aux difficultés rencontrées sur le projet de mesure des propriétés optiques. Un grand merci aussi à Marc Chammas pour son aide et son soutien moral lors des fastidieuses sessions de mesure au laboratoire.

Je remercie à nouveau Ali Tfayli pour son expertise précieuse sur les acquisitions et traitements des spectres Raman. Merci également de m'avoir permis l'accès au microscope Raman pour mes premières expérimentations Raman. Je remercie Ali Assi pour son aide sur les expérimentations Raman et sa disponibilité pour me conseiller sur les analyses des spectres.

Je remercie également Jean-Luc Perrot de m'avoir permis de valider mes travaux de thèse sur les biopsies et chirurgies de peau qu'il m'a confiées, et de m'avoir toujours encouragée dans l'avancée du projet Raman avec un très grand enthousiasme. Je remercie également Maximiliane Wußmann et



Lisa Kieseletter de l'institut Fraunhofer ISC de m'avoir permis de réaliser des acquisitions Raman sur leurs modèles *in vitro* et de partager les résultats obtenus dans ce manuscrit. Je remercie l'entreprise Chanel, en particulier Kamilia Kemel et François Lejeune, de m'avoir permis d'effectuer la preuve de concept de la transposition de la co-localisation LC-OCT/Raman à leur système Raman et de m'avoir permis de réaliser des expérimentations sur leurs explants.

Bien que n'ayant pas passé beaucoup de temps au cours de ma thèse dans les locaux du laboratoire Charles Fabry, je remercie l'ensemble des membres du groupe biophotonique pour leur accueil, ainsi que leurs retours et suggestions lors des présentations de mes travaux au laboratoire. Merci aux doctorants du groupe pour leur aide et leur bonne humeur lors de chacune de mes venues au laboratoire.

D'un point de vue plus personnel, je remercie ma famille de m'avoir permis d'aller au bout de ce diplôme et de m'avoir toujours aidée et conseillée au cours de mes études. Je remercie aussi tous mes amis de m'avoir toujours encouragée et changé les idées. Je remercie enfin mon compagnon Oscar d'avoir toujours été là pour croire en moi et m'épauler.

# Table des matières

<b>Table des figures</b>	<b>9</b>
<b>Liste des tableaux</b>	<b>23</b>
<b>Introduction générale</b>	<b>26</b>
<b>1 Introduction aux techniques d'imagerie et de spectroscopie optiques de la peau</b>	<b>27</b>
1.1 Les enjeux autour du diagnostic du cancer de la peau . . . . .	27
1.1.1 Description de la peau . . . . .	27
1.1.2 Le cancer de la peau . . . . .	29
1.1.3 Le diagnostic du cancer cutané . . . . .	30
1.2 Les interactions entre la lumière et les tissus biologiques . . . . .	32
1.2.1 Interactions avec une particule . . . . .	33
1.2.1.1 Phénomène d'absorption . . . . .	33
1.2.1.2 Phénomène de diffusion . . . . .	33
1.2.1.3 Théorie de Mie . . . . .	34
1.2.2 Interactions avec un milieu composé d'une multitude de particules . . . . .	35
1.2.3 Equation de transfert radiatif . . . . .	37
1.2.4 Propriétés optiques de la peau . . . . .	38
1.2.4.1 Absorption . . . . .	38
1.2.4.2 Diffusion . . . . .	39
1.2.5 Lien avec l'imagerie et la spectroscopie optique . . . . .	40
1.3 L'état de l'art des techniques de microscopie optique en réflectance de la peau . . . . .	41
1.3.1 La microscopie confocale en réflectance . . . . .	41
1.3.2 La tomographie par cohérence optique . . . . .	44
1.3.3 La tomographie par cohérence optique confocale à balayage de ligne (LC-OCT) . . . . .	45
1.4 L'état de l'art des méthodes de microscopie et spectroscopie moléculaires de la peau . . . . .	46
1.4.1 Les méthodes de fluorescence à un photon . . . . .	46
1.4.1.1 La microscopie confocale en fluorescence . . . . .	46
1.4.1.2 La spectroscopie d'auto-fluorescence . . . . .	49
1.4.2 Les techniques de fluorescence non-linéaire . . . . .	50
1.4.2.1 La microscopie de fluorescence à deux photons et la microscopie de seconde et triple harmoniques . . . . .	50
1.4.2.2 La microscopie de fluorescence en temps de vie . . . . .	52
1.4.3 La spectroscopie de réflexion diffuse . . . . .	55
1.4.4 La spectroscopie Raman . . . . .	56

<b>2</b>	<b>La tomographie par cohérence optique confocale à balayage de ligne (LC-OCT)</b>	<b>61</b>
2.1	Le principe de l'OCT . . . . .	61
2.2	La microscopie par cohérence optique (OCM) . . . . .	64
2.3	La tomographie par cohérence optique confocale à balayage de ligne (LC-OCT) . . . . .	66
2.3.1	Principaux composants du système d'imagerie LC-OCT . . . . .	67
2.3.1.1	Source . . . . .	67
2.3.1.2	Eclairage en ligne . . . . .	67
2.3.1.3	Objectifs de microscope . . . . .	68
2.3.1.4	Surface de référence . . . . .	68
2.3.1.5	Milieu d'immersion . . . . .	69
2.3.1.6	Détection et filtrage confocal . . . . .	70
2.3.2	Modularité <i>in vivo/ex vivo</i> . . . . .	70
2.3.3	Modes d'imagerie LC-OCT . . . . .	71
2.3.3.1	Génération d'images en coupe verticale . . . . .	71
2.3.3.2	Génération d'images en coupe horizontale . . . . .	73
2.3.3.3	Génération d'images 3D . . . . .	73
2.3.4	Voie d'imagerie dermoscopique . . . . .	75
2.3.5	Atouts de la LC-OCT pour l'imagerie <i>in vivo</i> de la peau . . . . .	76
2.3.6	Vers un besoin de multimodalité . . . . .	77
<b>3</b>	<b>Mesure des propriétés optiques de diffusion en LC-OCT</b>	<b>79</b>
3.1	Etat de l'art des techniques de mesure des propriétés optiques . . . . .	80
3.2	Méthodes de mesure des propriétés optiques en OCT et RCM . . . . .	84
3.2.1	Méthodes basées sur un modèle de diffusion simple . . . . .	84
3.2.1.1	Méthode dite de « curve-fitting » . . . . .	86
3.2.1.2	Méthode résolue en profondeur . . . . .	88
3.2.2	Méthodes basées sur un modèle de diffusion multiple . . . . .	92
3.2.2.1	Méthode développée par S. Jacques <i>et al.</i> . . . . .	92
3.2.2.2	Méthode basée sur le principe EHF (« Extended Huygens–Fresnel principle ») . . . . .	97
3.2.3	Choix de la méthode pour application à la LC-OCT . . . . .	99
3.3	Développement d'une méthode de mesure des propriétés optiques à partir d'images LC-OCT . . . . .	100
3.3.1	Fabrication d'échantillons . . . . .	100
3.3.2	Caractérisation des échantillons par sphères intégrantes et transmission collimatée	104
3.3.2.1	Montage . . . . .	104
3.3.2.2	Méthode Inverse Adding-Doubling . . . . .	105
3.3.2.3	Caractérisation des fantômes monocouches . . . . .	105
3.3.3	Mesures à partir d'images 3D LC-OCT . . . . .	108
3.3.3.1	Mesure des paramètres $\rho$ et $\mu_{eff}$ . . . . .	109
3.3.3.2	Extraction des propriétés optiques $\mu_s$ et $g$ . . . . .	109
3.3.3.3	Calibration . . . . .	111
3.3.3.4	Mesure de $\mu_s$ et $g$ - fantômes monocouches . . . . .	112

3.3.3.5	Mesure de $\mu_s$ et $g$ résolue par couche . . . . .	114
3.3.3.6	Mesure de $\mu_s$ et $g$ résolue latéralement . . . . .	116
3.4	Application à la peau . . . . .	118
3.5	Conclusion et perspectives . . . . .	121
<b>4</b>	<b>Couplage de la LC-OCT à la microspectroscopie Raman confocale (CRM)</b>	<b>123</b>
4.1	Introduction . . . . .	123
4.2	Etat de l'art des couplages de systèmes d'imagerie OCT et RCM à la spectroscopie Raman . . . . .	125
4.3	Choix de la méthode de couplage . . . . .	126
4.4	Instrumentation du système de microspectroscopie Raman confocale . . . . .	127
4.4.1	Source . . . . .	127
4.4.2	Filtres . . . . .	129
4.4.3	Objectif de microscope . . . . .	130
4.4.4	Filtrage confocal . . . . .	132
4.4.5	Spectromètre . . . . .	134
4.4.6	Voie d'imagerie dermoscopique . . . . .	136
4.5	Acquisitions de spectres Raman de peau <i>ex vivo</i> . . . . .	136
4.5.1	Porte-échantillon . . . . .	137
4.5.2	Acquisition de spectres Raman . . . . .	139
4.5.3	Traitements des spectres . . . . .	140
4.5.4	Lecture des spectres Raman . . . . .	141
4.5.5	Acquisitions en profondeur . . . . .	141
4.6	Co-localisation LC-OCT/CRM <i>ex vivo</i> avec deux systèmes distincts . . . . .	143
4.6.1	Montage et principe de la co-localisation LC-OCT/CRM . . . . .	143
4.6.2	Calibration des platines de translations XYZ . . . . .	145
4.6.3	Validation de la co-localisation LC-OCT/CRM sur peau de cochon tatouée . . . . .	148
4.6.4	Application de la co-localisation LC-OCT/CRM à la caractérisation de biopsies de tatouage . . . . .	152
4.6.4.1	Description des biopsies de tatouage et intérêt clinique . . . . .	152
4.6.4.2	Caractérisation morpho-moléculaire de biopsies de tatouage . . . . .	154
4.6.5	Co-localisation entre la LC-OCT et un système de CRM commercial . . . . .	163
4.6.6	Conclusion sur la co-localisation LC-OCT/CRM avec deux systèmes distincts . . . . .	166
4.7	Co-localisation LC-OCT/CRM <i>ex vivo</i> avec une plateforme motorisée . . . . .	167
4.7.1	Conception d'une sonde de microspectroscopie Raman . . . . .	167
4.7.2	Intégration au sein d'une plateforme motorisée de co-localisation . . . . .	170
4.7.3	Expérimentations au CHU de Saint-Etienne avec la plateforme de co-localisation LC-OCT/CRM . . . . .	171
4.7.3.1	Acquisitions et traitements des spectres Raman . . . . .	171
4.7.3.2	Caractérisation des différentes couches de peau saine . . . . .	172
4.7.3.3	Caractérisation d'une chirurgie de carcinome basocellulaire . . . . .	176
4.7.4	Expérimentations sur modèles <i>in vitro</i> de mélanomes avec la plateforme de co-localisation LC-OCT/CRM . . . . .	181

4.7.4.1	Description des modèles de mélanome et imagerie LC-OCT . . . . .	181
4.7.4.2	Acquisitions Raman . . . . .	182
4.7.4.3	Caractérisation moléculaire des modèles de mélanome . . . . .	184
4.7.5	Conclusion sur la co-localisation LC-OCT/CRM <i>ex vivo</i> avec la plateforme motorisée . . . . .	189
4.8	Applications <i>in vivo</i> de la sonde de CRM . . . . .	190
4.8.1	Acquisitions <i>in vivo</i> en profondeur . . . . .	191
4.8.2	Co-localisation LC-OCT/CRM <i>in vivo</i> . . . . .	191
4.8.3	Conclusion sur les applications <i>in vivo</i> de la sonde de CRM . . . . .	195
4.9	Conclusion et perspectives . . . . .	196
<b>Conclusion générale</b>		<b>202</b>
<b>A Interférences à deux ondes</b>		<b>203</b>
A.1	Lumière monochromatique . . . . .	203
A.2	Lumière polychromatique . . . . .	203
<b>B OCT temporel et OCT fréquentiel</b>		<b>207</b>
<b>Liste de publications</b>		<b>209</b>
<b>Bibliographie</b>		<b>211</b>

## Table des figures

1.1	a) Schéma descriptif de la peau avec ces différentes couches. Figure tirée de [1]. b) Schéma des couches et cellules de l'épiderme. Figure tirée de [2]. . . . .	27
1.2	Image de dermoscopie d'un mélanome, avec l'image clinique (visualisation à l'œil nu) en insert. Figure extraite de [3]. . . . .	30
1.3	Coupe histologique H&E d'un échantillon de peau saine, avec attribution des différentes couches de la peau. Figure extraite de [4]. . . . .	31
1.4	Coupes histologiques d'un mélanome présentant la mutation V600E du gène BRAF. A) Coloration H&E (grossissement x100. B) et C) Coloration immunohistochimique avec marqueur de la mutation BRAF V600E (grossissement 100x et 400x). Certaines cellules, représentées par des flèches, sont positives à la mutation, contrairement à celles pointées par les astérisques, détectées négatives. Figure extraite de [5]. . . . .	32
1.5	Illustration du facteur d'anisotropie de diffusion $g$ et de la fonction de phase $p(\theta)$ . La lumière incidente (flèche noire), suite un événement de diffusion, est redistribuée dans l'espace selon des directions représentées par les flèches bleues. Les trajectoires de la lumière diffusée sont représentées par des flèches bleues et sont principalement dirigées vers l'avant. Une composante avant moyenne, correspondant au facteur d'anisotropie de diffusion $g = \langle \cos(\theta) \rangle$ est représentée par une flèche rouge. Figure extraite de [6].	34
1.6	Illustration de la décroissance de Beer-Lambert de l'intensité incidente $I_0$ au travers d'un milieu diffusant d'épaisseur $L$ , composé de $\gamma$ particules par unité de volume, caractérisées par section efficace d'extinction $\sigma_e$ . La décroissance est exponentielle avec un coefficient de décroissance $\mu_e$ défini comme le coefficient d'extinction. . . . .	35
1.7	Illustration des différents régimes de diffusion : diffusion simple, diffusion multiple et approximation de la diffusion. Figure extraite puis adaptée de [7]. . . . .	36
1.8	Illustration du lien entre $\mu'_s$ , $\mu_s$ et $g$ dans le cas où $g = 0.90$ . Effectuer une marche aléatoire avec un pas $mpf' = l'_s = 1/\mu'_s$ où chaque pas correspond à un événement de diffusion isotrope est équivalent à effectuer 10 pas de taille $mpf = l_s = 1/\mu_s = 0.1mpf'$ où chaque pas correspond à un événement de diffusion anisotrope, déviant la trajectoire d'un angle $\theta$ par rapport à la trajectoire incidente. Figure extraite de [8].	37
1.9	Spectres du coefficient d'absorption des principaux chromophores de la peau. L'absorption de la peau connaît un minimum entre 600 et 1300 nm, gamme appelée « fenêtre thérapeutique ». Figure extraite de [9]. . . . .	39
1.10	Catégorisation des photons se propageant au sein d'un milieu absorbant et/ou diffusant en fonction de leurs interactions avec le milieu. Figure extraite de [10]. . . . .	41

1.11	Schéma de principe de la microscopie confocale. a) Le tissu à imager est éclairé par un faisceau focalisé en un point par un objectif de microscope (faisceau jaune). Ce faisceau, bien que focalisé, éclaire toute la profondeur du tissu. Un certain nombre de photons sont ainsi rétro-diffusés sur toute la profondeur du tissu, illustrés par le faisceau vert. b) L'utilisation d'un diaphragme placé avant le détecteur, conjugué du point de focalisation, permet de laisser passer les photons rétro-diffusés au niveau du point de focalisation, dont l'image par l'objectif est focalisée sur le capteur. c) Les photons rétro-diffusés en dehors du point de focalisation, dont l'image par l'objectif est défocalisée sur le capteur, sont majoritairement rejetés par le diaphragme. Figure extraite de [10]. . . . .	42
1.12	Images horizontales de peau saine, acquises dans les différentes couches de la peau par un système de RCM Vivascope. Images issues et adaptées de [11]. . . . .	43
1.13	Image OCT d'une peau saine imagée avec le système commercial Vivosight, montrant les principales couches superficielles et structures de la peau sur champ de vue de 6 mm × 6 mm ( $x \times z$ ). Figure issue de [12]. . . . .	45
1.14	Image LC-OCT 3D d'une peau saine, couvrant un champ de vue de 1.2 mm × 0.5 mm × 0.5 mm ( $x \times y \times z$ ) avec une résolution isotrope de $\sim 1 \mu\text{m}$ . . . . .	46
1.15	Illustration du phénomène de fluorescence sur un diagramme de Jablonski représentant deux états électroniques (excité et fondamental) avec leurs différents états vibrationnels. Figure issue de [13]. . . . .	47
1.16	a) Spectres d'absorption et b) d'émission d'auto-fluorescence des principaux fluorophores endogènes des tissus biologiques. Figure issue de [14]. . . . .	48
1.17	Images de microscopie confocale en fluorescence de la peau saine, marquée à la fluorescéine. a) Image de la couche cornée. Les espaces intercellulaires environnants apparaissent sous la forme d'un bord brillant dû à l'accumulation de fluorescéine (flèche noire). b) Image du stratum spinosum (SS) avec ses kératinocytes. c) Image de la couche basale (SB), présentant des kératinocytes et des papilles (PS). Le centre de chaque papille apparaît clair en raison de l'accumulation de fluorescéine. Figure issue de [15]. . . . .	48
1.18	Spectres d'auto-fluorescence de la peau saine à différentes longueurs d'onde d'excitation (de 270 à 500 nm) et identification des principaux composés fluorescents endogènes observés. Figure issue de [16]. . . . .	50
1.19	Diagramme de Jablonski décrivant les mécanismes de génération de fluorescence à deux photons, de seconde harmonique (SHG) et de troisième harmonique (THG). Figure issue de [10]. . . . .	51
1.20	Images de microscopie non-linéaire (fluorescence à deux photons et génération de seconde harmonique) des différentes couches de la peau saine. Ces images permettent d'observer les cellules basales de l'épiderme (en vert), les fibres d'élastine du derme (en vert), les papilles dermiques (en bleu) et les fibres de collagène (en bleu). Figure issue de [17]. . . . .	51
1.21	Spectres d'absorption, d'émission et temps de vie de fluorescence des fluorophores endogènes principaux des organismes biologiques. Figure issue de [18]. . . . .	52

1.22	Description du principe de la méthode TCSPC pour la mesure du temps de vie de fluorescence. Figure issue de [19]. . . . .	53
1.23	Images horizontales des différentes couches de la peau acquises en microscopie de fluorescence conventionnelle et en microscopie FLIM, avec une excitation à 740 nm. Figure issue de [20]. . . . .	54
1.24	Illustration du principe utilisé en spectroscopie de réflectance diffuse. La lumière incidente sur l'échantillon (au point $x_i$ ) est multiples fois diffusée dans le tissu jusqu'à émerger sous forme de réflectance diffuse au point $x_f$ . Cette réflectance diffuse peut être collectée et analysée spectralement pour extraire les propriétés optiques du milieu traversé. Figure extraite de [21] . . . . .	55
1.25	Montage expérimental d'un système de spectroscopie de réflectance diffuse, qui comprend une source de lumière blanche, un spectromètre et une sonde fibrée en contact de l'échantillon. Figure extraite de [21] . . . . .	56
1.26	Diagramme de Jablonski des niveaux d'énergie impliqués dans la fluorescence, l'absorption infrarouge, la diffusion Rayleigh, la diffusion inélastique Raman Stokes et anti-Stokes. L'absorption infrarouge est également représentée, un phénomène exploité par la spectroscopie infrarouge. Figure issue de [22]. . . . .	58
1.27	Spectre de diffusion Raman des différentes couches de la peau (épiderme, jonction épiderme/derme et derme). Figure extraite de [23]. . . . .	59
2.1	Interféromètre de Michelson dans le cas où l'échantillon est un milieu diffusant quelconque d'indice optique moyen $n$ . Figure tirée de [24]. . . . .	62
2.2	Montage classique d'OCT. Des fibres optiques permettent de guider la lumière dans chaque bras. Le bras de référence et le bras objet sont séparés puis recombinaison via un coupleur de fibres. Le bras objet illumine l'échantillon avec un faisceau focalisé dans l'échantillon, présentant une résolution latérale $\Delta x$ et $\Delta y$ . Un filtrage confocal effectué par la fibre du bras objet permet de collecter le signal sur une profondeur de champ $\Delta z$ . Figure tirée de [24]. . . . .	63
2.3	Schéma du montage de la LC-OCT. FM : fibre monomode ; C : collimateur ; LC : lentille cylindrique ; CS : cube séparateur ; M : miroir de renvoi ; LSG : lame séparatrice montée sur un galvanomètre ; OM : objectif de microscope ; LT : lentille de tube ; SR : surface de référence ; L : lame de verre, identique à la surface de référence ; IM : milieu d'immersion ; PZT : piézoélectrique ; L1 : objectif de la voie dermoscopique ; L2 : oculaire de la voie dermoscopique ; PB : filtre passe-bas. . . . .	66
2.4	Illustration de la séparation des plans de cohérence et de focalisation lorsque l'indice optique $n_{im}$ du milieu d'immersion est différent de l'indice optique $n$ de l'échantillon. a) Configuration initiale où les plans de cohérence et de focalisation sont superposés à la surface de l'échantillon. b) Séparation des plans de cohérence et de focalisation lorsque l'on pénètre d'une distance $z$ dans l'échantillon. Figure extraite de [25]. . . . .	69
2.5	Images en coupe verticale d'une peau saine, acquise <i>in vivo</i> . L'image en coupe permet de visualiser les différentes couches superficielles et structures cellulaires de la peau. SC : stratum corneum ; E : épiderme ; JDE : jonction derme-épiderme ; DP : derme papillaire ; DR : derme réticulaire. . . . .	72



2.6	Images en coupe horizontale d'une peau saine, acquises dans les différentes couches de la peau : a) couche cornée, b) couche épineuse, c) couche basale et d) derme papillaire. La profondeur $Z$ dans la peau est indiquée pour chaque image horizontale, et corrélée à une image en coupe verticale. Figure extraire de [26]. . . . .	74
2.7	Image dermoscopique, ou image de surface de la peau, acquise avec le dispositif de LC-OCT sur un grain de beauté. L'image est affichée en couleurs et couvre un champ de 3 mm de diamètre, avec une résolution latérale de $\sim 5 \mu\text{m}$ [27]. . . . .	75
3.1	Représentation schématique d'un montage à deux sphères intégrantes. L'échantillon est placé entre les deux sphères et éclairé par un faisceau collimaté. La lumière réfléchi (transmise) par l'échantillon est multiples fois réfléchi par le revêtement de la première (seconde) sphère. Une fraction de cette lumière est collectée par le détecteur de la sphère, permettant une mesure de réflectance (transmittance) de l'échantillon. Figure extraite de [28]. . . . .	81
3.2	Illustration d'une mesure goniométrique de la fonction de phase $p(\theta)$ L'échantillon est éclairé par un faisceau collimaté en incidence normale, et la lumière diffusée à chaque angle $\theta$ est collectée par un détecteur en rotation autour de l'échantillon. Figure extraite de [29]. . . . .	82
3.3	a) Illustration d'un montage de réflectométrie en incidence oblique. (b) lien entre l'éclairage laser en incidence oblique et la position du point source isotrope induit en profondeur dans l'échantillon. Figures extraites de [30]. . . . .	82
3.4	Exemple de montage de technique résolue en temps pour la mesure de propriétés optiques. Une impulsion ultracourte est envoyée dans l'échantillon. Les photons sont multiples fois diffusés dans le tissu puis collectés à une distance $r$ du point d'émission. L'analyse de la réponse temporelle $R(r, t)$ du tissu à l'impulsion permet, par des modèles mathématiques, de remonter aux propriétés optiques du tissu. Figure extraite de [31]. . . . .	83
3.5	Illustration du principe de la méthode « curve-fitting » pour la mesure du coefficient d'atténuation $\mu_e$ . a, b) Image OCT 3D (vues orthogonales) d'une lésion de peau bénigne. Une région d'intérêt est sélectionnée dans l'image horizontale (carré vert). Le profil axial d'intensité moyen dans cette région d'intérêt est extrait et donné en c). En appliquant un logarithme népérien au profil en c), on obtient un profil, illustré en d), présentant des zones de décroissances linéaires, correspondant chacune à une couche de peau (épiderme, derme papillaire superficiel, derme papillaire profond et derme réticulaire superficiel). En appliquant une régression linéaire sur chaque zone de décroissance linéaire, le coefficient d'atténuation $\mu_e$ peut être extrait pour chaque couche. Figure extraite et adaptée de [32]. . . . .	87

3.6	Application de la méthode de mesure du coefficient d'atténuation $\mu_e$ résolue en profondeur proposée par Vermeer <i>et al.</i> [33] à une image LC-OCT verticale de la peau saine. L'image verticale de LC-OCT montre une diminution de l'intensité avec la profondeur dans la peau, en raison de l'atténuation de l'intensité incidente. L'application de la méthode de Vermeer à chaque profil axial de l'image ( <i>i.e.</i> colonne de l'image) permet d'obtenir une cartographie 2D du coefficient d'atténuation $\mu_e(x, z)$ . Cette cartographie correspond à une image de même résolution spatiale que l'image LC-OCT originale, corrigée de l'atténuation de l'intensité en profondeur. . . . .	90
3.7	Evolution du facteur $G$ avec l'ouverture numérique (NA) du système d'imagerie, dans le cas d'un objectif à immersion eau et d'un milieu de propagation d'indice optique 1.4. Figure extraite et adaptée de [34]. . . . .	94
3.8	Evolution du facteur d'efficacité de diffusion $a(g)$ avec le facteur d'anisotropie $g$ du milieu de propagation. . . . .	94
3.9	a) Evolution de l'efficacité de collection de la diffusion $b(g, ON)$ avec l'ouverture numérique (NA) du système d'imagerie pour différentes valeurs du facteur d'anisotropie $g = [0 : 0.1 : 0.90.99]$ du milieu de propagation. b) Evolution de l'efficacité de collection de la diffusion $b(g, ON)$ avec le facteur d'anisotropie $g$ du milieu de propagation, pour différentes valeurs de l'ouverture numérique ( $NA = [0 : 0.1 : 1]$ ). Figure extraite de [34]. . . . .	95
3.10	Exemple de grille générée par le modèle de Jacques <i>et al.</i> , reliant les valeurs de $\mu_s$ et $g$ aux valeurs de $\mu_{eff}$ et $\rho$ . Grille générée pour une longueur d'onde $\lambda = 800$ nm, une ouverture numérique de 0.9 et $n_{milieu} = 1.4$ . Figure extraite et adaptée de [34].	96
3.11	Simulation d'un profil d'intensité $I(z)$ en présence de diffusion multiple selon le modèle EHF [35], pour $\mu_s = 15$ mm <sup>-1</sup> et $g = 0.8$ . L'intensité $I(z)$ peut être décomposée selon 3 termes liés à la diffusion simple et/ou multiple. . . . .	98
3.12	Photographie de deux fantômes monocouches. . . . .	102
3.13	Image LC-OCT verticale ( <i>i.e.</i> , vue en coupe) d'un fantôme bicouche. L'image LC-OCT est affichée en échelle d'intensité logarithmique (unité arbitraire). . . . .	103
3.14	Photographie du montage de transmission collimatée à 785 nm. Le faisceau laser à 785 nm est collimaté en sortie de fibre et réduit à un diamètre 1 mm par un diaphragme. Le fantôme est placé quelques cm derrière le diaphragme, perpendiculairement au faisceau laser (représenté par la flèche rouge). Une fibre de collection, reliée à un spectromètre, est placée à un mètre derrière le fantôme afin de collecter la lumière balistique. Du fait de son petit diamètre et de son ouverture numérique faible, la fibre fait office de sténopé permettant de rejeter les photons diffusés. . . . .	105
3.15	Valeurs de $\mu_a$ (en gris), $\mu_s$ (en bleu) et $g$ (en orange) obtenues pour les dix fantômes monocouches par sphères intégrantes et transmission collimatée. . . . .	107
3.16	a) Image LC-OCT 3D (vues horizontale et verticale) d'un fantôme composé de PDMS et de particules de TiO <sub>2</sub> , en échelle d'intensité logarithmique et (b) profil d'intensité moyenne $I(z)$ dans l'image LC-OCT 3D en fonction de la profondeur, en échelle logarithmique. Une régression linéaire (ligne rouge) est appliquée sur le profil d'intensité pour obtenir la mesure de la paire d'observables $\mu$ et $\rho$ . . . . .	110

3.17	Rapport de $\frac{\mu_{e\text{eff}}}{\rho}$ en fonction de $g$ , calculé pour $\lambda = 800$ nm, $ON = 0.5$ et $\Delta z = 1.2$ $\mu\text{m}$ . . . . .	110
3.18	Comparaison des valeurs de $\mu_s$ obtenues par LC-OCT (bleu foncé) et des mesures combinées par sphères intégrantes et transmission collimatée (bleu clair) sur des fantômes monocouches. . . . .	112
3.19	Comparaison des valeurs de $g$ obtenues par LC-OCT (orange foncé) et des mesures combinées par sphères intégrantes et transmission collimatée (orange clair) sur des fantômes monocouches. . . . .	112
3.20	Profil d'intensité moyenne $I(z)$ dans l'image LC-OCT 3D d'un fantôme bicouche en fonction de la profondeur (en échelle logarithmique). Pour chaque couche, une régression linéaire (ligne rouge) est appliquée au profil d'intensité afin d'obtenir la mesure de la paire d'observables $(\rho_{sup}, \mu_{e\text{eff}\ sup})$ et $(\rho_{inf}, \mu_{e\text{eff}\ inf})$ . La valeur de $\rho_{inf}$ est extraite de l'intersection de $\ln I(z)$ avec l'interface entre les deux couches ( $z = 110$ $\mu\text{m}$ ) corrigée de l'atténuation dans la couche supérieure. . . . .	115
3.21	Comparaison des valeurs de $\mu_s$ et de $g$ obtenues par LC-OCT et par des mesures combinées de sphères intégrantes et de transmission collimatée sur le fantôme bicouche n°1. . . . .	116
3.22	Comparaison des valeurs de $\mu_s$ et de $g$ obtenues par LC-OCT et par des mesures combinées de sphères intégrantes et de transmission collimatée sur le fantôme bicouche n°2. . . . .	116
3.23	Evolution qualitative de la mesure des propriétés optiques $\mu_s$ et $g$ réalisée au sein d'une ROI centrée dans l'image LC-OCT et de taille variable. . . . .	117
3.24	Cartographie des propriétés optiques $\mu_s$ et $g$ obtenues à partir d'une unique image 3D de deux fantômes diffusants placés côte à côte. . . . .	118
3.25	Profil d'intensité moyenne $I(z)$ dans une image LC-OCT 3D acquise sur le dos de la main <i>in vivo</i> . . . . .	119
3.26	Valeurs de $\mu_s$ et $g$ des différentes couches de la peau (couche cornée, épiderme et derme réticulaire) obtenues à partir d'une image LC-OCT 3D acquise sur le dos de la main <i>in vivo</i> . . . . .	120
4.1	Schéma du montage de microspectroscopie Raman. Laser CW : laser continu ; FP : fibre monomode à maintien de polarisation ; C : collimateur ; PBA : filtre passe-bande ; LD1 : lame dichroïque séparant la voie de spectroscopie Raman de la voie dermoscopique ; LD2 : lame dichroïque séparant l'excitation du signal Raman ; OM : objectif de microscope ; PH : filtre passe-haut ; OC : optique de collection ; FM : fibre multimode ; L1 : objectif de la voie dermoscopique ; L2 : oculaire de la voie dermoscopique ; PB : filtre passe-bas. . . . .	128
4.2	Courbes de transmission des filtres utilisés dans le système de CRM : filtre passe-bande (orange), lame dichroïque (bleu), filtre passe-haut (vert). Figure extraite de [10]. . . . .	130

4.3	Illustration de l'aberration sphérique pour une lentille de focale $f$ . Lorsque l'on tente de focaliser le faisceau d'excitation à une distance $\Delta$ au-dessous de la surface de l'échantillon, la réfraction déplace le point focal plus profondément dans l'échantillon, et la distance DR entre les foyers des rayons paraxiaux (en rouge) et marginaux (en vert) augmente avec $\Delta$ . Figure extraite de [36]. . . . .	131
4.4	Mesure de la résolution axiale du montage de CRM. Un échantillon de silicium cristallin est utilisé comme échantillon. Grâce à une platine de translation en $z$ , l'échantillon de silicium est déplacé par pas de $5 \mu\text{m}$ et le spectre collecté de l'échantillon est mesuré pour chaque position. On représente ici l'intensité du pic à $521 \text{ cm}^{-1}$ du silicium, en fonction de la position axiale de la platine. La largeur à mi-hauteur permet d'obtenir une résolution axiale de $30 \mu\text{m}$ . . . . .	134
4.5	Exemple d'architecture d'un spectromètre (configuration croisée Czerny-Turner). Celui-ci comporte une fente, un réseau, un détecteur ainsi qu'un ensemble d'optiques (ici des miroirs concaves) focalisant la lumière dispersée par le réseau sur le détecteur. Figure extraite de [37]. . . . .	134
4.6	Dispersion de la lumière par un réseau à faible (« Low gr/mm ») et à forte (« High gr/mm ») densité de rainures. Pour une taille de capteur donnée, une faible densité de rainures permet de couvrir une large gamme de longueurs d'ondes, tandis qu'une forte densité de rainures couvre une plage de longueurs d'onde plus faible, mais permet potentiellement d'accéder à une meilleure résolution spectrale. Figure extraite de [38].	135
4.7	Image de surface en couleur fournie du système de CRM. (a) Image de surface d'une cible de résolution USAF. L'image de surface couvre un champ de vision de $1.4 \text{ mm}$ de diamètre. (b) Zoom de l'image de surface de (a), montrant une résolution de $3 \mu\text{m}$ . (c) Image de surface d'un fantôme de PDMS comprenant des billes de dioxyde de titane ( $\text{TiO}_2$ ). La croix rouge représente l'emplacement latéral du point focal du système de CRM dans l'image de surface et cible ici une bille de $\text{TiO}_2$ . (d) Spectre Raman associé à la bille de $\text{TiO}_2$ ciblée en (c), faisant apparaître des raies Raman attribuées à la forme anatase du $\text{TiO}_2$ à $143, 396, 512, 521$ et $639 \text{ cm}^{-1}$ . Figure extraite de [39]. . .	137
4.8	a) Description schématique et b) photographie du porte-échantillon dédiée à la co-localisation LC-OCT/CRM. . . . .	137
4.9	Mesure de la résolution axiale du montage de CRM en conditions « réelles » en présence de la lame de $\text{CaF}_2$ du porte-échantillon. Grâce à une platine de translation en $z$ , la lame de $\text{CaF}_2$ du porte-échantillon est déplacée par pas de $5 \mu\text{m}$ et le spectre collecté pour chaque position axiale. On représente en a) l'intensité du pic à $321 \text{ cm}^{-1}$ du $\text{CaF}_2$ , en fonction de la position axiale de la platine. En dérivant ce profil, on obtient le graphique en b) dont la largeur à mi-hauteur indique une résolution axiale de $29 \mu\text{m}$ .	138
4.10	Spectre brut collecté à $50 \mu\text{m}$ de profondeur dans l'échantillon par le système de CRM, avec une puissance de $40 \text{ mW}$ , un temps d'intégration de $10 \text{ s}$ et 3 accumulations. . .	139

4.11	Suppression de l'auto-fluorescence d'un spectre Raman. Le spectre de gauche correspond au spectre brut, réduit ici à la gamme 400-1800 $\text{cm}^{-1}$ . La courbe rouge représente le fond d'auto-fluorescence superposé au signal Raman, approximé ici par un polynôme d'ordre 5. On peut alors supprimer ce fond d'auto-fluorescence pour obtenir le spectre de droite. Le spectre de droite est de plus lissé par un filtre de Savitzky-Golay utilisant un polynôme d'ordre 3 sur une fenêtre de 5 points consécutifs. Les principales raies caractéristiques de la peau [40] sont pointées par des flèches. . . . .	140
4.12	Spectres Raman acquis dans la peau de cochon pour des profondeurs allant de la surface de l'échantillon (0 $\mu\text{m}$ ) à 500 $\mu\text{m}$ de profondeur. Spectres acquis avec une puissance de 40 mW sur l'échantillon, un temps d'intégration de 10 s et 3 accumulations. Les spectres ont été soustraits de l'auto-fluorescence, puis lissés par un filtre de Savitzky-Golay utilisant un polynôme d'ordre 3 sur une fenêtre de 5 points consécutifs. Les spectres sont volontairement décalés en ordonnée pour faciliter la visualisation. .	142
4.13	Schéma du montage de co-localisation LC-OCT/CRM. Les deux dispositifs (LC-OCT et CRM) sont indépendants. Des platines de translation XYZ sont placées sous l'objectif du microscope de chaque dispositif. L'échantillon est placé dans un porte-échantillon qui est successivement placé sur la platine XYZ sous chaque dispositif. Le porte-échantillon est fixé sur les platines XYZ par l'intermédiaire d'une plateforme cinématique magnétique permettant de le positionner avec une grande répétabilité sur chaque platine. . . . .	143
4.14	Photographie du montage de co-localisation LC-OCT/CRM. . . . .	144
4.15	Description, en trois étapes, de la calibration réalisée en amont des expériences de co-localisation LC-OCT/CRM. . . . .	146
4.16	Interface utilisateur de l'application MATLAB dédiée à la co-localisation LC-OCT/CRM. Les données de calibration ( <i>i.e.</i> , la relation de passage) sont stockées dans l'onglet « Calibration ». L'interface graphique permet à l'utilisateur de télécharger une image LC-OCT 3D et ses coordonnées sur la platine, puis de sélectionner plusieurs points d'intérêt dans cette image à l'aide du réticule jaune. Sur la base de la calibration initiale, l'application calcule les coordonnées à atteindre sur la platine CRM pour cibler chaque POI et les affiche dans le tableau situé au-dessus de l'image 3D. . . . .	149
4.17	Image LC-OCT 3D en vues orthogonales d'un échantillon de peau de cochon contenant de l'encre de tatouage jaune, avec trois POIs matérialisés par des ellipsoïdes jaunes. Les ellipsoïdes représentent le volume dans lequel l'acquisition Raman est incluse, de dimensions $40 \times 40 \times 30 \mu\text{m}^3$ ( $x \times y \times z$ ). Des zones hyper-réfléchissantes peuvent être observées dans l'échantillon, suggérant la présence d'encre de tatouage jaune. . .	150

<p>4.18 Image LC-OCT 3D (vues orthogonales) d'un échantillon de peau de cochon tatouée à l'encre jaune, avec les spectres Raman associés acquis pour trois POIs identifiés dans l'image LC-OCT 3D et matérialisés par des ellipsoïdes jaunes. La LC-OCT fournit des images des deux couches principales de la peau de cochon, l'épiderme (E) et le derme (D). La ligne pointillée sur l'image horizontale montre la position de l'image verticale au-dessus par rapport au plan horizontal de l'image 3D, et vice versa. La profondeur Z de l'image horizontale est indiquée par rapport à la surface de la peau. La courbe pleine sur l'image verticale représente la distribution 1D de l'encre jaune avec la profondeur au niveau du POI 2. Les emplacements des POI dans les images de surface LC-OCT et CRM sont indiqués par des croix rouges. Le rectangle bleu sur l'image de surface LC-OCT représente l'emplacement de l'image 3D dans l'image de surface. Les flèches bleues sur les spectres Raman représentent les bandes Raman correspondant au derme de la peau de cochon et les flèches jaunes montrent les raies Raman attribuées à l'encre jaune. Figure extraite de [41]. . . . .</p>	151
<p>4.19 A) Image clinique d'un tatouage multicolore présentant une réaction inflammatoire dans les zones rouges du tatouage. Une biopsie a été prélevée au niveau de la zone de tatouage rouge entourée en blanc. B) Coupe histologique obtenue à partir de la biopsie prélevée. Cette coupe révèle la présence de pigments de tatouage rouge, ainsi que d'amas de cellules inflammatoires pointés par les astérisques. Illustrations tirées de [42]. . . . .</p>	153
<p>4.20 a) Image clinique d'un tatouage par fulguration. Le patient étudié portait une chaîne en argent autour de son cou lorsqu'il a été foudroyé. Sous l'effet du foudroiement, les particules de sa chaîne se sont incrustées au niveau de son cou, visibles sur l'image clinique agrandie en b). Illustrations tirées de [43]. . . . .</p>	154
<p>4.21 (a) Image LC-OCT 3D et (b) vues orthogonales d'une biopsie de tatouage à l'encre rouge avec de multiples POI matérialisés par des ellipsoïdes rouges. Des zones claires et diffuses peuvent être observées dans le derme, représentées par des flèches rouges. Des structures hyper-réfléchissantes d'environ 10-40 <math>\mu\text{m}</math> sont visibles proches de la jonction derme-épiderme, indiquées par des flèches vertes. . . . .</p>	154

- 4.22 Image LC-OCT 3D (vues verticale et horizontale) de la biopsie de tatouage à l'encre rouge, et spectres Raman associés obtenus pour cinq POI identifiés dans l'image LC-OCT 3D et matérialisés par les ellipsoïdes rouges. La ligne pointillée sur l'image horizontale montre la position de l'image verticale au-dessus par rapport au plan horizontal de l'image 3D, et vice-versa. La profondeur Z de l'image horizontale est indiquée par rapport à la surface de la peau. Les différentes couches superficielles de la peau sont visualisées : le stratum corneum (SC), l'épiderme (E) et le derme (D). Sur les images LC-OCT, les flèches rouges indiquent les zones brillantes contenant de l'encre de tatouage et les flèches vertes montrent les particules brillantes observées près de la jonction derme-épiderme. Sur les spectres Raman, les flèches bleues représentent les bandes Raman correspondant à l'épiderme et les flèches rouges les raies Raman attribuées à l'encre rouge. La flèche verte et le crochet représentent les principales bandes Raman associées aux particules brillantes observées près de la jonction derme-épiderme dans l'image LC-OCT 3D. Les images de surface fournies par les dispositifs LC-OCT et CRM sont également représentées. Figure extraite de [39]. . . . . 156
- 4.23 Identification des particules brillantes observées en LC-OCT, notamment au POI 3, en comparaison à la littérature. On observe une bonne correspondance morphologique entre les particules observées en LC-OCT et les images de RCM de mélanophages, qui sont macrophages ingérant de la mélanine, obtenues par Guitera *et al.* [44]. D'un point de vue du spectre obtenu pour ces mêmes particules, on observe une bonne correspondance avec le spectre obtenu par Tetard *et al.* [45], avec une bande centrée autour de  $570\text{ cm}^{-1}$  ainsi qu'une large bande allant de  $\sim 1200$  à  $1650\text{ cm}^{-1}$ . . . . . 157
- 4.24 Image LC-OCT 3D (vues orthogonales) d'une biopsie d'un tatouage de couleur noire, avec les spectres Raman associés obtenus avec le dispositif de CRM pour trois POIs identifiés dans l'image LC-OCT 3D et matérialisés par des ellipsoïdes rouges. Les lignes pointillées sur les images horizontales montrent la position de l'image verticale en dessous par rapport au plan horizontal de l'image 3D, et vice-versa. La profondeur Z de l'image horizontale est indiquée par rapport à la surface de la peau. Les flèches bleues sur les spectres Raman représentent les bandes Raman correspondant au derme et les flèches noires montrent les bandes Raman attribuées à l'encre noire. Les images de surface fournies par les appareils LC-OCT et CRM sont également représentées. Figure extraite de [39]. . . . . 159

4.25	Image LC-OCT 3D (vues orthogonales) d'une biopsie d'un tatouage induit par la fulguration, avec les spectres Raman associés obtenus par CRM pour quatre POIs choisis dans l'image LC-OCT 3D et matérialisés par des ellipsoïdes rouges. La ligne pointillée sur l'image horizontale montre la position de l'image verticale au-dessus par rapport au plan horizontal de l'image 3D, et vice-versa. La profondeur Z de l'image horizontale est indiquée par rapport à la surface de la peau. Les flèches bleu foncé sur les spectres Raman représentent les bandes Raman correspondant au derme, les flèches bleu clair correspondent aux bandes principales des matériaux hypothétiques dérivés de l'argent et les flèches vertes représentent les deux raies Raman attribuées au TiO <sub>2</sub> . Les images de surface fournies par les dispositifs LC-OCT et CRM sont également présentées. Figure extraite de [39]. . . . .	161
4.26	a) Photographie du système commercial de microscopie Raman confocal XploRA PLUS commercialisé par Horiba Scientific. b) Zoom sur la platine de translation motorisée sur laquelle est clipsée une plaque d'adaptation permettant de fixer la plateforme cinématique et le porte-échantillon. . . . .	164
4.27	a) Description schématique et b) photographie du porte-échantillon dédiée à la co-localisation LC-OCT/CRM adapté au système de CRM commercial XploRA PLUS. . . . .	165
4.28	Dispositif de LC-OCT dédié à l'imagerie <i>ex vivo</i> , placé dans un support maintenant la sonde à la verticale. Une platine de translation XYZ manuelle est placée sous la sonde. . . . .	166
4.29	Photographie de la plateforme compacte dédiée à la co-localisation LC-OCT/CRM <i>ex vivo</i> . . . . .	168
4.30	Comparaison des spectres collectés dans un échantillon de peau de cochon <i>ex vivo</i> par le système de CRM sur banc optique à immersion eau (spectre bleu), par le système sonde de CRM sans cuve à immersion à eau (orange), et par le système sonde de CRM avec cuve à immersion huile (jaune). Les spectres sont acquis avec une puissance de 40 mW, un temps d'intégration de 10 s et 3 accumulations. Les spectres sont soustraits de l'auto-fluorescence et lissés. a) Spectres acquis à 100 µm de profondeur dans l'échantillon et b) spectres acquis à 350 µm de profondeur dans l'échantillon. . . . .	169
4.31	Spectres Raman de l'épiderme (en bleu) et du derme (vert) sains, acquis dans une zone saine de chirurgie cutanée. Les deux spectres ont été normalisés par leur norme. . . . .	173
4.32	Image LC-OCT horizontale d'un échantillon de tissu adipeux, acquise à 75 µm de profondeur, avec les spectres Raman associés obtenus par CRM pour deux POIs choisis dans l'image LC-OCT et matérialisés par des ellipsoïdes jaunes. Le spectre bleu correspond au spectre du POI 1 et est associé aux lipides du tissu adipeux. Le spectre vert, correspondant au spectre du POI 2, fait apparaître des raies associées aux caroténoïdes, des molécules jouant un rôle antioxydant et donnant au tissu adipeux sa coloration jaune. L'image de surface fournie par le dispositif LC-OCT est également présentée. . . . .	175



4.33	Image LC-OCT 3D (vues orthogonales) d'une chirurgie de carcinome basocellulaire (BCC). Plusieurs POIs ont été choisis dans l'image LC-OCT 3D pour l'analyse moléculaire par CRM, matérialisés par des ellipsoïdes jaunes. Les lignes pointillées sur l'image verticale montrent la position des différentes images horizontales par rapport au plan horizontal de l'image 3D, et vice-versa. La profondeur Z de l'image horizontale est indiquée par rapport à la surface de la peau. L'image de surface fournie par le dispositif LC-OCT est également présentée. . . . .	176
4.34	Spectres Raman normalisés de l'épiderme sain (en bleu), du derme sain (vert) et des lobules de BCC (rouge). . . . .	177
4.35	Différences observées entre les spectres Raman normalisés de l'épiderme (en bleu) et des lobules de BCC (rouge). Les flèches pointent les différences observables entre le spectre de l'épiderme et le spectre des lobules de BCC : les flèches jaunes indiquent des différences d'intensité sur des bandes présentes à la fois dans les spectres de l'épiderme et des lobules ; les flèches vertes pointent quant à elles des raies Raman qui sont présentes uniquement dans l'un des deux spectres. . . . .	179
4.36	Images LC-OCT en coupe verticale des modèles de peau saine (ftSE) et des deux modèles de mélanomes (ftSE SKMEL28 et ftSE MeWo), à différents stades de développement (7, 14 et 21 jours de développement). Pour chaque échantillon, l'épaisseur de la couche cornée (SC) est donnée, ainsi que l'épaisseur de l'épiderme vivant (VE), c'est-à-dire l'épiderme excluant la couche cornée. Les flèches jaunes dans les modèles de mélanome montrent les amas de cellules cancéreuses. . . . .	183
4.37	Spectres moyens obtenus pour l'épiderme sain du modèle ftSE, pour les amas de cellules SK-MEL-28 et pour les amas de cellules MeWo. L'écart-type est affiché en transparence autour du spectre moyen pour chaque spectre. Les flèches jaunes pointent les raies ou bandes Raman faisant apparaître des différences visibles entre le spectre moyen de l'épiderme ftSE sain et les spectres des amas de cellules de mélanomes. . . .	184
4.38	Graphique représentant les scores associés aux deux premières composantes principales obtenues par l'analyse en composantes principales (PCA) appliquée à l'ensemble des spectres acquis dans l'épiderme sain du modèle ftSE (en bleu), des spectres acquis dans les amas de cellules de mélanomes de la lignée MeWo (en orange) et des spectres acquis dans les amas de cellules de mélanomes de la lignée SK-MEL-28 (en jaune). . . .	187
4.39	Spectres Raman acquis <i>in vivo</i> sur le dos de la main, pour des profondeurs allant de la surface de l'échantillon (0 $\mu\text{m}$ ) à 500 $\mu\text{m}$ de profondeur. Spectres acquis avec une puissance de 25 mW sur l'échantillon, un temps d'intégration de 30 s et 2 accumulations. Les spectres ont été soustraits de l'auto-fluorescence et lissés par un filtre de Savitzky-Golay utilisant un polynôme d'ordre 3 sur une fenêtre de 5 points consécutifs. Les spectres sont volontairement décalés en ordonnée pour faciliter la visualisation. Les flèches noires pointent les bandes amide III à 1260 et 1320 $\text{cm}^{-1}$ , avec une inversion du ratio d'intensité de ces bandes lors du passage de l'épiderme au derme à environ 150 $\mu\text{m}$ de profondeur. . . . .	192

- 4.40 Exemple d'expériences de co-localisation LC-OCT/CRM *in vivo*. Une image 3D de LC-OCT d'un angiome cutané a été acquise, représentée ici en coupes orthogonales. Dans cette image, trois POIs ont été ciblés. La ligne pointillée sur l'image horizontale montre la position de l'image verticale en dessous par rapport à l'image horizontale, et vice-versa. La profondeur Z de l'image horizontale est indiquée par rapport à la surface de la peau. Les flèches rouges sur les spectres Raman représentent les raies Raman correspondant au sang. Grâce à un recalage des images dermoscopiques des dispositifs de LC-OCT et de CRM, les spectres des trois mêmes POIs peuvent être acquis. Ils font apparaître la signature moléculaire du sang dans les deux POIs localisés à l'intérieur d'un capillaire sanguin. . . . . 193
- A.1 Schéma d'un interféromètre de Michelson et signaux d'interférences collectés par le détecteur en lumière monochromatique et polychromatique. Figure adaptée de [24, 46].204



## Liste des tableaux

3.1	Description de la composition des fantômes monocouches. Tous les fantômes sont constitués d'une matrice de PDMS comprenant des particules diffusantes de différents matériaux, diamètres et concentration dans le PDMS. . . . .	102
3.2	Description de la composition des fantômes bicouches. . . . .	103
4.1	Attribution biomoléculaire indicative des raies Raman principales observées dans le spectre de la peau de cochon. . . . .	141
4.2	Évaluation de la précision de la co-localisation. Pour 10 billes de TiO <sub>2</sub> incluses dans l'échantillon de calibration et ciblées avec LC-OCT, nous avons mesuré l'erreur de positionnement définie comme l'écart entre les coordonnées théoriques de la platine CRM données par la calibration et les coordonnées réelles de la platine permettant de placer la bille au point focal du système de CRM. Une erreur maximale de 20 µm et 10 µm a été mesurée en X/Y et Z respectivement. Cette précision de la co-localisation est limitée comme on peut le constater par le pas de 10 µm des platines de translation manuelles utilisées. . . . .	148
4.3	Résumé de l'analyse morpho-moléculaire réalisée par LC-OCT/CRM co-localisées sur la biopsie du tatouage à l'encre rouge. Les raies Raman sélectionnées font uniquement référence aux raies Raman utilisées pour l'attribution biochimique. . . . .	158
4.4	Résumé des résultats morphologiques et biochimiques obtenus sur la biopsie du tatouage à l'encre noire. Les raies Raman sélectionnées font uniquement référence aux raies Raman utilisées pour l'attribution biochimique. . . . .	160
4.5	Résumé des résultats morphologiques et biochimiques obtenus sur la biopsie du tatouage induit par la fulguration. Les raies Raman sélectionnées correspondent aux raies Raman utilisées pour l'attribution biochimique. . . . .	163
4.6	Différences observées entre le spectre Raman de l'épiderme et du derme sains, avec leur confirmation dans la littérature. Les spectres de l'épiderme et du derme analysés ici ont été acquis dans une zone saine de chirurgie. . . . .	174
4.7	Comparaison des raies Raman dans les spectres des lobules avec les raies Raman de l'épiderme et du derme. En bleu sont indiquées les bandes pour lesquelles les lobules et l'épiderme présentent des caractéristiques communes. . . . .	178
4.8	Identification des raies et bandes Raman présentant des différences d'intensité entre les lobules de BCC et l'épiderme sain. + indique une différence d'intensité positive entre les spectres des lobules et le spectre de l'épiderme, - indique une différence d'intensité négative. . . . .	180

4.9 Attribution indicative des raies et bandes Raman faisant apparaître des différences entre les spectres acquis dans l'épiderme sain du modèle ftSE, dans les amas de cellules SK-MEL-28 et dans les amas de cellules MeWo, et résultats du test de Wilcoxon-Mann-Whitney appliqué à l'aire de chaque raie ou bande Raman pour les différents groupes testés. . . . . 188

## Introduction générale

Le cancer de la peau est un des cancers les plus répandus dans le monde, avec une incidence qui n'a cessé d'augmenter au cours des dernières décennies. La procédure de diagnostic standard consiste en un examen visuel des structures superficielles de la peau, souvent assisté par dermoscopie. Si une lésion est suspecte, une biopsie est effectuée pour analyse histologique. Cette procédure comporte plusieurs inconvénients puisqu'elle est invasive, longue et ne permet pas une détection précoce efficace du fait de l'examen visuel en surface. Ainsi, on estime qu'environ 20 % des cancers de la peau à un stade précoce ne sont pas détectés par cette approche. Or, malgré les récents progrès thérapeutiques, les facteurs qui influencent le plus le pronostic d'un patient restent la détection précoce et le traitement complet du cancer avant qu'il devienne invasif ou crée des métastases dans d'autres organes.

Pour améliorer la prise en charge du cancer de la peau et permettre une détection plus précoce, plusieurs modalités d'imagerie, notamment basées sur des techniques de microscopie optique, ont vu le jour. Ces techniques, telles que la microscopie confocale ou la tomographie par cohérence optique (OCT), permettent de réaliser des biopsies optiques, c'est-à-dire des images de la peau en profondeur mais sans réaliser de prélèvement. Cependant, ces techniques d'imagerie actuelles ne répondent pas correctement aux besoins des dermatologues pour la détection précoce de tous les types de cancer de la peau - en particulier le mélanome -, en raison de la résolution insuffisante des images (en OCT), de la profondeur insuffisante de pénétration dans les tissus ou du manque d'images en coupe rendant la comparaison aux images histologiques complexe (en microscopie confocale).

En 2014, une nouvelle modalité de microscopie optique, la tomographie par cohérence optique confocale à balayage de ligne (LC-OCT pour « Line-field Confocal Optical Coherence Tomography » en anglais) a été inventée au Laboratoire Charles Fabry à l'Institut d'Optique. La LC-OCT combine les principes de l'OCT et de la microscopie confocale, bénéficiant ainsi des avantages des deux technologies : une haute résolution spatiale de  $\sim 1 \mu\text{m}$  et une profondeur d'imagerie allant jusqu'à  $500 \mu\text{m}$  dans le tissu cutané. La LC-OCT dispose de modes d'imagerie bidimensionnels et tridimensionnel permettant la visualisation de la lésion cutanée dans son ensemble, avec un niveau de détail similaire à celui des images histologiques. Cette technologie d'imagerie est valorisée par la start-up DAMAE Medical comme outil d'aide à la détection précoce du cancer de la peau. Les systèmes de LC-OCT sont commercialisés depuis 2020 et un peu plus de 30 systèmes sont aujourd'hui installés dans le monde, principalement en Europe.

Néanmoins, la LC-OCT apporte uniquement une information morphologique, là où l'histologie apporte une information à la fois morphologique et fonctionnelle grâce à l'application de colorants sur les coupes histologiques, qui viennent se fixer sélectivement sur certaines structures de la peau. Dans le cas de lésions précoces ou de lésions ambiguës, il peut être utile de disposer d'informations complémentaires à l'image LC-OCT pour aider à établir le bon diagnostic. D'autres informations, portant par exemple sur le profil moléculaire ou génétique des lésions, pourraient également aider à améliorer la précision du diagnostic et à terme permettre une prise en charge personnalisée du patient. Le sujet de cette thèse a ainsi consisté à investiguer comment de nouvelles informations, complémentaires aux images, peuvent être apportées à la LC-OCT, en considérant deux approches différentes. Dans une première approche, nous avons cherché à extraire des images LC-OCT des

informations complémentaires, par une approche de traitement d'images et modélisation du signal en LC-OCT. Notre choix s'est porté sur l'extraction des propriétés optiques de diffusion (coefficient de diffusion et facteur d'anisotropie de diffusion) des tissus imagés, informations intrinsèquement comprises dans les images LC-OCT. Dans une seconde approche, nous avons cherché à coupler la LC-OCT à une autre modalité afin de lui apporter des informations nouvelles, d'ordre moléculaire. La modalité choisie pour le couplage est la microspectroscopie Raman confocale, une méthode de spectroscopie capable d'identifier la composition moléculaire d'un échantillon en un point en sondant les vibrations de ses liaisons chimiques.

Ce manuscrit s'articule autour de quatre chapitres : le premier introduit tout d'abord le contexte clinique dans lequel s'inscrit cette thèse et établit ensuite l'état de l'art en matière de microscopie optique pour la dermatologie, en distinguant les techniques d'imagerie pures des techniques d'imagerie et spectroscopie moléculaires. Le second chapitre présente plus en détail le principe de l'OCT et de la LC-OCT, technologie sur laquelle reposent ces travaux de thèse. Après avoir introduit le principe de fonctionnement de la LC-OCT, nous présentons dans les deux chapitres suivants les travaux réalisés au cours de ces trois ans de thèse pour apporter à la LC-OCT des informations complémentaires. Dans le chapitre 3, nous présentons une approche, basée sur une modélisation du signal de LC-OCT, permettant d'extraire d'images de LC-OCT existantes les propriétés optiques de diffusion des tissus imagés à une échelle macroscopique. Enfin, dans le chapitre 4, nous décrivons le développement d'une méthode de couplage de la LC-OCT à la microspectroscopie Raman confocale pour combiner au sein d'une même image de LC-OCT informations morphologiques et moléculaires.

# 1 - Introduction aux techniques d'imagerie et de spectroscopie optiques de la peau

## 1.1 . Les enjeux autour du diagnostic du cancer de la peau

### 1.1.1 . Description de la peau

La peau est l'organe le plus étendu du corps humain, remplissant de multiples rôles. La peau constitue premièrement une couche barrière protégeant le corps des agressions physiques et chimiques de l'environnement et des infections par des pathogènes. Elle remplit également le rôle d'organe thermorégulateur grâce au mécanisme de sudation et de vasodilatation. Ses nombreux récepteurs font également de la peau un organe sensoriel fournissant à l'organisme une mine d'information sur son environnement extérieur.

La peau est constituée de trois principales couches : l'épiderme, le derme et l'hypoderme. Un schéma descriptif de la peau donné à la figure 1.1a).

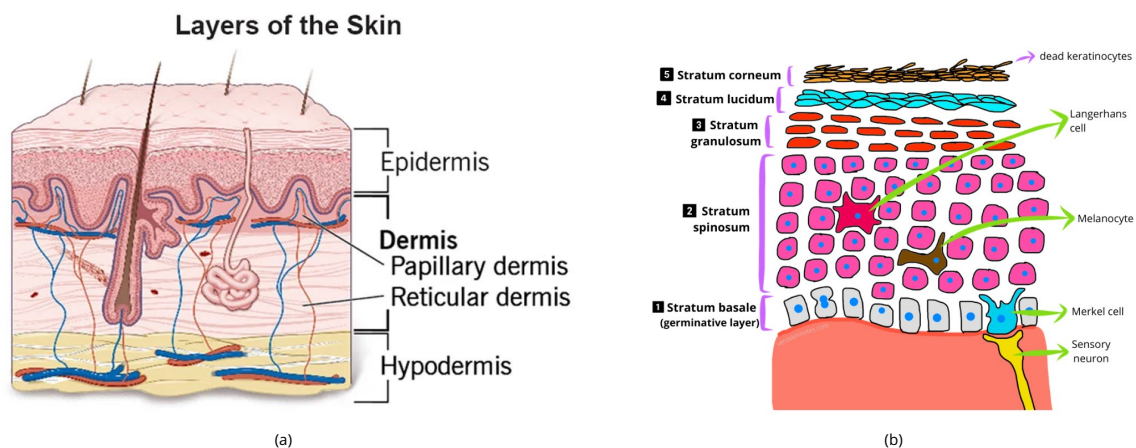


Figure 1.1 - a) Schéma descriptif de la peau avec ces différentes couches. Figure tirée de [1]. b) Schéma des couches et cellules de l'épiderme. Figure tirée de [2].

L'épiderme a une épaisseur d'environ 100  $\mu\text{m}$ , variable selon les zones du corps, et est composé de différents types de cellules incluant les kératinocytes, les mélanocytes, les cellules de Langerhans et les cellules de Merkel [47, 48, 49], illustrés à la figure 1.1b).

- Les kératinocytes sont les principales cellules de l'épiderme (elles représentent 90 à 95 % des cellules), mesurant des tailles de l'ordre de 10  $\mu\text{m}$ . Ces cellules fabriquent la kératine, protéine conférant à la peau ses propriétés protectrices et sa résistance. Les kératinocytes sont organisés en quatre couches successives qui reflètent un processus de maturation de ces cellules : les kératinocytes naissent dans la couche basale (stratum basale à la figure 1.1b)), la couche la plus profonde de l'épiderme. Puis ils migrent progressivement dans la couche épineuse (stratum spinosum) où ils commencent à s'aplatir, pour migrer ensuite dans la couche granuleuse (stratum granulosum), où ils dégènèrent. Enfin, les kératinocytes morts et aplatis



s'accumulent dans la couche cornée (*stratum corneum*), la couche la plus externe de la peau, où ils sont progressivement éliminés par desquamation et renouvelés par les kératinocytes des couches inférieures. Au niveau du bout des doigts, de la paume des mains et de la plante des pieds, une couche supplémentaire, appelée la couche claire (*stratum lucidum*), est présente entre la couche granuleuse et la couche cornée. Au fur et à mesure de leur ascension dans l'épiderme, les kératinocytes produisent une quantité croissante de kératine qui s'accumule dans le cytoplasme jusqu'à leur apoptose. Leur cycle de vie a une durée d'environ 4 semaines, au bout de laquelle l'entièreté des kératinocytes a été renouvelée.

- Les mélanocytes sont les cellules responsables de la production de mélanine, qui donne à la peau sa pigmentation et absorbe les rayons ultraviolets. Les mélanocytes sont dispersés parmi les kératinocytes de la couche basale, et présentent des dendrites allant jusque dans la couche épineuse pour transférer les grains de mélanine aux kératinocytes, permettant de protéger ces derniers contre les ultraviolets.
- Les cellules de Langerhans sont des cellules dendritiques mobiles jouant un rôle important dans la réponse immunitaire de la peau face à un pathogène. Par leur capacité à capter des antigènes et à migrer dans les ganglions lymphatiques, les cellules de Langerhans permettent de déclencher une réaction du système immunitaire. Tout comme les mélanocytes, elles sont disséminées parmi les kératinocytes de la couche basale.
- Enfin, les cellules de Merkel ont une fonction de récepteurs mécaniques et sont situées dans la couche basale (non représentées à la figure 1.1).
- D'autres structures peuvent être observées dans l'épiderme, comme les parties superficielles des glandes sudoripares et des follicules pileux.

Sous l'épiderme se trouve le derme, un tissu composé principalement de fibres élastiques, constituées de collagène (majoritairement) et d'élastine, donnant à la peau sa résistance mécanique. Le derme comporte également des cellules, des vaisseaux et capillaires sanguins, des follicules pileux, des glandes sébacées et des terminaisons nerveuses. Le derme est organisé en deux couches principales [47] :

- Le derme papillaire : il est entre autres formé de projections, appelées papilles dermiques, s'introduisant dans l'épiderme. Ces papilles augmentent la surface de contact et donc la cohésion entre l'épiderme et le derme. Le bout des papilles comporte des terminaisons nerveuses, incluant parfois des récepteurs tactiles (*corpuscules de Meissner*). Il comprend également plusieurs types de cellules tels que les fibroblastes, synthétisant la matrice extra-cellulaire (*i.e.*, fibres de collagène et d'élastine) ou des cellules immunitaires tels que les mastocytes. Le derme papillaire est également riche en vaisseaux sanguins [48].
- Le derme réticulaire, ou derme profond, est principalement constitué de fibres de collagène et d'élastine, regroupées en faisceaux de fibres plus épais, principalement alignés horizontalement. Le collagène représente 98 % de la masse totale du derme sec [48].

Enfin, l'hypoderme est la couche la plus profonde de la peau et contient des tissus adipeux et un riche réseau de vaisseaux sanguins. Il constitue une séparation entre le derme et les muscles et tendons [47, 48].

### 1.1.2 . Le cancer de la peau

Un cancer est une maladie provoquée par la transformation de cellules initialement saines en cellules anormales qui prolifèrent de façon excessive [50]. Ces cellules cancéreuses s'accumulent pour former une tumeur maligne, envahissant les tissus alentours. Dans certains cancers, ces cellules peuvent se détacher de la tumeur et migrer vers d'autres zones du corps via les vaisseaux sanguins pour former d'autres tumeurs malignes qu'on appelle des métastases [50].

Parmi l'ensemble des cancers, le cancer de la peau représente un tiers des cancers diagnostiqués actuellement et touche chaque année entre 2 et 3 millions de personnes dans le monde [51]. Les causes de développement des cancers cutanés sont multifactorielles et incluent des facteurs individuels (âge, genre, dispositions génétiques) et des facteurs environnementaux [52]. Parmi ces causes, l'exposition aux rayons ultraviolets constitue la principale cause environnementale [53, 54]. Les rayons ultraviolets endommagent l'ADN en introduisant des anomalies dans les séquences de l'ADN. Si les anomalies ne sont pas réparées, elles peuvent induire des mutations génétiques. L'impact des rayons ultraviolets sur des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN et/ou dans la régulation de la croissance cellulaire peut alors résulter en la prolifération anormale de certaines cellules et à la formation de cancers [55, 56, 57]. Le cancer de la peau touche de ce fait principalement les peaux claires, qui disposent de peu de mélanine pour protéger les cellules de leur peau contre les dommages des rayonnements ultraviolets [52].

On distingue deux grandes catégories de cancers cutanés : les carcinomes et les mélanomes. Parmi les carcinomes, on distingue deux grandes familles que sont les carcinomes basocellulaires (abrégiés BCC pour « Basal Cell Carcinoma » en anglais) et les carcinomes spinocellulaires (SCC pour « Squamous Cell Carcinoma » en anglais). Les carcinomes représentent la majorité des cancers cutanés avec plus de 90% des cas. Néanmoins, les carcinomes se développent lentement et métastasent peu, de ce fait ils présentent un taux de mortalité faible comparé à leur prévalence [52]. Les carcinomes basocellulaires sont causés par la prolifération de cellules de l'épiderme au niveau de la couche basale et peuvent être classifiés selon trois principaux sous-types, dépendant de leur localisation dans les couches de la peau et de leur structure : les BCC superficiels, nodulaires et infiltrants.

Par rapport aux carcinomes basocellulaires, les carcinomes spinocellulaires sont plus susceptibles de se propager aux autres organes. Leur développement est dû à la prolifération de kératinocytes de la couche épineuse [58]. Certains carcinomes spinocellulaires peuvent se développer à partir de lésions pré-malignes appelées kératoses actiniques [59], résultant de l'exposition cumulée aux rayonnements ultraviolets.

A la différence des carcinomes, les mélanomes se développent par la prolifération des mélanocytes, cellules produisant la pigmentation, présentes en grande concentration dans les grains de beauté. Les mélanomes se manifestent ainsi fréquemment sous la forme de tumeurs pigmentées. Les mélanomes sont plus rares que les carcinomes mais ils sont bien plus agressifs : ils se développent et créent des métastases rapidement [52]. Ils sont responsables de la très grande majorité des décès causés par le cancer de la peau. Ainsi, le diagnostic précoce du mélanome joue un rôle essentiel dans le pronostic du patient.

### 1.1.3 . Le diagnostic du cancer cutané

Aujourd'hui, la détection des cancers de la peau se fait par un dermatologue grâce à un examen visuel de la surface de la peau, à l'œil nu ou en utilisant un dermoscope. Un dermoscope est un dispositif portatif d'imagerie optique, équipé d'une lentille grossissante et d'une source lumineuse. Un liquide de contact, réalisant l'adaptation d'indice optique entre le dermoscope et la peau, permet de s'affranchir de la forte réflexion entre l'air et la peau présente lors de l'observation à l'œil nu [60]. La lumière peut ainsi mieux pénétrer dans la peau, permettant de visualiser la morphologie de surface et sub-surface des lésions cutanées et de révéler des structures qui ne sont normalement pas visibles à l'œil nu. Certains dermoscopes intègrent des polariseurs croisés qui filtrent la lumière diffusée par la périphérie, réduisent l'éblouissement et permettent de visualiser les structures sub-surface sans avoir recours à liquide de contact [60]. Le dermoscope est dispositif peu onéreux et présentant un pouvoir discriminant supérieur à celui d'une analyse à l'œil nu. Une comparaison entre une image clinique (photographie) et une image obtenue avec un dermoscope sur un mélanome est donnée pour exemple à la figure 1.2.

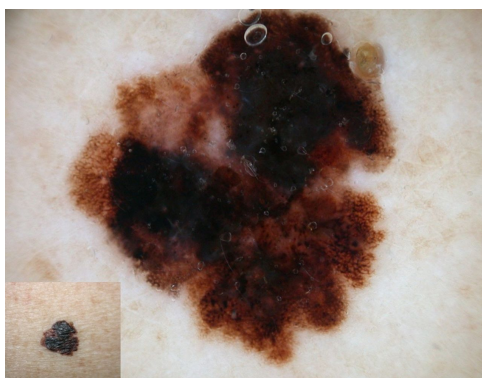


Figure 1.2 - Image de dermoscopie d'un mélanome, avec l'image clinique (visualisation à l'œil nu) en insert. Figure extraite de [3].

Le dermoscope constitue le dispositif d'imagerie de routine utilisé par le dermatologue. En se basant sur des critères morphologiques observés avec le dermoscope (asymétrie de la lésion, irrégularité de ses bords, hétérogénéité de couleur au sein de la lésion, diamètre de la lésion), le dermatologue détecte les lésions qui lui paraissent suspectes. Dans ce cas, une biopsie, c'est-à-dire un prélèvement dans la lésion, est réalisée pour confirmer ou non le caractère malin de la lésion. La biopsie est déshydratée, figée dans un bloc de paraffine puis découpé en fines coupes transversales appelées coupes histologiques de quelques micromètres d'épaisseur à l'aide d'un microtome. Des colorants sont appliqués, se fixant sélectivement sur certaines structures, pour mieux visualiser les différents constituants cellulaires de la peau. Les coupes colorées résultantes sont ensuite observées au microscope optique par un anapathologiste. L'image histologique, de résolution cellulaire, lui permet d'établir le diagnostic. Suite à ce diagnostic, le dermatologue choisira le meilleur traitement en fonction du type de lésion : crème topique, chirurgie, chimiothérapie ou encore thérapies ciblées. Il est donc crucial d'avoir une très bonne précision de diagnostic afin d'orienter le patient vers le traitement le plus efficace pour sa pathologie.

Parmi les colorations utilisées en histologie, la coloration à l'hématoxyline et à l'éosine (H&E)

est celle a plus couramment utilisée. L'hématoxyline colore notamment les noyaux en bleu/violet, en se fixant sur les acides nucléiques, tandis que l'éosine colore le cytoplasme en rose et les autres éléments cellulaires basiques en rose/rouge plus ou moins vif. Un exemple d'image histologique H&E de la peau saine est donnée à la figure 1.3. Dans le cas de lésions complexes à diagnostiquer, d'autres

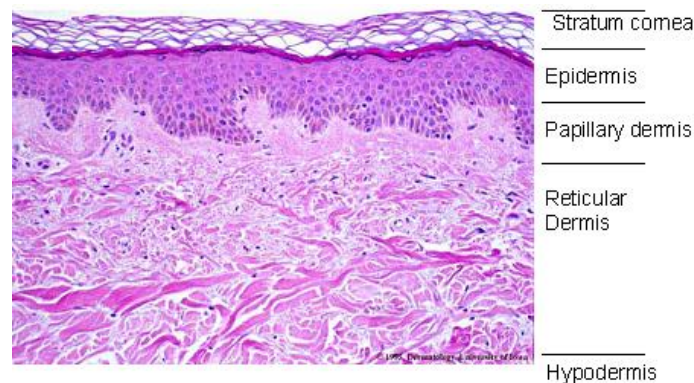


Figure 1.3 – Coupe histologique H&E d'un échantillon de peau saine, avec attribution des différentes couches de la peau. Figure extraite de [4].

techniques, comme l'immunohistochimie, peuvent être utilisées. L'immunohistochimie est une technique utilisant des anticorps pour vérifier la présence de certains antigènes dans un échantillon. Les anticorps sont généralement liés à une enzyme colorée ou à un colorant fluorescent. Une fois que les anticorps se sont liés à l'antigène dans l'échantillon, l'enzyme ou le colorant est activé, et les zones présentant l'antigène peuvent être repérées au microscope. Certains anticorps permettent de mettre en évidence certains types de cellules (mélanocytes, cellules Langerhans, lymphocytes) [61]. D'autres plus spécifiques permettent de cibler des antigènes tumoraux produits par les cellules cancéreuses [61]. Plus récemment, de nouveaux marqueurs immunohistochimiques, permettant de détecter la présence de certaines mutations génétiques, ont vu le jour [62, 5], en complément des techniques déjà existantes basées notamment sur des techniques PCR et séquençages de l'ADN et de l'ARN (techniques transcriptomiques) [63, 64]. Dans le cas du mélanome en particulier, l'identification de la mutation impliquée est décisive dans le choix du traitement [65, 5]. La réponse aux traitements à la fois conventionnels comme la chimiothérapie et les thérapies ciblées, basées sur des molécules inhibant l'action des gènes mutés, dépendent de la mutation impliquée [5]. Le mélanome progressant très rapidement, l'identification de la mutation permet de mettre en place au plus vite le traitement le plus approprié, favorisant les chances de survie du patient. Une illustration est donnée à la figure 1.4, comparant une coupe histologique H&E et une coupe histologique marquée par immunohistochimie avec marquage des cellules présentant la mutation V600E du gène BRAF. Les mutations du gène BRAF sont les plus fréquemment rencontrées dans les cas de mélanomes (50 à 60 % des mélanomes) [5]. L'immunohistochimie permet dans ce cas d'identifier spécifiquement les cellules présentant la mutation.

Ce processus de diagnostic, reposant sur l'analyse en surface de la peau, la biopsie et l'analyse histologique et immunohistochimique, n'est cependant pas optimal. Tout d'abord, ce processus est long car il faut compter environ une quinzaine de jours pour obtenir le diagnostic histologique, une attente potentiellement anxiogène pour le patient. De plus, il repose sur une suspicion résultant de

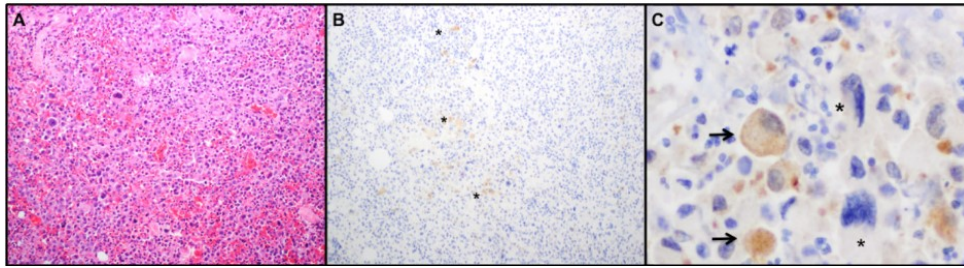


Figure 1.4 – Coupes histologiques d'un mélanome présentant la mutation V600E du gène BRAF. A) Coloration H&E (grossissement x100. B) et C) Coloration immunohistochimique avec marqueur de la mutation BRAF V600E (grossissement 100x et 400x). Certaines cellules, représentées par des flèches, sont positives à la mutation, contrairement à celles pointées par les astérisques, détectées négatives. Figure extraite de [5].

l'observation de la lésion en surface. De ce fait, une biopsie est souvent réalisée alors que la lésion est bénigne, par peur de manquer une lésion cancéreuse, ce qui peut être invasif pour le patient, en particulier lorsque la lésion est située sur des zones exposées comme le visage. D'autre part, certaines lésions malignes, encore à un stade précoce, ne peuvent être détectées à ce stade par manque d'anomalies morphologiques visibles en surface. Or la détection précoce, en particulier dans le cas du mélanome, est cruciale compte tenu de la progression rapide de ce type de cancer et de sa capacité à métastaser. Une détection précoce améliore significativement le pronostic du patient et permet d'éviter l'utilisation de traitements lourds.

Pour améliorer ce processus de diagnostic et permettre un diagnostic plus précoce, plusieurs modalités optiques, basées sur des techniques d'imagerie ou de spectroscopie, ont été développées. A la différence de l'histologie, ces techniques permettent d'analyser la peau en profondeur de façon non invasive. Elles se basent sur l'interaction de la lumière avec les tissus biologiques comme la peau pour en extraire des informations diverses telles que des informations morphologiques ou moléculaires, à la manière d'une « biopsie optique ». Avant de présenter le panel de techniques optiques existantes permettant l'étude *in vivo* de la peau, nous allons dans un premier temps revenir sur le comportement de la lumière lors de sa propagation au sein de tissus biologiques tels que la peau, afin de comprendre quelles interactions de la lumière avec les tissus sont mises en jeu dans les différentes modalités optiques.

## 1.2 . Les interactions entre la lumière et les tissus biologiques

Les techniques d'imagerie et de spectroscopie optique consistent à recueillir une information extraite de la lumière ayant interagi avec l'échantillon imagé. Les tissus biologiques tels que la peau sont des échantillons qualifiés de complexes, pouvant être décrits comme une multitude de particules pouvant interagir avec le champ électromagnétique incident. Dans cette partie, nous allons brièvement revenir sur les interactions de la lumière avec un échantillon complexe.

### 1.2.1 . Interactions avec une particule

Considérons dans un premier temps un échantillon constitué d'une particule unique. Lors de sa rencontre avec la particule, le champ incident peut interagir avec elle en lui cédant tout ou une partie de sa puissance. Cette puissance cédée est absorbée et/ou diffusée par la particule, contribuant alors à l'atténuation, plus précisément appelée extinction, du champ incident. La puissance  $P_e$  prélevée au champ incident peut s'écrire [66] :

$$P_e = \sigma_e I_{inc} \quad (1.1)$$

Où  $I_{inc}$  est l'intensité du champ incident (en  $W \cdot m^{-2}$ ) et  $\sigma_e$  la section efficace d'extinction de la particule en interaction avec le champ (en  $m^2$ ). L'extinction comporte deux composantes : une composante liée à l'absorption par la particule de la puissance cédée par le champ incident et une composante liée à sa diffusion par la particule. On définit alors les sections efficaces de diffusion  $\sigma_s$  et d'absorption  $\sigma_a$  telles que [66] :

$$\sigma_e = \sigma_s + \sigma_a \quad (1.2)$$

#### 1.2.1.1 . Phénomène d'absorption

L'absorption de la lumière par une particule correspond à la conversion de l'énergie électromagnétique cédée à la particule en une autre forme d'énergie. Cette énergie peut être convertie sous diverses formes : chaleur, lumière ré-émise à une autre longueur d'onde dans le cadre de la fluorescence par exemple, que nous présenterons plus tard dans ce chapitre. Les molécules absorbant la lumière dans le domaine du visible sont appelées chromophores. Pour que l'absorption ait lieu, l'énergie de la lumière incidente doit coïncider avec les transitions électroniques et vibrationnelles du chromophore.

#### 1.2.1.2 . Phénomène de diffusion

La diffusion quant à elle naît de la différence d'indice optique entre la particule et le milieu où se propage le champ électromagnétique. Lorsqu'elle rencontre une particule d'indice optique différent de celui du milieu environnant, la lumière peut, en interagissant avec la particule, être déviée de sa trajectoire initiale : la lumière est diffusée. Cette interaction peut se faire de façon élastique, c'est-à-dire sans modification de la fréquence incidente, ou bien de façon inélastique avec modification de la fréquence incidente, comme c'est le cas dans le phénomène de diffusion Raman que nous étudierons dans le chapitre 4.

Lors de la diffusion, l'énergie est redistribuée dans toutes les directions de l'espace. Pour décrire cette redistribution de l'énergie, on introduit la fonction de phase  $p(\theta)$  (en  $sr^{-1}$ ) décrivant la probabilité qu'un photon soit diffusé dans un angle solide unitaire orienté avec un angle  $\theta$  par rapport à sa trajectoire initiale, tel qu'illustré à la figure 1.5. Dans cette définition,  $p(\theta)$  ne dépend que de l'angle polaire et suppose une symétrie de la diffusion selon l'angle azimutal  $\psi$ .

La composante dirigée vers l'avant de chacune de ces trajectoires diffusées est donnée par  $\cos(\theta)$ . On définit alors le facteur d'anisotropie  $g$  comme la valeur moyenne de  $\cos(\theta)$  :

$$g = \langle \cos(\theta) \rangle = \int_0^\pi p(\theta) \cos \theta \, 2\pi \sin \theta \, d\theta \quad (1.3)$$



Aussi écrite de façon équivalente :

$$g = \int_{-1}^1 p(\cos \theta) \cos \theta d \cos \theta \quad (1.4)$$

$g$  décrit la part de diffusion dirigée vers l'avant (flèche rouge dans la figure 1.5).  $g$  varie entre -1 (diffusion exclusivement dirigée vers l'arrière) et 1 (diffusion exclusivement dirigée vers l'avant). Lorsque  $g = 0$ , la diffusion est isotrope, *i.e.*, la lumière est diffusée de façon équiprobable dans toutes les directions de l'espace.

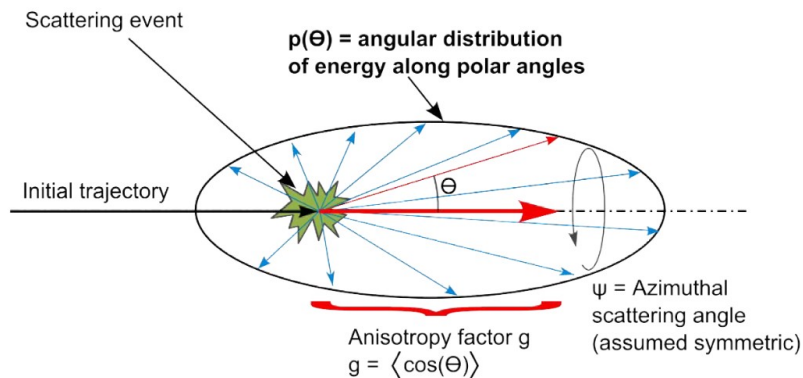


Figure 1.5 – Illustration du facteur d'anisotropie de diffusion  $g$  et de la fonction de phase  $p(\theta)$ . La lumière incidente (flèche noire), suite un événement de diffusion, est redistribuée dans l'espace selon des directions représentées par les flèches bleues. Les trajectoires de la lumière diffusée sont représentées par des flèches bleues et sont principalement dirigées vers l'avant. Une composante avant moyenne, correspondant au facteur d'anisotropie de diffusion  $g = \langle \cos(\theta) \rangle$  est représentée par une flèche rouge. Figure extraite de [6].

### 1.2.1.3 . Théorie de Mie

La diffusion de la lumière par une particule peut être décrite par la théorie de Mie, du nom du physicien allemand Gustav Mie. Cette théorie décrit le cas spécifique de la diffusion d'une onde plane par une particule sphérique et homogène de taille quelconque (bien qu'elle puisse être adaptée à d'autres géométries [67]). Cette théorie fournit les champs diffusés (dont peuvent être déduites les sections efficaces et la fonction de phase) sous forme de développement en série qui peuvent être calculés, à partir du rayon  $R$  de la particule diffusante, de son paramètre de taille  $x = 2\pi R/\lambda$  avec  $\lambda$  la longueur d'onde incidente et du rapport  $m$  de l'indice optique de la particule et de l'indice optique du milieu environnant. La théorie de Mie est couramment utilisée pour traiter la diffusion dans les tissus biologiques.

Dans le cas particulier de particules de taille très inférieure à la longueur d'onde, la diffusion de la lumière est décrite par la théorie de la diffusion de Rayleigh. Dans ce cas, le champ électrique incident agit sur les charges de la particule, les faisant osciller à la même fréquence. Les barycentres des charges positives et négatives se déplacent l'un par rapport à l'autre créant ainsi un moment dipolaire oscillant. Ce moment dipolaire conduit à la formation d'un dipôle, rayonnant un champ électrique induit constituant l'onde diffusée. L'expression de la section efficace de diffusion  $\sigma_s$  s'écrit alors :

$$\sigma_s = \frac{\omega^4}{6\pi c^4} |\alpha(\omega)|^2 \quad (1.5)$$

avec  $\alpha(\omega)$  la polarisabilité de la particule et  $\omega$  la fréquence de l'onde incidente. L'expression de la fonction de phase est :

$$p(\cos \theta) = \frac{3}{4}(1 + \cos^2 \theta) \quad (1.6)$$

Cette fonction de phase montre que dans le cas de la diffusion de Rayleigh, la lumière est diffusée de manière identique dans les directions avant ( $\theta = 0$ ) et arrière ( $\theta = \pi$ ).

A l'inverse, lorsque la particule est de taille très grande devant la longueur d'onde, elle se trouve dans un régime de diffusion spéculaire où s'appliquent les lois de l'optique géométrique. Dans ces conditions, l'onde qui se propage après avoir rencontré la particule de rayon  $R$  est similaire à l'onde plane incidente, obturée par la particule de section géométrique  $\pi R^2$ . L'onde qui continue à se propager va diffracter et ne plus se propager dans la direction incidente, contribuant à l'extinction. On peut montrer qu'en champ lointain, l'effet de la géométrie de la particule et de la diffraction conduit à une section efficace d'extinction  $\sigma_e$  égale à  $2\pi R^2$ , soit deux fois la section géométrique de la particule.

### 1.2.2 . Interactions avec un milieu composé d'une multitude de particules

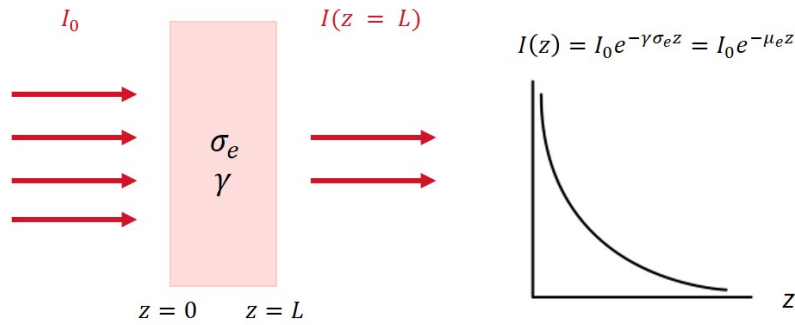


Figure 1.6 – Illustration de la décroissance de Beer-Lambert de l'intensité incidente  $I_0$  au travers d'un milieu diffusant d'épaisseur  $L$ , composé de  $\gamma$  particules par unité de volume, caractérisées par section efficace d'extinction  $\sigma_e$ . La décroissance est exponentielle avec un coefficient de décroissance  $\mu_e$  défini comme le coefficient d'extinction.

Lorsqu'une onde plane traverse un milieu complexe constitué d'une multitude de particules, son intensité décroît au fil de sa propagation par absorption et diffusion. Etablissons alors la loi de décroissance de l'intensité  $I(z)$ , pour une onde plane se propageant selon la direction  $Oz$  au travers d'un tel milieu complexe, caractérisé par un nombre de particules par unité de volume  $\gamma$ . Toutes les particules sont considérées comme identiques et caractérisées par une section efficace d'extinction  $\sigma_e$ , tel qu'illustré à la figure 1.6. En effectuant un bilan de puissance entre les plans  $z$  et  $z + dz$  sur une section  $S$  normale à l'axe  $Oz$ , nous obtenons :

$$I(z + dz)S - I(z)S = SdI = -I(z)\gamma Sdz\sigma_e \quad (1.7)$$

où  $\gamma$  est le nombre de particules par unité de volume contenues dans le milieu. L'expression peut alors se simplifier :

$$\begin{aligned} \frac{dI}{dz} + I(z)\gamma\sigma_e &= 0 \\ I(z) &= I_0 e^{-\gamma\sigma_e z} \end{aligned} \quad (1.8)$$



Cette loi de décroissance exponentielle de l'intensité incidente est appelée loi de Beer-Lambert, illustrée à la figure 1.6. Elle traduit la diminution du nombre de photons balistiques, *i.e.*, n'ayant pas subi d'interaction avec le milieu, au fil de leur propagation. La longueur  $l_e = 1/\gamma\sigma_e$  est appelée libre parcours moyen d'extinction [68, 66] et correspond à la distance parcourue par l'onde dans le milieu entre deux événements d'absorption ou de diffusion. On définit également le coefficient d'extinction  $\mu_e = 1/l_e = \gamma\sigma_e$  (en  $\text{mm}^{-1}$ ) reflétant la décroissance exponentielle de l'intensité par absorption et diffusion.

De façon similaire, nous pouvons définir un libre parcours moyen d'absorption,  $l_a = 1/\gamma\sigma_a$  et un coefficient d'absorption  $\mu_a = \gamma\sigma_a$  (en  $\text{mm}^{-1}$ ), ainsi qu'un coefficient de diffusion  $\mu_s = \gamma\sigma_s$  (en  $\text{mm}^{-1}$ ) et un libre parcours moyen de diffusion  $l_s = 1/\gamma\sigma_s$ . Ce libre parcours moyen peut être vu comme la distance moyenne entre deux événements de diffusion. L'intensité de la lumière balistique, c'est-à-dire n'ayant subi aucune interaction avec le milieu, se propageant selon l'axe  $Oz$  dans un milieu à la fois absorbant et diffusant, peut ainsi s'écrire :

$$I(z) = I_0 e^{-\mu_e z} = I_0 e^{-(\mu_a + \mu_s)z} \quad (1.9)$$

$e^{-\mu_a z}$  correspond à la probabilité d'un photon de ne pas avoir été absorbé après avoir parcouru une distance  $z$  dans le milieu.

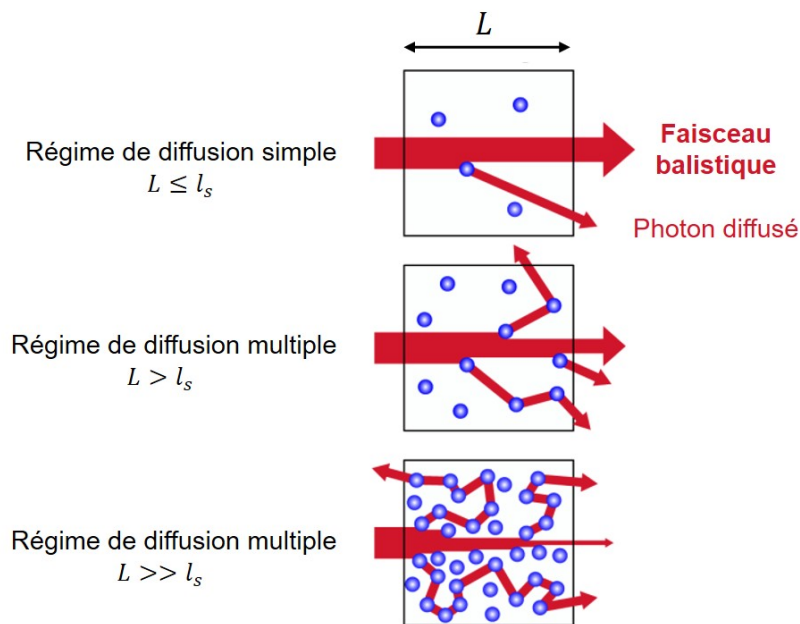


Figure 1.7 – Illustration des différents régimes de diffusion : diffusion simple, diffusion multiple et approximation de la diffusion. Figure extraite puis adaptée de [7].

En fonction de l'échelle de longueur  $L$  du milieu de propagation, deux régimes de diffusion peuvent être distingués, illustrés à la figure 1.7 :

- Régime de diffusion simple : lorsque l'échelle de longueur du milieu traversé par l'échantillon est inférieure ou égale au libre parcours moyen de diffusion, *i.e.*,  $L \leq l_s$ , la plupart des photons sont balistiques ou ont subi au plus un événement de diffusion. C'est généralement ce régime de diffusion qui est exploité pour l'imagerie microscopique conventionnelle.

- Régime de diffusion multiple : lorsque  $L > l_s$ , les photons subissent plusieurs événements de diffusion et rares deviennent les photons balistiques. En particulier, si  $L \gg l_s$  la propagation dans un milieu de coefficient de diffusion  $\mu_s$  et de facteur d'anisotropie  $g$  peut être vue comme équivalente à la propagation dans un milieu isotrope et de coefficient de diffusion  $\mu'_s = \mu_s(1 - g)$ . Ce coefficient  $\mu'_s$  (en  $\text{mm}^{-1}$ ) est appelé coefficient de diffusion réduit. Il décrit la diffusion d'un photon à la manière d'une marche aléatoire, où chaque pas de taille  $l'_s = 1/\mu'_s$  correspond à un événement de diffusion isotrope. Cela est équivalent à dire que le photon a subi  $n$  événements de diffusion avec un pas de taille  $l_s = 1/\mu_s < l'_s$  qui dévient chacun d'un angle  $\theta$  la trajectoire incidente du photon, tel qu'illustré schématiquement à la figure 1.8. Autrement dit, le coefficient de diffusion réduit  $\mu'_s$  traduit la distance parcourue dans le milieu diffusant à partir de laquelle le photon a perdu toute mémoire de sa trajectoire initiale. Cette description de la diffusion multiple est cependant valable à condition que le coefficient d'absorption  $\mu_a \ll \mu'_s$ .

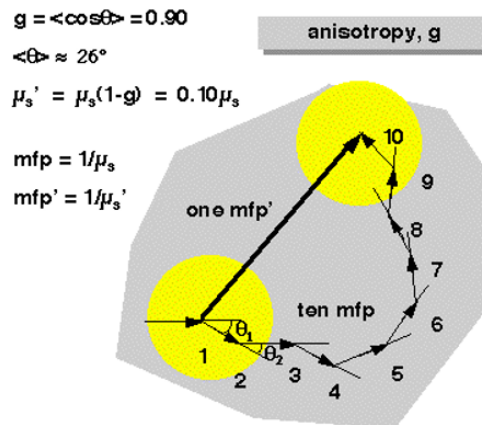


Figure 1.8 – Illustration du lien entre  $\mu'_s$ ,  $\mu_s$  et  $g$  dans le cas où  $g = 0.90$ . Effectuer une marche aléatoire avec un pas  $mfp' = l'_s = 1/\mu'_s$  où chaque pas correspond à un événement de diffusion isotrope est équivalent à effectuer 10 pas de taille  $mfp = l_s = 1/\mu_s = 0.1mfp'$  où chaque pas correspond à un événement de diffusion anisotrope, déviant la trajectoire d'un angle  $\theta$  par rapport à la trajectoire incidente. Figure extraite de [8].

### 1.2.3 . Equation de transfert radiatif

Jusqu'à présent, nous nous sommes intéressés à la décroissance de l'intensité balistique au travers d'un milieu absorbant et diffusant. D'un point de vue du transport énergétique, l'énergie transportée par l'onde balistique est progressivement redistribuée dans le milieu par diffusion. L'énergie totale se propageant dans le milieu correspond alors à la somme de l'énergie transportée par l'onde balistique et de l'énergie redistribuée dans le milieu par diffusion. Le transport de l'énergie dans un milieu absorbant et diffusant est classiquement décrit par l'équation de transfert radiatif (ETR). Cette équation est basée sur une grandeur photométrique, la luminance  $L(r, s, t)$ , décrivant la puissance  $P(r, s, t)$  de la lumière traversant un élément de surface  $dS$  centré au point  $r$ , dans un angle solide élémentaire  $d\Omega$  centré sur la direction  $s$ , dans l'intervalle de fréquences  $[\omega, \omega + d\omega]$  et au temps  $t$  :

$$P(r, s, t) = L(r, s, t)u \cdot n dSd\Omega d\omega$$

Dans les grandes lignes, cette équation est établie à partir d'un bilan d'énergie radiative et permet d'exprimer la luminance  $L(r, s)$  (en  $W \cdot m^{-2} \cdot sr^{-1} \cdot Hz^{-1}$ ) en tout point  $r$  du milieu et se propageant dans une direction de vecteur unitaire  $s$  (ici en régime stationnaire) [69, 70] :

$$s \cdot \nabla L(r, s) = -\mu_e L(r, s) + \frac{\mu_s}{4\pi} \int_{4\pi} L(r, s') p(s, s') d\Omega' \quad (1.10)$$

avec  $\nabla$  l'opérateur gradient par rapport à  $r$  et  $d\Omega'$  est l'angle solide unitaire dans la direction  $s'$ .

Le premier terme de cette équation,  $-\mu_e L(r, s)$  traduit l'extinction de la luminance, *i.e.* sa décroissance, en raison des phénomènes d'absorption et de diffusion par le milieu. D'ailleurs, en décomposant la luminance  $L(r, s)$  en la somme d'une composante balistique  $L_{bal}$  et d'une composante diffuse  $L_{diff}$ , il est possible de retrouver avec cette équation la loi de décroissance de Beer-Lambert évoquée précédemment pour la luminance balistique  $L_{bal}$ .

Le second terme de l'ETR,  $\frac{\mu_s}{4\pi} \int_{4\pi} L(r, s') p(s, s') d\Omega'$ , traduit le gain en luminance dans une direction  $s$  par la diffusion. En effet, des photons se propageant initialement dans une direction  $s'$  donnée peuvent être diffusés dans la direction  $s$  et contribuer à la luminance totale  $L(r, s)$ .

L'idée ici n'est pas de donner plus de détails sur cette théorie de transfert radiatif de par sa complexité, mais d'avoir en tête que cette équation est classiquement utilisée pour modéliser la propagation de la lumière dans le cas d'un régime de diffusion multiple. L'ETR constitue l'équation de base des techniques d'imagerie ou de spectroscopie opérant à des échelles de longueur  $L > l_s$ . C'est par exemple le cas de la spectroscopie de réflexion diffuse, que nous présenterons plus tard dans ce chapitre.

## 1.2.4 . Propriétés optiques de la peau

### 1.2.4.1 . Absorption

Les principaux chromophores de la peau sont l'hémoglobine, l'eau et la mélanine [71]. L'absorption des tissus biologiques en général connaît un minimum dans la gamme spectrale du rouge et proche infrarouge (entre 600 et 1300 nm), gamme appelée « fenêtre thérapeutique » [68], illustrée à la figure 1.9 représentant les spectres d'absorptions des principaux chromophores de la peau. Le minimum d'absorption garantit une pénétration maximale de ces longueurs d'onde dans les tissus et permet ainsi de nombreuses applications biomédicales telles que l'imagerie optique en profondeur comme la LC-OCT. Dans le cas de la peau, le coefficient d'absorption  $\mu_a$  est de l'ordre de 0.1 à 1  $mm^{-1}$  dans la gamme de longueurs d'onde visible et proche infrarouge [71]. Il varie en fonction notamment de la concentration en mélanine (dans l'épiderme) présentant un  $\mu_a$  de l'ordre de 10  $mm^{-1}$  [71] et en vaisseaux sanguins (dans le derme) présentant un  $\mu_a$  de l'ordre de 1 à 5  $mm^{-1}$  [71].

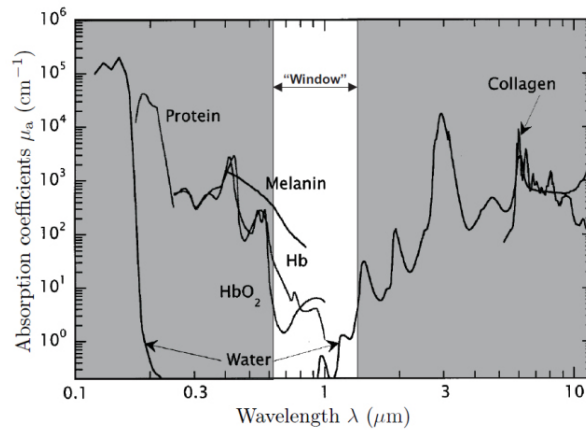


Figure 1.9 – Spectres du coefficient d'absorption des principaux chromophores de la peau. L'absorption de la peau connaît un minimum entre 600 et 1300 nm, gamme appelée « fenêtre thérapeutique ». Figure extraite de [9].

#### 1.2.4.2 . Diffusion

Dans la peau, la diffusion peut être modélisée par une composante due à la diffusion de Mie et une composante due à la diffusion de Rayleigh, en raison des différentes tailles des structures de la peau. A noter que dans la gamme de longueurs d'onde correspondant à la fenêtre thérapeutique, la diffusion de Mie prédomine sur la diffusion de Rayleigh, en raison de la dépendance en  $\omega^4$  de la diffusion de Rayleigh. Les principales structures responsables de la diffusion dans la peau sont les protéines filamenteuses [72]. Dans l'épiderme, les fibres de kératine produites par les kératinocytes sont responsables de la diffusion de Mie (la théorie de Mie pouvant être également appliquée pour décrire la diffusion par des particules cylindriques telles que des fibres [67]). Les organelles des kératinocytes (mitochondries, lysosomes et autres), de par leurs tailles de l'ordre de 0.5  $\mu\text{m}$  à quelques  $\mu\text{m}$ , contribuent également à la diffusion de Mie [73]. Les noyaux des kératinocytes, composés de filaments de chromatine de quelques dizaines de nm, sont responsables de la diffusion de Rayleigh. Cependant, la diffusion de Rayleigh des noyaux est faible en comparaison de la diffusion de Mie par les structures de taille proches de la longueur d'onde mentionnés précédemment. Ceci explique pourquoi les noyaux des kératinocytes apparaissent sombres dans les images de microscopie confocale et de LC-OCT comme nous le verrons dans la suite [74]. Dans l'épiderme, les mélanosomes, des organelles des mélanocytes produisant la mélanine et situés dans la couche basale, ont également une contribution significative à la diffusion de Mie avec des tailles allant jusqu'à 1-2  $\mu\text{m}$  [72, 75]. Ils se retrouvent ensuite fragmentés en plus petites particules lorsqu'ils migrent vers le haut de l'épiderme. Dans le derme, les diffuseurs majoritaires sont les fibres de collagène et d'élastine. Le collagène se présente sous la forme fibrilles de l'ordre de 100 nm de diamètre, regroupées en faisceaux de fibres de 1 à 8  $\mu\text{m}$  de diamètre [75]. Ces faisceaux de fibres sont responsables de la diffusion de Mie qui est dirigée vers l'avant, tandis que la diffusion de Rayleigh se manifeste à l'échelle des fibrilles de collagène plus petites [73]. Cependant la contribution de la diffusion de Rayleigh par les fibrilles est négligeable devant la diffusion de Mie par les faisceaux de fibres dans la gamme du proche infrarouge.

Cette multitude de structures cellulaires et sub-cellulaires fait de la peau un milieu relativement diffusant, avec des coefficients de diffusion  $\mu_s$  allant d'environ 5  $\text{mm}^{-1}$  à 20  $\text{mm}^{-1}$  dans l'épiderme et le

derme dans la gamme du rouge et proche infrarouge [76, 77]. La couche cornée quant à elle présente un coefficient de diffusion bien plus élevé (jusqu'à plusieurs dizaines de  $\text{mm}^{-1}$ ) de par la densité élevée de kératine qui s'y trouve [76].

La diffusion de la lumière dans les tissus biologiques est en générale anisotrope et majoritairement dirigée vers l'avant. De ce fait, la fonction de phase  $p(\cos \theta)$  est couramment approximée par la fonction de Henyey-Greenstein qui décrit bien la dépendance angulaire de la diffusion dans le cas d'une forte anisotropie de diffusion :

$$p(\cos \theta) = \frac{1}{2} \frac{1 - g^2}{(1 + g^2 - 2g \cos \theta)^{\frac{3}{2}}} \quad (1.11)$$

Dans la peau, le facteur d'anisotropie  $g$  atteint des valeurs allant de 0.7 à 0.95 dans l'épiderme et le derme (toujours dans la gamme du rouge et proche infrarouge) [71, 68, 76]. Du fait de l'orientation et l'alignement des fibres de kératine, la couche cornée est une couche très anisotrope avec un facteur  $g$  supérieur à 0.9 [76].

### 1.2.5 . Lien avec l'imagerie et la spectroscopie optique

Comme on l'a vu dans les sections précédentes, la lumière se propageant au sein d'un milieu complexe tel que la peau peut interagir avec les constituants du milieu par absorption et/ou diffusion. Les techniques d'imagerie optique et de spectroscopie optique exploitent ces interactions entre la lumière et le milieu pour obtenir des informations morphologiques ou fonctionnelles du milieu de propagation. L'analyse du spectre d'absorption par exemple peut refléter la nature chimique des chromophores du milieu puisque l'absorption n'a lieu que lorsque l'énergie incidente coïncide avec les niveaux électroniques et vibrationnels des chromophores. L'imagerie et la spectroscopie de fluorescence sont des techniques optiques tirant profit de cette absorption.

D'autres techniques d'imagerie et de spectroscopie optiques exploitent quant à elle le phénomène de diffusion. En fonction des propriétés optiques de diffusion ( $\mu_s$  et  $g$ ) du milieu, les photons incidents peuvent suivre différents trajets dans le milieu suite à un ou plusieurs événements de diffusion. En fonction de leur trajet, les photons peuvent être regroupés selon différentes catégories, illustrées à la figure 1.10 :

- les photons balistiques : ils traversent le milieu sans interagir avec celui-ci.
- les photons rétro-diffusés : il s'agit des photons ayant subi un unique événement de diffusion, dirigé vers l'arrière.
- les photons serpentiles : il s'agit de photons diffusés plusieurs fois dans une direction proche de l'axe optique. Ces photons sont difficiles à distinguer des photons balistiques et ils sont d'autant plus nombreux que le milieu présente un facteur d'anisotropie de diffusion  $g$  élevé.
- les photons multiples diffusés : il s'agit de photons diffusés plusieurs fois mais dont la direction est aléatoire et différente des photons balistiques, contrairement aux photons serpentiles.

Selon les modalités d'imagerie ou de spectroscopie, certains types de photons diffusés sont sélectionnés. Les techniques de microscopie optique de la peau exploitent les photons rétro-diffusés, car, comme nous le verrons par la suite, ces photons portent une information précise sur la localisation de l'évènement de diffusion et permettent d'atteindre une haute résolution d'imagerie, tandis que

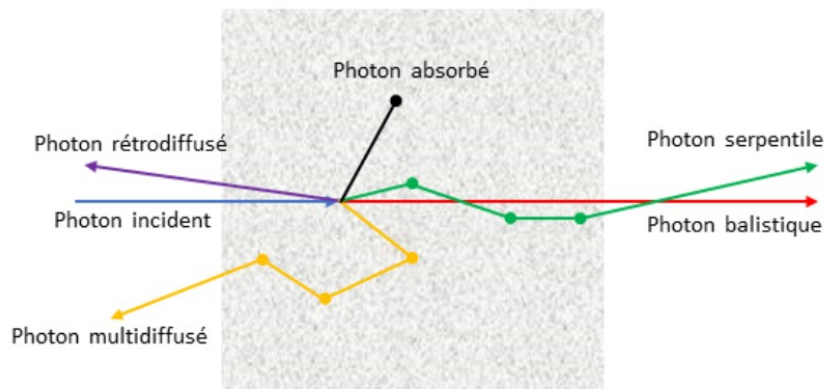


Figure 1.10 – Catégorisation des photons se propageant au sein d'un milieu absorbant et/ou diffusant en fonction de leurs interactions avec le milieu. Figure extraite de [10].

d'autres techniques comme la spectroscopie de réflexion diffuse exploitent l'information portée par des photons multiples diffusés [78, 79]. Dans la suite de ce chapitre, nous allons présenter les différentes techniques de microscopie optique, puis de spectroscopie optique, dédiées à l'imagerie de la peau. Nous nous focaliserons sur les principales modalités optiques utilisées *in vivo*.

### 1.3 . L'état de l'art des techniques de microscopie optique en réflectance de la peau

#### 1.3.1 . La microscopie confocale en réflectance

La microscopie confocale en réflectance (RCM pour « Reflectance Confocal Microscopy » en anglais) est une technique d'imagerie introduite dans les années 1950 pour imager des tissus biologiques en profondeur [80]. Un schéma décrivant le principe de la microscopie confocale est donné à la figure 1.11. Le tissu à imager est éclairé par un faisceau focalisé en un point par un objectif de microscope. Ce faisceau, bien que focalisé en un point, éclaire l'ensemble de la profondeur de l'échantillon. Un certain nombre de photons sont rétro-diffusés sur toute la profondeur du tissu et collectés par le même objectif de microscope puis envoyés en direction d'un capteur. Cependant, seuls les photons rétro-diffusés au niveau du point de focalisation sont effectivement conjugués avec le capteur. Les photons rétro-diffusés à d'autres profondeurs sont aussi collectés par le capteur mais leur image par l'objectif est défocalisée sur le capteur. Si rien n'est fait, la superposition sur le capteur des images défocalisées provenant des différentes profondeurs brouille l'image focalisée du point de focalisation. L'utilisation d'un diaphragme, conjugué au point de focalisation et placé juste avant un détecteur, permet alors de sélectionner uniquement les photons rétro-diffusés au niveau du point de focalisation et de rejeter les photons rétro-diffusés à d'autres profondeurs. De cette façon, la majeure partie de la lumière défocalisée est rejetée par le diaphragme tandis que l'image du point de focalisation est correctement focalisée sur le détecteur. On parle alors de *filtrage confocal*.

Ce schéma est très différent de la microscopie conventionnelle : en microscopie conventionnelle, l'échantillon est éclairé sur une large surface et profondeur et l'intensité rétro-diffusée est collectée par un objectif de microscope puis envoyée sur une caméra 2D. De ce fait, la caméra collecte l'intensité

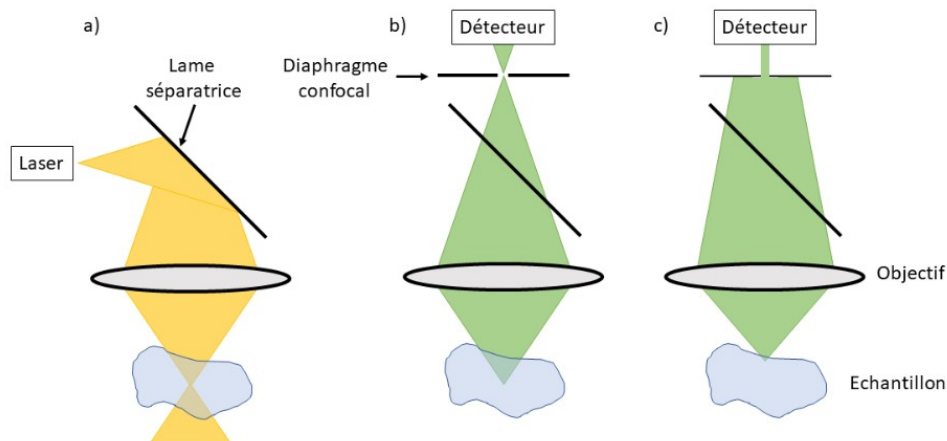


Figure 1.11 – Schéma de principe de la microscopie confocale. a) Le tissu à imager est éclairé par un faisceau focalisé en un point par un objectif de microscope (faisceau jaune). Ce faisceau, bien que focalisé, éclaire toute la profondeur du tissu. Un certain nombre de photons sont ainsi rétro-diffusés sur toute la profondeur du tissu, illustrés par le faisceau vert. b) L'utilisation d'un diaphragme placé avant le détecteur, conjugué du point de focalisation, permet de laisser passer les photons rétro-diffusés au niveau du point de focalisation, dont l'image par l'objectif est focalisée sur le capteur. c) Les photons rétro-diffusés en dehors du point de focalisation, dont l'image par l'objectif est défocalisée sur le capteur, sont majoritairement rejetés par le diaphragme. Figure extraite de [10].

rétro-diffusée à toutes les profondeurs en même temps, générant sur la caméra une superposition d'images défocalisées brouillant l'image focalisée issue du plan de focalisation de l'objectif. C'est bien l'effet du filtrage confocal qui permet d'imager un échantillon en profondeur en sélectionnant uniquement les photons rétro-diffusés en provenance d'une profondeur bien spécifique.

Le diamètre du diaphragme permet de définir l'épaisseur autour du point de focalisation sur laquelle les photons rétro-diffusés peuvent être collectés, et régissant ainsi la résolution axiale du microscope confocal. En pratique, on choisit généralement un diamètre de l'ordre de grandeur de la tache d'Airy afin que la lumière rétro-diffusée au niveau du point de focalisation soit conservée par le diaphragme, tout en rejetant la très grande majorité de la lumière défocalisée.

En rejetant la lumière défocalisée, le filtrage confocal permet également de limiter très fortement la collection de photons multi-diffusés ayant une direction aléatoire. Du fait de leur trajet complexe dans l'échantillon, leur origine dans le milieu ne peut être déterminée avec précision comme c'est le cas des photons rétro-diffusés, ayant subi un événement de diffusion au niveau du point de focalisation. Le filtrage confocal permet ainsi de s'affranchir de ces photons multi-diffusés contribuant à brouiller l'image du point de focalisation.

A la différence de la microscopie conventionnelle, la microscopie confocale utilise une source spatialement cohérente afin de pouvoir la focaliser en un point de l'échantillon par un objectif de microscope. La longueur d'onde est généralement choisie dans le proche infrarouge ( $\sim 850$  nm), au cœur de la fenêtre thérapeutique, afin de garantir une pénétration maximale dans les tissus. Les objectifs de microscope utilisés en microscopie confocale ont généralement des ouvertures numériques élevées ( $ON = 0.9$ ) afin d'atteindre une haute résolution spatiale, au détriment d'un champ de vue limité typiquement à  $0.5 \text{ mm} \times 0.5 \text{ mm}$  ( $x \times y$ ) et d'une sensibilité aux aberrations en profondeur. La profondeur de pénétration typique de la RCM est de l'ordre de  $300 \mu\text{m}$ . Par définition, l'acquisition d'une image en microscopie confocale se fait point par point en balayant le point de focalisation dans



l'échantillon. Les résolutions axiale et latérale étant dépendantes l'une de l'autre, il est difficile d'obtenir une résolution spatiale isotrope. En pratique, on préfère ainsi effectuer un balayage latéral afin de générer des images horizontales, aussi appelées images *en face*, présentant une résolution latérale identique dans les deux directions X et Y. Des images 3D peuvent être acquises par concaténation d'images horizontales acquises à différentes profondeurs, en translatant axialement le point de focalisation entre l'acquisition de chaque image horizontale. Cependant, on présente rarement des images verticales du fait de la différence de résolution dans les deux directions X et Z.

La microscopie confocale en réflectance est une technique d'imagerie optique très utilisée en dermatologie du fait de sa résolution spatiale élevée permettant une visualisation des structures de la peau avec un niveau de détail comparable à l'histologie, mais ce *in vivo* grâce au sectionnement optique par filtrage confocal. Cependant, la comparaison aux images verticales de coupes histologiques peut être rendue complexe du fait de l'orientation horizontale des images de microscopie confocale.

Parmi les systèmes de RCM commercialisés pour la dermatologie, les systèmes Vivascope développés par Caliber ID sont les plus répandus. Ces systèmes de RCM fournissent des images avec une résolution latérale  $< 1.25 \mu\text{m}$  et un sectionnement optique  $< 5 \mu\text{m}$  sur un champ de  $0.5 \text{ mm} \times 0.5 \text{ mm}$  à  $0.75 \text{ mm} \times 0.75 \text{ mm}$  ( $x \times y$ ), selon le dispositif de la gamme Vivascope choisi [11]. Des images de la peau saine imagée par ce type de système RCM sont données à la figure 1.12.

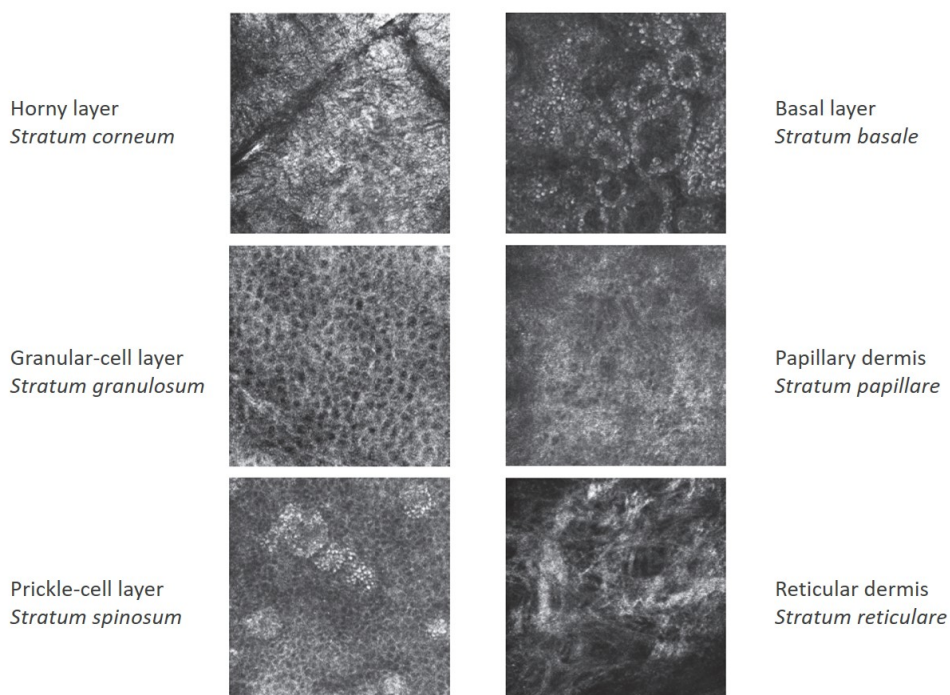


Figure 1.12 – Images horizontales de peau saine, acquises dans les différentes couches de la peau par un système de RCM Vivascope. Images issues et adaptées de [11].



### 1.3.2 . La tomographie par cohérence optique

La tomographie par cohérence optique, communément appelée OCT pour « Optical Coherence Tomography » en anglais, est une technique d'imagerie optique permettant de réaliser de manière non invasive et *in vivo* des images en profondeur d'échantillons.

D'un point de vue conceptuel, l'OCT est basée sur le même principe que l'échographie. En échographie, une onde ultrasonore est envoyée dans le tissu étudié puis réfléchi par les structures rencontrées dans le tissu. L'intensité de l'écho produit par la réflexion et la durée de propagation de l'onde ultrasonore permettent de déduire la position et le coefficient de réflexion des structures de l'échantillon, permettant de former une image échographique. L'OCT en revanche utilise une onde lumineuse au lieu d'une onde ultrasonore. Les longueurs d'onde plus courtes permettent d'avoir une meilleure résolution que l'échographie, en contrepartie d'une profondeur de pénétration plus faible. Au fil de sa propagation, la lumière est rétro-diffusée par les structures de l'échantillon présentant des hétérogénéités d'indice optique. L'intensité de la lumière rétro-diffusée en fonction de la position de ces structures permet de générer une image de l'échantillon.

Cependant, la lumière étant bien plus rapide que les ondes ultrasonores, il n'est pas possible d'en mesurer simplement la durée de propagation à l'aide de détecteurs conventionnels. Une option est alors de faire appel à des techniques dites d'interférométrie en faible cohérence pour obtenir l'information sur la position des structures diffusant la lumière. Au sein d'un interféromètre dont l'un des bras inclut l'objet à observer, cette faible cohérence temporelle permet d'obtenir des interférences uniquement à partir des particules pour lesquelles la durée de propagation de la lumière de la source lumineuse à l'objet est sensiblement identique à la durée de propagation de la source à la surface de référence de l'interféromètre. En isolant le signal d'interférence (franges d'interférences), il est ainsi possible de récupérer une information très localisée spatialement (dans la direction de propagation de la lumière). Le sectionnement optique se fait avec une résolution axiale inversement proportionnelle à la largeur spectrale de la source. La source utilisée en OCT est donc une source à large spectre, dont la longueur d'onde centrale est généralement choisie dans la fenêtre thérapeutique afin de maximiser la profondeur de pénétration. Nous reviendrons en détail sur le principe de fonctionnement de l'OCT au chapitre suivant.

En fonction du choix de la source, l'OCT permet de générer des images avec des résolutions allant de  $\sim 1$  à  $15 \mu\text{m}$ , sur des profondeurs allant de 1 à plusieurs mm. Les images d'OCT sont généralement des images verticales, donc orientées de la même façon que les images histologiques, car comme nous le verrons dans le chapitre suivant, le schéma d'acquisition de l'OCT est particulièrement adapté à ce mode d'imagerie. De plus, la résolution latérale est en général moins élevée que la résolution axiale du fait de l'utilisation d'optiques faiblement ouvertes, favorisant ainsi l'imagerie verticale plutôt que l'imagerie horizontale. De ce fait, l'OCT constitue un intermédiaire en termes d'échelle entre la microscopie confocale et l'échographie. L'OCT présente une résolution plus faible que la microscopie confocale, mais elle permet d'accéder à des profondeurs d'imagerie plus importantes.

L'OCT a connu un développement rapide suite à son invention en 1991 [81] en raison de sa capacité à acquérir des images en coupe verticale de structures à l'échelle de  $10\text{-}100 \mu\text{m}$  avec une résolution beaucoup plus élevée que l'échographie. Cette technique a très vite trouvé application en ophtalmologie, où elle a apporté une visualisation de la rétine auparavant inaccessible. L'OCT constitue aujourd'hui un examen cliniquement répandu en ophtalmologie. Elle est également couramment

utilisée en cardiologie [82]. En dermatologie, l'OCT est également utilisée pour l'imagerie *in vivo* de la peau [83]. Des systèmes commerciaux d'OCT existent pour l'imagerie *in vivo* de la peau, tels que le dispositif Vivosight commercialisé par Michelson Diagnostics Limited ou le système HD-OCT SkinTell autrefois commercialisé par Agfa Healthcare. Un exemple d'image OCT d'une peau saine, obtenue avec un système commercial Vivosight, est donné à la figure 1.13.

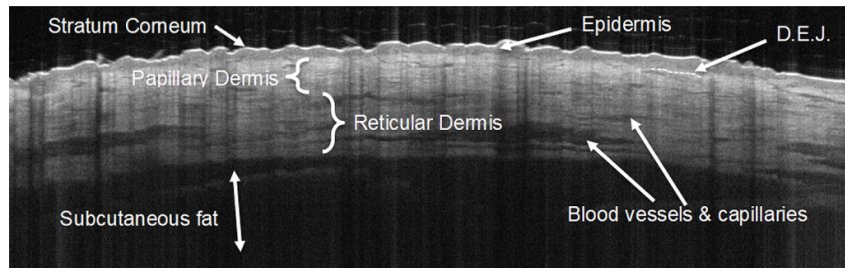


Figure 1.13 – Image OCT d'une peau saine imagée avec le système commercial Vivosight, montrant les principales couches superficielles et structures de la peau sur champ de vue de 6 mm × 6 mm ( $x \times z$ ). Figure issue de [12].

### 1.3.3 . La tomographie par cohérence optique confocale à balayage de ligne (LC-OCT)

La tomographie par cohérence optique confocale à balayage de ligne (LC-OCT pour « Line-Field Confocal Optical Coherence Tomography » en anglais) est une technique d'imagerie optique permettant d'obtenir des images en profondeur et à haute résolution d'échantillons. Inventée au laboratoire Charles Fabry à l'Institut d'Optique, la LC-OCT a été développée et est aujourd'hui commercialisée par l'entreprise DAMAE Medical pour l'imagerie *in vivo* de la peau [84].

Son principe repose sur une combinaison de l'OCT et de la RCM : elle repose comme l'OCT sur des interférences en lumière de faible cohérence et dispose d'un effet de filtrage confocal apporté par un éclairage de l'échantillon le long d'une ligne et une détection de l'intensité rétro-diffusée par une caméra ligne. En combinant les deux modalités, la LC-OCT bénéficie des atouts de chacune, à savoir entre autres la haute résolution spatiale de la RCM et une profondeur de pénétration accrue due au filtrage interférométrique de l'OCT. Elle bénéficie également du mode d'imagerie horizontal de la RCM et de l'imagerie verticale de l'OCT. De ce fait, la LC-OCT permet de générer des images bidimensionnelles (2D) et tridimensionnelles (3D) de la peau, avec une résolution cellulaire de  $\sim 1 \mu\text{m}$  et une profondeur de pénétration allant jusqu'à 500  $\mu\text{m}$  et sur un champ de vue latéral de 1.2 mm × 0.5 mm ( $x \times y$ ) [85]. Un exemple d'image 3D de la peau saine est donné à la figure 1.14. L'imagerie LC-OCT sera décrite plus en détail dans le chapitre 2 suivant.

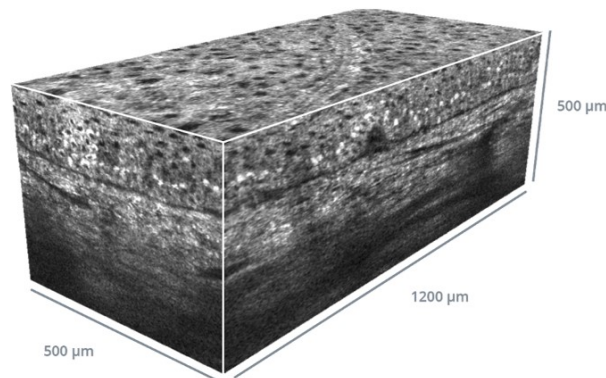


Figure 1.14 – Image LC-OCT 3D d'une peau saine, couvrant un champ de vue de  $1.2 \text{ mm} \times 0.5 \text{ mm} \times 0.5 \text{ mm}$  ( $x \times y \times z$ ) avec une résolution isotrope de  $\sim 1 \mu\text{m}$ .

## 1.4 . L'état de l'art des méthodes de microscopie et spectroscopie moléculaires de la peau

### 1.4.1 . Les méthodes de fluorescence à un photon

#### 1.4.1.1 . La microscopie confocale en fluorescence

La microscopie confocale en fluorescence est une variante de la microscopie confocale en réflectance précédemment décrite. La fluorescence est un phénomène physique consistant à amener les électrons d'une molécule dite fluorescente dans un état électronique excité via l'absorption d'un photon dont l'énergie correspond à la transition entre le niveau électronique fondamental et le niveau électronique excité. Chaque état électronique comporte plusieurs états vibrationnels, tels qu'illustrés à la figure 1.15. Les électrons se désexcitent alors spontanément en subissant une succession de transitions non radiatives entre les niveaux vibrationnels, jusqu'à retomber au niveau électronique fondamental par une transition radiative, *i.e.*, en émettant un photon d'énergie plus faible, donc de longueur d'onde plus élevée, que celle du photon absorbé. Du fait des multiples états électroniques et vibrationnels, de multiples transitions sont possibles, telles qu'illustrées à la figure 1.15. La fluorescence présente généralement des spectres d'excitation et d'émission assez larges et lisses.

Le montage d'un microscope confocal en fluorescence est similaire à celui de la figure 1.11, à la différence que la lame séparatrice est remplacée par une lame dichroïque. Cette lame dichroïque permet d'amener le faisceau laser d'excitation sur l'échantillon, puis de transmettre le signal de fluorescence en direction du capteur tout en rejetant la rétro-diffusion à la longueur d'onde d'excitation. Éventuellement, un filtre passe-haut peut être ajouté afin de minimiser le signal de rétro-diffusion, celui-ci étant généralement dominant sur le signal de fluorescence. Une image de l'intensité de la fluorescence émise peut alors être construite en balayant le point focal d'excitation.

La fluorescence excitée peut être endogène ou exogène. La peau humaine comporte plusieurs fluorophores endogènes incluant des coenzymes, telles que l'hydrure de nicotinamide adénine dinucléotide (NADH), les flavines, les porphyrines, des protéines telles que la kératine, le collagène, l'élastine, des acides aminés tels que le tryptophane, la tyrosine, ou encore des vitamines et lipides [86, 87]. De ce fait, la fluorescence endogène peut être exploitée *in vivo* pour obtenir des informations biochimiques

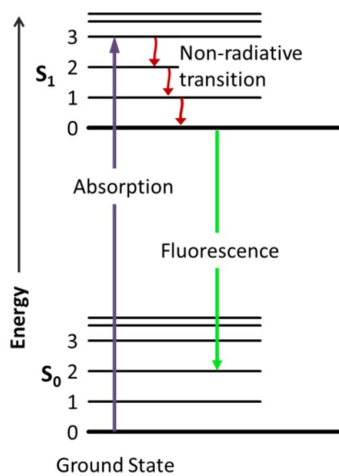


Figure 1.15 – Illustration du phénomène de fluorescence sur un diagramme de Jablonski représentant deux états électroniques (excité et fondamental) avec leurs différents états vibrationnels. Figure issue de [13].

sur les fluorophores, incluant notamment des informations sur l'activité métabolique de la peau via les coenzymes (NADH, flavines, porphyrines) [87]. Ces fluorophores sont généralement excités dans les ultraviolets et les courtes longueurs d'onde du visible. Les spectres d'absorption et d'émission de fluorescence des principaux fluorophores des tissus biologiques, comprenant ceux de la peau, sont donnés à la figure 1.16. Cependant, on peut voir à la figure 1.16, les spectres d'absorption et d'émission des fluorophores se superposent nettement, ce qui rend difficile la distinction des différents fluorophores au sein d'une même image de microscopie confocale en fluorescence si seule l'intensité de la fluorescence est détectée. Par ailleurs, la fluorescence endogène des tissus biologiques étant excitée par des courtes longueurs d'onde, la profondeur de pénétration se trouve assez limitée par rapport à la microscopie confocale en réflectance. Comme nous le verrons par la suite, la fluorescence endogène, aussi appelée auto-fluorescence, est plus couramment exploitée dans une configuration spectroscopique, utilisant plusieurs longueurs d'onde d'excitation afin de pouvoir tirer des informations sur les différents fluorophores présents.

Une autre possibilité est d'utiliser des marqueurs fluorescents qui ciblent des molécules sub-cellulaires spécifiques, notamment des protéines, ou des marqueurs qui vont préférentiellement s'accumuler dans les cellules cancéreuses. Ces derniers sont généralement des molécules photo-sensibilisantes utilisées pour la photothérapie dynamique et qui présentent des propriétés de fluorescence, ce qui permet un suivi du traitement par l'image. Ces marqueurs présentent un signal de fluorescence plus conséquent que les fluorophores endogènes, ce qui permet de générer des images de fluorescence des structures ayant été ciblées par le marqueur exogène. L'utilisation de fluorophores exogènes permet également d'apporter une dimension dynamique à l'image de microscopie confocale en suivant l'assimilation et la distribution de la fluorescence par les cellules *in vivo* [15]. Des images de microscopie confocale en fluorescence obtenues *in vivo* par l'injection de fluorescéine sont données pour exemple à la figure 1.17.

L'utilisation de la microscopie confocale en fluorescence exogène est plus courante *ex vivo* car il

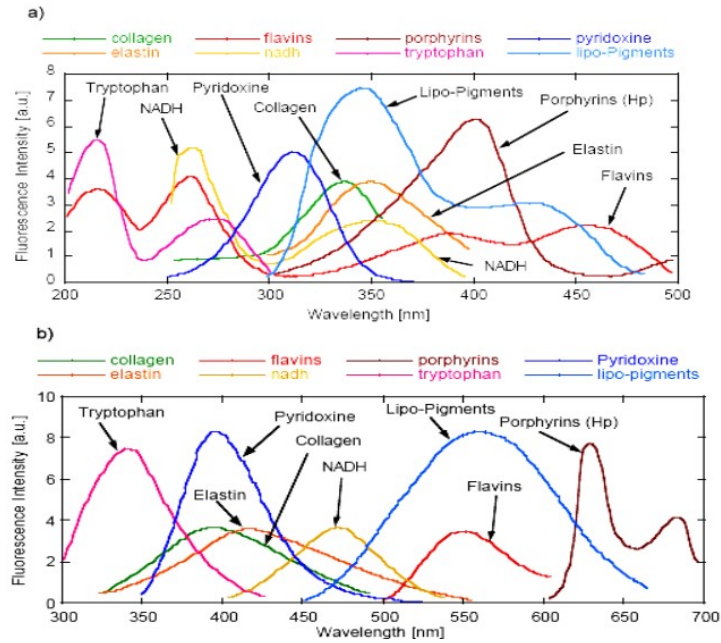


Figure 1.16 – a) Spectres d'absorption et b) d'émission d'auto-fluorescence des principaux fluorophores endogènes des tissus biologiques. Figure issue de [14].

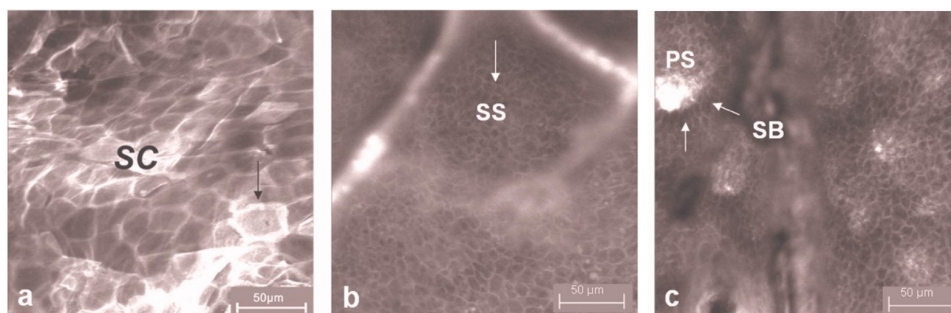


Figure 1.17 – Images de microscopie confocale en fluorescence de la peau saine, marquée à la fluorescéine. a) Image de la couche cornée. Les espaces intercellulaires environnants apparaissent sous la forme d'un bord brillant dû à l'accumulation de fluorescéine (flèche noire). b) Image du stratum spinosum (SS) avec ses kératinocytes. c) Image de la couche basale (SB), présentant des kératinocytes et des papilles (PS). Le centre de chaque papille apparaît clair en raison de l'accumulation de fluorescéine. Figure issue de [15].

Il y a encore peu de marqueurs exogènes approuvés pour l'utilisation *in vivo*. On peut citer la fluorescéine, le vert d'indocyanine ou le bleu de méthylène, auxquelles s'ajoutent certains marqueurs utilisés pour la photothérapie telles que les phtalocyanines, chlorines et précurseurs photosensibles, tels que l'acide delta-aminolévulinique (5-ALA) [16]. Pour l'analyse *in vivo* en fluorescence, il est préférable d'utiliser des techniques de spectroscopie d'auto-fluorescence ou des méthodes d'imagerie basées sur des mécanismes de fluorescence non-linéaires, deux approches ne nécessitant pas de marqueur mais permettant d'apporter des informations plus spécifiques sur les fluorophores de la peau que l'imagerie confocale en fluorescence (endogène).

#### 1.4.1.2 . La spectroscopie d'auto-fluorescence

Comme on l'a vu dans la section précédente, les fluorophores endogènes de la peau émettent, suite à une excitation, de la fluorescence dans un certain spectre d'émission. Au-delà de faire de l'imagerie en collectant simplement l'intensité de la fluorescence émise, il est également possible d'analyser le spectre de la fluorescence afin d'obtenir des informations sur les fluorophores endogènes de la peau. On parle alors de spectroscopie d'auto-fluorescence. La spectroscopie d'auto-fluorescence peut être implémentée dans une configuration confocale, mais elle semble plus couramment implémentée à une échelle macroscopique, utilisant des sondes fibrées pour guider l'excitation sur la peau et collecter la fluorescence émise sur une région d'intérêt de la peau (sur un diamètre typiquement de l'ordre de quelques centaines de  $\mu\text{m}$ ) [88]. L'excitation peut être réalisée à une longueur d'onde donnée, puis la fluorescence émise analysée avec un spectromètre. Connaissant le spectre d'émission des principaux fluorophores de la peau et leur efficacité quantique, il est possible, par des méthodes d'ajustement de courbe, d'évaluer la contribution de chaque fluorophore au spectre de fluorescence total [89]. Pour mieux distinguer la contribution des différents fluorophores, plusieurs longueurs d'onde d'excitation peuvent être utilisées successivement. Un spectre d'auto-fluorescence est alors collecté pour chaque longueur d'onde d'excitation, tel qu'illustré à la figure 1.18. La forme du spectre change avec la longueur d'onde d'excitation en raison de la contribution variable de chacun des fluorophores, dépendant de leur spectre d'absorption et d'émission. Connaissant leur minima et maxima d'absorption et d'émission, il est alors plus facile d'identifier leur contribution qu'en utilisant une unique longueur d'onde d'excitation et l'utilisation de modèles de déconvolution permet de remonter à la concentration relative des différents fluorophores [90]. Des systèmes de spectroscopie d'auto-fluorescence sont rapportés dans la littérature [91, 92] mais ce type de système nécessite une analyse assez complexe et semble encore au stade de recherche ou de validation clinique. Parmi les systèmes les plus aboutis, on peut mentionner le système développé par le laboratoire du CRAN, appelé SpectroLive, permettant l'acquisition de spectres d'auto-fluorescence à 5 longueurs d'onde [93].



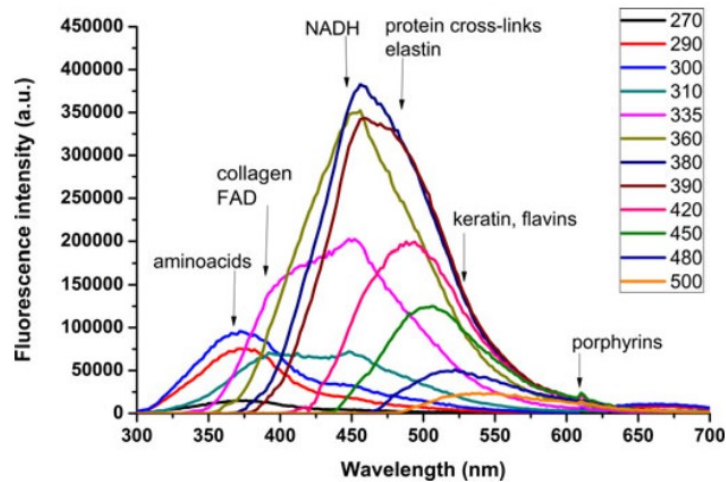


Figure 1.18 – Spectres d'auto-fluorescence de la peau saine à différentes longueurs d'onde d'excitation (de 270 à 500 nm) et identification des principaux composés fluorescents endogènes observés. Figure issue de [16].

## 1.4.2 . Les techniques de fluorescence non-linéaire

### 1.4.2.1 . La microscopie de fluorescence à deux photons et la microscopie de seconde et triple harmoniques

Les techniques de microscopie non-linéaire reposent sur l'interaction simultanée de plusieurs photons avec une molécule donnée. Elles génèrent alors une émission de fluorescence à des fréquences doublées ou triplées par rapport à la fréquence des photons incidents. Trois principales techniques de microscopie non-linéaire peuvent être distinguées : la microscopie en fluorescence à deux photons, la microscopie de seconde harmonique (SHG pour « Second-Harmonic Generation » en anglais) et la microscopie de troisième harmonique (THG pour « Third-Harmonic Generation »). Le principe de chacune de ces trois techniques est décrit à la figure 1.19. Comme pour la microscopie confocale en fluorescence, le signal en microscopie à deux photons découle d'un phénomène d'absorption de deux photons par un fluorophore, suivi de l'émission d'un photon ayant environ le double d'énergie des photons absorbés (à une transition non radiative près). Les techniques de microscopie de seconde et troisième harmoniques reposent quant à elles sur la polarisation des molécules de l'échantillon sous l'effet du champ incident, qui rayonnent alors un champ présentant des fréquences doubles et triples de la fréquence incidente. Ce phénomène est instantané et les photons générés sont cohérents, à la différence de la fluorescence. Ces techniques de génération multi-harmoniques ne nécessitent pas la présence de fluorophores dans l'échantillon, mais elles sont tout de même basées sur des interactions simultanées de deux ou trois photons pour générer un photon de fréquence double ou triple. Néanmoins, seules les structures polarisables ne présentant pas de centre de symétrie peuvent générer des secondes harmoniques [94]. La microscopie SHG permet donc par exemple d'imager des structures linéaires, telles que les fibres de collagène dans la peau. La microscopie THG s'applique quant à elle à tout milieu polarisable [94].

Du fait que l'interaction simultanée de plusieurs photons est rare, les effets non-linéaires de fluorescence à deux photons, de seconde et triple harmoniques ne se produisent qu'au niveau du point

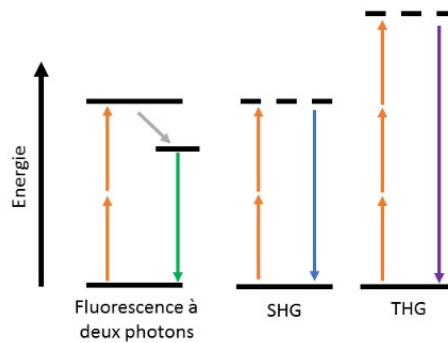


Figure 1.19 – Diagramme de Jablonski décrivant les mécanismes de génération de fluorescence à deux photons, de seconde harmonique (SHG) et de troisième harmonique (THG). Figure issue de [10].

de focalisation où est concentrée la lumière, ce qui génère un effet confocal sans même requérir de diaphragme devant le capteur. De plus, la fréquence des photons émis étant doublée ou triplée, il est possible d'utiliser des longueurs d'onde d'excitation dans la gamme du rouge ou proche infrarouge pour générer de la fluorescence dans le domaine visible. L'utilisation de longueurs d'excitation plus grandes permet d'augmenter la pénétration dans les tissus biologiques par rapport à la microscopie confocale en fluorescence conventionnelle. En associant les techniques de microscopie à deux photons

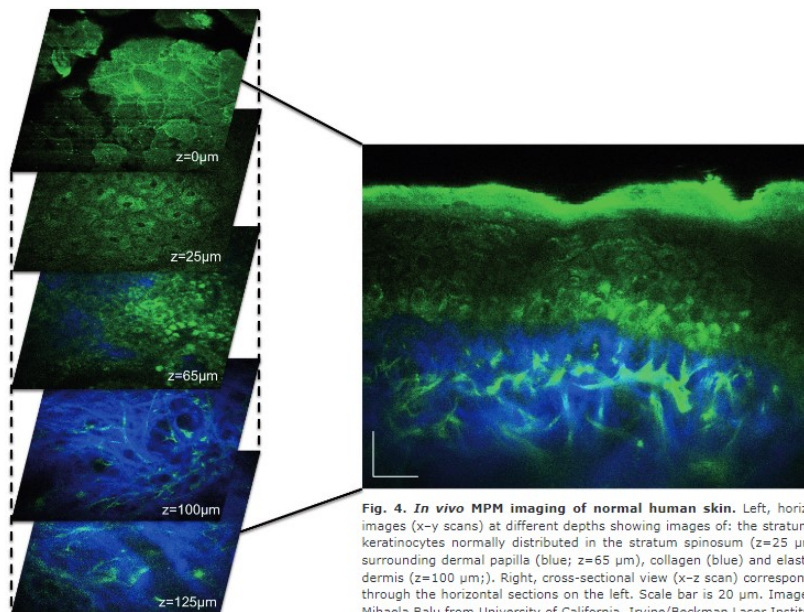


Figure 1.20 – Images de microscopie non-linéaire (fluorescence à deux photons et génération de seconde harmonique) des différentes couches de la peau saine. Ces images permettent d'observer les cellules basales de l'épiderme (en vert), les fibres d'élastine du derme (en vert), les papilles dermiques (en bleu) et les fibres de collagène (en bleu). Figure issue de [17].

et de génération d'harmoniques, il est possible d'obtenir des images *in vivo* de la peau de très haute résolution, combinant informations morphologiques et moléculaires. En effet, à la différence de la microscopie confocale en réflectance qui ne permet pas facilement la discrimination des fluorophores



endogènes due à la superposition de leurs spectres d'émission, l'excitation à deux photons permet de sélectionner certains fluorophores endogènes générant de l'auto-fluorescence à deux photons (NADH réduit, FAD, la kératine, la mélanine, le collagène et l'élastine) [17]. L'imagerie SHG permet quant à elle l'imagerie sélective du collagène du derme, tel qu'illustré à la figure 1.20. A noter que la fluorescence à deux photons peut également être exploitée dans une configuration de spectroscopie.

Pour garantir l'absorption de plusieurs photons, il faut focaliser en un point une forte concentration de photons. Les systèmes de microscopie non-linéaires utilisent typiquement des lasers femtosecondes permettant de générer des impulsions de très haute énergie. De ce fait, les microscopes non-linéaires sont des appareils onéreux encore peu utilisés en clinique en dermatologie. Quelques systèmes multi-photons sont cependant commercialisés pour l'imagerie *in vivo* de la peau tel que les dispositifs proposés par JenLab (Dermalnspect, MPTflex et autres).

#### 1.4.2.2 . La microscopie de fluorescence en temps de vie

Fluorophore	Excitation, nm	Emission, nm	Lifetime, ns	ref
phenylalanine	258 (max) 240-270	280 (max)	7.5	31
tyrosine	275 (max) 250-290	300 (max)	2.5	32
tryptophan	280 (max) 250-310	350 (max)	3.03	33
NAD(P)H free	300-380	450-500	0.3	34
NAD(P)H protein	300-380	450-500	2.0-2.3	34
FAD	420-500	520-570	2.91	34, 35
FAD protein bound	420-500	weak in 520-570	<0.01	219
flavin mononucleotide (FMN)	420-500	520-570	4.27-4.67	35, 36
riboflavin	420-500	520-570	4.12	35
protoporphyrin IX	400-450	635,710	up to 15	34, 37
hemoglobin	400-600	non-fluorescent	n/a	
melanin	300-800	440,520, 575	0.1/1.9/8	34
collagen	280-350	370-440	≤ 5.3	34, 38
elastin	300-370	420-460	≤ 2.3	34, 38
lipofuscin	340-395	540,430-460	1.34	39
chlorophyll <i>a</i> in leaves PS II	430, 662	650-700, 710-740	0.17-3 ns	40, 41
chlorophyll <i>b</i> in plants	453, 642	non-fluorescent	n/a	
lignin	240-320	360	1.27	42

Figure 1.21 – Spectres d'absorption, d'émission et temps de vie de fluorescence des fluorophores endogènes principaux des organismes biologiques. Figure issue de [18].

Ce type de système multi-photon est parfois combiné à une autre technique de fluorescence non invasive, la microscopie de fluorescence en temps de vie (FLIM pour « Fluorescence Lifetime Imaging » en anglais). Cette modalité de microscopie est basée sur la mesure de la durée de vie de fluorescence. Conceptuellement, le temps de vie de la fluorescence est le temps moyen qu'un fluorophore passe dans les états excités suite à l'absorption d'un ou plusieurs photons, avant de redescendre dans son état fondamental via des transitions non radiatives et radiatives (émission de fluorescence). Lorsqu'on excite une population de fluorophores, l'intensité de la fluorescence émise

suit une décroissance exponentielle dans le temps  $I_{fluor}(t) = I_{fluor}(0)e^{-\tau/t}$  avec  $\tau$  la durée de vie de la fluorescence. Autrement dit, la durée de vie de la fluorescence est le temps nécessaire à une population de molécules excitées électroniquement pour être réduite d'un facteur e, via la perte d'énergie par fluorescence et d'autres processus non radiatifs [18]. Ce temps de vie  $\tau$  est de l'ordre de 0.1 à 7 ns pour les fluorophores biologiques endogènes et varie d'un fluorophore à un autre [18]. Un tableau décrivant les spectres d'absorption, d'émission et les temps de vie des principaux fluorophores endogènes des tissus biologiques est donné à la figure 1.21. Comme on peut le constater, le temps de vie apporte une information plus spécifique que le signal de fluorescence en lui-même, car il permet de résoudre des constituants biologiques ayant un spectre d'émission se chevauchant mais un temps de vie différent. Le temps de vie constitue de ce fait une source de contraste endogène supplémentaire en microscopie de fluorescence. A noter que la microscopie FLIM peut également être utilisée avec des fluorophores exogènes. Le temps de vie de la fluorescence varie également avec l'environnement moléculaire (par exemple avec le pH, la pression partielle d'oxygène, la température) ce qui permet d'étudier des changements physico-chimiques de l'environnement [19]. De plus, le temps de vie de la fluorescence est généralement indépendant de la concentration en fluorophore et de son rendement quantique, ce qui permet de réaliser des analyses quantitatives *in vivo*.

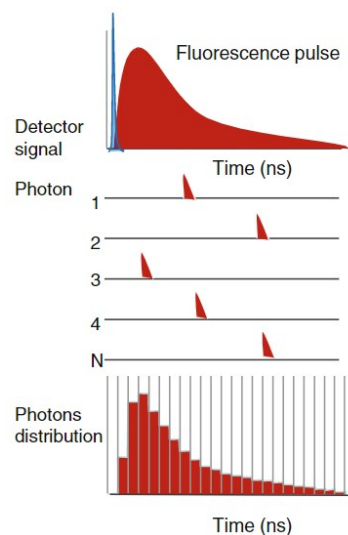


Figure 1.22 – Description du principe de la méthode TCSPC pour la mesure du temps de vie de fluorescence. Figure issue de [19].

Un dispositif de microscopie FLIM est similaire à un microscope confocal en fluorescence, utilisant comme source un laser pulsé pico- ou femtoseconde. L'excitation peut se faire à un ou plusieurs photons. La mesure du temps de vie de fluorescence peut être réalisée via différentes techniques de mesure décrites en détail dans [19]. La méthode la plus communément utilisée est la méthode TCSPC (pour « Time-Correlated Single-Photon Counting » en anglais), décrite par un schéma à la figure 1.22. L'échantillon est excité par une source laser pulsée avec un taux de répétition élevé. Suite à l'excitation par une impulsion, un unique photon de fluorescence est détecté par un détecteur de photon unique (photomultiplicateur sensible aux très faibles intensités) et son temps d'arrivée par rapport à l'impulsion d'excitation est mesuré. En répétant cela pour de multiples impulsions d'excitation, on construit progressivement un histogramme du nombre de photons uniques collectés en fonction du

décali entre l'émission de l'impulsion et la détection des photons. Cette distribution des probabilités de détection d'un seul photon émis suite à une impulsion laser reproduit la distribution temporelle formée par tous les photons de fluorescence émis suite à l'impulsion, décrite par  $I(t)$ . Ainsi, le temps de vie  $\tau$  est obtenu par le temps de décroissance à  $1/e$  mesurée sur l'histogramme.

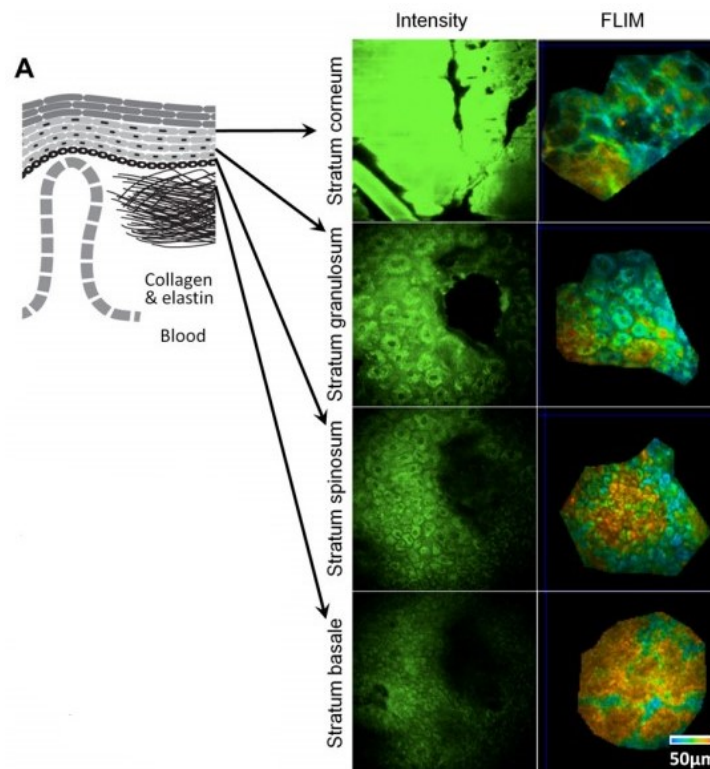


Figure 1.23 – Images horizontales des différentes couches de la peau acquises en microscopie de fluorescence conventionnelle et en microscopie FLIM, avec une excitation à 740 nm. Figure issue de [20].

En balayant le point de focalisation de l'excitation dans l'échantillon, on peut alors obtenir, comme en microscopie de fluorescence conventionnelle, des images horizontales reflétant le temps de vie des fluorophores. Des images FLIM de la peau *in vivo* sont données à la figure 1.23. Ces images ont été acquises avec un système Dermalnspect, commercialisé par JenLab, comportant un module FLIM additionnel [20]. Ce genre de système reste onéreux compte tenu de la source femto- ou picoseconde et du détecteur de photon unique nécessaires et est peu utilisé en dermatologie *in vivo*. Il s'agit néanmoins d'une technique de microscopie de grand intérêt pour l'imagerie *in vivo* de la peau car elle apporte des informations d'ordre moléculaire sur les fluorophores endogènes de la peau, plus spécifiques que la microscopie de fluorescence seule, ainsi que sur leur environnement physico-chimique. La microscopie FLIM est également une technologie d'intérêt pour la dermo-cosmétique, afin d'accéder à une meilleure compréhension de la physiologie de la peau.

### 1.4.3 . La spectroscopie de réflexion diffuse

Jusqu'à présent, nous avons présenté les principales techniques, basées sur des mécanismes de fluorescence, permettant d'obtenir des informations sur certains constituants (fluorophores) de la peau. D'autres modalités, qui ne sont pas basées sur la fluorescence, permettent également d'apporter des informations sur les constituants de la peau. Parmi ces modalités, la spectroscopie de réflexion diffuse est une technique sensible aux propriétés de diffusion et d'absorption. Contrairement aux techniques de fluorescence, la spectroscopie de réflexion diffuse ne fournit pas d'informations sur la composition chimique des tissus de manière directe. Le spectre de réflectance diffuse étant la superposition du spectre de diffusion et d'absorption, il permet d'obtenir des informations morphologiques (via les propriétés de diffusion régies par la structure et l'organisation des tissus comme nous l'avons vu précédemment) mais également des informations sur les chromophores de la peau, principalement l'hémoglobine et la mélanine [87]. Le principe de la spectroscopie de réflectance diffuse consiste à envoyer un faisceau lumineux vers un échantillon et à détecter la réflectance diffuse à sa surface. La réflectance diffuse correspond aux photons qui pénètrent dans le tissu, s'y propagent par diffusion multiple puis émergent ensuite à la surface du tissu, à la différence de la réflexion spéculaire à la surface, décrite par les coefficients de Fresnel. Le phénomène de réflectance diffuse est décrit à la figure 1.24. Il est issu d'une succession d'événements d'absorption et de diffusion multiple dans les tissus, et son spectre reflète donc les propriétés de diffusion et d'absorption du tissu en profondeur. Ce spectre est ensuite analysé à l'aide de modèles mathématiques pour extraire les propriétés optiques du tissu [21] ainsi que la concentration en chromophores [95].

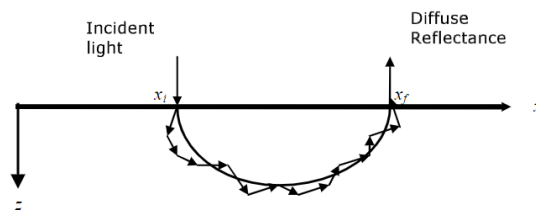


Figure 1.24 - Illustration du principe utilisé en spectroscopie de réflectance diffuse. La lumière incidente sur l'échantillon (au point  $x_i$ ) est multiples fois diffusée dans le tissu jusqu'à émerger sous forme de réflectance diffuse au point  $x_f$ . Cette réflectance diffuse peut être collectée et analysée spectralement pour extraire les propriétés optiques du milieu traversé. Figure extraite de [21]

Un montage typique de spectroscopie de réflectance diffuse est donné à la figure 1.25 : un faisceau de lumière blanche est envoyé sur l'échantillon au moyen de plusieurs fibres optiques d'émission, concentriques autour d'une fibre de collection centrale. La lumière délivrée à l'échantillon par les fibres d'émission va être partiellement absorbée par l'échantillon, tandis que la fraction non absorbée va être multiples fois diffusée jusqu'à éventuellement émerger à la surface de l'échantillon sous forme de réflectance diffuse. La lumière émergente à la surface de l'échantillon est alors collectée par la fibre centrale et envoyée vers un spectromètre pour analyse.

La distance entre les fibres d'émission et la fibre de collection sélectionne la profondeur sondée dans l'échantillon. Plus la distance est grande, plus la trajectoire, sous forme de « banane » (illustrée à la figure 1.24), des photons multiples fois diffusés atteint une profondeur élevée dans l'échantillon [96]. De ce fait, en disposant des fibres optiques d'émission et de collection à différents intervalles de distance, il est possible de remonter aux propriétés de diffusion et d'absorption d'un échantillon

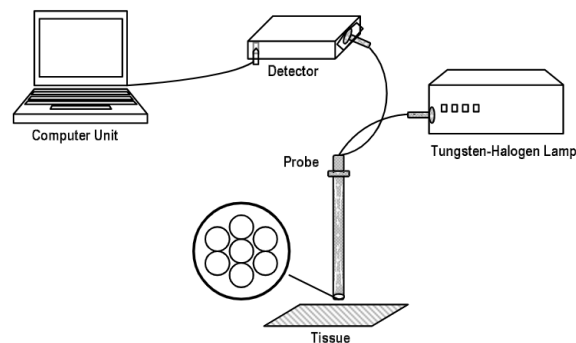


Figure 1.25 – Montage expérimental d'un système de spectroscopie de réflectance diffuse, qui comprend une source de lumière blanche, un spectromètre et une sonde fibrée en contact de l'échantillon. Figure extraite de [21]

de façon résolue en profondeur : c'est ce qu'on appelle la spectroscopie de réflectance diffuse résolue spatialement [95]. La spectroscopie de réflectance diffuse est couramment combinée avec la spectroscopie d'auto-fluorescence [93, 92] car il s'agit de deux techniques complémentaires, l'une apportant des informations sur la morphologie et les chromophores du tissu, l'autre apportant des informations sur les fluorophores endogènes. Ces deux techniques sont relativement peu onéreuses et peuvent être facilement intégrées dans un même système fibré tel que celui de la figure 1.25. Ces systèmes restent encore principalement des systèmes de recherche et peu de systèmes commerciaux sont aujourd'hui disponibles.

#### 1.4.4 . La spectroscopie Raman

La spectroscopie Raman est une technique de spectroscopie optique basée sur l'effet de diffusion Raman, qui fournit un spectre dont les raies et les bandes reflètent les vibrations des liaisons chimiques des molécules constitutives de l'échantillon. Elle apporte donc des informations moléculaires de haute spécificité. Elle ne nécessite pas de marquage, permettant l'application *in vivo*, ni de propriétés de fluorescence car elle est basée sur un mécanisme de diffusion inélastique.

La diffusion Raman est un phénomène découvert en 1928 par Chandrasekhara Venkata Raman, à qui elle doit son nom, et Kariamanickam Srinivasa Krishnan [97]. Lorsqu'un faisceau de lumière se propage au sein d'un milieu diffusant, la grande majorité de la lumière diffusée conserve la même longueur d'onde que celle du faisceau incident. Néanmoins, une petite fraction, environ 1 photon sur  $10^8$ , est diffusée à une longueur d'onde différente de la longueur d'onde incidente : c'est la diffusion Raman. Cette diffusion inélastique est due à l'interaction des photons avec les modes vibrationnels des molécules. Les modes de vibrations d'une molécule sont les mouvements des atomes de la molécule résultant en des elongations et déformations des liaisons chimiques entre les atomes [97].

Le phénomène de diffusion Raman peut être décrit de deux façons différentes, soit par la théorie « classique » de polarisabilité, soit par la théorie quantique. Dans la description classique, l'effet Raman est décrit par la polarisabilité des molécules. Lorsqu'une molécule est placée dans un champ électrique, les particules chargées qui la constituent se déplacent. Ceci peut alors séparer le barycentre des charges positives et négatives pour créer un moment électrique dipolaire induit. La molécule est alors polarisée. La norme du moment dipolaire  $p$  est définie par  $p = \alpha E$  avec  $\alpha$  la polarisabilité et

$E$  l'amplitude du champ incident. Lorsque la molécule est soumise à un champ monochromatique, le moment dipolaire créé oscille à la fréquence du champ incident :

$$p = \alpha E_0 \cos(2\pi\nu t) \quad (1.12)$$

avec  $E_0$  l'amplitude du champ et  $\nu$  sa fréquence. Le dipôle rayonne alors un champ incident de même fréquence  $\nu$  : c'est la diffusion de Rayleigh, mentionnée plus tôt dans ce chapitre. Si la molécule polarisée subit des vibrations périodiques avec une fréquence  $\nu_{vibr}$ , alors sa polarisabilité subit des variations de même fréquence :  $\alpha = \alpha_0 + \beta \sin(2\pi\nu_{vibr}t)$ . Dans ce cas, la molécule polarisée va voir son moment dipolaire modifié par ces vibrations :

$$\begin{aligned} p &= (\alpha_0 + \beta \sin(2\pi\nu_{vibr}t))E_0 \cos(2\pi\nu t) \\ &= \alpha_0 E_0 \cos(2\pi\nu t) + \frac{1}{2}\beta E_0 [\cos(2\pi(\nu - \nu_{vibr})t) - \cos(2\pi(\nu + \nu_{vibr})t)] \end{aligned} \quad (1.13)$$

Ainsi, la molécule rayonne un champ à la fréquence  $\nu$  du champ incident, mais également à des fréquences  $\nu - \nu_{vibr}$  et  $\nu + \nu_{vibr}$  correspondant à ce qu'on appelle des décalages Raman Stokes et anti-Stokes. Toutes les vibrations moléculaires ne génèrent pas de diffusion Raman. Pour que la diffusion Raman soit possible, il faut que la polarisabilité subisse des variations, c'est-à-dire que la vibration doit modifier la molécule de telle sorte qu'elle soit plus polarisable dans une direction de la vibration et moins polarisable dans l'autre. Si c'est le cas, le mode de vibration est dit actif en diffusion Raman. Le caractère actif ou inactif d'une vibration peut être mis en lien avec les propriétés de symétrie des modes de vibrations. De manière générale, les vibrations symétriques donnent lieu à des raies Raman intenses alors que les vibrations asymétriques, même si elles sont théoriquement actives, sont souvent faibles.

La diffusion Raman peut également être décrite de façon quantique, à l'aide d'un diagramme de Jablonski donné à la figure 1.26. Chaque état électronique d'une molécule est caractérisé par plusieurs états vibrationnels. Lors de la collision d'un photon de fréquence  $\nu$  avec la molécule, le photon peut transférer une partie de son énergie  $\Delta E$  à la molécule, où  $\Delta E$  correspond à l'écart d'énergie entre deux niveaux vibrationnels. Dans ce cas, le photon est diffusé avec une fréquence  $\nu - \Delta E/h$  ( $h$  étant la constante de Planck) : c'est la diffusion Stokes. Si la molécule est dans un état vibrationnel excité lors de la collision avec le photon, alors celle-ci peut céder au photon une fraction d'énergie  $\Delta E$  correspondant là aussi à l'écart d'énergie entre deux niveaux vibrationnels, et le photon est diffusé avec une fréquence  $\nu + \Delta E/h$  : c'est la diffusion anti-Stokes. Celle-ci est plus rare que la diffusion Stokes puisque la molécule doit être dans un état vibrationnel déjà excité. Comme on peut le voir à la figure 1.26, la diffusion Raman est différente de la fluorescence puisque cette dernière implique l'absorption d'un photon, faisant passer la molécule dans un état électronique excité, tandis que l'effet Raman est un phénomène de diffusion inélastique basé sur des transitions entre les niveaux vibrationnels d'un même état électronique.

La spectroscopie Raman exploite ce phénomène de diffusion Raman. Elle consiste à illuminer un échantillon avec un faisceau monochromatique, puis à étudier le spectre de la lumière diffusée par effet Raman. Ce spectre comporte des raies, dont l'écart à la longueur d'onde incidente reflète des transitions entre niveaux d'énergie vibrationnels. En spectroscopie Raman conventionnelle, on mesure le spectre de la diffusion Stokes, c'est-à-dire les raies émises à des longueurs d'onde supérieures à la

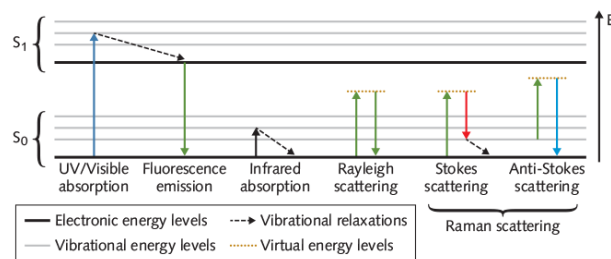


Figure 1.26 – Diagramme de Jablonski des niveaux d'énergie impliqués dans la fluorescence, l'absorption infrarouge, la diffusion Rayleigh, la diffusion inélastique Raman Stokes et anti-Stokes. L'absorption infrarouge est également représentée, un phénomène exploité par la spectroscopie infrarouge. Figure issue de [22].

longueur d'onde incidente, la diffusion Stokes étant plus importante que la diffusion anti-Stokes. Le spectre Raman est classiquement représenté en nombre d'onde  $\sigma$ . Il représente plus spécifiquement l'intensité collectée en fonction du *décalage Raman* noté  $\Delta\sigma$ , c'est-à-dire de l'écart entre le nombre d'onde de l'excitation et le nombre d'onde de la composante diffusée. Ce décalage Raman est directement lié à l'écart d'énergie  $\Delta E$  entre les niveaux vibrationnels :  $\Delta\sigma = \Delta E/hc$ . Il est donc totalement indépendant de la longueur d'onde d'excitation. L'intensité associée à un décalage Raman dépend quant à elle de l'efficacité de diffusion Raman associée à la vibration moléculaire, à la concentration de la molécule associée et de la longueur d'onde d'excitation.

La spectroscopie est une modalité très spécifique car le spectre Raman fournit des informations sur les vibrations des liaisons chimiques des molécules sondées. Elle est adaptée à l'analyse *in vivo* car elle ne nécessite pas de marquage. Elle ne requiert pas non plus la présence de fluorophores, l'effet Raman étant lié à des modes de vibration moléculaires et non à des propriétés de fluorescence. De ce fait, un spectre Raman peut être complexe à interpréter car le spectre généré représente la somme des spectres générés par chaque molécule. La peau étant un tissu de composition complexe, comportant à la fois des protéines, des lipides, de l'ADN et autres constituants, son spectre Raman est riche. Le spectre Raman de la peau peut être divisé en trois régions spectrales [97]. La région comprise entre 600 et 1800  $\text{cm}^{-1}$  est qualifiée d'empreinte digitale (« fingerprint region » en anglais). Cette région doit son nom à la présence de raies Raman nettes et localisées qui donnent aux molécules des signatures Raman uniques. Un exemple de spectre Raman de la peau saine dans cette gamme spectrale est donné à la figure 1.27. L'attribution des différentes raies Raman peut être trouvée dans [23]. D'autres vibrations, de plus haute énergie, occupent la région comprise entre 2500 et 3400  $\text{cm}^{-1}$ , connue sous le nom de région des nombres d'onde élevés (« high wavenumber region ») d'un spectre Raman. Entre ces deux zones spectrales se trouve la région dite silencieuse car généralement dépourvue de contributions de molécules biologiques.

Un montage de spectroscopie Raman est principalement composé d'une source monochromatique, telle qu'un laser, pour l'excitation, d'un spectromètre et d'un jeu de filtres permettant de sélectionner les photons diffusés par effet Raman. La spectroscopie Raman peut être implémentée à une échelle macroscopique via l'utilisation de sondes fibrées [98], mais elle peut également être implémentée dans une configuration confocale, permettant une analyse moléculaire ponctuelle au sein d'un échantillon [99]. La diffusion Raman étant un phénomène rare, les systèmes de spectroscopie Raman nécessitent des spectromètres très sensibles, et l'acquisition d'un spectre Raman peut nécessiter des temps d'inté-

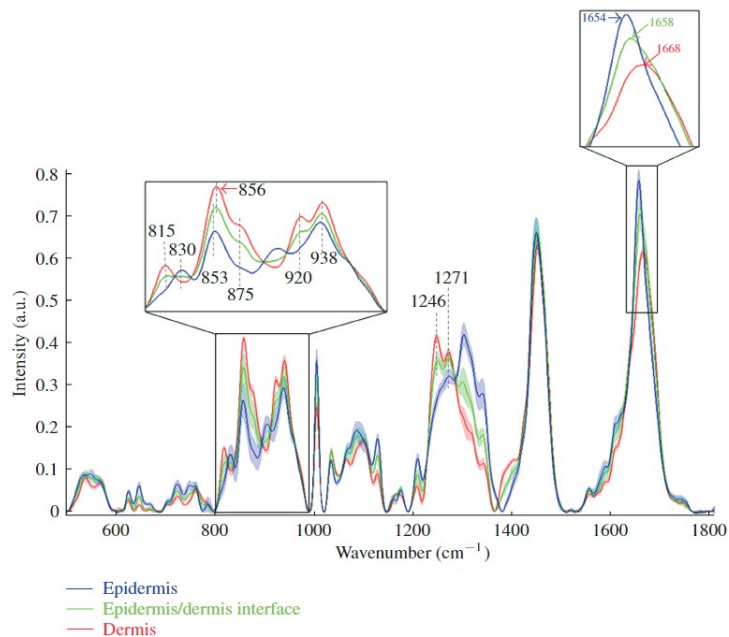


Figure 1.27 – Spectre de diffusion Raman des différentes couches de la peau (épiderme, jonction épiderme/derme et derme). Figure extraite de [23].

gration relativement longs (de quelques secondes à une minute) et ce d'autant plus que la profondeur sondée est élevée. Pour s'affranchir de cette limite, diverses techniques ont vu le jour pour augmenter la quantité de signal Raman collectée. On peut par exemple mentionner les techniques de spectroscopie Raman par résonance exaltée de surface ou les techniques de spectroscopie Raman non-linéaires telles que la spectroscopie Raman stimulée (SRS) et la spectroscopie Raman anti-Stokes cohérente (CARS). Néanmoins il s'agit de techniques plus onéreuses que la spectroscopie Raman conventionnelle notamment car elles nécessitent l'utilisation de deux sources lasers accordables en longueur d'onde pour sonder différentes vibrations chimiques. Une description détaillée de ces techniques peut être trouvée dans [97].

La spectroscopie Raman est une modalité aujourd'hui relativement répandue pour l'étude *ex vivo* de la peau, notamment en dermo-cosmétique [100]. Mais peu de systèmes Raman commerciaux existent pour l'analyse *in vivo* de la peau, le principal système commercial étant le système gen2-SCA commercialisé par l'entreprise RiverD, dédié à l'analyse Raman confocale de la peau.





## 2 - La tomographie par cohérence optique confocale à balayage de ligne (LC-OCT)

La tomographie par cohérence optique confocale à balayage de ligne (LC-OCT pour « Line-Field Confocal Optical Coherence Tomography » en anglais) est une technique d'imagerie optique permettant d'obtenir des images en profondeur et à haute résolution d'échantillons. Inventée au laboratoire Charles Fabry à l'Institut d'Optique, la LC-OCT a été développée et est aujourd'hui commercialisée par l'entreprise DAMAE Medical pour l'imagerie *in vivo* de la peau [84]. Son principe repose sur une combinaison de l'OCT et de la RCM, permettant de générer des images bidimensionnelles (2D) et tridimensionnelles (3D) de la peau, avec une résolution cellulaire de  $\sim 1 \mu\text{m}$  et une profondeur de pénétration allant jusqu'à  $500 \mu\text{m}$  [85].

Ce chapitre est consacré à la description de cette technologie. La première partie de ce chapitre présentera plus en détails l'OCT, technologie dont la LC-OCT tire son origine. Nous présenterons ensuite le principe de la microscopie par cohérence optique (OCM pour « Optical Coherence Microscopy » en anglais), une variante de l'OCT permettant de générer des images en coupe horizontale à haute résolution spatiale grâce à l'utilisation d'objectifs de microscope de haute ouverture numérique. La dernière partie sera dédiée à la description de la technologie de LC-OCT. Nous verrons en particulier comment la LC-OCT répond aux limites de techniques d'imagerie précédemment mentionnées et en quoi elle est particulièrement adaptée pour l'imagerie de la peau.

### 2.1 . Le principe de l'OCT

Comme nous l'avons introduit dans le chapitre précédent, l'OCT est une technique d'imagerie optique non invasive permettant d'imager en profondeur des échantillons semi-transparents. Le principe de l'OCT repose sur l'interférométrie en lumière de faible cohérence temporelle. La cohérence temporelle caractérise le degré d'auto-corrélation d'une onde dans le temps, c'est à dire sa capacité à interférer avec elle-même à un instant  $t$  ultérieur. Une onde monochromatique est une onde parfaitement cohérente. A l'inverse, la lumière blanche, pouvant être considérée comme la superposition d'ondes monochromatiques couvrant un large spectre de longueurs d'onde, est une lumière faiblement cohérente.

En guise d'introduction, nous présentons en annexe A le principe de l'interférométrie en lumière monochromatique et polychromatique, en considérant un interféromètre de Michelson avec comme échantillon dans le bras objet une simple surface réfléchissante. Dans le cas d'une source monochromatique, les interférences détectées en sortie d'interféromètre constituent un signal sinusoïdal, compte tenu de la cohérence parfaite des ondes du bras de référence et du bras objet (voir annexe A) :

$$I_{mono} = \frac{I_0}{4}(r_1^2 + r_2^2 + r_1 r_2 \cos(k\delta)) \quad (2.1)$$

avec  $\delta$  la différence de marche entre les deux bras et  $r_1, r_2$  les coefficients de réflexion en amplitude de la surface de référence et de la surface échantillon.

Dans le cas d'une source polychromatique, le signal interférométrique obtenu en translatant par exemple le bras de référence est modulé par une enveloppe notée  $V_{coh}$ , en raison de la superposition des interférences produites par chaque longueur d'onde de la source (voir annexe A) :

$$I_{poly} = \frac{I_0}{4}(r_1^2 + r_2^2 + r_1 r_2 \cos(k_0 \delta)) V_{coh}(\delta(z))$$

où  $k_0$  représente le vecteur d'onde barycentre du spectre polychromatique.

Grâce à un algorithme de démodulation, il est possible d'extraire l'enveloppe des interférences, dont l'amplitude est proportionnelle au coefficient de réflexion  $r_2$  de la surface échantillon. Sa position dans le bras objet est obtenue à partir de la longueur du bras de référence pour laquelle des interférences sont observées. Du fait de la largeur  $V_{coh}$  de l'interférogramme, la précision sur la localisation de la surface échantillon, autrement dit le sectionnement axial ou résolution axiale  $\Delta z_{OCT}$ , sera d'autant plus élevée que  $V_{coh}$  est fin :

$$\Delta z_{OCT} = \frac{l_c}{2} = \frac{2 \ln 2}{\pi} \frac{\lambda_0^2}{\Delta \lambda}$$

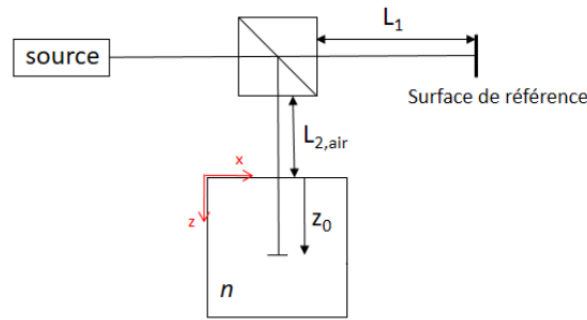


Figure 2.1 – Interféromètre de Michelson dans le cas où l'échantillon est un milieu diffusant quelconque d'indice optique moyen  $n$ . Figure tirée de [24].

L'OCT est basé sur ce principe de sectionnement axial. Dans un système OCT, un faisceau de lumière incident est envoyé au sein d'un interféromètre similaire, où la surface échantillon est remplacée par un échantillon diffusant quelconque d'indice optique moyen  $n$ , tel qu'illustré à la figure 2.1. Dans ce cas, l'intensité collectée par le bras objet n'est plus caractérisée par un coefficient de réflexion  $r_2$  mais une grandeur  $R_{ech}(x, y, z)$  caractérisant la fraction d'intensité incidente rétro-diffusée au point  $(x, y, z)$  de l'échantillon. Pour des raisons de simplicité, considérons un faisceau paraxial se propageant selon l'axe Z et situé en  $(x_0, y_0)$ . Pour une longueur du bras de référence  $L_1$  fixe, la différence de marche entre les deux bras de l'interféromètre s'écrit ainsi  $\delta(z) = 2[(L_1 - L_{2,air}) - nz]$ . L'ensemble des diffuseurs de l'échantillon rétro-diffusent la lumière et le terme d'interférences obtenu peut alors s'écrire :

$$I_{int\ OCT}(x_0, y_0) = \frac{I_0}{2} \sqrt{R_{ref}} \int \sqrt{R_{ech}(x_0, y_0, z)} V_{coh}(\delta(z)) \cos(k\delta(z)) dz \quad (2.2)$$

Du fait de l'extension axiale restreinte de  $V_{coh}$ , seuls les photons dont la différence de marche  $\delta(z)$  est comprise dans la largeur de  $V_{coh}$  pourront interférer. Autrement dit, parmi les photons rétro-diffusés, seuls ceux rétro-diffusés dans une extension axiale  $\Delta z_{OCT}$  autour du plan de différence de marche nulle

noté  $z_0 = \frac{L_1 - L_{2,air}}{n}$  peuvent alors interférer. Le terme d'interférences permet bien un sectionnement axial en  $z_0$  et peut alors s'écrire :

$$I_{int\ OCT}(x_0, y_0, z_0) = \frac{I_0}{2} \sqrt{R_{ref}} \int_{z_0 - \Delta z_{OCT}/2}^{z_0 + \Delta z_{OCT}/2} \sqrt{R_{ech}(x_0, y_0, z)} V_{coh}(\delta(z)) \cos(k\delta(z)) dz \quad (2.3)$$

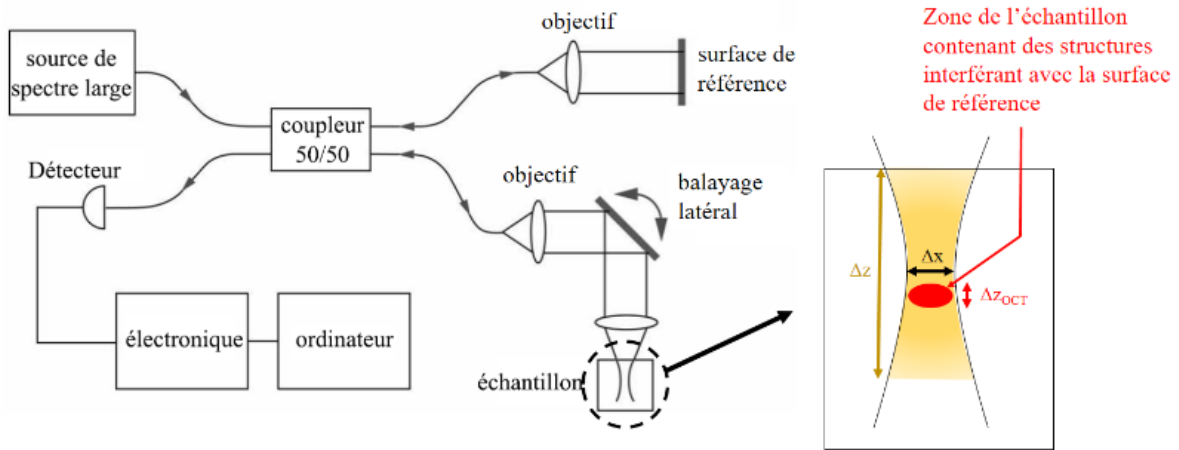


Figure 2.2 – Montage classique d'OCT. Des fibres optiques permettent de guider la lumière dans chaque bras. Le bras de référence et le bras objet sont séparés puis recombinaisonnés via un coupleur de fibres. Le bras objet illumine l'échantillon avec un faisceau focalisé dans l'échantillon, présentant une résolution latérale  $\Delta x$  et  $\Delta y$ . Un filtrage confocal effectué par la fibre du bras objet permet de collecter le signal sur une profondeur de champ  $\Delta z$ . Figure tirée de [24].

En pratique, le faisceau se propageant en  $Z$  dans l'échantillon n'est pas un faisceau infiniment fin en  $XY$  comme nous l'avons jusqu'à présent considéré. Un montage classique d'OCT est donné à la figure 2.2. Dans ce montage, des fibres optiques permettent de guider la lumière dans chaque bras. Le bras de référence et le bras objet sont séparés puis recombinaisonnés via un coupleur de fibres. Le bras objet illumine l'échantillon avec un faisceau focalisé dans l'échantillon. Celui-ci présente une certaine extension en  $XY$ , dépendant de l'optique utilisée. De ce fait, le terme d'interférence résulte de la somme des interférences dues à la rétro-diffusion par l'ensemble des structures contenues dans un volume  $V_{OCT}$  centré en  $(x_0, y_0, z_0)$  et d'extension  $V_{OCT} = \Delta x \times \Delta y \times \Delta z_{OCT}$ , avec  $\Delta x$  et  $\Delta y$  la résolution latérale du système OCT dans le plan de différence de marche nulle. Le terme d'interférences  $I_{int\ OCT}$  peut alors s'écrire :

$$I_{int\ OCT}(x_0, y_0, z_0) = \frac{I_0}{2} \sqrt{R_{ref}} \iiint_{V_{OCT}(x,y,z_0)} \sqrt{R_{ech}(x, y, z)} V_{coh}(\delta(z)) \cos(k\delta(z)) dx dy dz \quad (2.4)$$

En translatant la surface de référence, on fait varier la distance  $L_1$  et donc la position du plan de cohérence  $z_0$  dans l'échantillon. Cela permet premièrement, pour chaque point  $(x, y, z)$  donné du volume  $V_{OCT}$  de générer un signal interférométrique en faisant varier la différence de marche  $\delta(z) = 2n(z_0 - z)$  au sein de l'extension définie par  $V_{coh}$ . Deuxièmement, le balayage du bras de référence permet de déplacer axialement le volume sondé  $V_{OCT}$  à différentes profondeurs dans l'échantillon

pour finalement obtenir un signal interférométrique sur toute la profondeur de champ de l'optique de focalisation. En appliquant un algorithme de démodulation, l'enveloppe du signal interférométrique  $I_{int\ OCT}$ , proportionnelle à  $\iiint_{V_{OCT}} \sqrt{R_{ech}(x, y, z)}$ , peut être extraite en fonction de la profondeur du plan de cohérence  $z_0$  dans l'échantillon. L'information sur  $\iiint_{V_{OCT}} \sqrt{R_{ech}(x, y, z)}$  en fonction de  $z_0$  forme un profil de la fraction d'intensité rétro-diffusée par l'échantillon en fonction de la profondeur. Dans le montage de la figure 2.2, un miroir oscillant est placé avant l'optique de focalisation afin de déplacer le faisceau objet dans le plan latéral. Cela permet de déplacer le volume  $V_{OCT}$  en différents points  $(x_0, y_0)$  de l'échantillon. En translatant le faisceau dans une direction latérale entre chaque balayage du plan de cohérence, une succession de profils peut être acquise pour reconstruire des images 2D en coupe verticale ainsi que des images 3D par concaténation d'images verticales.

Grâce aux interférences précisément localisées, l'OCT permet intrinsèquement de rejeter les photons dont le chemin optique est différent (à  $\Delta z_{OCT}$  près) de celui des photons du bras de référence, jouant ainsi de rôle de filtre cohérent. Ce filtrage permet donc de sélectionner les photons ayant subi une rétro-diffusion au niveau du plan de cohérence, et de rejeter les photons rétro-diffusés en dehors du volume  $V_{OCT}$ . Dans une certaine mesure, le filtrage cohérent permet également de rejeter les photons multiples diffusés ayant parcouru un chemin optique différent de  $L_1$ , qui, typiquement contribueraient à brouiller l'image en microscopie classique. Néanmoins, dans le cas d'échantillons très diffusants, il est possible que certains photons multiples diffusés en dehors de  $V_{OCT}$  aient parcouru un chemin optique égal à  $L_1$ . Dans ce cas, les photons multiples diffusés peuvent interférer avec les photons du bras de référence. Ces photons, dont l'origine dans l'échantillon est incertaine, constituent un signal parasite pour l'OCT puisque leurs interférences s'additionnent à celles des photons rétro-diffusés porteur de l'information précise sur la localisation de l'intensité rétro-diffusée dans l'échantillon. A faible profondeur, la diffusion multiple représente une faible contribution au signal OCT, mais sa contribution augmente dans le cas de milieux très diffusants et profondeurs d'imagerie élevées. Ce point sera rediscuté dans le chapitre 3.

Le montage de la figure 2.2 correspond à un système d'OCT qu'on qualifie d'OCT dans le domaine temporel (TD-OCT pour « Time-Domain » OCT) car la surface de référence est translatée « temporellement ». L'OCT peut également être implémentée dans le domaine fréquentiel, dont une description est donnée dans l'annexe B.

## 2.2 . La microscopie par cohérence optique (OCM)

La microscopie par cohérence optique (OCM pour « Optical Coherence Microscopy » en anglais) est une technique proche de l'OCT, mais qui dans le principe se rapproche également de la microscopie confocale. Cette technologie permet d'accéder à des résolutions latérales plus élevées que l'OCT conventionnelle grâce à l'utilisation d'objectifs de microscope de haute ouverture numérique. Un système d'OCM dans le domaine temporel est similaire à un système de TD-OCT tel que celui de la figure 2.2, avec un objectif de microscope comme optique dans le bras objet. La fibre optique du bras objet fait office de trou confocal, rendant alors le bras objet similaire à un microscope confocal.

Comme en TD-OCT conventionnelle, le balayage du plan de cohérence pourrait s'effectuer en translatant la surface de référence pour générer un profil axial de l'intensité rétro-diffusée. En raison de la faible profondeur de champ de l'objectif, l'objectif doit être également translaté au cours du

scan de la surface de référence, afin que le plan de cohérence reste compris en permanence au sein de la profondeur de champ de l'objectif. Autrement dit, il faut balayer le plan de focalisation, *i.e.*, le plan horizontal dans lequel se trouve le point de focalisation de l'objectif, de façon synchrone avec le plan de cohérence, c'est ce qu'on appelle la « focalisation dynamique ». La focalisation dynamique peut être faite en translatant mécaniquement en  $z$  l'objectif de microscope pour obtenir un profil axial d'intensité rétro-diffusée. En balayant ensuite le faisceau objet dans le plan latéral, une succession de profils peut être obtenue pour former une image verticale. Le problème de cette approche est qu'un objectif de microscope, contrairement à une lentille simple, est un composant lourd à déplacer, ce qui limite fortement la vitesse d'acquisition de profils successifs. Pour contrer ce problème, l'OCM effectue en pratique le balayage latéral en amont du balayage axial : pour une profondeur donnée du plan de cohérence, le faisceau objet est rapidement balayé dans une des directions latérales grâce à un miroir galvanométrique. Une fois le balayage latéral effectué, le plan de cohérence et le plan de focalisation sont translattés pour effectuer le balayage latéral à une autre profondeur. Cette technique autorise une translation axiale plus lente de l'objectif de microscope, qui ne limite alors plus la vitesse d'acquisition. Il est également possible d'effectuer un balayage latéral dans les deux directions afin d'obtenir des images en coupe horizontale, puis, en translatant le plan de cohérence et de focalisation en  $z$ , des images 3D résultant de la concaténation d'images en coupe horizontale. Des images en coupes verticales peuvent par la suite être obtenues en recoupant l'image 3D dans le plan vertical. Néanmoins, si le plan de cohérence reste fixe, le signal interférométrique ne peut être obtenu, puisque nous avons vu dans la section 2.1 que les interférences apparaissent en faisant varier la différence de marche  $\delta(z) = 2n(z - z_0)$ . Il faut donc produire une modulation de phase afin de faire varier le signal interférométrique. Plusieurs méthodes existent pour produire cette modulation de phase, notamment faire vibrer la surface de référence afin de déplacer la position du plan de cohérence autour de sa position  $z_0$  tout en le gardant toujours inclus dans la profondeur de champ de l'objectif.

Grâce à la focalisation dynamique, des résolutions latérales micrométriques peuvent être atteintes grâce à l'utilisation d'objectifs de haute ouverture numérique. La résolution axiale quant à elle reste définie par la largeur spectrale de la source, permettant ainsi d'accéder à des images de haute résolution dans les trois directions. Par ailleurs, la combinaison du filtrage confocal et du filtrage cohérent permet de restreindre fortement la collection de photons en dehors du volume  $V_{OCT}$ . Pour un même objectif de microscope utilisé, la combinaison des deux filtrages en OCM permet ainsi d'améliorer la profondeur de pénétration par rapport à un système de microscopie confocale seule [101].

Néanmoins, la vitesse d'acquisition de l'OCM reste limitée par le balayage point par point du faisceau objet dans le plan horizontal. Pour l'image *in vivo*, un compromis doit alors être trouvé entre vitesse d'acquisition et champ de vue. Il y a une vingtaine d'années, la technologie de OCM plein champ a été proposée pour s'affranchir de ce balayage latéral limitant [102]. En OCM plein champ, l'éclairage de l'échantillon ne se fait plus en un seul point balayé, mais sur tout le champ de l'objectif comme en microscopie conventionnelle et la détection est effectuée par une caméra 2D. Une description détaillée de l'OCM plein champ peut être trouvée dans [103]. L'OCM plein champ permet d'obtenir une image en coupe horizontale (puis 3D par concaténation d'images horizontales) sans balayage mécanique du plan horizontal. Néanmoins, du fait de l'éclairage sur tout le champ, l'OCM ne dispose pas d'effet confocal et collecte une quantité de photons incohérents, ne pouvant interférer, bien plus importante qu'en OCM à balayage. De ce fait, l'OCM plein de champ dispose

d'une sensibilité de détection et profondeur de pénétration plus faible que l'OCT à balayage.

### 2.3 . La tomographie par cohérence optique confocale à balayage de ligne (LC-OCT)

Dans cette dernière section, nous présentons la LC-OCT, technique d'imagerie optique permettant d'obtenir des images en profondeur et à haute résolution d'échantillons *in vivo*. La LC-OCT peut être vue comme un intermédiaire entre l'OCM à balayage et la TD-OCT parallélisée. Son principe repose sur l'éclairage de l'échantillon selon une ligne, permettant la parallélisation des acquisitions selon une direction, et sur une détection par un capteur ligne assurant un filtrage confocal dans une direction.

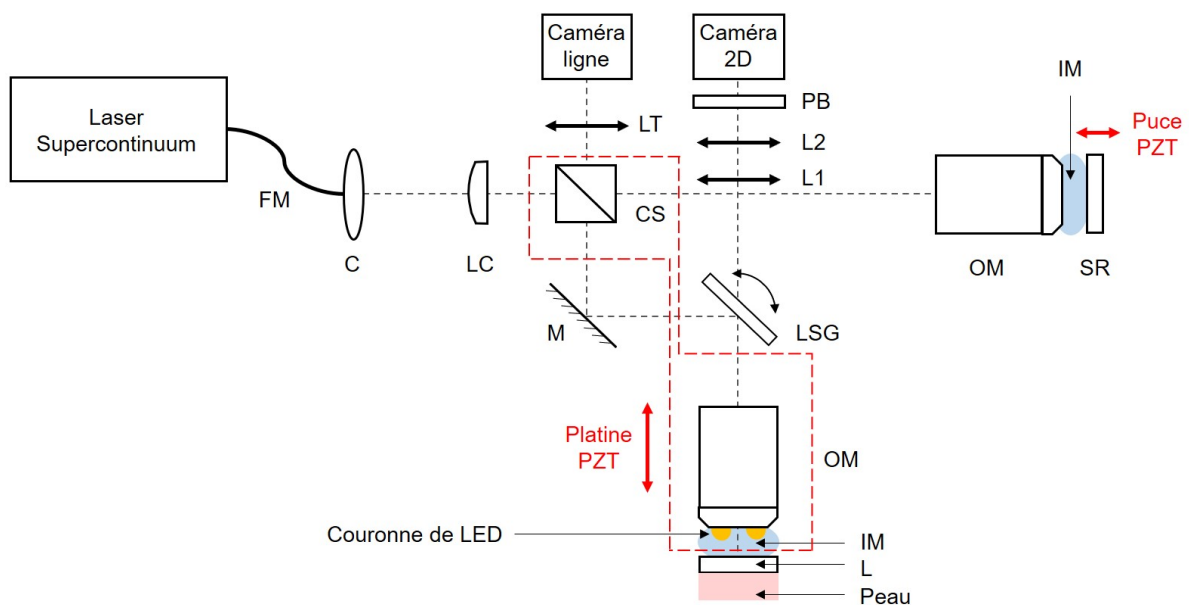


Figure 2.3 – Schéma du montage de la LC-OCT. FM : fibre monomode; C : collimateur; LC : lentille cylindrique; CS : cube séparateur; M : miroir de renvoi; LSG : lame séparatrice montée sur un galvanomètre; OM : objectif de microscope; LT : lentille de tube; SR : surface de référence; L : lame de verre, identique à la surface de référence; IM : milieu d'immersion; PZT : piézoélectrique; L1 : objectif de la voie dermoscopique; L2 : oculaire de la voie dermoscopique; PB : filtre passe-bas.

Un schéma descriptif de la LC-OCT est donné à la figure 2.3. La source à large spectre utilisée est un laser super-continuum fibré. En sortie de fibre, le faisceau est collimaté et envoyé dans un interféromètre de Linnik. Une lentille cylindrique est placée en amont de l'interféromètre. Le faisceau est divisé en deux faisceaux par un cube séparateur. Dans chaque bras, le faisceau est focalisé selon une ligne par un objectif de microscope, sous l'effet de la lentille cylindrique placée en amont. Après réflexion sur une surface de référence dans le bras de référence et rétro-diffusion par les différentes couches de l'échantillon, les faisceaux de référence et objet sont recombinaés au niveau du cube séparateur. En utilisant une lentille de tube, le faisceau recombinaé est finalement focalisé sur une caméra en ligne (*i.e.*, une ligne de pixels). Une voie d'imagerie de surface, séparée de la voie d'imagerie LC-OCT par une lame séparatrice montée sur un galvanomètre, permet de générer une image couleur de la surface de l'échantillon. Dans la suite, nous allons tout d'abord balayer les principaux composants utilisés en LC-OCT. Puis nous présenterons les différents modes d'imagerie en LC-OCT, incluant la

voie d'imagerie de surface. Enfin, nous reviendrons sur les avantages de la LC-OCT par rapport aux autres méthodes pour l'imagerie *in vivo* de la peau et présenterons des images de la peau acquises en LC-OCT.

## 2.3.1 . Principaux composants du système d'imagerie LC-OCT

### 2.3.1.1 . Source

La LC-OCT utilise un laser super-continuum comme source à large spectre. Un laser super-continuum génère un faisceau lumineux dont le spectre, très étendu, est obtenu en élargissant le spectre d'un laser impulsionnel par propagation dans un milieu non-linéaire. Ces lasers couvrent une gamme de longueurs d'onde très large et sont donc dès lors tout à fait adaptés à l'OCT. La source utilisée en pratique en LC-OCT présente une longueur d'onde centrale d'environ 800 nm, avec une largeur de spectre allant de 600 à 1000 nm. Ce spectre étendu permet à la LC-OCT d'atteindre une résolution axiale de 1.2  $\mu\text{m}$  [26]. Le faisceau du laser super-continuum est guidé jusque dans l'interféromètre par une fibre monomode. La source en sortie de fibre peut de ce fait être considérée comme ponctuelle et donc spatialement cohérente. Cette cohérence spatiale de la source est nécessaire pour pouvoir focaliser le faisceau selon une ligne très fine dans l'échantillon, permettant d'avoir un effet confocal selon une direction.

### 2.3.1.2 . Eclairage en ligne

Une des spécificités de la LC-OCT par rapport aux techniques d'OCT et OCM réside dans l'éclairage de l'échantillon selon une ligne. Cet éclairage est obtenu, comme mentionné ci-dessus, par une lentille cylindrique placée en amont du cube séparateur. Dans une direction, la lentille cylindrique agit comme une lentille sphérique, tandis qu'elle n'a aucun effet dans l'autre direction. Placée de façon à ce que son plan image soit situé au niveau du plan focal arrière de l'objectif de microscope, l'image de la source, une ligne dans le plan focal objet de la lentille, est renvoyée en une ligne à l'infini dans le plan image de l'objectif. En pratique, il n'est pas nécessaire d'obtenir une ligne « renvoyée à l'infini » sur l'échantillon mais plutôt une ligne dont le champ sera suffisamment grand pour couvrir l'ensemble du capteur ligne à la collection, ce qui peut se faire en jouant sur la distance du plan focal image de la lentille au plan focal objet de l'objectif. En pratique, on utilise une lentille cylindrique avec une focale de 50 mm placée en amont du cube séparateur de façon à générer une ligne couvrant un champ de 1.2 mm dans l'échantillon [84, 85]. A noter que la focale de la lentille cylindrique quant à elle permet de jouer sur l'uniformité de l'éclairage le long de la ligne objet en vignettant plus ou moins le faisceau gaussien sur la pupille de l'objectif. Une focale plus courte aura tendance à vignetter les bords du faisceau gaussien et donc à obtenir un éclairage plus (mais jamais totalement) uniforme sur l'échantillon. En pratique, l'uniformité de l'éclairage laser en LC-OCT est corrigée en post-traitement sur les lignes acquises.



### 2.3.1.3 . Objectifs de microscope

L'utilisation d'objectifs de microscope de haute ouverture numérique permet à la LC-OCT d'atteindre une haute résolution latérale. Le choix des objectifs est guidé par la résolution et le champ de vue souhaités. Afin d'imager à haute résolution, on va avoir tendance à choisir des objectifs de microscope de très haute ouverture numérique, de l'ordre de 0.8 à 1. Cependant, ces objectifs de très haute ouverture numérique ont un fort grandissement, et donc un champ de vue et une distance de travail très limités. En pratique, des objectifs de grandissement 20x et d'ouverture numérique 0.5 sont utilisés en LC-OCT car ils constituent un bon compromis entre résolution latérale et champ de vue. Ces objectifs permettent à la LC-OCT d'obtenir une résolution latérale de  $0.9 \mu\text{m}$  sur un champ de vue latéral de  $1.2 \text{ mm} \times 0.5 \text{ mm}$  ( $x \times y$ ) [26]. La résolution latérale obtenue est une résolution dite cellulaire, c'est-à-dire permettant la visualisation des noyaux des cellules de la peau, critère nécessaire pour le bon diagnostic par le dermatologue comme nous l'avons précédemment mentionné. L'objectif dans le bras de référence permet dans le montage de la figure 2.3 de compenser la dispersion potentiellement introduite par l'objectif du bras objet. La dispersion caractérise le fait qu'une onde se propageant dans un milieu dit dispersif, voit sa vitesse varier en fonction de sa longueur d'onde. En OCT, si la dispersion est différente dans les deux bras, alors le balayage du plan de cohérence en profondeur dans l'échantillon ne s'effectue pas de façon identique pour toutes les longueurs d'onde. Les différences de décalage du plan de cohérence selon les longueurs d'onde causent un élargissement de l'interférogramme et une diminution de son enveloppe. En résultent alors une perte de résolution axiale et une perte de contraste. En introduisant un objectif identique dans le bras de référence, la dispersion dans le bras objet est égale à la dispersion dans le bras de référence.

### 2.3.1.4 . Surface de référence

La surface de référence utilisée en LC-OCT est réalisée à partir d'une lame de silice fondue de 1 mm d'épaisseur. Le faisceau de référence est focalisé sur la surface externe de la lame de verre, résultant un coefficient de réflexion sur la surface de référence d'environ 3 % (interface verre/air). On ne le détaillera pas ici, mais on peut montrer que le contraste des interférences est maximisé lorsque la quantité de lumière réfléchie par la surface de référence est similaire à la quantité de lumière incohérente (*i.e.*, n'interférant pas) rétro-diffusée par l'échantillon [104]. Sur la peau, la fraction de lumière incohérente collectée a été estimée à 0.1 % [105]. Afin d'abaisser le coefficient de réflexion dans le bras de référence, le faisceau de référence est en pratique légèrement défocalisé de l'interface verre/air. Afin d'égaliser la dispersion du bras de référence, une lame de silice fondue identique est introduite dans le bras objet. Lors de l'imagerie *in vivo*, la peau est plaquée contre cette lame de verre dans le bras objet, ce qui permet de la stabiliser.

### 2.3.1.5 . Milieu d'immersion

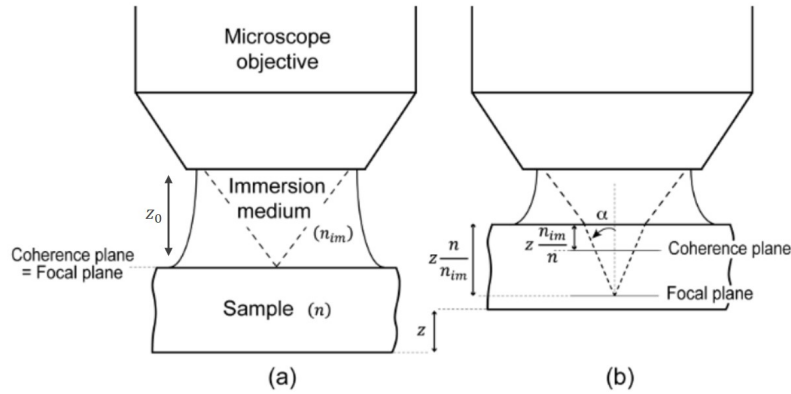


Figure 2.4 – Illustration de la séparation des plans de cohérence et de focalisation lorsque l'indice optique  $n_{im}$  du milieu d'immersion est différent de l'indice optique  $n$  de l'échantillon. a) Configuration initiale où les plans de cohérence et de focalisation sont superposés à la surface de l'échantillon. b) Séparation des plans de cohérence et de focalisation lorsque l'on pénètre d'une distance  $z$  dans l'échantillon. Figure extraite de [25].

Les objectifs utilisés sont des objectifs à immersion à eau. Dans le cas de la LC-OCT, ce milieu d'immersion permet une adaptation d'indice optique avec l'échantillon à analyser, c'est-à-dire dans notre cas la peau qui présente un indice moyen de 1.40. Tout comme l'OCM dans le domaine temporel, la LC-OCT repose sur un balayage temporel du plan de cohérence avec focalisation dynamique de la ligne d'éclairage. Le plan de cohérence et la ligne de focalisation sont balayés de façon synchrone en profondeur dans l'échantillon. Afin que le plan de cohérence et la ligne de focalisation restent bien superposés, il est important de choisir un milieu d'immersion dont l'indice optique est proche de celui de l'échantillon imagé. Pour l'expliquer, considérons la figure 2.4. Dans une configuration initiale, supposons le plan de cohérence et ligne de focalisation superposés à l'interface de l'échantillon d'indice  $n$  et du milieu d'immersion d'indice  $n_{im}$ . Dans cette configuration, la distance à parcourir en sortie d'objectif pour atteindre le plan de cohérence dans chaque bras est de  $n_{im}z_0$  (figure 2.4a). Supposons ensuite, pour une question de simplicité, que l'échantillon est translaté axialement d'une distance  $z$  afin de balayer le plan de cohérence et la ligne de focalisation en profondeur dans l'échantillon. En raison de la différence d'indice optique, les lois de l'optique géométrique permettent de situer la ligne de focalisation à une profondeur  $z_{foc} = \frac{n}{n_{im}}z$ . Le plan de cohérence situé désormais en  $z_{coh}$  dans l'échantillon et le chemin optique entre l'objectif et le plan de cohérence s'écrit alors  $n_{im}(z_0 - z) + nz_{coh}$ . Puisqu'il vérifie une différence de marche nulle, le plan de cohérence est donc situé à une profondeur  $z_{coh} = \frac{n_{im}}{n}z$ . On voit bien que si  $n_{im}$  est différent de  $n$ , les plans de cohérence et de focalisation se séparent au fur et à mesure de la pénétration dans l'échantillon, tel qu'illustré à la figure 2.4b). En pratique, le milieu d'immersion utilisé en LC-OCT est de l'huile de silicone d'indice 1.40 égal à l'indice optique moyen de la peau.

### 2.3.1.6 . Détection et filtrage confocal

L'éclairage selon une ligne avec un objectif de microscope de haute ouverture numérique, couplé à la détection du signal interférométrique par un capteur en ligne, permet d'avoir un effet de filtrage confocal selon une direction, contribuant à limiter le nombre de photons collectés en dehors du plan où est focalisée la ligne. La force du filtrage confocal est à la fois par la finesse de la ligne d'éclairage et par la longueur des pixels. Pour une ligne en limite de diffraction, le volume confocal sera d'autant plus restreint que la ligne de pixel est fine, au détriment de l'intensité du signal collecté cependant. Classiquement, on choisit une hauteur de pixel de la taille de la tache d'Airy dans le plan de la caméra. La largeur des pixels est choisie de façon à échantillonner correctement cette tache d'Airy, c'est-à-dire, selon le critère de Shannon, en comptant au moins deux pixels pour couvrir une tache d'Airy dans l'espace du capteur de la caméra. Enfin, la taille du capteur est déterminée par le champ couvert par la ligne dans le plan de l'échantillon et le grandissement du système défini par l'objectif de microscope et la lentille de tube. En LC-OCT, naturellement, le spectre de détection de la caméra doit être adapté à celui de la source et présenter une sensibilité suffisante pour l'imagerie en profondeur. On utilise ainsi en LC-OCT des capteurs en silicium. Enfin, un critère important pour le choix de la caméra est sa vitesse d'acquisition. Comme on le verra dans la suite, les images LC-OCT sont obtenues par concaténation de lignes acquises les unes à la suite des autres et leur vitesse d'acquisition régit la cadence d'imagerie. Il faut également une caméra avec une grande dynamique pour maximiser la sensibilité de détection. En pratique, le capteur utilisé est une caméra CMOS constituée de 2048 pixels carré de 14  $\mu\text{m}$  de côté fonctionnant à une cadence de 70 kHz.

### 2.3.2 . Modularité *in vivo/ex vivo*

Récemment, des améliorations ont été réalisées afin de permettre l'utilisation du système de LC-OCT à la fois pour des applications *in vivo* et *ex vivo*. Ces améliorations permettant la modularité *in vivo/ex vivo* du dispositif de LC-OCT font l'objet d'une demande de brevet par DAMAE Medical (WO 2022/161816). Pour permettre une modularité *in vivo/ex vivo* du système de LC-OCT, les deux lames de silice fondue de 1 mm d'épaisseur, présentes dans chaque bras, sont remplacées par deux lames de silice fondue de 500  $\mu\text{m}$  d'épaisseur. Dans cette configuration, l'objectif de microscope dans chaque bras est contenu dans une cuve en deux parties : la partie supérieure de la cuve contient effectivement l'objectif de microscope ainsi qu'une lame de silice fondue de 500  $\mu\text{m}$  placée sous l'objectif de microscope. Du liquide d'immersion (huile de silicone) est introduit entre l'objectif de microscope et la lame de silice fondue. La partie inférieure de la cuve est constituée d'un embout amovible, comprenant la seconde lame de silice fondue de 500  $\mu\text{m}$  d'épaisseur et du liquide d'immersion. Lors de l'utilisation *in vivo* du système de LC-OCT, la peau est plaquée contre la lame de silice fondue de l'embout amovible de la cuve du bras objet.

Lors de l'utilisation *ex vivo*, l'embout de la cuve du bras objet est enlevé, et l'échantillon *ex vivo* est alors placé dans un porte-échantillon recouvert d'une lame de silice fondue de 500  $\mu\text{m}$ . Cette lame du porte-échantillon remplace alors la lame de 500  $\mu\text{m}$  de l'embout amovible utilisé *in vivo*. Du liquide d'immersion est alors introduit entre la lame de silice fondue de la partie supérieure de la cuve et la lame de silice fondue du porte-échantillon. Dans le porte-échantillon, l'échantillon est plaqué contre la lame de silice fondue de 500  $\mu\text{m}$ , ce qui permet de le maintenir immobile pendant l'imagerie.

Dans cette configuration *ex vivo*, il est alors possible de déplacer l'échantillon indépendamment

du système de LC-OCT, ce qui permet d'imager toute région de l'échantillon en contact avec la lame de silice fondue du porte-échantillon, sans risquer de déformer ou d'endommager l'échantillon [106]. Nous reviendrons plus sur cette configuration *ex vivo* dans le chapitre 4, où la LC-OCT est utilisée pour des applications *ex vivo*.

## 2.3.3 . Modes d'imagerie LC-OCT

### 2.3.3.1 . Génération d'images en coupe verticale

Comme nous l'avons précédemment introduit, la LC-OCT se base sur un balayage synchrone du plan de cohérence et de la ligne de focalisation dans l'échantillon. De ce fait, une série de profils adjacents sont acquis en parallèle au cours du balayage de la profondeur de l'échantillon, permettant d'obtenir une image verticale en un seul balayage. Pour rappel en OCM, les profils étant acquis un par un, la vitesse d'acquisition se trouve limitée par la vitesse de translation de l'objectif de microscope assurant la focalisation dynamique dans le bras objet. Désormais, c'est donc la vitesse d'acquisition d'une image verticale qui est limitée par la vitesse de déplacement de l'objectif, ce qui permet d'atteindre une cadence d'imagerie plus élevée. En LC-OCT, le balayage synchrone du plan de cohérence et du plan de focalisation peut être réalisé de plusieurs manières, mais la méthode implémentée en pratique consiste à traduire l'ensemble constitué du cube séparateur et de l'objectif de microscope du bras objet, tel qu'illustré par le cadre en pointillés rouge de la figure 2.3. Dans cette configuration, le chemin optique est allongé de façon identique dans chaque bras au cours de la translation, ce qui n'altère pas la différence de marche entre les deux bras. C'est en rapprochant l'ensemble constitué du cube séparateur et de l'objectif objet de l'échantillon que le plan de cohérence et la ligne de focalisation pénètrent de façon superposée dans l'échantillon.

L'ensemble formé par le cube séparateur et l'objectif de microscope du bras objet est monté sur une platine piézoélectrique pouvant se déplacer linéairement sur une plage de 500  $\mu\text{m}$ . Au cours de la translation de la platine, la ligne de focalisation, superposée au plan de cohérence, est balayée en profondeur dans l'échantillon et l'intensité rétro-diffusée par l'échantillon est collectée par la caméra en ligne au cours du balayage. Comme on l'a vu en TD-OCT, la translation du plan de cohérence permet d'acquérir un signal interférométrique  $I_{int\ OCT}(x_0, y_0, z_0)$  en fonction de la profondeur  $z_0$  du plan de cohérence dans l'échantillon et de la position latérale  $(x_0, y_0)$  de focalisation du faisceau dans l'échantillon. Dans le cas d'une ligne de focalisation, le faisceau n'est plus focalisé en  $x_0$  mais éclaire un ensemble de points  $x_i$ . Pour chaque point  $x_i$  de la ligne d'éclairement, l'intensité  $I_{int\ LC-OCT}$  collectée par la caméra ligne de la LC-OCT s'écrit :

$$I_{int\ LC-OCT}(x_i, y_0, z_0) = \frac{I_0}{2} \sqrt{R_{ref}} \iiint_{V_{OCT}(x_i, y_0, z_0)} \sqrt{R_{ech}(x, y, z)} V_{coh}(\delta(z)) \cos(k\delta(z)) dx dy dz \quad (2.5)$$

$I_{int\ LC-OCT}(x_i, y_0, z_0)$  est échantillonnée par les pixels de la caméra, chaque pixel situé en  $X_i$  dans le capteur collectant le signal provenant d'un volume  $V_{OCT}$  centré à la position  $(x_i = \frac{X_i}{G}, y_0, z_0)$  dans l'échantillon, avec  $G$  le grandissement formé par l'objectif et la lentille de tube. Pour retrouver l'intensité rétro-diffusée le long de la ligne en fonction de la profondeur sondée (*i.e.*,  $\iiint_{V_{OCT}(x_i, y_0, z_0)} R_{ech}(x, y, z)$  pour chaque point  $x_i$  illuminé par la ligne et chaque profondeur  $z_0$  sondée dans l'échantillon), un algorithme de démodulation est appliqué à l'intensité collectée pour obtenir l'enveloppe du signal

interférométrie.

Pour ce faire, on utilise un algorithme dit à décalage de phase. Dans le cas de la LC-OCT, on utilise plus précisément l'algorithme de Larkin [107]. Cet algorithme utilise 5 lignes déphasées successivement de  $\frac{\pi}{2}$  l'une par rapport à l'autre pour fournir un signal démodulé proportionnel à  $\frac{I_0^2}{2} R_{ref} \iiint_{V_{OCT}} R_{ech}(x, y, z)$ . Acquérir des lignes déphasées de  $\frac{\pi}{2}$  revient à faire varier la différence de marche  $\delta(z) = 2n(z_0 - z)$  de  $\frac{\lambda}{4}$  et donc à traduire le plan de cohérence  $z_0$  de  $\frac{\lambda}{8n}$ . Au cours du balayage du plan de cohérence, on synchronise la caméra par rapport à la translation de la platine piézoélectrique, de façon à acquérir des lignes chacune espacée de  $\frac{\lambda}{8n}$ . Ensuite, on combine les lignes 5 par 5 pour obtenir une ligne démodulée. En réalisant cela pour l'ensemble des lignes acquises sur la profondeur sondée par le plan de cohérence, on obtient alors une image verticale faite d'une concaténation de lignes démodulées. En pratique, pour une longueur d'onde centrale de 800 nm et un indice optique de 1.4, le déplacement du plan de cohérence à réaliser entre chaque acquisition de ligne est de 71 nm. Pour obtenir une image verticale sur une profondeur de 500  $\mu\text{m}$ , 7000 lignes doivent ainsi être acquises. D'où la nécessité d'avoir une caméra à haute cadence d'imagerie pour pouvoir acquérir ces lignes le plus rapidement possible. Actuellement, la LC-OCT permet d'acquérir des images en coupe verticales de 0 à 500  $\mu\text{m}$  de profondeur à une fréquence temps réel d'au moins 8 Hz.

Un exemple d'image verticale de peau saine est donné à la figure 2.5. L'image verticale permet de visualiser les différentes couches superficielles de la peau, à savoir la couche cornée, l'épiderme, la jonction derme-épiderme, le derme papillaire puis le derme réticulaire. Dans l'épiderme, les noyaux sombres des kératinocytes sont clairement visibles, entourés par leur cytoplasme en gris. Dans le derme, les vaisseaux sanguins forment des structures sombres dont la forme dépend du plan de coupe de l'image par rapport aux vaisseaux. Les fibres, composées de collagène et d'élastine, forment des structures longilignes très brillantes dans le derme.

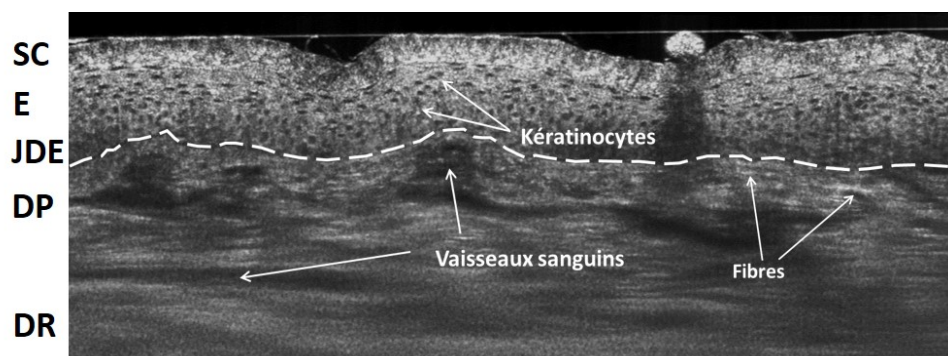


Figure 2.5 – Images en coupe verticale d'une peau saine, acquise *in vivo*. L'image en coupe permet de visualiser les différentes couches superficielles et structures cellulaires de la peau. SC : stratum corneum; E : épiderme; JDE : jonction derme-épiderme; DP : derme papillaire; DR : derme réticulaire.

### 2.3.3.2 . Génération d'images en coupe horizontale

La LC-OCT est également capable de générer des images en coupe horizontales, aussi appelées images en face, grâce à un miroir galvanométrique placé dans le bras objet, permettant de balayer latéralement la ligne d'éclairage sur l'échantillon (*i.e.*, de modifier la position  $Y_0$  dans l'équation 2.3.3.1) pour une position donnée  $z_0$  du plan de cohérence. Tout comme en OCM, la LC-OCT nécessite de produire un déphasage pour faire varier le signal interférométrique et ainsi le détecter. En pratique, cela est réalisé en faisant osciller de façon sinusoïdale la surface de référence grâce à une puce piézoélectrique. Au cours du balayage de la ligne, la surface de référence oscille, permettant d'acquérir dans le plan latéral des lignes déphasées les unes par rapport aux autres. Dans ce mode d'imagerie en coupe horizontale, la caméra, la puce piézoélectrique et le miroir galvanométrique sont synchronisés de façon à acquérir des lignes séparées de  $\sim 50$  nm. Tout comme dans le mode d'imagerie vertical, les lignes acquises dans le plan latéral sont groupées 5 par 5 pour obtenir une ligne horizontale démodulée via un algorithme à décalage de phase. En pratique, 10 600 lignes successives sont acquises par la caméra au cours d'un balayage latéral de la ligne par le miroir galvanométrique. Ces 10 600 lignes permettent de reconstruire une image en coupe horizontale couvrant un champ latéral de  $1.2 \text{ mm} \times 0.5 \text{ mm}$  ( $x \times y$ ), avec une résolution latérale de  $\sim 1 \text{ }\mu\text{m}$ . Les images en coupe horizontales sont affichées en temps réel à une cadence de 8 Hz.

Quelques exemples d'images horizontales acquises dans les différentes couches de la peau (couche cornée, couche épineuse, couche basale et derme papillaire) sont donnés à la figure 2.6. Dans l'épiderme, la résolution cellulaire de l'image permet de visualiser en noir les noyaux des kératinocytes de l'épiderme et en gris leur cytoplasme. Dans la couche basale, la mélanine est visible sous la forme de grains très réfléchissants. Dans le derme papillaire, l'image horizontale montre l'organisation des fibres de collagène et d'élastine très réfléchissantes.

### 2.3.3.3 . Génération d'images 3D

En combinant le balayage latéral de la ligne de focalisation et le balayage axial du plan de cohérence superposé à la ligne, il est possible de reconstruire des images 3D de LC-OCT. Pour obtenir des images 3D, deux modes d'acquisitions peuvent être proposés, le premier donnant la priorité au balayage latéral de la ligne, le second donnant la priorité au balayage axial.

Dans le premier cas de figure, les images 3D sont produites en acquérant une pile d'images en coupe horizontales à des profondeurs successives. Les images de coupe horizontale sont acquises en balayant rapidement la ligne avec le miroir galvanométrique, tandis que la platine piézo-électrique se déplace pour translater le plan de cohérence entre deux images horizontales. La translation de la platine est ajustée de manière à ce que les images de coupe horizontale successives soient séparées d'un micromètre en  $z$ , approximativement égale à la résolution axiale du système d'imagerie. Dans le second cas de figure, l'ordre des balayages latéral et axial est inversé. La ligne est lentement balayée dans le plan latéral ; pour chaque position latérale de la ligne, une image en coupe verticale est acquise en balayant la ligne en profondeur avec la platine piézoélectrique. En résulte une succession d'images verticales, qui, concaténées, permettent de reconstruire une image 3D.

En pratique, les deux modes d'acquisition 3D sont implémentés dans le système de LC-OCT, et permettent de couvrir un volume 3D LC-OCT de  $1.2 \text{ mm} \times 0.5 \text{ mm} \times 0.5 \text{ mm}$  ( $x \times y \times z$ ) avec une résolution isotrope de  $\sim 1 \text{ }\mu\text{m}$ . Une image 3D est acquise sur l'ensemble de ce volume sur

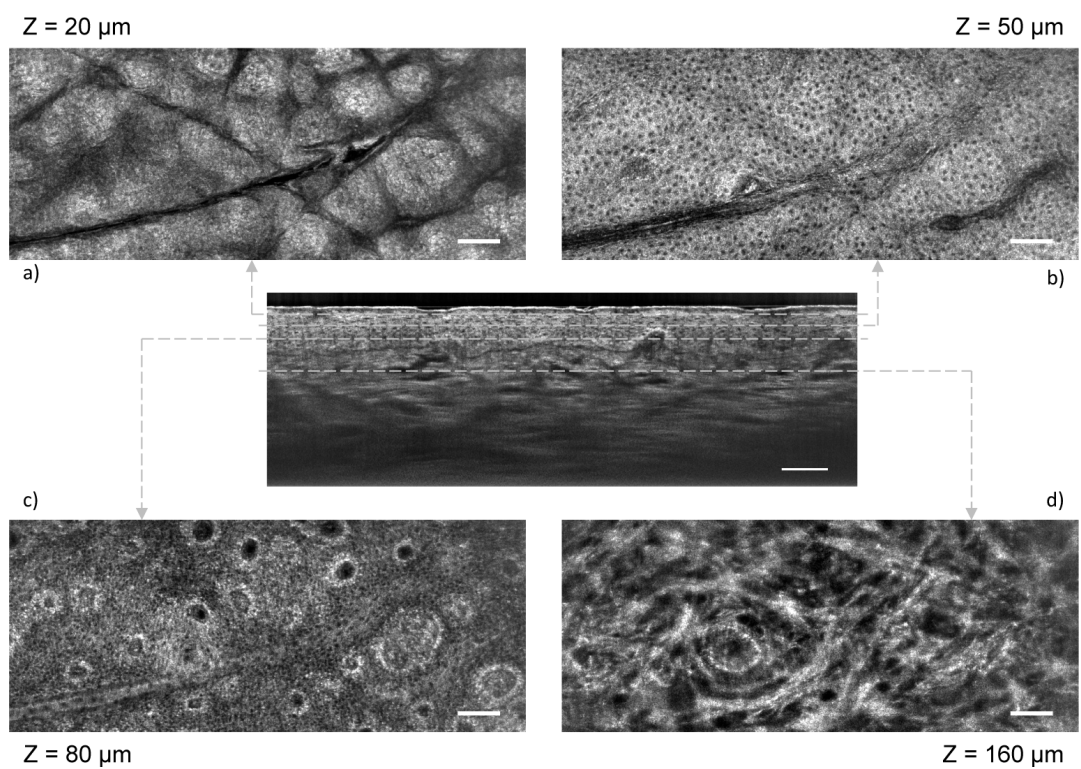


Figure 2.6 - Images en coupe horizontale d'une peau saine, acquises dans les différentes couches de la peau : a) couche cornée, b) couche épineuse, c) couche basale et d) derme papillaire. La profondeur Z dans la peau est indiquée pour chaque image horizontale, et corrélée à une image en coupe verticale. Figure extraire de [26].



une durée d'environ 30 s. En clinique, le mode d'acquisition 3D horizontal (*i.e.*, image 3D obtenue par concaténation d'images horizontales acquises à différentes profondeurs) est souvent privilégié par rapport au mode d'acquisition 3D vertical car comme on l'a précédemment expliqué en introduction, les lésions cutanées et cancéreuses se développent généralement dans l'épiderme, à une profondeur variant entre 100 et 200  $\mu\text{m}$  pour la couche basale. Il n'est ainsi pas toujours nécessaire d'acquérir des images jusqu'à 500  $\mu\text{m}$  de profondeur. L'utilisation du mode 3D horizontal permet alors d'ajuster la profondeur maximale d'imagerie tout en ayant une image sur tout le champ latéral, ce qui permet de réduire le temps d'acquisition d'une 3D si toute la profondeur d'imagerie n'est pas requise. Ce qui n'est pas possible en imagerie 3D verticale, où jouer sur le temps d'acquisition d'une image 3D se fait réduisant le champ de vue latéral, peu préconisé en clinique. Le mode d'imagerie 3D horizontal permet également de corriger plus facilement des éventuels mouvements d'une image horizontale à une autre par rapport au mode d'acquisition 3D vertical.

#### 2.3.4 . Voie d'imagerie dermoscopique

Enfin, un développement récent en LC-OCT est l'ajout d'une voie d'imagerie de surface, aussi appelée imagerie dermoscopique. Cette image, en couleurs, sert d'outil de visée pour le dermatologue afin de se repérer par rapport à la surface de la peau et de positionner la sonde au niveau de la lésion à imager. L'image de surface est affichée avec une fréquence de 8 Hz, en parallèle des images verticales, horizontales ou 3D. Elle couvre un champ de 3 mm de diamètre, avec une résolution latérale de  $\sim 5 \mu\text{m}$  [27]. Un exemple d'image dermoscopique obtenue sur un grain de beauté avec le dispositif de LC-OCT est donné à la figure 2.7.

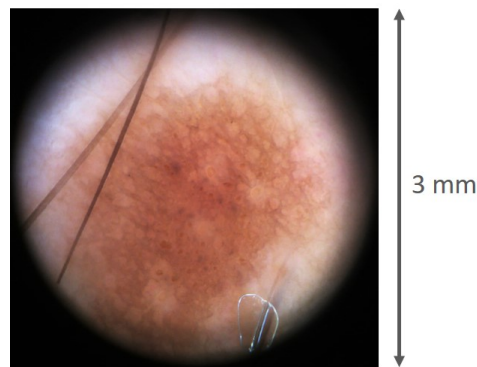


Figure 2.7 – Image dermoscopique, ou image de surface de la peau, acquise avec le dispositif de LC-OCT sur un grain de beauté. L'image est affichée en couleurs et couvre un champ de 3 mm de diamètre, avec une résolution latérale de  $\sim 5 \mu\text{m}$  [27].

Pour générer cette image, l'idée originale consiste en l'utilisation du même objectif de microscope simultanément dans deux configurations différentes. En effet, l'objectif de microscope utilisé dans le système de LC-OCT est conçu pour imager à haute résolution sur un champ de 1.33 mm, mais il permet en réalité de collecter la lumière sur un champ allant jusqu'à 4 mm. En fait, au-delà des 1.33 mm de champ préconisés par le constructeur, les aberrations et le vignettage sont considérés trop importants pour obtenir une qualité d'image suffisante sur tout le champ. Une image peut ainsi être obtenue sur un champ plus grand, en contrepartie d'un niveau d'illumination et d'une qualité d'image hétérogène (plus faible sur les bords). L'idée consiste alors à réduire l'ouverture numérique de l'objectif,



en utilisant un diaphragme, pour obtenir une résolution et une illumination homogène sur l'ensemble du champ. De ce fait, l'objectif peut être utilisé dans deux configurations : dans la configuration dédiée à l'imagerie LC-OCT, l'objectif est utilisé dans ses conditions d'utilisation standards, sur un champ restreint à 1.2 mm avec une ouverture numérique de 0.5 permettant l'imagerie à haute résolution. Dans la configuration dermoscopie, l'objectif est utilisé avec une ouverture numérique réduite (entre 0.05 et 0.1) et permet d'obtenir une image de résolution plus faible, évaluée à 5  $\mu\text{m}$ , mais sur un plus grand champ, de 3 mm de diamètre sur les dispositifs de LC-OCT actuels.

Concernant l'illumination, une couronne de LEDs est placée au niveau de l'objectif du bras objet, afin d'éclairer la surface de la peau avec une lumière blanche, tel que représenté à la figure 2.3. Le miroir galvanométrique, mentionné jusqu'à présent, est remplacé par une lame séparatrice montée sur un galvanomètre. Elle sépare le faisceau du laser supercontinuum rétro-diffusé par la peau de la lumière blanche des LEDs, ce qui permet de générer l'image LC-OCT et l'image dermoscopique simultanément. La lame choisie favorise la voie d'imagerie LC-OCT (séparation 90/10) afin d'affecter au minimum la qualité des images LC-OCT. Un relais afocal composé de deux lentilles (objectif et oculaire) est placé derrière la séparatrice et permet de relayer l'image jusqu'à une caméra 2D. La caméra 2D dispose d'une micro-lentille avec focalisation ajustable, projetant l'image en couleur de la surface de la peau sur le capteur de la caméra. L'ajustement automatique de la focalisation de cette micro-lentille permet d'obtenir une image toujours focalisée au niveau de la surface de la peau lors du déplacement de l'objectif de microscopie permettant le balayage des plans de cohérence et de focalisation nécessaires à l'imagerie LC-OCT. Un filtre passe-bas est placé devant la caméra pour atténuer l'intensité du laser supercontinuum qui risque d'éblouir la caméra. Le flux restant permet de visualiser la ligne du laser supercontinuum à la surface de la peau, et ainsi de localiser l'acquisition LC-OCT au sein de l'image dermoscopique.

### 2.3.5 . Atouts de la LC-OCT pour l'imagerie *in vivo* de la peau

La LC-OCT est une technique qui a été introduite à l'imagerie de la peau en 2018 [84]. Par rapport aux techniques précédemment mentionnées d'OCT et d'OCM, la LC-OCT présente de nombreux atouts qui la rendent très adaptée à l'imagerie dermatologique, que nous allons brièvement résumer. Par rapport à l'OCT conventionnel, la LC-OCT présente une résolution latérale bien meilleure, proche de celle de la microscopie confocale et de l'OCM grâce aux objectifs de microscope utilisés. Cette résolution permet, comme on le verra dans la suite, d'imager la peau avec un niveau de détail cellulaire. La parallélisation de l'acquisition des profils selon une ligne permet d'atteindre des vitesses d'acquisitions meilleures qu'en OCM à balayage, mais également meilleure qu'en OCM plein champ, les capteurs en ligne étaient plus rapides que les caméras 2D. La profondeur de pénétration, du fait du filtrage confocal en ligne, est également meilleure qu'en OCM plein champ, limitée généralement à environ 200  $\mu\text{m}$  de profondeur. La LC-OCT permet de générer en temps réel des images à la fois horizontales et verticales grâce à des modes d'acquisition distincts, ce que ne permettent pas l'OCT ou l'OCM conventionnels : l'OCT peut générer des images verticales en temps réel, mais l'obtention d'une image horizontale nécessite l'acquisition d'une image 3D par concaténation d'images verticales. Cette image 3D est ensuite recoupée dans le plan latéral pour fournir des images en coupe horizontale en post-traitement. En OCM, des images en coupes verticales peuvent être obtenues, mais là encore cela nécessite de recouper une image 3D formée par concaténation d'images horizontales cette fois.

Ces modes d'acquisitions en coupe horizontale et verticale constituent un atout majeur en dermatologie, où certaines lésions telles que les carcinomes sont mieux visualisés en coupe verticale, tandis que d'autres telles que les mélanomes nécessitent l'imagerie horizontale et 3D pour en comprendre l'architecture bien plus complexe.

### 2.3.6 . Vers un besoin de multimodalité

La LC-OCT constitue aujourd'hui une modalité d'imagerie optique utilisée dans plusieurs hôpitaux européens disposant d'un service de dermatologie, avec un total de plus de 30 systèmes installés dans le monde aujourd'hui. La LC-OCT permet de visualiser des changements structuraux en profondeur dans la peau et l'échelle de la cellule, signes d'une potentielle pathologie cutanée. La valeur de la LC-OCT en dermatologie a été démontrée par de nombreuses études, tant pour la caractérisation de la peau saine [108, 109, 110] que pour l'identification et la caractérisation de diverses pathologies cutanées *in vivo*, incluant les carcinomes basocellulaires et leurs différents sous-types [111, 112], les carcinomes spinocellulaires [113], les kératoses actiniques [113, 114] et plus récemment les mélanomes [115].

Néanmoins, par rapport au « gold standard » actuel qu'est l'histologie, la LC-OCT est limitée à l'apport d'informations morphologiques. Comme nous l'avons vu, l'histologie apporte non seulement des informations morphologiques à l'échelle cellulaires, mais également des informations fonctionnelles, grâce aux colorants se fixant spécifiquement sur certaines cellules ou certains marqueurs tumoraux. Bien que la LC-OCT fournisse des images avec un niveau de détail comparable à l'histologie, le diagnostic précis peut, dans certains cas, être complexe à établir à partir d'informations morphologiques uniquement :

- Certaines pathologies cutanées peuvent présenter des structures ambiguës, que l'image ne suffit à identifier.
- Différentes pathologies peuvent présenter des structures morphologiques similaires qui les rendent difficiles à différencier morphologiquement : on parle de pathologies imitatrices.
- D'autre part, les pathologies très précoces peuvent présenter des changements structuraux difficilement observables à l'image.
- L'extension spatiale de certaines lésions, nécessaire notamment pour la définition des zones à exciser lors d'un traitement par chirurgie, peut être difficile à délimiter avec l'image.
- Enfin, certaines informations, par exemple les mutations génétiques impliquées dans le développement d'un cancer cutané comme nous l'avons évoqué au chapitre 1 d'introduction, sont des informations cruciales pour l'orientation du traitement, mais qui ne peuvent être apportées par une modalité d'imagerie optique seule.

De ce fait, il serait utile de disposer d'informations complémentaires permettant de lever le doute sur ces cas difficiles pour la LC-OCT ou d'apporter des informations qui amélioreront la précision du diagnostic et à terme la prise en charge des patients. Au cours de cette thèse, nous avons ainsi investigué deux approches différentes pour apporter à la LC-OCT des informations complémentaires.

Dans une première approche, nous avons étudié comment il est possible d'extraire d'images LC-OCT existantes des informations complémentaires sur les propriétés optiques des échantillons imagés, via l'analyse du signal d'intensité des images. Ces informations sur les propriétés optiques sont des informations intrinsèquement comprises dans les images de LC-OCT puisqu'une image est obtenue

en collectant la lumière rétro-diffusée par les structures de l'échantillon. En fonction des propriétés optiques d'absorption et de diffusion (coefficient d'absorption  $\mu_a$ , de diffusion  $\mu_s$  et facteur d'anisotropie de diffusion  $g$  introduites au chapitre 1), des variations d'intensité, à l'origine du contraste des images, sont observées. Ces informations permettent d'apporter à la LC-OCT des informations quantitatives *in vivo* sur les propriétés structurales et organisationnelles des cellules des tissus imagés, en complément des informations plus qualitatives apportées par les images de LC-OCT. Au cours de cette thèse, nous avons développé une méthode, permettant, à partir d'images 3D de LC-OCT, d'extraire les propriétés  $\mu_s$  et  $g$  à une échelle macroscopique (variable de  $\sim 100 \mu\text{m}$  à l'échelle de toute une image). Le chapitre 3 qui suit est consacré à ce premier volet de la thèse.

Dans un second volet, nous avons investigué le couplage de la LC-OCT avec une modalité optique complémentaire, la spectroscopie Raman, afin d'apporter à la LC-OCT des informations complémentaires d'ordre moléculaire, que la LC-OCT seule ne peut fournir. Pour ce faire, nous avons développé une méthode de couplage des deux modalités, basée sur une approche de co-localisation à l'échelle quasi-cellulaire permettant l'acquisition de spectres Raman précisément localisés en certains points d'une image 3D de LC-OCT. Ce couplage permet d'enrichir localement les images par des informations moléculaires. Cette approche a dans un premier temps été développée pour des applications *ex vivo* afin de valider l'apport de la spectroscopie Raman à l'imagerie LC-OCT. Nous l'avons appliquée à la caractérisation morpho-moléculaire de divers échantillons cutanés *ex vivo*, tels que des biopsies de tatouage présentant des réactions cutanées, des chirurgies cutanées, incluant des cas de cancers, et des modèles de mélanome. Dans un second temps, nous avons proposé une extension de cette approche de co-localisation à des applications *in vivo*. Le chapitre 4 de ce manuscrit rend compte des travaux menés sur ce couplage de la LC-OCT à la spectroscopie Raman et ses applications en dermatologie.

## 3 - Mesure des propriétés optiques de diffusion en LC-OCT

### sectionIntroduction

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, la LC-OCT génère des images tridimensionnelles fournissant des informations morphologiques sur la peau à l'échelle cellulaire. Ces images sont obtenues en collectant l'intensité rétro-diffusée par les différentes structures de la peau. La quantité de lumière rétro-diffusée est régie par les propriétés optiques de chacune de ces structures, à savoir le coefficient d'absorption  $\mu_a$ , le coefficient de diffusion  $\mu_s$  et le facteur d'anisotropie de diffusion  $g$ . Ces propriétés optiques sont la source de contraste des images. Une image de LC-OCT contient donc, au-delà d'informations morphologiques, des informations portant sur ces propriétés optiques. Comme nous l'avons évoqué à la section 1.2.4 du chapitre 1, ces propriétés optiques sont elles-mêmes déterminées par la présence de chromophores dans la peau et par les propriétés structurelles et organisationnelles de la peau comme la taille, la forme et la densité des structures cellulaires et sub-cellulaires.

Des changements dans la structure et l'organisation de la peau à l'échelle cellulaire peuvent être des indicateurs de développement ou de progression d'une pathologie. Ces changements modifient les interactions de la lumière avec les tissus, modifiant en conséquence les propriétés optiques. La quantification des propriétés optiques peut ainsi apporter à l'imagerie un outil de caractérisation de la peau et de ses changements structuraux. En particulier, la mesure des deux propriétés optiques  $\mu_s$  et  $g$  fournit des informations complémentaires sur l'ensemble des structures diffusant la lumière, c'est-à-dire présentent des hétérogénéités d'indice optique. Dans le cadre de la théorie de Mie, le coefficient de diffusion  $\mu_s$  d'un milieu diffusant est déterminé par le rapport d'indices optiques entre les diffuseurs et le milieu environnant, le rayon des diffuseurs ainsi que leur densité. Le facteur d'anisotropie  $g$  est quant à lui principalement déterminé par le ratio des indices optiques et le rayon des diffuseurs, mais est peu sensible à leur densité [116]. L'obtention des deux propriétés  $\mu_s$  et  $g$  permettrait donc potentiellement d'identifier et de quantifier des changements à la fois dans la taille et la densité des structures biologiques, comme cela a été récemment mis en lumière par Cannon *et al.* [117]. Le coefficient d'absorption  $\mu_a$  permet quant à lui d'apporter des informations sur les chromophores de la peau (mélanine, sang). Néanmoins, la LC-OCT opérant dans la gamme du proche infrarouge, ce coefficient  $\mu_a$  se trouve généralement négligeable devant le coefficient de diffusion  $\mu_s$  de la peau, comme nous l'avons évoqué à la section 1.2.4 du chapitre 1 ( $0.1$  à  $1 \text{ mm}^{-1}$  pour  $\mu_a$  et  $5$  à  $20 \text{ mm}^{-1}$  pour  $\mu_s$ ).

Dans ce chapitre, nous présentons les investigations menées pour extraire les propriétés optiques de diffusion  $\mu_s$  et  $g$  d'échantillons à partir d'images 3D de LC-OCT. Dans une première partie, nous présentons le panel de techniques optiques existantes permettant la quantification des propriétés optiques de tissus biologiques. La seconde partie de ce chapitre rendra compte de l'état de l'art plus spécifique des méthodes utilisées en OCT et RCM. Enfin, nous présentons la méthode développée au cours de cette thèse, permettant d'extraire les propriétés optiques de diffusion à partir d'images 3D de LC-OCT, et sa validation sur des échantillons tests. Notre approche permet de mesurer les propriétés optiques  $\mu_s$  et  $g$  moyennes au sein d'une image 3D de LC-OCT sur des échantillons monocouches.

Elle peut également être étendue à des échantillons organisés par couches homogènes de tissus, pour lesquels elle permet d'extraire une valeur de  $\mu_s$  et  $g$  dans chaque couche. Nous présentons également des travaux préliminaires sur la possibilité d'obtenir des mesures de  $\mu_s$  et  $g$  résolues spatialement à l'échelle de régions d'intérêt sélectionnées dans l'image 3D de LC-OCT. Cette méthode fournit à la LC-OCT un outil de quantification des propriétés optiques  $\mu_s$  et  $g$  avec une résolution macroscopique (à l'échelle de la centaine de  $\mu\text{m}$ ), complémentaire à la résolution micrométrique des images LC-OCT.

### 3.1 . Etat de l'art des techniques de mesure des propriétés optiques

Plusieurs techniques optiques ont été proposées pour mesurer les propriétés optiques de tissus biologiques [28]. Les principales techniques, que nous allons expliciter dans la suite, sont : la mesure par sphères intégrantes, les techniques de mesure de réflectance diffuse, la mesure par spectroscopie en temps de vol, la mesure par imagerie SFDI (« Spatial-Frequency Domain Imaging » en anglais) et la mesure à partir d'images d'OCT ou de RCM.

La méthode par sphères intégrantes apparaît dans la littérature comme la méthode de référence pour la mesure des propriétés optiques [118, 119, 120]. C'est d'ailleurs généralement à cette méthode que sont confrontées les techniques de mesure émergentes. La mesure par sphères intégrantes consiste à mesurer la réflectance et la transmittance d'un échantillon à l'aide d'un montage comportant une ou deux sphères creuses recouvertes d'un revêtement interne possédant un facteur de réflexion diffuse élevé. Un exemple de montage à deux sphères intégrantes est donné à la figure 3.1. Chaque sphère dispose d'un port d'entrée, d'un port de sortie et d'un détecteur. L'échantillon à analyser est placé entre deux sphères intégrantes, entre le port de sortie de la première sphère et le port d'entrée de la seconde sphère. Un faisceau collimaté est envoyé sur l'échantillon au travers de la première sphère. Le faisceau est partiellement réfléchi par l'échantillon au sein de la première sphère, et partiellement transmis par l'échantillon au sein de la seconde sphère. Dans la première sphère, la lumière renvoyée par l'échantillon est réfléchi par le revêtement de la sphère de façon lambertienne, c'est-à-dire qu'elle est uniformément réfléchi dans toutes les directions. Après multiples réflexions sur la paroi interne de la sphère, le flux initialement réfléchi par l'échantillon se retrouve uniformément distribué au sein de la sphère, perdant toute information sur sa directivité initiale. Une fraction de ce flux est alors collectée par le détecteur de la première sphère. De façon similaire dans la seconde sphère, la lumière transmise par l'échantillon est multiples fois réfléchi par le revêtement de la sphère et une fraction du flux résultant est collectée par le détecteur. En normalisant l'intensité réfléchi et transmise collectée par chaque détecteur par l'intensité collectée en l'absence d'échantillon entre les deux sphères, il en résulte une mesure de réflectance et de transmittance diffuses de l'échantillon. A partir de ces deux mesures, il est possible de remonter aux propriétés optiques de l'échantillon, à l'aide d'algorithmes modélisant la propagation de la lumière dans un milieu diffusant [121]. Néanmoins, ces deux mesures ne permettent d'accéder qu'à la mesure de deux des trois propriétés optiques  $\mu_a$ ,  $\mu_s$  et  $g$ . Pour pouvoir malgré tout déterminer les propriétés optiques, il est supposé que la réflectance et transmittance pour un échantillon ayant des propriétés optiques  $\mu_a$ ,  $\mu_s$  et  $g \neq 0$  sont les mêmes que celles d'un échantillon de même épaisseur ayant des propriétés optiques  $\mu_a$ ,  $\mu'_s$  et  $g = 0$  [28]. Avec cette hypothèse, il est possible d'utiliser des modèles pour accéder à la mesure des deux propriétés  $\mu_a$  et  $\mu'_s$ . Cette hypothèse est valable pour des échantillons d'épaisseur finie et vérifiant  $\mu_a \ll \mu'_s$ , mais devient invalide pour

des échantillons d'épaisseur faible, comparable au libre parcours moyen de diffusion  $l_s = 1/\mu_s$  puisque la diffusion au sein de cet échantillon devient alors simple [28] et  $\mu'_s$  n'est alors plus un paramètre pertinent.

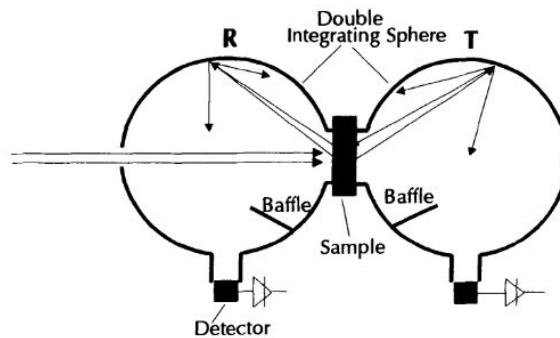


Figure 3.1 – Représentation schématique d'un montage à deux sphères intégrantes. L'échantillon est placé entre les deux sphères et éclairé par un faisceau collimaté. La lumière réfléchie (transmise) par l'échantillon est multiples fois réfléchi par le revêtement de la première (seconde) sphère. Une fraction de cette lumière est collectée par le détecteur de la sphère, permettant une mesure de réflectance (transmittance) de l'échantillon. Figure extraite de [28].

Pour séparer la contribution du coefficient de diffusion  $\mu_s$  et du facteur d'anisotropie  $g$  au sein de  $\mu'_s = \mu_s(1 - g)$ , une mesure de transmission collimatée peut être réalisée en complément des mesures par sphères intégrantes. Cette mesure est obtenue en recueillant la lumière balistique d'un faisceau se propageant perpendiculairement à l'échantillon. Comme nous l'avons vu au chapitre 1, la lumière balistique suit une loi de décroissance Beer-Lambert de coefficient  $\mu_e = \mu_a + \mu_s$ , permettant d'en déduire la valeur du coefficient de diffusion  $\mu_s$  connaissant la valeur de  $\mu_a$  par sphères intégrantes. Une description plus détaillée des sphères intégrantes et des mesures de transmission collimatée peut être trouvée dans [122].

Bien que faisant office de « gold standard » dans le domaine biomédical, la mesure par sphères intégrantes n'est généralement applicable qu'aux échantillons *ex vivo* puisqu'elle nécessite de collecter la lumière en transmission de l'échantillon. Du fait que l'échantillon soit analysé en transmittance sur toute son épaisseur, cette méthode ne permet pas non plus de faire une distinction entre des couches de tissus qui présenteraient des propriétés optiques distinctes. De plus, la mesure par transmission collimatée est limitée à des échantillons fins et/ou peu à moyennement diffusants afin de collecter une quantité suffisante de photons balistiques après traversée de l'échantillon, tout en minimisant la collection de photons multiples diffusés remis dans l'axe du faisceau balistique. Cet aspect sera rediscuté plus tard dans ce même chapitre. Elle ne permet pas non plus de distinguer des couches de tissus aux propriétés optiques différentes.

Une autre méthode, basée sur une mesure goniométrique, permet de mesurer individuellement la fonction de phase  $p(\theta)$  et par conséquent le paramètre  $g$  [29]. Cette technique consiste à éclairer un échantillon avec un faisceau collimaté en incidence normale, et à collecter la lumière diffusée par l'échantillon à chaque angle  $\theta$  en faisant tourner un détecteur dans le plan horizontal autour de l'échantillon, tel qu'illustré à la figure 3.2. Elle peut être utilisée en complément de la mesure par sphères intégrantes pour accéder à l'ensemble des propriétés optiques  $\mu_a$ ,  $\mu_s$  et  $g$ . Tout comme la mesure de transmission collimatée, cette méthode reste limitée à des échantillons *ex vivo* et ne permet pas de différencier des couches de tissus aux propriétés optiques distinctes.

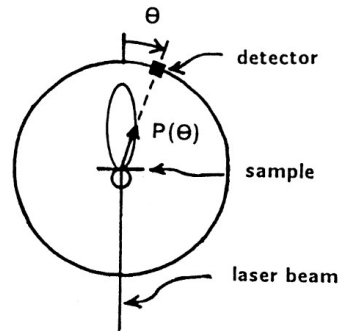


Figure 3.2 – Illustration d’une mesure goniométrique de la fonction de phase  $p(\theta)$ . L’échantillon est éclairé par un faisceau collimaté en incidence normale, et la lumière diffusée à chaque angle  $\theta$  est collectée par un détecteur en rotation autour de l’échantillon. Figure extraite de [29].

D’autres techniques ont été proposées dans la littérature pour la mesure *in vivo* des propriétés optiques. Ces techniques ne nécessitent pas de mesures en transmission. De ce fait, elles permettent de mesurer les propriétés optiques d’échantillons épais et très diffusants, mais toutes ne permettent pas de séparer la contribution du coefficient de diffusion  $\mu_s$  et du facteur d’anisotropie de diffusion  $g$  au sein du coefficient de diffusion réduit  $\mu'_s$ .

Parmi ces techniques, on peut mentionner deux principales méthodes basées sur une mesure de réflectance diffuse du tissu à analyser. Pour rappel, la lumière réfléchie par un tissu comprend à la fois la réflexion spéculaire à sa surface, décrite par les coefficients de Fresnel, et la réflectance diffuse correspondant aux photons qui pénètrent dans le tissu, s’y propagent par diffusion multiple puis émergent ensuite à la surface du tissu. La réflectance diffuse dépend des trois propriétés optiques  $\mu_a$ ,  $\mu_s$  et  $g$  régissant la diffusion des photons dans le tissu. La première méthode proposée dans

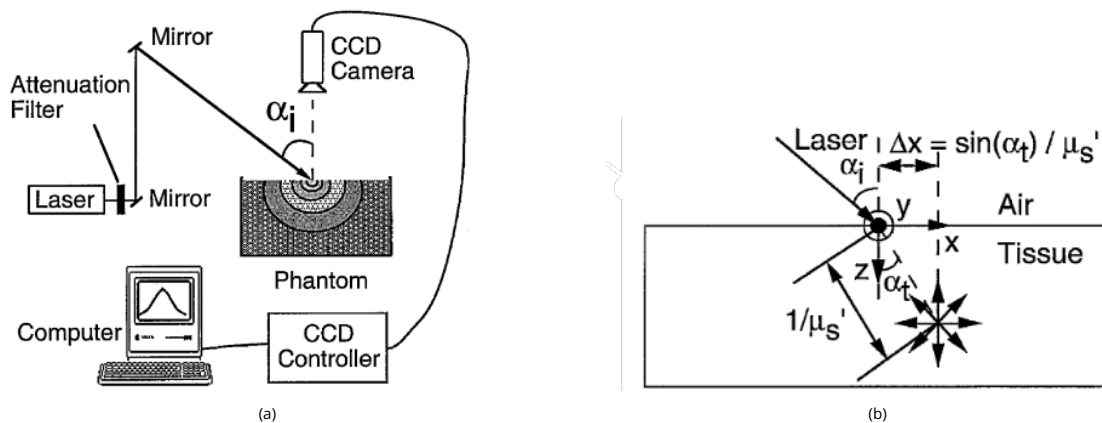


Figure 3.3 – a) Illustration d’un montage de réflectométrie en incidence oblique. (b) lien entre l’éclairage laser en incidence oblique et la position du point source isotrope induit en profondeur dans l’échantillon. Figures extraites de [30].

la littérature est la réflectométrie en incidence oblique, dont un schéma de principe est donné à la figure 3.3a. Un faisceau laser avec un angle d’incidence oblique par rapport au milieu est envoyé sur l’échantillon. Du fait de cette incidence oblique, on peut montrer que si  $\mu_a \ll \mu'_s$ , le faisceau

laser peut être vu comme un point source isotrope situé à une profondeur  $1/\mu'_s$  dans l'échantillon et décalé latéralement d'une distance  $\Delta x$  par rapport au point d'impact du laser avec la surface de l'échantillon [30], tel que représenté à la figure 3.3a. Une caméra CCD (ou une matrice de fibres) permet ensuite d'imager le point source formé par le laser dans le tissu et d'obtenir la distribution spatiale de la réflectance diffuse autour de ce point source en fonction de la position latérale  $x$ . À l'aide d'algorithmes ou de simulations, il est ensuite possible de faire le lien entre la distribution spatiale de la réflectance diffuse et les propriétés optiques  $\mu_a$  et  $\mu'_s$  du tissu.

La seconde technique est la spectroscopie de réflectance diffuse, précédemment décrite dans la section 1.4.3. Cette méthode utilise une sonde généralement fibrée, mise en contact de l'échantillon pour envoyer de la lumière en un point de l'échantillon et recueillir le spectre de la réflectance diffuse par le tissu à une certaine distance du point d'émission. Ce spectre est ensuite analysé à l'aide de modèles mathématiques pour remonter aux propriétés optiques du tissu [21]. Bien que l'instrumentation soit assez simple et la mesure de spectre réalisée en temps réel, l'extraction précise des propriétés optiques nécessite de gros efforts de modélisation de la réflectance diffuse, pouvant amener à des temps de calculs conséquents.

Les techniques résolues en temps consistent quant à elles à éclairer l'échantillon avec des impulsions ultracourtes (de l'ordre de la picoseconde voir de la femtoseconde) et à collecter la réponse temporelle du tissu à ces impulsions, à une certaine distance du point d'émission de l'impulsion [31]. Une illustration d'un montage typique de mesure résolue temporellement est donnée à la figure 3.4. L'utilisation de modèles permet de relier la réponse temporelle à l'impulsion aux propriétés optiques du tissu. Le principal inconvénient de ces techniques résolues en temps est leur coût très onéreux principalement en raison des sources nécessaires pour générer les impulsions.

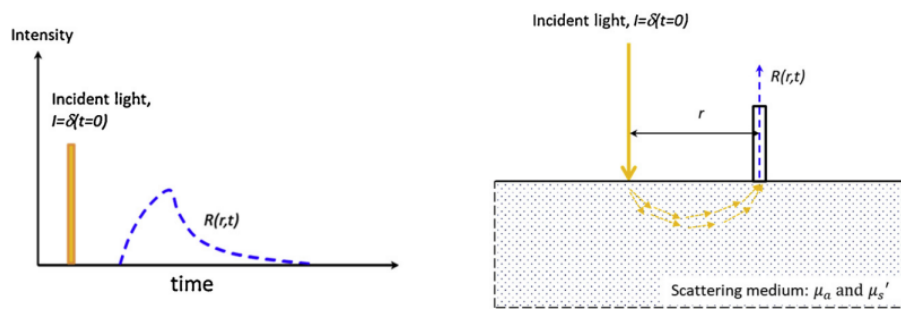


Figure 3.4 – Exemple de montage de technique résolue en temps pour la mesure de propriétés optiques. Une impulsion ultracourte est envoyée dans l'échantillon. Les photons sont multiplesment diffusés dans le tissu puis collectés à une distance  $r$  du point d'émission. L'analyse de la réponse temporelle  $R(r, t)$  du tissu à l'impulsion permet, par des modèles mathématiques, de remonter aux propriétés optiques du tissu. Figure extraite de [31].

La technique SFDI (« Spatial-Frequency Domain Imaging ») est une technique permettant d'obtenir une cartographie grand champ des propriétés optiques d'un tissu. Pour ce faire, le tissu est éclairé à l'aide d'un motif spécifique en deux dimensions tels qu'un motif sinusoïdal. En acquérant des images en réflectance du tissu illuminé avec différentes fréquences spatiales, il est possible après démodulation des images d'en estimer les propriétés optiques, toujours à l'aide de modèles mathématiques. Plus de détails sur cette technique peuvent être trouvés dans [123].



Enfin, différentes techniques ont également vu le jour pour mesurer les propriétés optiques *in vivo* de tissus biologiques à partir d'images de microscopie optique, comme la RCM et l'OCT. Nous détaillons l'état de l'art de ces méthodes dans la partie suivante.

A noter que d'autres techniques non purement optiques (telles que des techniques photo-acoustiques [28]) permettent la mesure de propriétés optiques, mais nous nous limitons dans le cadre de cette thèse aux techniques purement optiques.

## 3.2 . Méthodes de mesure des propriétés optiques en OCT et RCM

Plusieurs méthodes visant à mesurer les propriétés optiques à partir d'images OCT et d'images RCM ont été rapportées dans la littérature. Pour ce faire, plusieurs modèles ont été développés afin de relier l'intensité rétro-diffusée par l'échantillon et collectée par le système d'imagerie à ses propriétés optiques. Dans cette partie seront présentés les principaux modèles et techniques associées, regroupées en deux principales catégories : les méthodes de mesure basées sur une modélisation du signal OCT/RCM dans un régime de diffusion simple et les méthodes de mesure basées sur une modélisation tenant compte de la diffusion multiple.

### 3.2.1 . Méthodes basées sur un modèle de diffusion simple

Comme nous l'avons explicité dans les chapitres 1 et 2, la RCM et l'OCT sont des techniques d'imagerie optique basées sur une sélection des photons rétro-diffusés par un filtrage, soit confocal soit interférométrique. Pour commencer, nous allons établir le lien entre l'intensité collectée par un système de RCM et d'OCT et les propriétés optiques d'un échantillon.

Comme nous l'avons établi au chapitre 1, un faisceau incident qui traverse un milieu diffusant et absorbant voit son intensité diminuer au cours de sa propagation dans le milieu. Si le milieu est homogène, c'est-à-dire composé de  $N$  particules identiques chacune caractérisée par une même section efficace d'absorption et de diffusion, le milieu présente un coefficient d'absorption  $\mu_a$  et un coefficient de diffusion  $\mu_s$  homogènes et l'intensité incidente suit une loi de décroissance en  $e^{-(\mu_a+\mu_s)z}$  (expression établie dans la section 1.2.2 du chapitre 1). Dans ce chapitre, nous allons considérer le cas plus général d'un échantillon quelconque, potentiellement hétérogène, présentant un coefficient de diffusion  $\mu_s(x, y, z)$  et coefficient d'absorption  $\mu_a(x, y, z)$ .

Plaçons-nous dans le cas de la RCM : un faisceau d'intensité incidente  $I_0$  est focalisé en  $(x_0, y_0, z_0)$  dans l'échantillon par un objectif de microscope. Pour des raisons de simplicité, considérons pour le moment un faisceau paraxial. Lors de sa propagation dans l'échantillon, l'intensité  $I_0$  du faisceau incident décroît selon une loi de Beer-Lambert transposée au cas d'un échantillon quelconque : seule une fraction  $e^{-\int_0^{z_0} (\mu_a(x_0, y_0, u) + \mu_s(x_0, y_0, u)) du}$  de l'intensité  $I_0$  parvient à atteindre la profondeur de focalisation  $z_0$ . Au niveau du point de focalisation, une fraction notée  $\rho_0(x_0, y_0, z_0)$  de cette intensité est rétro-diffusée par les diffuseurs de l'échantillon dans une direction permettant la collection par le filtre confocal. Cette fraction  $\rho_0$  est une fonction des propriétés optiques de diffusion  $\mu_s$  et  $g$  : plus  $\mu_s$  est élevé et  $g$  faible, plus la part de photons rétro-diffusés est importante, est inversement. En pratique, elle dépend également des propriétés de collection du système : plus l'angle de collection est élevé, plus la fraction  $\rho_0$  de photons pouvant être collectée est importante. Sur le trajet retour, seule une fraction  $e^{-\int_0^{z_0} (\mu_a(x_0, y_0, u) + \mu_s(x_0, y_0, u)) du}$  de ces photons rétro-diffusés en  $z_0$  y parviendra sans être à

nouveau déviée de sa trajectoire par diffusion ou absorption. L'intensité collectée du point  $(x_0, y_0, z_0)$  de l'échantillon par le système de RCM peut alors s'écrire :

$$I_{RCM}(x_0, y_0, z_0) = \rho_0(x_0, y_0, z_0)I_0 e^{-2 \int_0^{z_0} (\mu_a(x_0, y_0, u) + \mu_s(x_0, y_0, u)) du} = R_{ech}(x_0, y_0, z_0)I_0 \quad (3.1)$$

Le facteur 2 traduit l'extinction de l'intensité par diffusion et absorption lors de l'aller-retour de la lumière dans l'échantillon. Le terme  $\rho_0(x_0, y_0, z_0)e^{-2 \int_0^{z_0} (\mu_a(x_0, y_0, u) + \mu_s(x_0, y_0, u)) du}$  peut être vu comme la fraction notée  $R_{ech}(x_0, y_0, z_0)$  de l'intensité incidente  $I_0$  rétro-diffusée par l'échantillon à la profondeur  $z_0$  et collectée par le système d'imagerie. En pratique, les photons rétro-diffusés collectés par le système de RCM proviennent d'un volume  $V$  centré en  $(x_0, y_0, z_0)$ , de dimensions définies par la résolution latérale et la résolution axiale du système :

$$I_{RCM}(x_0, y_0, z_0) = I_0 \iiint_V R_{ech}(x, y, z) dx dy dz \quad (3.2)$$

En pratique, on considérera que  $\iiint_V R_{ech}(x, y, z) dx dy dz$  peut être représenté par un  $R'_{ech}(x_0, y_0, z_0)$  représentant la fraction d'intensité rétro-diffusée par l'ensemble des diffuseurs contenus dans le volume  $V$ . De façon similaire, on peut définir un  $\rho(x_0, y_0, z_0)$  global pour décrire la fraction de photons rétro-diffusés au sein du volume  $V$  :

$$I_{RCM}(x_0, y_0, z_0) = \rho(x_0, y_0, z_0)I_0 e^{-2 \int_0^{z_0} (\mu_a(x_0, y_0, u) + \mu_s(x_0, y_0, u)) du} = R'_{ech}(x_0, y_0, z_0)I_0 \quad (3.3)$$

L'équation 3.3 met bien en lumière la dépendance de l'intensité collectée aux propriétés optiques  $\mu_s$  et  $\mu_a$  du tissu. Les propriétés optiques sont clairement la source de contraste des images de microscopie confocale.

En OCT, nous avons vu au chapitre 2 que l'expression du signal interférométrique peut s'écrire (équation 2.4) :

$$I_{int\ OCT}(x_0, y_0, z_0) = \frac{I_0}{2} \sqrt{R_{ref}} \iiint_{V_{OCT}} \sqrt{R_{ech}(x, y, z)} V_{coh}(\delta(z)) \cos(k\delta(z)) dx dy dz \quad (3.4)$$

avec  $R_{ech}(x, y, z)$  la fraction d'intensité rétro-diffusée au point  $(x, y, z)$  de l'échantillon et  $V_{OCT}$  le volume d'où proviennent les interférences, localisé en  $(x_0, y_0, z_0)$  dans l'échantillon. En translatant le plan de cohérence noté  $z_0$ , on obtient un signal interférométrique fonction de  $z_0$ . En le démodulant (par exemple via l'application d'un algorithme à décalage de phase présenté dans la section 2.3.3.1 du chapitre 2), on obtient un signal  $I_{demod\ OCT}(x_0, y_0, z_0)$  proportionnel à  $\iiint_{V_{OCT}} R_{ech}(x, y, z) :$

$$I_{demod\ OCT}(x_0, y_0, z_0) \propto \iiint_{V_{OCT}} R_{ech}(x, y, z) \quad (3.5)$$

$\iiint_{V_{OCT}} R_{ech}(x, y, z)$  représente la fraction d'intensité rétro-diffusée par l'ensemble des diffuseurs contenus dans le volume  $V_{OCT}$ . De façon analogue à ce qui a été établi plus haut, cette fraction  $\iiint_{V_{OCT}} R_{ech}(x, y, z)$  peut être représentée par un  $R'_{ech}(x_0, y_0, z_0)$  effectif représentant la fraction d'intensité rétro-diffusée par l'ensemble des diffuseurs contenus dans le volume  $V_{OCT}$  :  $R'_{ech}(x_0, y_0, z_0) = \rho(x_0, y_0, z_0)e^{-2 \int_0^{z_0} (\mu_a(x_0, y_0, u) + \mu_s(x_0, y_0, u)) du}$ . Ainsi, le signal collecté en OCT s'écrit :

$$I_{demod\ OCT}(x_0, y_0, z_0) \propto \rho(x_0, y_0, z_0) e^{-2 \int_0^{z_0} (\mu_a(x_0, y_0, u) + \mu_s(x_0, y_0, u)) du} \quad (3.6)$$

On obtient une équation similaire à l'équation 3.3 obtenue pour la RCM.

Dans la suite, on notera  $I(x, y, z)$  l'intensité rétro-diffusée, collectée depuis le point  $(x, y, z)$  d'un échantillon par l'une ou l'autre des deux modalités et on considérera qu'elle s'écrit de façon identique sous la forme suivante :

$$I(x, y, z) = \rho(x, y, z)I_0e^{-2\int_0^z(\mu_a(x,y,u)+\mu_s(x,y,u))du} = R'_{ech}(x, y, z)I_0 \quad (3.7)$$

Avec toujours  $I_0$  l'intensité incidente. Cette modélisation de l'intensité en RCM et en OCT néglige la contribution des photons multi-diffusés. Pour que cette modélisation soit valide, il faut donc se trouver dans un régime de diffusion simple, où la plupart des photons incidents sont balistiques ou ont subi un événement de diffusion. Ce régime est valide tant que  $\mu_s z \leq 1$ , et s'applique donc à des échantillons présentant des coefficients de diffusion faibles et/ou à des profondeurs d'imagerie faibles. A partir de cette expression de l'intensité rétro-diffusée, deux méthodes ont été proposées dans la littérature afin de mesurer le coefficient d'extinction  $\mu_e = \mu_a + \mu_s$ , aussi couramment appelé coefficient d'atténuation dans le monde de l'OCT.

### 3.2.1.1 . Méthode dite de « curve-fitting »

Une première approche suppose que l'échantillon imagé présente des propriétés optiques homogènes à l'échelle du champ imagé. En faisant cette hypothèse, l'expression de l'intensité rétro-diffusée (équation 3.7) peut se simplifier en une intensité  $I(z)$  indépendante de  $(x, y)$  :

$$I(z) = \rho I_0 e^{-2(\mu_a + \mu_s)z} = \rho I_0 e^{-2\mu_e z} \quad (3.8)$$

La méthode consiste alors simplement à extraire cette intensité  $I(z)$  d'une image 2D verticale ou d'une image 3D puis à ajuster une courbe de décroissance exponentielle sur  $I(z)$  pour en mesurer le paramètre  $\mu_e = \mu_s + \mu_a$ . De façon équivalente, le coefficient d'atténuation  $\mu_e$  peut être extrait en appliquant une régression linéaire sur le logarithme népérien de  $I(z)$  en mesurant la pente de décroissance de  $\ln I(z)$  :

$$\ln I(z) = \ln \rho I_0 - 2\mu_e z \quad (3.9)$$

Afin que l'hypothèse d'homogénéité soit vérifiée, il est courant d'utiliser un profil  $I(z)$  moyen, résultant du moyennage de l'intensité dans une région d'intérêt ou au sein de toute l'image, tel qu'illustré dans les figures 3.5a,b). Cela permet de lisser le profil  $I(z)$  si l'échantillon n'est pas bien homogène, et d'en mesurer alors un coefficient  $\mu_e$  moyen.

Lorsque le tissu est structuré selon plusieurs couches homogènes superposées en  $z$ , il est également possible d'appliquer cette méthode séparément sur chaque couche. Cela a été réalisé en OCT en dermatologie [124, 32] afin de mesurer le coefficient d'atténuation dans chacune des principales couches de la peau, à savoir l'épiderme, le derme papillaire superficiel, le derme papillaire profond et le derme réticulaire superficiel, tel qu'illustré dans les figures 3.5c,d). Cela nécessite une segmentation préalable des différentes couches de tissus.

De par sa facilité de mise en œuvre, cette méthode, qualifiée dans la littérature de « curve-fitting method », est très répandue dans la littérature et apparaît comme le « gold standard » pour la mesure du coefficient d'atténuation de tissus biologiques. Cette technique a par exemple été appliquée en OCT à la caractérisation de plaques d'athérosclérose dans les artères coronaires [125], à la détection du

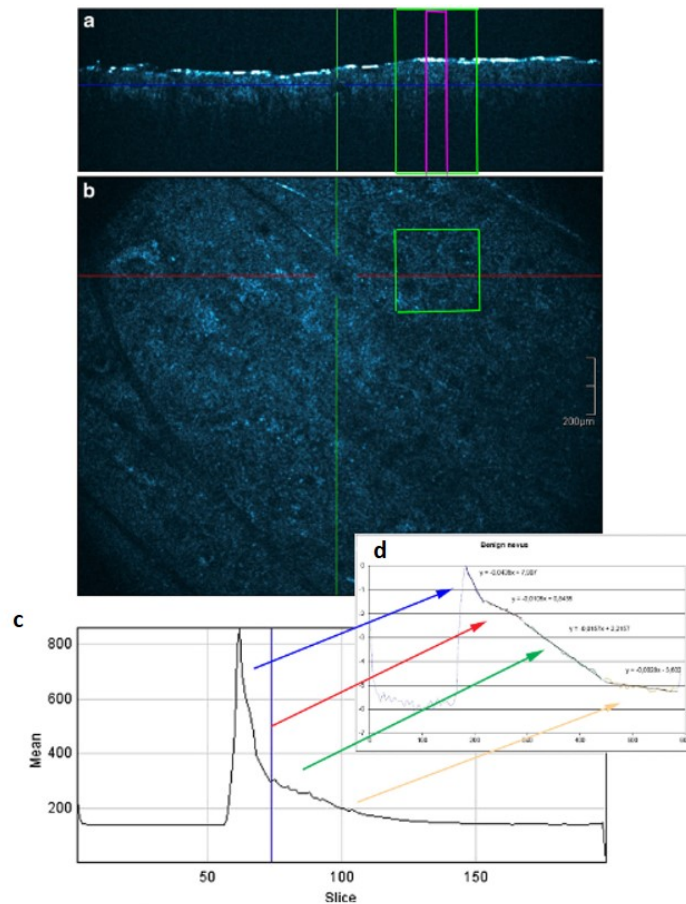


Figure 3.5 – Illustration du principe de la méthode « curve-fitting » pour la mesure du coefficient d'atténuation  $\mu_e$ . a, b) Image OCT 3D (vues orthogonales) d'une lésion de peau bénigne. Une région d'intérêt est sélectionnée dans l'image horizontale (carré vert). Le profil axial d'intensité moyen dans cette région d'intérêt est extrait et donné en c). En appliquant un logarithme népérien au profil en c), on obtient un profil, illustré en d), présentant des zones de décroissances linéaires, correspondant chacune à une couche de peau (épiderme, derme papillaire superficiel, derme papillaire profond et derme réticulaire superficiel). En appliquant une régression linéaire sur chaque zone de décroissance linéaire, le coefficient d'atténuation  $\mu_e$  peut être extrait pour chaque couche. Figure extraite et adaptée de [32].

cancer du cerveau [126], au diagnostic du carcinome urothélial [127]. En dermatologie, cette méthode a été appliquée *in vivo* à la caractérisation du carcinome basocellulaire et la différenciation de ses sous-types [124] ainsi qu'à la caractérisation de lésions mélanocytaires bénignes et malignes [32]. Les auteurs ont pu mettre en évidence des différences de coefficient d'atténuation entre les différents sous-types de carcinome basocellulaire, mais également entre les différentes lésions mélanocytaires. Les conclusions de leurs études suggèrent que la mesure du coefficient d'atténuation, en combinaison avec l'image morphologique, permet une meilleure caractérisation et un meilleur diagnostic des lésions cutanées que le diagnostic par l'image seule.

Ce modèle de diffusion simple reste néanmoins assez simpliste puisqu'il considère que la lumière se propage de façon paraxiale et néglige ainsi l'effet de l'ouverture numérique de l'objectif de microscope utilisé. Cela peut être problématique dans le cas de la RCM qui travaille avec des objectifs de haute ouverture numérique. Concernant son utilisation en OCT, ce modèle néglige également le fait que l'OCT conventionnel image les tissus à différentes profondeurs tout en ayant une focalisation fixe en profondeur (à la différence de l'OCT avec focalisation dynamique). Dans le cas d'un système d'OCT conventionnel tel que celui présenté à la figure 2.2 du chapitre 2, un filtrage confocal, même faible (en tout cas par rapport le filtrage interférométrique), est effectué par la fibre de collection du fait de la focalisation à une profondeur fixe. Dès lors, l'intensité collectée ne subit pas une décroissance exponentielle régie uniquement par le coefficient  $\mu_e$  mais elle est impactée par une fonction dite confocale décrivant la variation de l'intensité collectée avec la profondeur en raison du filtrage confocal [128]. Dans le cas particulier de l'OCT en domaine fréquentiel, le modèle de diffusion simple néglige l'effet de la variation de sensibilité avec la profondeur, due à la résolution limitée du spectromètre utilisé, tel qu'expliqué en annexe B. Des améliorations du modèle de diffusion simple de l'équation 3.7 ont été proposées dans la littérature afin de prendre en compte les hautes ouvertures numériques, l'effet de la focalisation fixe et de la perte de sensibilité en profondeur [129, 130, 131].

### 3.2.1.2 . Méthode résolue en profondeur

En 2014, Vermeer *et al.* [33] ont introduit une méthode permettant d'accéder à une mesure résolue en profondeur du coefficient d'atténuation  $\mu_e$ . Cette nouvelle approche a pour objectif de permettre la mesure du coefficient d'atténuation de tissus hétérogènes, ce que ne permet pas la méthode « curve-fitting ». Pour ce faire, la méthode repose sur deux hypothèses : premièrement, l'intensité incidente est totalement atténuée sur la plage de profondeurs imagée ; deuxièmement, l'intensité rétro-diffusée est un pourcentage fixe de l'intensité atténuée.

L'approche proposée par Vermeer *et al.* est fondée sur la modélisation en diffusion simple de l'intensité  $I(z)$  collectée par le système d'imagerie pour un échantillon hétérogène. Comme nous l'avons précédemment introduit (équation 3.7), l'intensité  $I(x, y, z)$  collectée dans le cas d'un échantillon hétérogène s'écrit :

$$I(x, y, z) = \rho(x, y, z)I_0 e^{-2 \int_0^z \mu_e(x, y, u) du} \quad (3.10)$$

Dans le modèle de Vermeer, les auteurs considèrent individuellement chaque profil axial de l'image (OCT ou RCM). Pour le cas d'une image 3D, on notera  $I(x_0, y_0, z)$  un profil axial donné dans l'image, associé à une position latérale  $(x_0, y_0)$  dans l'échantillon (cela s'applique de façon identique pour une image 2D) :

$$I(x_0, y_0, z) = \rho(x_0, y_0, z)I_0 e^{-2 \int_0^z \mu_e(x_0, y_0, u) du} \quad (3.11)$$

En supposant que l'intensité rétro-diffusée est un pourcentage fixe noté  $\alpha$  de l'intensité atténuée, il vient :

$$I(x_0, y_0, z) = \alpha \mu_e(x_0, y_0, z) I_0 e^{-2 \int_0^z \mu_e(x_0, y_0, u) du} \quad (3.12)$$

En intégrant  $I(x_0, y_0, z)$  :

$$\begin{aligned} \int I(x_0, y_0, z) dz &= \alpha I_0 \int \mu_e(x_0, y_0, z) e^{-2 \int_0^z \mu_e(x_0, y_0, u) du} dz \\ &= -\frac{\alpha I_0}{2} e^{-2 \int_0^z \mu_e(x_0, y_0, u) du} + C \\ &= -\frac{I(x_0, y_0, z)}{2\mu_e(x_0, y_0, z)} + C \end{aligned} \quad (3.13)$$

En supposant que l'intensité incidente est totalement atténuée sur la plage de profondeurs imagée, on peut définir la condition aux limites  $I(\infty) = 0$  et on obtient :

$$\int_z^\infty I(x_0, y_0, u) du = - \int_z^\infty \left( \frac{I(u)}{2\mu_e(x_0, y_0, u)} + C \right) du = \frac{I(x_0, y_0, z)}{2\mu_e(x_0, y_0, z)} \quad (3.14)$$

De cette équation en découle une expression du coefficient d'atténuation  $\mu_e(x_0, y_0, z)$  en fonction de la profondeur  $z$  :

$$\mu_e(x_0, y_0, z) = \frac{I(x_0, y_0, z)}{2 \int_z^\infty I(x_0, y_0, u) du} \approx \frac{I(x_0, y_0, z)}{2 \int_z^D I(x_0, y_0, u) du} \quad (3.15)$$

Avec  $D$  la profondeur maximale d'imagerie. Cette expression peut être discrétisée pour obtenir une expression du coefficient d'atténuation  $\mu_e(x_0, y_0, z)$  pour chaque pixel en  $z$  du profil d'intensité [33] :

$$\mu_e(x_0, y_0, z) \approx \frac{I(x_0, y_0, z)}{2\Delta \sum_{z+1}^D I(x_0, y_0, z)} \quad (3.16)$$

avec  $\Delta$  la taille du pixel. On obtient alors un profil résolu en profondeur du coefficient  $\mu_e$  en  $(x_0, y_0)$ . En appliquant cette approche à l'ensemble des profils d'intensité  $I(x, y, z)$  d'une image OCT, la méthode de Vermeer *et al.* permet de générer une cartographie du coefficient d'atténuation  $\mu_e(x, y, z)$  avec la même résolution que l'image OCT initiale. Cette approche est facile à mettre en œuvre et a connu un rapide essor dans la communauté scientifique. Divers tissus biologiques ont été caractérisés à l'aide de cette approche, incluant la rétine [33, 132], les tissus des voies respiratoires [133] et les artères coronariennes [134]. En dermatologie, quelques travaux préliminaires ont été proposés par Real *et al.* [135]. Les auteurs ont appliqué la méthode développée par Vermeer à des images 3D d'OCT d'un cas de carcinome basocellulaire et d'un cas de mélanome, afin d'obtenir des cartographies 3D du coefficient d'atténuation dans ces lésions. Les cartographies obtenues montrent des différences par rapport à la peau saine ainsi qu'entre les lésions mais ces travaux sont démonstratifs et restent limités à deux cas cliniques. Les auteurs ne se sont pas intéressés à la validité des hypothèses du modèle de Vermeer pour l'application à la peau, un point qui pourtant peut être limitant pour l'application du modèle à des tissus hétérogènes comme la peau. Cet aspect sera rediscuté plus tard dans ce chapitre.

Puisqu'elle fournit une cartographie du coefficient d'atténuation, la méthode de Vermeer a également été utilisée comme outil de segmentation de différentes couches de tissus [136]. De plus, les

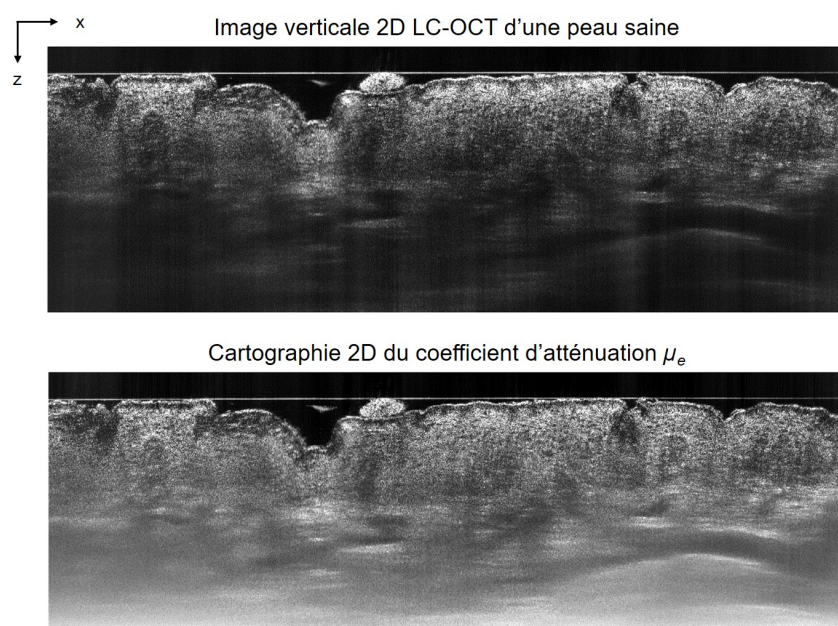


Figure 3.6 – Application de la méthode de mesure du coefficient d'atténuation  $\mu_e$  résolue en profondeur proposée par Vermeer *et al.* [33] à une image LC-OCT verticale de la peau saine. L'image verticale de LC-OCT montre une diminution de l'intensité avec la profondeur dans la peau, en raison de l'atténuation de l'intensité incidente. L'application de la méthode de Vermeer à chaque profil axial de l'image (*i.e.* colonne de l'image) permet d'obtenir une cartographie 2D du coefficient d'atténuation  $\mu_e(x, z)$ . Cette cartographie correspond à une image de même résolution spatiale que l'image LC-OCT originale, corrigée de l'atténuation de l'intensité en profondeur.



images de coefficient d'atténuation permettent de rehausser le signal en profondeur et de corriger les ombres parfois présentes dans une image OCT conventionnelle. En effet, dans le cas d'un échantillon contenant des structures très diffusantes ou absorbantes, l'intensité rétro-diffusée par les tissus situés en dessous de ces structures peut être considérablement réduite, en raison de la forte atténuation de l'intensité balistique par diffusion et absorption dans les structures supérieures. En résultent alors des ombres dans les images OCT. Puisque les images de coefficient d'atténuation reflètent en chaque pixel un coefficient propre au tissu imagé par ce pixel et non une intensité atténuée par les tissus traversés auparavant, les images de coefficient d'atténuation sont corrigées de la perte de signal avec la profondeur et des ombres. La méthode de Vermeer a ainsi également débouché sur des applications en traitement d'images pour rehausser le signal en profondeur d'une image OCT [137]. Au cours de cette thèse, nous avons fait quelques tests de la méthode de Vermeer pour cette application de rehaussement de contraste. Une illustration de l'application de cette méthode aux images de LC-OCT est donnée à la figure 3.6. Comme on le voit dans l'image verticale LC-OCT, le derme en bas de l'image apparaît plus sombre que la surface de la peau en raison de l'atténuation de l'intensité incidente avec la profondeur. En appliquant la méthode de Vermeer à chaque profil axial de l'image (au sens de chaque colonne de l'image verticale), on obtient une cartographie 2D du coefficient d'atténuation  $\mu_e(x, z)$ . Cette cartographie fournit une image, présentant la même résolution spatiale que l'image LC-OCT originale et corrigée de l'atténuation de l'intensité avec la profondeur.

Tout comme pour la précédente méthode dite de « curve-fitting », la méthode de Vermeer a connu des améliorations visant à prendre en compte la fonction confocale et la perte de sensibilité [138, 139]. D'autres travaux ont proposé des solutions pour s'affranchir des hypothèses sur lesquelles repose l'approche résolue en  $z$ , notamment de la première hypothèse stipulant que l'intensité incidente est totalement atténuée sur la plage de profondeurs imagée [140, 141, 142].

Concernant la seconde hypothèse selon laquelle l'intensité rétro-diffusée est un pourcentage fixe de l'intensité atténuée, de récents travaux ont été effectués par Cannon *et al.* [117]. Les auteurs ont proposé une méthode permettant, pour des tissus biologiques organisés en couches homogènes, d'extraire la valeur du paramètre  $\rho$  pour chaque couche et de générer des images de  $\mu_e$  prenant en compte les différentes valeurs de  $\rho$  dans chaque couche, et ainsi s'affranchir de l'hypothèse selon laquelle  $\rho$  est une fraction  $\alpha$  fixe de  $\mu_e$ . Cette méthode repose néanmoins sur une combinaison des méthodes de Vermeer et de « curve-fitting ». En réalité, il est difficile d'accéder à une mesure résolue en  $z$  au pixel près des deux paramètres  $\rho$  et  $\mu_e$ , puisque l'image (OCT ou RCM) nous fournit une unique équation (équation 3.11), dont nous cherchons à extraire ces deux paramètres inconnus. Comme nous allons le voir dans la suite, seuls des modèles basés sur des méthodes de « curve-fitting » permettent l'accès aux deux paramètres  $\rho$  et  $\mu_e$  et par la suite aux deux propriétés optiques  $\mu_s$  et  $g$ .



### 3.2.2 . Méthodes basées sur un modèle de diffusion multiple

Dans la section précédente, nous avons vu deux méthodes, basées sur des modèles de diffusion simple, permettant de mesurer le coefficient d'atténuation  $\mu_e$ . Dans les milieux très diffusants et/ou présentant une forte anisotropie de diffusion (facteur d'anisotropie  $g$  élevé), il est possible que certains photons multiplement diffusés ou serpentiles soient collectés par le système d'imagerie.

En RCM, le filtrage confocal permet de s'affranchir de la majorité des photons multiplement diffusés ayant une direction aléatoire. Cependant le filtrage confocal permet plus difficilement de s'affranchir des photons serpentiles. En effet, lorsque la diffusion est principalement dirigée vers l'avant ( $g$  élevé), un certain nombre de photons suivront une trajectoire serpentile très proche de celles des photons balistiques. Pour une profondeur  $z$  sondée par le microscope confocal, ces photons serpentiles peuvent, tout comme les photons balistiques, être rétro-diffusés en direction du microscope et ainsi contribuer à la fraction d'intensité balistique rétro-diffusée à la profondeur  $z$ . De même lors du trajet retour, des photons serpentiles peuvent suivre un trajet très similaire aux photons n'ayant subi qu'une rétro-diffusion en  $z$ , et ainsi passer au travers du diaphragme.

En OCT, la contribution de la diffusion multiple peut venir de la collection là aussi de photons serpentiles, difficilement discernables des photons balistiques. Mais il peut également s'agir de photons multiplement diffusés tel qu'introduit au chapitre 2 : certains photons multiplement diffusés, bien qu'ayant suivi un chemin optique très différent des photons balistiques, peuvent avoir un chemin optique de même longueur que celui des photons du bras de référence et ainsi contribuer aux interférences. Contrairement aux photons serpentiles, ces photons contribuent à brouiller l'image en raison de leur chemin optique incertain et leur contribution à l'intensité détectée est d'autant plus importante que la profondeur d'imagerie est élevée.

Compte tenu des coefficients d'atténuation de la peau de l'ordre de 5 à une vingtaine de  $\text{mm}^{-1}$  dans le rouge et proche infrarouge [76, 77], et des profondeurs d'imagerie de la LC-OCT allant jusqu'à 400-500  $\mu\text{m}$ , il est pertinent de s'intéresser aux modèles prenant en compte la diffusion multiple. Dans la littérature, deux principaux modèles ont été proposés, avec une approche théorique et une complexité d'implémentation différentes.

#### 3.2.2.1 . Méthode développée par S. Jacques *et al.*

Il y a une dizaine d'années, le groupe de S. Jacques [34] a proposé un modèle, conçu pour l'OCT avec focalisation dynamique et la RCM, reliant l'intensité  $I(z)$  le long d'un profil axial d'intensité aux propriétés optiques de diffusion de l'échantillon imagé, à savoir le coefficient de diffusion  $\mu_s$  et le facteur d'anisotropie de diffusion  $g$ . Ce modèle a été développé à partir de simulations de Monte-Carlo. Les simulations de Monte-Carlo sont une technique mathématique utilisant un échantillonnage aléatoire répété pour simuler un modèle mathématique donné et obtenir une évaluation statistique de ce modèle. Les simulations de Monte-Carlo sont utilisées dans de nombreux domaines incluant par exemple la finance ou l'ingénierie. Dans le cas présent, les simulations de Monte-Carlo ont été utilisées par Jacques *et al.* pour modéliser la propagation de la lumière dans les tissus dans le cas d'un système d'imagerie RCM ou OCT avec focalisation dynamique et estimer l'intensité  $I(z)$  rétro-diffusée collectée par le système en fonction des propriétés optiques du milieu simulé. Dans ces simulations, la lumière incidente est représentée sous forme de paquets de photons émis par une source. La propagation des paquets de photons dans les tissus est décrite sous la forme d'une marche aléatoire,

régie par des densités de probabilité décrivant le départ de chaque photon (liée à la distribution spatiale de la source, la géométrie du faisceau et du système) et des densités de probabilité représentant la probabilité d'interaction de chaque photon avec le milieu (absorption et diffusion, liées aux coefficients d'absorption  $\mu_a$  et de diffusion  $\mu_s$  du milieu) et la probabilité de diffusion du photon dans une direction donnée (liée au facteur d'anisotropie  $g$ ). En se basant sur les résultats de ces simulations, les auteurs ont construit un modèle analytique reliant les propriétés optiques du milieu et l'intensité  $I(z)$  collectée [143, 34].

Ce modèle part de l'expression  $I(z)$  de l'intensité rétro-diffusée collectée par le système d'imagerie du modèle de diffusion simple et appliqué au cas d'un échantillon homogène (équation 3.8), à savoir :

$$I(z) = \rho I_0 e^{-2\mu_{eff} z} \quad (3.17)$$

A l'exception que le coefficient d'atténuation est remplacé par un coefficient d'atténuation « effectif »  $\mu_{eff}$  qui diffère légèrement de  $\mu_e$  comme nous allons l'expliquer dans la suite.

Dans ce modèle, les paramètres  $\rho$  et  $\mu_{eff}$  sont reliés aux propriétés optiques  $\mu_a$ ,  $\mu_s$  et  $g$  par les relations suivantes [34] :

$$\begin{cases} \mu_{eff} &= G(g, ON)(\mu_a + a(g)\mu_s) \\ \rho &= \mu_s \Delta z b(g, ON) \end{cases} \quad (3.18)$$

Où  $\Delta z$  est la résolution axiale du système d'imagerie. A noter que les auteurs du modèle mentionnent qu'un facteur correctif sur  $\Delta z$  peut être nécessaire, par exemple pour tenir compte d'une différence éventuelle entre la résolution axiale théorique du système et la résolution axiale effective [144].  $G(g, ON)$ ,  $a(g)$  et  $b(g, ON)$  sont des paramètres du modèle que nous allons détailler dans les paragraphes suivants.

Tout d'abord, le terme  $G(g, ON)$  est un terme qui décrit la longueur de chemin optique moyen parcouru par les photons collectés par le système d'imagerie, en tenant compte de l'ouverture numérique ON et du facteur d'anisotropie de diffusion  $g$  du milieu imagé. Ce terme permet de prendre en compte le fait que les photons émis en bord de faisceau parcourent un chemin optique plus long que les photons émis sur l'axe optique.  $G$  est déterminé à partir des simulations de Monte-Carlo et dépend en réalité peu de  $g$ . L'évolution de  $G(ON)$  avec l'ON est donné à la figure 3.7, pour un objectif à immersion à eau et un milieu d'indice optique  $n$  égal à 1.4 (celui de la peau). Pour des petites ouvertures numériques, son expression peut être approximée par :

$$G(ON) = \frac{1}{\sqrt{1 - \left(\frac{ON}{n}\right)^2}} \quad (3.19)$$

Le terme  $a(g)$  appelé facteur d'efficacité de diffusion, est un paramètre traduisant la contribution des photons multiples diffusés vers l'avant, *i.e.*, des photons serpentiles. Pour une profondeur  $z$  donnée, les photons serpentiles peuvent contribuer à l'intensité rétro-diffusée en  $z$  du fait de leur trajet similaire aux photons balistiques. Puis, ils peuvent, s'ils suivent une trajectoire également serpentile sur le trajet retour, participer à la formation de l'image. De ce fait, les photons serpentiles ralentissent l'extinction de l'intensité incidente par diffusion dans le milieu de propagation. Cet effet a été formalisé sous la forme d'une fonction  $a(g)$  approximée à partir des simulations de Monte-Carlo :

$$a(g) \approx u(1 - e^{-(1-g)^v/w}) \quad (3.20)$$

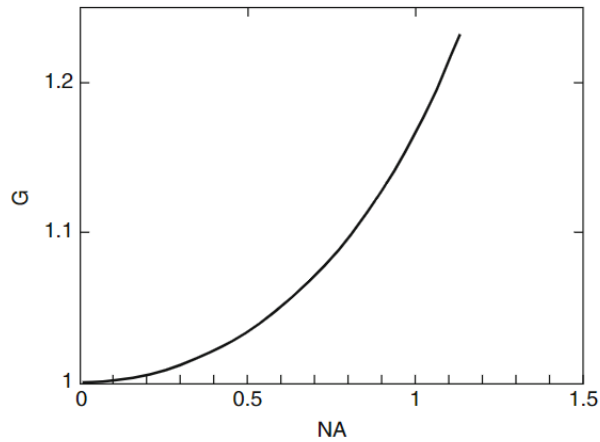


Figure 3.7 - Evolution du facteur  $G$  avec l'ouverture numérique (NA) du système d'imagerie, dans le cas d'un objectif à immersion eau et d'un milieu de propagation d'indice optique 1.4. Figure extraite et adaptée de [34].

avec  $u$ ,  $v$ , et  $w$  des paramètres déterminés par simulations de Monte-Carlo [145, 34]. Une illustration de l'évolution  $a(g)$  est donnée à la figure 3.8. Lorsque le facteur d'anisotropie  $g$  est relativement faible (jusqu'à  $g = 0.6$ ),  $a(g) \approx 1$  et dans ce cas, on retrouve le modèle de diffusion simple où  $\mu_{eff} = \mu_e$  (en supposant  $G = 1$ ). Lorsque  $g$  tend vers 1, la diffusion multiple vers l'avant (serpentile) limite l'extinction de l'intensité incidente par diffusion, menant à un coefficient d'atténuation  $\mu_{eff} < \mu_e = \mu_s + \mu_a$ . Les auteurs du modèle ont montré que cette modélisation de la contribution des photons serpentiles est valable tant que  $\mu_s z \leq 3$  [6]. A noter qu'elle ne prend pas en compte la diffusion multiple non serpentile, c'est-à-dire les photons multiples diffusés selon un chemin optique non balistique.

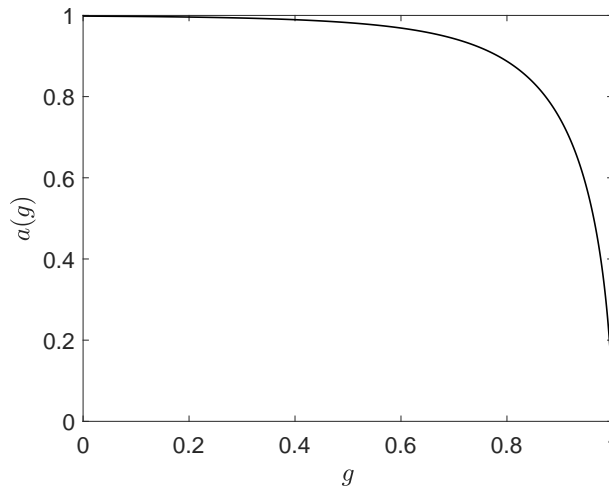


Figure 3.8 - Evolution du facteur d'efficacité de diffusion  $a(g)$  avec le facteur d'anisotropie  $g$  du milieu de propagation.

La fraction  $\rho$  de l'intensité rétro-diffusée par le milieu est régie par le coefficient de diffusion  $\mu_s$ , la résolution axiale  $\Delta z$  et un facteur  $b(g, ON)$ . Pour une profondeur  $z$  sondée par le système d'imagerie, le produit  $\mu_s \Delta z$  représente la fraction de l'intensité ayant atteint la profondeur  $z$  qui est diffusée dans

le volume sondé par le système, d'extension axiale donnée par la résolution  $\Delta z$  du système.  $b(g, ON)$  représente alors la fraction de cette lumière diffusée dans le volume sondé qui est rétro-diffusée dans l'angle solide de collection du système.  $b(g, ON)$  est qualifiée d'efficacité de collection de la diffusion et est décrite par l'expression suivante :

$$b(g, ON) = \int_{\pi}^{\pi - \arcsin(ON/n_{milieu})} p(\theta) 2\pi \sin \theta d\theta \quad (3.21)$$

Dans le modèle de Jacques, la fonction de phase  $p(\theta)$  est décrite par la fonction de Henyey-Greenstein donnée précédemment dans l'équation 1.11. L'évolution de  $b(g, ON)$  avec  $g$  et  $ON$  est donnée à la figure 3.9.  $b(g, ON)$  augmente avec l'ouverture numérique  $ON$  (autrement dit avec l'angle de collection), et diminue avec le facteur d'anisotropie  $g$ . En effet, lorsque  $g$  augmente, la diffusion tend à être majoritairement dirigée vers l'avant, réduisant ainsi la fraction d'intensité rétro-diffusée (*i.e.*, diffusée vers l'arrière pour rappel).

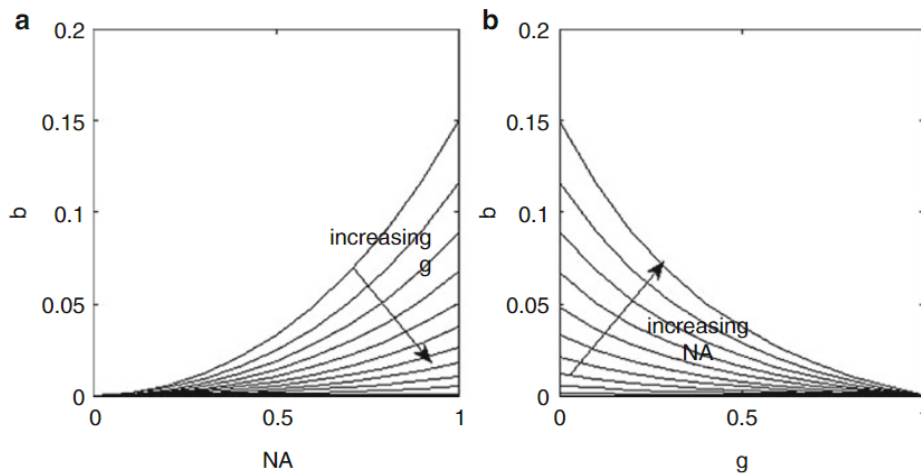


Figure 3.9 - a) Evolution de l'efficacité de collection de la diffusion  $b(g, ON)$  avec l'ouverture numérique ( $NA$ ) du système d'imagerie pour différentes valeurs du facteur d'anisotropie  $g = [0 : 0.1 : 0.90.99]$  du milieu de propagation. b) Evolution de l'efficacité de collection de la diffusion  $b(g, ON)$  avec le facteur d'anisotropie  $g$  du milieu de propagation, pour différentes valeurs de l'ouverture numérique ( $NA = [0 : 0.1 : 1]$ ). Figure extraite de [34].

Basée sur ce modèle, l'extraction des propriétés optiques à partir d'une image OCT ou RCM est simple de mise en œuvre. La première étape consiste à extraire les paramètres  $\rho$  et  $\mu_{eff}$  de l'intensité  $I(z)$  collectée le long d'un profil axial d'intensité, par l'application d'une régression linéaire sur  $\ln I(z)$ , tel qu'expliqué dans la section 3.2.1.  $\mu_{eff}$  est obtenu en mesurant la pente de décroissance de  $\ln I(z)$  et  $\rho$  est obtenu en mesurant l'ordonnée à l'origine  $\ln \rho I_0$ , c'est-à-dire pour la profondeur  $z = 0$  représentant la surface de l'échantillon. Pour obtenir la valeur de  $\rho$ , une calibration préalable est nécessaire pour déterminer  $I_0$ . Cette calibration peut être réalisée de différentes manières, par exemple en imageant une interface entre deux milieux d'indices optiques connus ou bien un fantôme aux propriétés optiques connues. Nous reviendrons par la suite sur cette étape de calibration.

Dans le cadre de l'application à des tissus biologiques présentant un coefficient d'absorption  $\mu_a$

négligeable devant le coefficient de diffusion  $\mu_s$ , le système d'équations 3.18 se simplifie :

$$\begin{cases} \mu_{e\,eff} &= G(g, ON)a(g)\mu_s \\ \rho &= \mu_s \Delta z b(g, ON) \end{cases} \quad (3.22)$$

A partir de ce système d'équations, il est possible de générer une grille représentant les valeurs de  $\mu_{e\,eff}$  et  $\rho$  correspondant à différentes valeurs de  $\mu_s$  et  $g$ , dont un exemple est donné à la figure 3.10. Inversement, il est possible de remonter aux propriétés optiques  $\mu_s$  et  $g$  à partir des valeurs expérimentales de  $\mu_{e\,eff}$  et  $\rho$  en utilisant cette même grille.

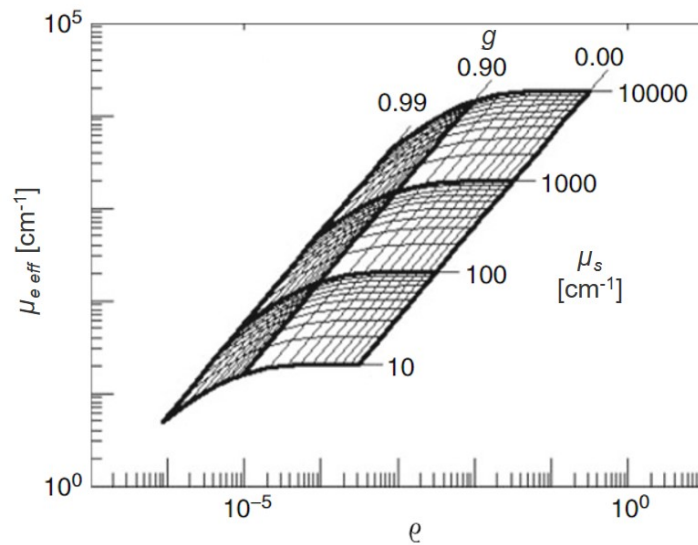


Figure 3.10 – Exemple de grille générée par le modèle de Jacques *et al.*, reliant les valeurs de  $\mu_s$  et  $g$  aux valeurs de  $\mu_{e\,eff}$  et  $\rho$ . Grille générée pour une longueur d'onde  $\lambda = 800$  nm, une ouverture numérique de 0.9 et  $n_{milieu} = 1.4$ . Figure extraite et adaptée de [34].

La méthode développée par Jacques est d'une simplicité d'implémentation comparable à celle du modèle de diffusion simple, sous couvert d'une étape de calibration préalable pour obtenir  $\rho$ . Il permet d'extraire les deux propriétés de diffusion d'un échantillon que sont le coefficient de diffusion  $\mu_s$  et le facteur d'anisotropie  $g$ . Contrairement aux paramètres  $\rho$  et  $\mu_{e\,eff}$  qui, comme on peut le voir au travers du système d'équations 3.18, dépendent des spécifications optiques du système d'imagerie utilisé (l'ouverture numérique ON, la résolution axiale  $\Delta z$ ), les propriétés optiques  $\mu_s$  et  $g$  sont propres à l'échantillon imagé et ne dépendent pas du système d'imagerie. Comme nous l'avons explicité dans la section 1.2, ces propriétés optiques sont des grandeurs physiques absolues qui reflètent la structure et l'organisation des diffuseurs de l'échantillon, comme les fibres de kératine, les organelles des kératinocytes, les fibres de collagène dans le cas de la peau. Chaque paramètre fournit des informations différentes et complémentaires sur la structure des tissus, puisque  $g$  fournit principalement des informations sur la taille des diffuseurs, tandis que  $\mu_s$  dépend également de leur densité. Ce modèle a été validé sur des fantômes aux propriétés optiques connues [6], puis appliqué à la caractérisation des propriétés optiques de divers tissus biologiques, notamment chez la souris le cerveau, la peau, le foie et les muscles [145], mais également le crâne d'oiseau [146] et la rétine

humaine [144]. Tout comme la méthode « curve-fitting », ce modèle peut être appliqué par couches de tissus en appliquant une régression linéaire sur chaque couche, comme cela a été fait sur la rétine [144].

### 3.2.2.2 . Méthode basée sur le principe EHF (« Extended Huygens–Fresnel principe »)

Un autre modèle de diffusion multiple en OCT a été originellement proposé par Thrane *et al.* [35] et plus récemment repris par Almasian *et al.* [147]. Ce modèle est basé sur le principe de Huygens-Fresnel étendu (« Extended Huygens–Fresnel principle » en anglais). Le principe de Huygens-Fresnel, dans les grandes lignes, décrit la propagation d'une onde lumineuse de proche en proche, sous la forme d'une superposition d'ondelettes : lorsqu'une source ponctuelle émet une onde primaire, chaque point du front d'onde peut être vu comme la source d'une onde sphérique secondaire. Ces ondes sphériques secondaires interfèrent et l'amplitude de l'onde en tout point du milieu de propagation est vue comme la somme des amplitudes des multiples ondes sphériques atteignant de point. Ce principe permet par exemple de décrire le phénomène de diffraction et le phénomène de réfraction à l'interface entre deux milieux homogènes d'indice optiques différents. En 1970, ce principe a été étendu par Lutomirski et Yura [148] au cas de la propagation dans un milieu hétérogène, présentant des variations spatiales aléatoires de l'indice optique. En 2004, Thrane *et al.* exploitent ce principe pour proposer une modélisation de l'intensité  $I(z)$  collectée en OCT le long d'un profil axial, pour un échantillon aux propriétés optiques homogènes. Une description détaillée du modèle peut être trouvée dans [35]. L'intensité  $I(z)$  en l'absence d'absorption est décrite par la somme de trois termes :

$$\begin{aligned}
 I(z) \propto I_0 [ & e^{-2\mu_s z} \\
 & + \frac{2e^{-\mu_s z}(1 - e^{-\mu_s z})}{1 + w_S^2(z)/w_H^2(z)} \\
 & + (1 - e^{-\mu_s z})^2 \frac{w_S^2(z)}{w_H^2(z)} ]
 \end{aligned} \tag{3.23}$$

$w_H(z)$  est le rayon du faisceau à la profondeur  $z$  en l'absence de diffusion vers l'avant et  $w_S(z)$  son rayon en présence de diffusion multiple dirigée vers l'avant. Une simulation du profil d'intensité  $I(z)$  calculé avec l'équation 3.23 est donné à la figure 3.11, pour  $\mu_s = 15 \text{ mm}^{-1}$  et  $g = 0.8$ . Le premier terme de l'équation 3.23 reflète la contribution de la diffusion simple. Comme discuté précédemment, ce terme suit une loi de décroissance linéaire (en échelle logarithmique) illustré par la courbe bleue de la figure 3.11. Le second terme reflète la contribution de la diffusion multiple (courbe jaune de la figure 3.11), qui s'additionne à la diffusion simple. Plus la profondeur d'imagerie augmente, plus la contribution de la diffusion multiple devient importante par rapport à la contribution de la diffusion simple. Le dernier terme, représenté par la courbe orange (figure 3.11) correspond quant à lui à un terme transversal. Du fait de la contribution de la diffusion multiple, l'intensité totale  $I(z)$  en échelle logarithmique (courbe violette de la figure 3.11) ne suit pas une loi de décroissance linéaire sur l'ensemble de la profondeur : jusqu'à environ 200  $\mu\text{m}$  de profondeur, la décroissance est linéaire avec une pente inférieure à celle de la courbe de diffusion simple (courbe bleue). On peut d'ailleurs vérifier que ceci est bien en accord le modèle proposé par Jacques décrit dans la section précédente (contribution des photons serpentes pour  $\mu_s z \leq 3$ ). Au-delà,  $\ln I(z)$  voit sa pente se courber avec

la profondeur en raison de la contribution significative de la diffusion multiple (serpentile et non serpentile) à l'intensité  $I(z)$  totale.

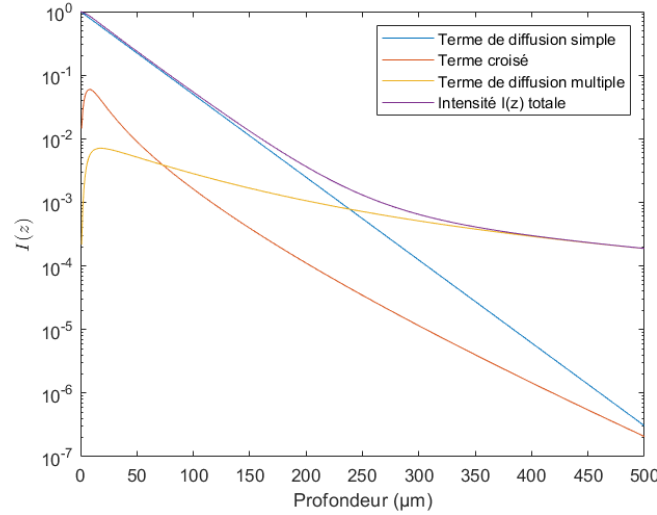


Figure 3.11 – Simulation d'un profil d'intensité  $I(z)$  en présence de diffusion multiple selon le modèle EHF [35], pour  $\mu_s = 15 \text{ mm}^{-1}$  et  $g = 0.8$ . L'intensité  $I(z)$  peut être décomposée selon 3 termes liés à la diffusion simple et/ou multiple.

Ce modèle est valable dans l'approximation paraxiale, c'est à dire pour des faisceaux optiques se propageant proches de l'axe optique. Les auteurs indiquent que le modèle s'applique à des milieux présentant une diffusion fortement dirigée vers l'avant, jusqu'à des angles de diffusion de  $30^\circ$  [35]. Dans le cas d'un système OCT avec focalisation dynamique, les auteurs montrent que :

$$w_S^2(z)/w_H^2(z) = \frac{1}{1 + \left(\frac{2w_0}{\rho_0(z)}\right)^2} \quad (3.24)$$

où

$$\rho_0(z) = \sqrt{\frac{3}{\mu_s z} \frac{\lambda}{\pi \theta_{rms}^2} \left[1 + \frac{n(f - z/n)}{z}\right]} \quad (3.25)$$

Dans l'expression de  $\rho_0(z)$ ,  $n$  est l'indice optique du milieu et  $f$  la focal de l'optique de focalisation du faisceau dans l'échantillon. Le terme  $\theta_{rms}$  représente l'angle de diffusion quadratique moyen et est donc une mesure de l'anisotropie de diffusion. Dans l'approximation des petits angles,  $g \approx 1 - \theta_{rms}^2/2$ . L'expression de  $\rho_0(z)$  montre que l'élargissement du faisceau dû à la diffusion multiple dirigée vers l'avant est régi par le nombre d'événements de diffusion  $\mu_s z$  et par la distribution angulaire de la diffusion. Lorsque la diffusion est fortement dirigée vers l'avant ( $g$  tendant vers 1,  $\theta_{rms}$  tendant vers 0),  $\rho_0(z)$  tendant vers l'infini. Ainsi, la forme du faisceau est peu altérée par la diffusion multiple, qui peut alors contribuer significativement à la formation de l'image. Pour extraire les propriétés optiques de diffusion d'une image OCT, le modèle théorique de l'équation 3.23 est appliqué sur le profil d'intensité  $I(z)$  extrait de l'image OCT. Une régression par la méthode des moindres carrés est alors utilisée pour ajuster les paramètres  $\mu_s$  et  $\theta_{rms}$  du modèle au profil expérimental  $I(z)$ . Ce modèle a récemment été amélioré pour prendre en compte l'absorption, en incluant la contribution de  $\mu_a$  dans le modèle [149].

Cette méthode basée sur le modèle EHF est plus complexe à mettre en œuvre que le modèle de Jacques précédemment décrit car les deux paramètres  $\mu_s$  et  $\theta_{rms}$  sont co-dépendants, c'est-à-dire que potentiellement plusieurs couples  $(\mu_s, \theta_{rms})$  peuvent être solutions. Ceci est encore plus complexe si on inclue une contribution de  $\mu_a$ . Pour contrer ce problème, il est généralement nécessaire d'avoir une connaissance approximative des propriétés optiques pour initialiser le problème. Par ailleurs, le modèle est peu adapté à des échantillons multicouches. Des travaux [150] ont été menés pour montrer l'applicabilité à des échantillons bicouches, cependant le modèle devient très lourd à implémenter et n'a été validé que par simulations. Cependant, le modèle EHF présente l'avantage de ne pas nécessiter de calibration pour déterminer  $\mu_s$  et  $g$ , contrairement au modèle de Jacques et peut inclure la contribution de  $\mu_a$ .

Les applications du modèle aux tissus biologiques sont encore peu nombreuses dans la littérature. Ce modèle a néanmoins été récemment appliqué à la peau par Turani *et al.* [149] pour améliorer la détection du mélanome en OCT. Dans leur étude *in vivo*, les auteurs ont observé des changements dans les propriétés optiques du mélanome, en comparaison à la peau saine. Ils ont par exemple observé une augmentation du coefficient de diffusion  $\mu_s$ , hypothétiquement liée à une augmentation du nombre de mélanocytes, ainsi qu'une augmentation du facteur d'anisotropie  $g$ , potentiellement due à une augmentation de la taille des cellules. Cependant, les auteurs ont considéré le profil axial sur l'ensemble de la profondeur imagée sans distinguer les différentes couches. Du fait de l'organisation de la peau par couche (épiderme, derme), l'allure du profil ne suit pas exactement une décroissance telle que simulée à la figure 3.11, ce qui rend l'ajustement du modèle sur le profil axial de peau peu évident. Malgré cela, cette étude est un exemple illustrant le potentiel des propriétés optiques pour quantifier des changements structuraux causés par le développement d'une pathologie.

### 3.2.3 . Choix de la méthode pour application à la LC-OCT

A la lumière de cet état de l'art sur les techniques de mesure des propriétés optiques en OCT, plusieurs observations peuvent être faites. Les méthodes basées sur un modèle de diffusion simple, la méthode dite de « curve-fitting » et la méthode résolue en profondeur, sont des méthodes simples de mise en œuvre mais ne fournissent que l'information sur le coefficient d'atténuation  $\mu_e$ . Or, comme nous l'avons évoqué dans le chapitre 1, obtenir une mesure à la fois du coefficient de diffusion  $\mu_s$  et du facteur d'anisotropie  $g$  présentent un intérêt pour la quantification de changements structuraux et organisationnels dans les tissus puisque chaque paramètre fournit des informations différentes et complémentaires sur la structure des tissus :  $g$  fournit principalement des informations sur la taille des diffuseurs tandis que  $\mu_s$  fournit également une information sur leur densité.

De plus, la méthode proposée par Vermeer, bien qu'étant la seule permettant une mesure résolue spatialement, est en réalité peu adaptée à la peau car ses structures (noyaux, cytoplasme de l'épiderme, fibres du derme) ont potentiellement des tailles différentes et donc des valeurs du facteur d'anisotropie  $g$  différentes. Cette variation potentielle de  $g$  avec la profondeur dans la peau met en péril la seconde hypothèse du modèle de Vermeer selon laquelle l'intensité rétro-diffusée est un pourcentage fixe de l'intensité atténuée, puisque la fraction d'intensité rétro-diffusée  $\rho$  est en réalité une fonction de l'anisotropie  $g$ .

Les deux modèles de diffusion multiple permettent la mesure des deux propriétés optiques de diffusion  $\mu_s$  et  $g$ . Parmi ces deux modèles, le modèle de Jacques présente l'avantage d'être plus



simple de mise en œuvre. De plus, il permet facilement de mesurer les propriétés optiques par couche de tissus en appliquant une régression sur les différentes couches, contrairement au modèle EHF qui est lourd à implémenter dans une configuration multicouche. Ce point est clef pour l'application du modèle à la peau, qui est un tissu hétérogène organisé par couche (couche cornée, épiderme, derme). Par ailleurs, le modèle de Jacques est tout à fait adapté à la LC-OCT puisque les simulations de Monte-Carlo sur lesquelles il se base ont été réalisées dans une configuration de focalisation dynamique. Il permet de prendre en compte la diffusion multiple pour des cas allant jusqu'à  $\mu_s z = 3$ , ce qui permet typiquement de mesurer des coefficients de diffusion l'ordre de  $10 \text{ mm}^{-1}$  jusqu'à une profondeur de  $400 \mu\text{m}$ , et jusqu'à  $200 \mu\text{m}$  pour les tissus les plus diffusants (jusqu'à  $20 \text{ mm}^{-1}$ ). Le modèle de Jacques paraît donc très bien adapté à la mesure de propriétés optiques de tissus biologiques en LC-OCT compte tenu des profondeurs sondées.

Ainsi, au vu des différents atouts du modèle de Jacques, *i.e.* simplicité d'implémentation, possibilité d'application à des tissus organisés par couches, prise en compte de la diffusion multiple et développement dans une configuration proche de la LC-OCT, notre choix s'est porté sur le modèle de Jacques pour développer une méthode de mesure des propriétés optiques à partir d'images LC-OCT.

### 3.3 . Développement d'une méthode de mesure des propriétés optiques à partir d'images LC-OCT

Dans cette partie, nous décrivons l'approche proposée au cours de cette thèse pour mesurer les propriétés optiques de diffusion  $\mu_s$  et  $g$  à partir d'image 3D de LC-OCT. Pour développer et valider notre méthode, nous avons fabriqué des échantillons tests, généralement appelés « fantômes » dans le monde de l'imagerie médicale, simulant les propriétés optiques des tissus biologiques. Nous avons confronté notre méthode de mesure par LC-OCT à la méthode de mesure par sphères intégrantes et transmission collimatée. Dans une première sous-partie, nous décrivons le choix et la fabrication de ces fantômes. Dans une seconde sous-partie, nous présentons le montage utilisé pour la mesure par sphères intégrantes et transmission collimatée et la caractérisation des propriétés optiques des fantômes par cette méthode. Nous présentons ensuite les traitements appliqués aux images 3D LC-OCT pour obtenir une mesure des propriétés optiques de diffusion  $\mu_s$  et  $g$ . Enfin, nous présentons les résultats obtenus par LC-OCT et leur comparaison aux mesures obtenues par sphères intégrantes et transmission collimatée sur les différents fantômes fabriqués.

#### 3.3.1 . Fabrication d'échantillons

Plusieurs types de fantômes visant à simuler les propriétés optiques de tissus biologiques sont décrits dans la littérature, avec des niveaux de complexité variables. Un fantôme visant à modéliser les propriétés optiques de tissus biologiques est généralement formé d'une matrice, composée de silicone, de résine, de gélatine ou d'agarose. Dans cette matrice sont incluses des micro- ou nanoparticules afin de créer les propriétés optiques de diffusion des fantômes. Ces particules sont généralement composées d'oxydes de métaux ou de polystyrène. Des substances absorbantes (encre, café) sont parfois ajoutées afin de créer des propriétés d'absorption [151]. Le fantôme le plus simple consiste en un échantillon uniforme, composé d'une unique couche aux propriétés optiques homogènes [152, 153]. Plusieurs couches homogènes peuvent aussi être superposées pour créer un fantôme multicouche simulant

différentes strates de tissus. Dans le cas de la peau, des fantômes mimant les propriétés optiques des différentes couches que sont la couche cornée, l'épiderme et le derme ont été rapportés dans la littérature [154, 155]. D'autres fantômes, plus complexes, incluent les réseaux de capillaires et vaisseaux sanguins du derme [156, 157].

Nous avons choisi de fabriquer des fantômes avec une matrice de polydiméthylsiloxane (PDMS) (Sylgard 184 silicone Elastomer Kit, Neyco, France). Le PDMS est un silicone ayant un indice optique relativement proche de la peau, d'une valeur de 1.42 à la longueur d'onde de 800 nm (longueur d'onde centrale du système de LC-OCT utilisé). Contrairement aux fantômes composés de gélatine ou d'agarose qui ne se conservent pas dans le temps en raison de leur composition aqueuse, le PDMS est un matériau stable. Dans un souci de simplicité, nous avons fabriqué des fantômes homogènes monocouches ainsi que des fantômes bicouches, homogènes dans chaque couche, afin de modéliser l'épiderme et le derme de la peau. Puisque nous travaillons dans la gamme du rouge et proche infrarouge, nous avons choisi de négliger le rôle de l'absorption devant celui de la diffusion, et n'avons pas inclus de substance absorbante dans nos fantômes. Pour créer les propriétés de diffusion des fantômes, nous avons ajouté à la matrice de PDMS des micro- ou nanoparticules jouant le rôle de diffuseurs.

Afin de sélectionner les diffuseurs adéquats pour mimer les propriétés optiques  $\mu_s$  et  $g$  de la peau, nous avons utilisé la théorie de Mie (faisant l'hypothèse de particules sphériques) pour simuler les valeurs de  $\mu_s$  et  $g$  des fantômes en fonction de l'indice optique, de la taille et de la densité des particules incluses dans le PDMS, paramètres qui régissent les propriétés de diffusion comme nous l'avons évoqué dans la section 1.2. Cependant, il était difficile de connaître avec précision tous les paramètres nécessaires à la prédiction des propriétés optiques par la théorie de Mie. Par exemple, seule la taille moyenne des particules était donnée par le fabricant, sans information sur la distribution des tailles autour de cette moyenne. Parfois même, la taille moyenne n'était pas fournie. L'indice optique des nanoparticules n'était pas fourni non plus.

Afin de simuler les propriétés optiques de la peau tout en ayant une gamme de propriétés optiques assez large et variée pour permettre la validation de notre méthode, nous avons ciblé des valeurs de  $\mu_s$  comprises entre  $\sim 5$  et  $20 \text{ mm}^{-1}$  et des valeurs de  $g$  entre  $\sim 0.6$  et  $0.9$ . La théorie de Mie nous a permis de déterminer pour chaque fantôme le matériau, la taille et la concentration de particules adéquates pour obtenir théoriquement les propriétés optiques attendues. Nous avons sélectionné des particules composées de trois matériaux différents : particules de dioxyde de titane ( $\text{TiO}_2$ ) (Sigma-Aldrich Corporation, Etats-Unis et US Research Nanomaterials, Inc., Etats-Unis), particules d'oxyde de zinc ( $\text{ZnO}$ ) (US Research Nanomaterials, Inc, Etats-Unis) et particules de dioxyde de silicium ( $\text{SiO}_2$ ) (US Research Nanomaterials, Inc., Etats-Unis). Avec ces trois matériaux, nous avons fabriqué 10 fantômes différents en faisant varier la taille et la concentration des particules. La description détaillée de la composition des fantômes est donnée dans le tableau 3.1, avec les valeurs cibles de  $\mu_s$  et  $g$  calculés avec la théorie de Mie pour les fantômes dont nous connaissions approximativement les paramètres physiques (indice optique et diamètre). Pour les particules de  $\text{ZnO}$  et  $\text{SiO}_2$ , nous avons approximé l'indice optique par des valeurs d'indice optique extraites de la littérature à la longueur d'onde de 800 nm [158, 159]. Pour les particules de  $\text{TiO}_2$ , nous avons trouvé dans la littérature une large gamme d'indices optiques, ainsi nous avons pris comme valeur une moyenne des différents indices optiques rapportés dans la littérature [160, 161, 158]. Les valeurs cibles de  $\mu_s$  et  $g$  ne sont

pas indiquées pour les fantômes 0 et 3 en raison du manque d'information précise sur la taille des particules utilisées ( $< 5 \mu\text{m}$ ).

Fantôme	Matériau des particules	Indice optique	Diamètre	Densité (% massique de PDMS)	$\mu_s$ ciblé	$g$ ciblé
Calibration/n°0	TiO <sub>2</sub>	2.29	$< 5 \mu\text{m}$	0.40%		
n°1	TiO <sub>2</sub>	2.29	800 nm	0.13%	1.8 mm <sup>-1</sup>	0.6
n°2	TiO <sub>2</sub>	2.29	$< 5 \mu\text{m}$	0.30%		
n°3	TiO <sub>2</sub>	2.29	800 nm	1.34%	18 mm <sup>-1</sup>	0.6
n°4	ZnO	1.96	800 nm	0.12%	1.4 mm <sup>-1</sup>	0.8
n°5	ZnO	1.96	800 nm	1.19%	14 mm <sup>-1</sup>	0.8
n°6	SiO <sub>2</sub>	1.54	400 nm	1.27%	1 mm <sup>-1</sup>	0.7
n°7	SiO <sub>2</sub>	1.54	400 nm	12.7%	10 mm <sup>-1</sup>	0.7
n°8	SiO <sub>2</sub>	1.54	1 $\mu\text{m}$	0.38%	1 mm <sup>-1</sup>	0.9
n°9	SiO <sub>2</sub>	1.54	1 $\mu\text{m}$	3.81%	10 mm <sup>-1</sup>	0.9

Table 3.1 – Description de la composition des fantômes monocouches. Tous les fantômes sont constitués d'une matrice de PDMS comprenant des particules diffusantes de différents matériaux, diamètres et concentration dans le PDMS.

Les fantômes ont été conçus au laboratoire Charles Fabry en collaboration avec Frédéric Pain selon le protocole suivant : la matrice de PDMS a été fabriquée en utilisant un rapport de 10 :1 en poids de prépolymère de PDMS et d'agent durcisseur. Tous les fantômes ont été préparés en mélangeant d'abord l'agent durcisseur avec les particules. Le mélange a été placé dans un bain à ultrasons pendant 30 minutes pour éviter l'agrégation des particules, puis mélangé avec le prépolymère. Le mélange obtenu a été versé sur une boîte de Pétri de 40 mm de diamètre. Le volume versé a été choisi afin de fabriquer des fantômes d'environ 1 à 2.5 mm d'épaisseur, une épaisseur permettant leur caractérisation par sphères intégrantes. En effet, comme nous l'avons introduit à la section 3.1, les fantômes fins, opérant dans un régime de diffusion simple, ne sont pas adaptés aux mesures par sphères intégrantes. Les bulles d'air ont été éliminées à l'aide d'une pompe à vide pendant 1h. Enfin, le mélange a été durci pendant 1h30 à 80°C pour obtenir le fantôme final. Une photographie des fantômes est donnée à la figure 3.12.



Figure 3.12 – Photographie de deux fantômes monocouches.

Dans le but de simuler différentes couches de tissus, nous avons également conçu des fantômes bicouches avec des propriétés optiques distinctes dans chaque couche, décrits dans le tableau 3.2.

L'objectif avec ces fantômes bicouches n'était pas dans un premier temps de recréer les propriétés optiques exactes de l'épiderme et du derme de la peau, mais avant tout de démontrer le potentiel de notre méthode de mesure en LC-OCT à distinguer des propriétés optiques distinctes dans chaque couche. Nous avons ainsi choisi des couches aux compositions et donc aux propriétés optiques très différentes dans chacune des couches, comme nous le verrons dans la suite de ce chapitre.

Pour créer la couche supérieure, nous avons prélevé un petit volume des mélanges PDMS/particules utilisés pour fabriquer les fantômes monocouches, que nous avons versé dans une autre boîte de Pétri. Ce petit volume a été calculé en fonction des dimensions de la boîte de Pétri et de l'épaisseur voulue. Le fantôme a été laissé pendant 24h dans une chambre à vide à température ambiante, permettant au mélange de s'étaler en une fine couche avant de durcir. Ce procédé nous a permis d'obtenir un fantôme fin, d'épaisseur de  $\sim 100 \mu\text{m}$ , présentant la même composition de PDMS/particules que les fantômes monocouches. En pratique, il n'a pas été facile de fabriquer des couches aussi fines qui soient homogènes et ne présentent pas ou peu d'agrégats. Parmi l'ensemble des fantômes fabriqués, seuls quelques échantillons fins se sont avérés être exploitables. Une fois durcie, la couche supérieure obtenue a été superposée à un fantôme plus épais ayant des propriétés optiques différentes pour créer un fantôme bicouche. Une image LC-OCT verticale de l'un des fantômes bicouches est présentée à la figure 3.13.

Fantôme bicouche	Couche	Fantôme monocouche correspondant
n°1	Supérieure	n°5
	Inférieure	n°2
n°2	Supérieure	n°2
	Inférieure	n°5

Table 3.2 – Description de la composition des fantômes bicouches.

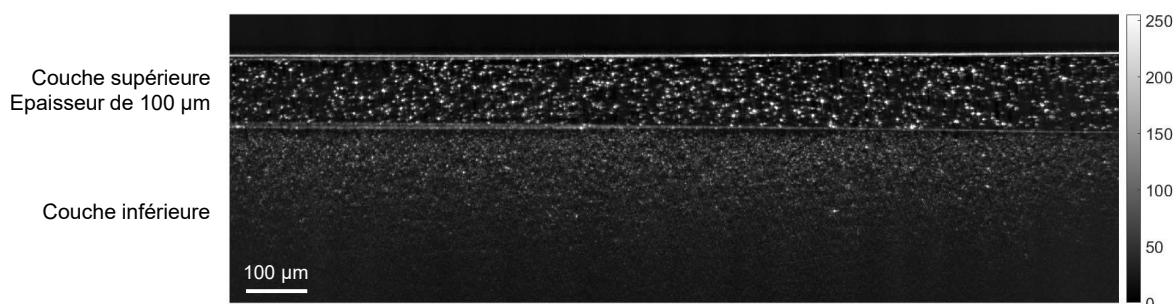


Figure 3.13 – Image LC-OCT verticale (*i.e.*, vue en coupe) d'un fantôme bicouche. L'image LC-OCT est affichée en échelle d'intensité logarithmique (unité arbitraire).

### 3.3.2 . Caractérisation des échantillons par sphères intégrantes et transmission collimatée

Comme nous l'avons évoqué dans la section précédente, la théorie de Mie nous a permis de définir des valeurs cibles pour les propriétés optiques  $\mu_s$  et  $g$  de nos fantômes. Cependant, en raison des incertitudes sur la distribution des tailles et l'indice optique des particules utilisées dans nos fantômes, la caractérisation des propriétés optiques par la théorie de Mie peu précise et peu fiable. De ce fait, ces valeurs cibles correspondent à des valeurs indicatives et ne peuvent être prises comme valeurs de référence auxquelles comparer les valeurs obtenues à partir d'images LC-OCT. Ainsi, nous avons fait le choix de caractériser les propriétés optiques de nos échantillons de manière expérimentale, en utilisant un montage de sphères intégrantes et transmission collimatée. Au vu de l'état de l'art établi au début de ce chapitre, nous avons choisi cette méthode car il s'agit de la méthode de référence pour la mesure de propriétés optiques, à laquelle se confrontent les techniques nouvelles. Par rapport à d'autres méthodes, elle permet de plus une caractérisation complète des trois propriétés optiques  $\mu_a$ ,  $\mu_s$  et  $g$  des échantillons.

#### 3.3.2.1 . Montage

Nous avons utilisé un montage conçu par Frédéric Pain au laboratoire Charles Fabry. Il est composé de deux sphères intégrantes (IS200-4 2", Thorlabs, Etats-Unis). Dans ce montage, le fantôme est placé entre les deux sphères et éclairé par une source Xénon à large bande et haute puissance (HPX 2000, Ocean Insight, Etats-Unis). La lumière de cette source est guidée vers la première sphère à l'aide d'une fibre optique. A l'entrée de la sphère, la lumière est collimatée en un faisceau de 6 mm de diamètre éclairant le fantôme. La lumière réfléchiée et transmise par le fantôme est ensuite collectée à l'aide d'une fibre optique fixée sur le port de détection de chaque sphère. Cette fibre est couplée à un spectromètre (AvaSpec2048, Avantes, Pays-Bas) faisant office de détecteur. Pour chaque fantôme monocouche, nous avons ainsi mesuré le spectre de la réflectance en connectant la fibre du spectromètre à la première sphère. Nous avons ensuite mesuré le spectre de la transmittance en connectant le spectromètre à la seconde sphère. Chaque spectre a été corrigé du spectre du bruit de fond et normalisé par le spectre à blanc, sans échantillon.

La mesure de la transmission collimatée a été effectuée avec une diode laser fibrée monochromatique à 785 nm (Micron Cheetah, Sacher LaserTechnik, Allemagne). Le faisceau laser est collimaté en sortie de fibre et réduit à un diamètre  $< 1$  mm par un diaphragme. Le fantôme est placé quelques cm derrière le diaphragme, perpendiculairement au faisceau laser. Une fibre de collection (105  $\mu\text{m}$  de diamètre de cœur,  $\text{ON} = 0.1$ ), reliée au spectromètre, est placée à un mètre derrière le fantôme afin de collecter la lumière balistique. Du fait de son petit diamètre et de son ouverture numérique faible, la fibre fait office de sténopé permettant de rejeter les photons diffusés. Une photographie du montage de transmission collimatée est donnée à la figure 3.14. Afin d'éviter des biais expérimentaux, nous avons utilisé un laser très stable en intensité et nous avons moyenné dans le temps le signal balistique acquis par le spectromètre. Nous avons également effectué les mesures dans l'obscurité pour éviter toute contribution éventuelle de la lumière ambiante. Là aussi, les mesures de transmission collimatée ont été corrigées du bruit de fond et normalisées par rapport aux mesures à blanc sans échantillon.

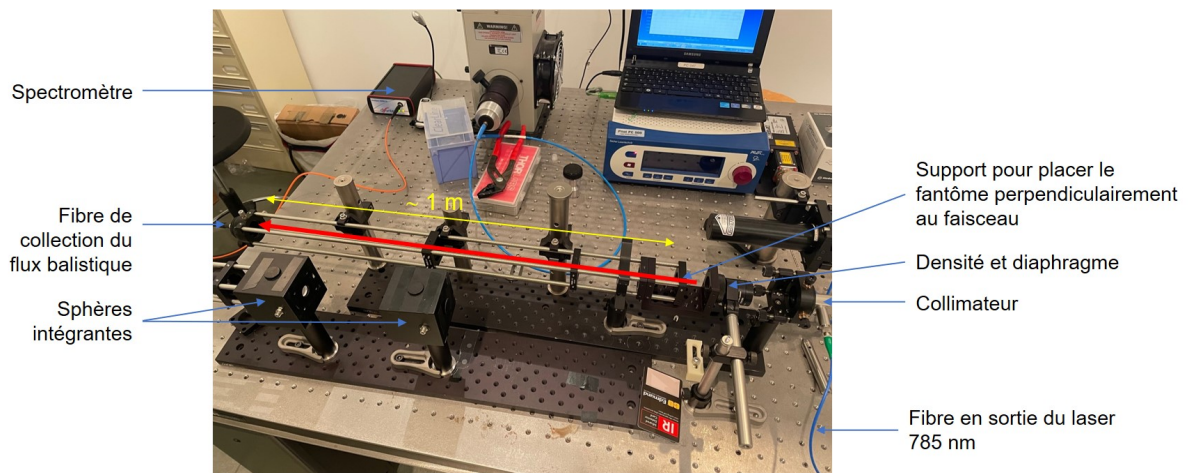


Figure 3.14 – Photographie du montage de transmission collimatée à 785 nm. Le faisceau laser à 785 nm est collimaté en sortie de fibre et réduit à un diamètre 1 mm par un diaphragme. Le fantôme est placé quelques cm derrière le diaphragme, perpendiculairement au faisceau laser (représenté par la flèche rouge). Une fibre de collection, reliée à un spectromètre, est placée à un mètre derrière le fantôme afin de collecter la lumière balistique. Du fait de son petit diamètre et de son ouverture numérique faible, la fibre fait office de sténopé permettant de rejeter les photons diffusés.

### 3.3.2.2 . Méthode Inverse Adding-Doubling

Pour calculer les propriétés optiques à partir des mesures de réflectance, transmittance et transmission collimatée, nous avons utilisé l’algorithme IAD (Inverse Adding-Doubling) développé par Jacques et Prah [162]. Cet algorithme est basé sur une méthode appelée « Adding-Doubling » permettant de simuler numériquement la propagation de la lumière dans les tissus biologiques connaissant leurs propriétés optiques. Dans les grandes lignes, elle permet d’obtenir les valeurs de réflectance et transmittance en résolvant numériquement l’équation du transfert radiatif (ETR) pour un échantillon modélisé comme une succession de couches aux propriétés optiques homogènes. Une description détaillée de cette méthode peut être trouvée dans [163]. L’algorithme IAD utilise les simulations par Adding-Doubling afin d’estimer de manière itérative les propriétés optiques jusqu’à ce que les valeurs prédites de la réflectance, de la transmittance et de la transmission collimatée correspondent aux valeurs expérimentales. Les valeurs de  $\mu_a$ ,  $\mu_s$  et  $g$  ont été déterminées à la longueur d’onde 785 nm en fournissant à l’IAD les valeurs de réflectance, transmittance et transmission collimatée mesurées par le spectromètre à cette longueur d’onde.

### 3.3.2.3 . Caractérisation des fantômes monocouches

Les valeurs de  $\mu_a$ ,  $\mu_s$  et  $g$  obtenus par sphères intégrantes et transmission collimatée sont données à la figure 3.15 pour l’ensemble des dix fantômes monocouches. Pour chaque fantôme, nous avons effectué trois sessions de mesure de réflectance et transmittance par sphères et transmission collimatée. Les valeurs données correspondent aux valeurs moyennes de  $\mu_s$  et  $g$  obtenues sur ces trois sessions d’expérimentations. Les barres d’erreurs correspondent à l’écart-type sur  $\mu_s$  et  $g$  résultant de ces trois sessions.

En pratique, nous n’avons pas pu effectuer la mesure sur les fantômes monocouches 3, 5, 7 et 9 car le flux balistique collecté en sortie de ces échantillons était insuffisant. Pour rappel, la mesure de

transmission collimatée consiste à mesurer le flux balistique après traversée d'un échantillon diffusant. Le flux balistique, comme nous l'avons vu dans le chapitre 1, décroît avec l'épaisseur de l'échantillon selon une loi de Beer-Lambert de coefficient  $\mu_s$ . Il devient donc très faible dès lors que les fantômes sont très diffusants ou épais. Pour ces fantômes 3, 5, 7 et 9, nous avons fait l'hypothèse d'une valeur de  $g$  identique aux fantômes 1, 4, 6 et 8 constitués des mêmes particules mais en concentrations plus faibles.

Globalement, on peut constater que les propriétés optiques de diffusion obtenues correspondent à la gamme de propriétés ciblée théoriquement, avec des valeurs de  $\mu_s$  comprises entre 1 et 25 mm<sup>-1</sup> et des valeurs de  $g$  entre 0.68 et 0.94. Les résultats obtenus confirment que le coefficient d'absorption  $\mu_a$  est bien négligeable devant le coefficient de diffusion  $\mu_s$  pour l'ensemble des fantômes fabriqués. Pour les fantômes constitués des mêmes particules (en termes d'indice optique et diamètre), nous pouvons constater que le paramètre  $\mu_s$  augmente avec la concentration en particules, en accord avec la théorie de Mie. Les valeurs de  $\mu_s$  ne correspondent pas exactement aux valeurs théoriques données par la théorie de Mie, mais l'ordre de grandeur est en accord avec ces valeurs cibles. Comme nous l'avons indiqué précédemment, les valeurs théoriques sont indicatives en raison des incertitudes sur les paramètres de taille et d'indice optique des particules diffusantes. A noter qu'au cours du processus de fabrication, des pertes ont pu être introduites lors du transvasement du mélange particules/durcisseur dans le prépolymère, ce qui peut aussi contribuer à certains écarts de  $\mu_s$ . Concernant le paramètre  $g$ , on peut noter que là aussi les valeurs de  $g$  pour les fantômes 1, 4 et 8 ont le bon ordre de grandeur par rapport à la théorie de Mie. Cependant, la valeur de  $g$  obtenue pour le fantôme 6, constitué des particules de SiO<sub>2</sub> de 400 nm de diamètre, est largement plus élevée (0.94) que la valeur cible (0.7) et équivaut à la valeur de  $g$  obtenue pour le fantôme 8, composé de particules de SiO<sub>2</sub> de taille plus grande (1 μm). Nous n'avons pas pour le moment d'explication avérée pour cet écart. Une éventuelle explication pourrait être une erreur dans la taille des particules ou bien l'agrégation de particules de 400 nm en des particules plus grosses, de l'ordre du μm. Nous rediscuterons de ce point dans la suite de ce chapitre.

En pratique, bien qu'étant une méthode de référence, la mesure de transmission collimatée est une mesure expérimentale qui a été difficile à effectuer de façon répétable et qui a nécessité d'améliorer le montage initial. Notamment, les fantômes n'étant pas tous bien plats, le faisceau balistique en sortie de l'échantillon se trouvait parfois dévié de sa trajectoire initiale. Dans ce cas, il était nécessaire de réajuster l'injection du flux balistique dans la fibre collectrice, ce qui a nécessité d'ajouter des réglages au montage initial. Ce réajustement peut être source d'erreur dans la mesure.

Une autre source d'erreur potentielle est la contribution de photons diffusés à l'intensité balistique. En effet, dans le cas d'échantillon épais et de valeurs de  $g$  élevées (autrement dit d'une diffusion fortement dirigée vers l'avant), il est possible que certains photons soient diffusés dans une direction proche de l'axe du faisceau balistique et pris en compte dans l'intensité balistique collectée. Pour éviter cela, la solution idéale est de travailler en régime de diffusion simple, c'est-à-dire avec des échantillons vérifiant  $\mu_s z \leq 1$ . En pratique, il aurait donc fallu travailler avec des fantômes plus fins, de quelques centaines de μm, ce qui aurait rendu la mesure complexe en raison de la fragilité de ces fantômes. De plus, comme nous l'avons évoqué précédemment dans la section 3.3.1, nous avons rencontré plus de difficultés à fabriquer des fantômes fins homogènes par rapport à des fantômes plus épais.

Pour des échantillons plus épais (~ 1 à 2.5 mm pour nos fantômes), la proportion de photons

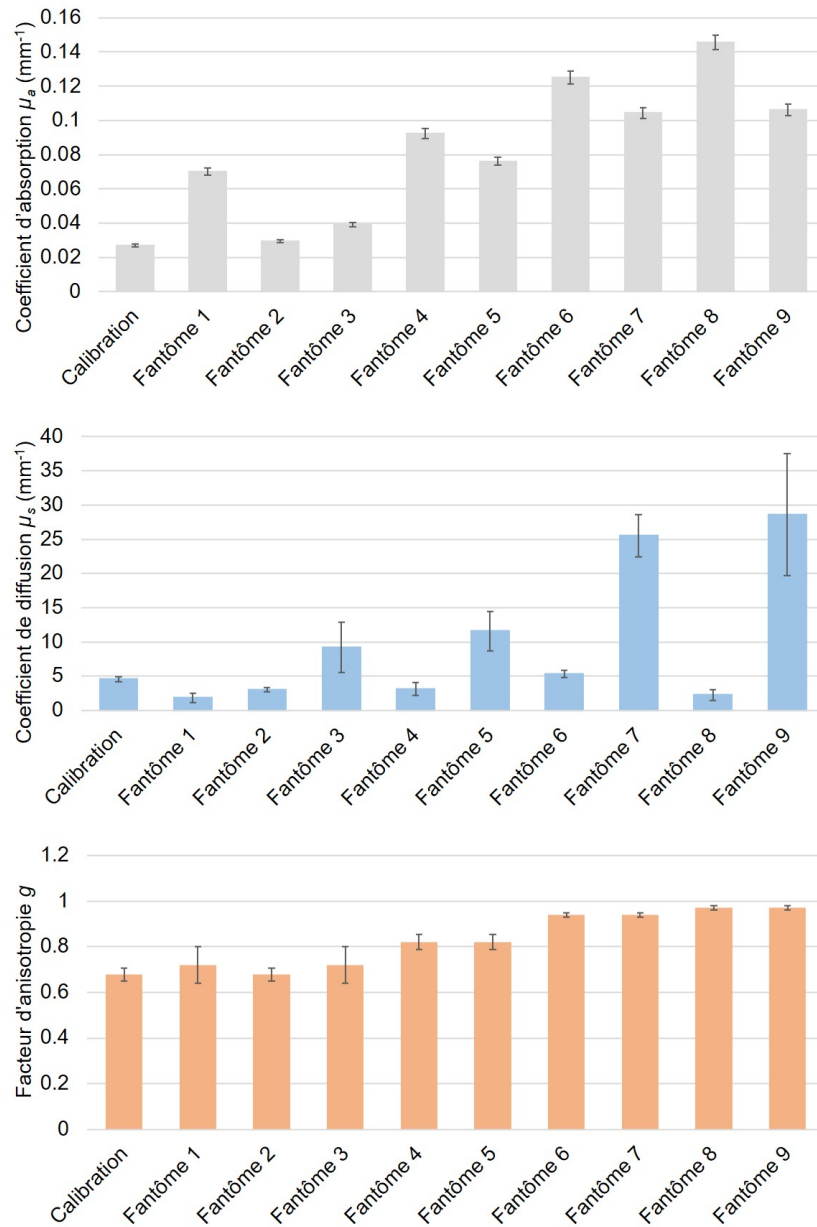


Figure 3.15 - Valeurs de  $\mu_a$  (en gris),  $\mu_s$  (en bleu) et  $g$  (en orange) obtenues pour les dix fantômes monocouches par sphères intégrantes et transmission collimatée.



diffusés collectés par rapport aux photons balistiques dépend de la fonction de phase de l'échantillon et de l'angle d'acceptance du système de collection de l'intensité balistique. En réduisant cet angle d'acceptance, il est possible de réduire la contribution de la diffusion au signal balistique. Pour minimiser cet angle, nous avons choisi une fibre d'ouverture numérique faible (0.1), de diamètre faible (105  $\mu\text{m}$ ) et placée à une distance d'1 m derrière l'échantillon.

Par un calcul relativement simple, proposé dans [164], il est possible d'obtenir un ordre de grandeur de l'erreur due à la collection de photons diffusés. Le nombre de photons balistiques est donné par  $N_0 = N_{inc} e^{-\mu_s z}$  avec  $N_{inc}$  le nombre de photons incident. Le nombre de photons ayant subi  $i$  diffusions (en supposant une loi de probabilité de diffusion Poissonnienne de paramètre  $\mu_s z$ ) est donné par  $N_i = N_{inc} e^{-\mu_s z} \frac{(\mu_s z)^i}{i!}$ . Pour faire simple, considérons le nombre photons diffusés une fois donné par  $N_1 = N_{inc} e^{-\mu_s z} \mu_s z$ . Parmi ces photons diffusés une fois, une fraction notée  $\chi = \frac{\theta^2}{2(1-g)^2}$  d'entre eux peut être collectée par l'angle d'acceptance  $\theta$  du détecteur (en supposant une fonction de phase de Henyey-Greenstein [164]). Le nombre de photons diffusés une fois et collectés par le système en pourcentage du nombre de photons balistiques est alors donné par :

$$\epsilon = \chi \frac{N_1}{N_0} = \frac{\theta^2}{2(1-g)^2} \mu_s z \quad (3.26)$$

Ce calcul nous permet d'avoir un ordre d'idée de la proportion de photons diffusés simplement collectés et nous permet de constater que la contribution de photons diffusés est extrêmement faible ( $< 10^{-3}$  %) pour l'ensemble de nos fantômes en raison du petit diamètre de la fibre de collection et de la grande distance entre le fantôme et la fibre. Ce calcul reste néanmoins limité à la diffusion simple. Pour évaluer précisément la contribution de la diffusion multiple, il aurait fallu effectuer des simulations de Monte-Carlo prenant en compte la géométrie de notre montage et les propriétés optiques de nos fantômes. Dans une publication de Ou et Seader [165], les simulations de Monte-Carlo montrent que pour une diffusion isotrope, la contribution de la diffusion multiple à un faisceau balistique transmis au travers d'un échantillon diffusant reste négligeable tant que  $\mu_s z \leq 7$ . Bien que ne prenant pas en compte la géométrie de détection et considérant une diffusion isotrope, ces simulations donnent un ordre d'idée de la validité de la mesure de transmission collimatée, vérifiée par l'ensemble de nos fantômes analysés par transmission collimatée (fantômes 0, 1, 2, 4, 6 et 8). Ainsi, les travaux mentionnés ci-dessus nous confortent dans l'applicabilité de la mesure à nos fantômes.

### 3.3.3 . Mesures à partir d'images 3D LC-OCT

Dans cette partie, nous décrivons la méthode développée au cours de cette thèse pour mesurer les propriétés optiques  $\mu_s$  et  $g$  à partir d'images 3D de LC-OCT. Une image 3D résulte de l'acquisition d'une succession d'images LC-OCT 2D horizontales à différentes profondeurs. Pour rappel du chapitre 2, chaque image horizontale résulte de la démodulation des lignes interférométriques acquises successivement dans le plan horizontal lors du balayage latéral, à l'aide d'un algorithme à décalage de phase [26]. Les images que nous utilisons dans le cadre de ce chapitre sont exemptes de traitements d'images afin de ne pas fausser la mesure des propriétés optiques de diffusion.

Afin de valider notre méthode en comparaison aux mesures obtenues par sphères intégrantes et transmission collimatée, opérant à une échelle macroscopique, nous proposons dans un premier temps de mesurer les propriétés optiques des fantômes en utilisant l'ensemble du champ imagé par la LC-OCT. Au-delà de la validation de notre méthode, cette mesure à l'échelle millimétrique apporte une

information quantitative à la LC-OCT, complémentaire aux informations qualitatives apportées par les images de résolution micrométrique. Dans un second temps, nous verrons comment il est possible d'apporter une dimension résolue spatialement à la mesure des propriétés optiques, en considérant des macro-pixels au sein d'une image de LC-OCT.

### 3.3.3.1 . Mesure des paramètres $\rho$ et $\mu_{eff}$

Pour mesurer les propriétés optiques  $\mu_s$  et  $g$  sur l'ensemble du champ LC-OCT, la première étape consiste à extraire le profil d'intensité  $I(z)$  moyen dans l'image 3D, en moyennant l'ensemble des profils axiaux (au sens de colonnes) de l'image LC-OCT 3D. Un logarithme népérien est ensuite appliqué à  $I(z)$  pour obtenir les valeurs des observables  $\rho$  et  $\mu_{eff}$  :

$$\ln I(z) = \ln I_0\rho - 2\mu_{eff}z \quad (3.27)$$

$\rho$  et  $\mu_{eff}$  sont extraits en appliquant une régression linéaire sur  $\ln I(z)$  partant de la surface de l'échantillon jusqu'à une profondeur d'environ 150  $\mu\text{m}$ , tel qu'illustré à la figure 3.16b).  $\mu_{eff}$  correspond quant à lui à la moitié de la pente. La valeur de  $\rho$  est obtenue à partir de  $\ln I_0\rho$ , qui correspond à l'ordonnée à l'origine en  $z = 0$  représentant l'interface entre le fantôme et la lame de verre du système d'imagerie LC-OCT contre laquelle est plaqué le fantôme (pic d'intensité visible à  $z = 0$  à la figure 3.16b).  $\rho$  est extrait de  $\ln I_0\rho$  à l'aide d'une calibration préalable décrite dans la suite de ce chapitre.

### 3.3.3.2 . Extraction des propriétés optiques $\mu_s$ et $g$

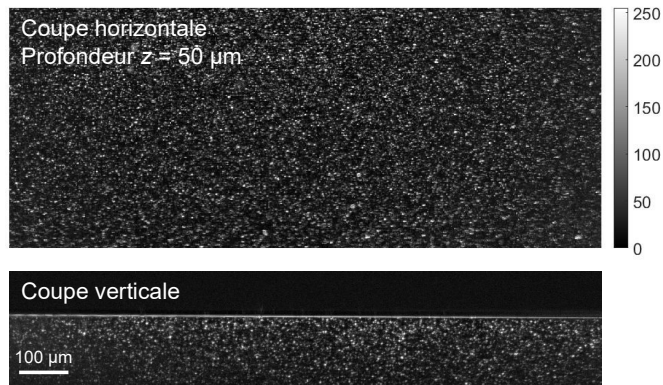
Enfin, les propriétés optiques  $\mu_s$  et  $g$  sont obtenues à partir des paramètres  $\rho$  et  $\mu_{eff}$  extraits de l'image LC-OCT 3D en utilisant le modèle de Jacques *et al.* [34]. Pour rappel, dans le cadre de ce modèle, les propriétés optiques  $\mu_s$  et  $g$  sont reliées aux paramètres  $\rho$  et  $\mu_{eff}$  par le système d'équations suivant :

$$\begin{cases} \mu_{eff} &= G(g, ON)a(g)\mu_s \\ \rho &= \mu_s \Delta z b(g, ON) \end{cases} \quad (3.28)$$

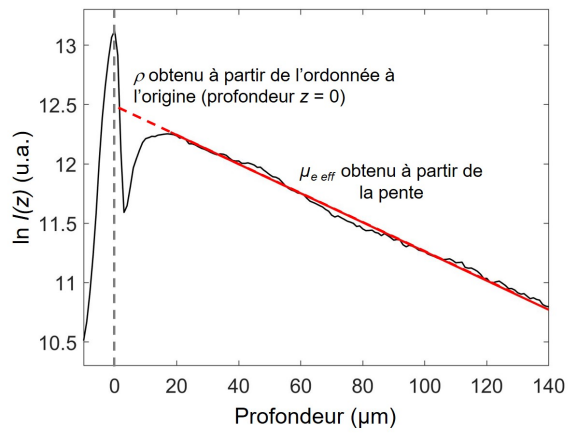
$\Delta z$  correspondant à la résolution axiale. Dans le cas de la LC-OCT, la résolution axiale est donnée par la longueur de cohérence :  $\Delta z = \Delta z_{OCT} = \frac{l_c}{2} = 1.2 \mu\text{m}$ . Aucun facteur correctif sur  $\Delta z$  n'a semblé nécessaire sur la base des résultats présentés dans la suite. Dans notre méthode, nous n'avons pas directement utilisé la grille générée par le modèle (illustrée à la figure 3.10) mais nous avons procédé d'une façon équivalente, en remarquant que le ratio  $\frac{\mu_{eff}}{\rho}$  ne dépend que du facteur d'anisotropie  $g$  et de l'ouverture numérique ON :

$$\frac{\mu_{eff}}{\rho} = \frac{a(g)G(g, ON)}{b(g, ON)\Delta z} \quad (3.29)$$

Pour une ouverture numérique donnée, on peut tracer un graphique théorique représentant  $\frac{\mu_{eff}}{\rho}$  en fonction de  $g$ , illustré à la figure 3.17. Dans notre méthode, ce graphique est alors utilisé en sens inverse, pour extraire le facteur  $g$  à partir du ratio  $\frac{\mu_{eff}}{\rho}$ . Une fois  $g$  extrait, le coefficient de diffusion  $\mu_s$  est calculé à partir des valeurs de  $\rho$ ,  $\mu_{eff}$ ,  $g$  et du système d'équations ci-dessus. Cette façon de procéder donne des résultats identiques à ceux obtenus en générant la grille de la figure 3.10, mais elle



(a)



(b)

Figure 3.16 – a) Image LC-OCT 3D (vues horizontale et verticale) d'un fantôme composé de PDMS et de particules de  $\text{TiO}_2$ , en échelle d'intensité logarithmique et (b) profil d'intensité moyenne  $I(z)$  dans l'image LC-OCT 3D en fonction de la profondeur, en échelle logarithmique. Une régression linéaire (ligne rouge) est appliquée sur le profil d'intensité pour obtenir la mesure de la paire d'observables  $\mu$  et  $\rho$ .

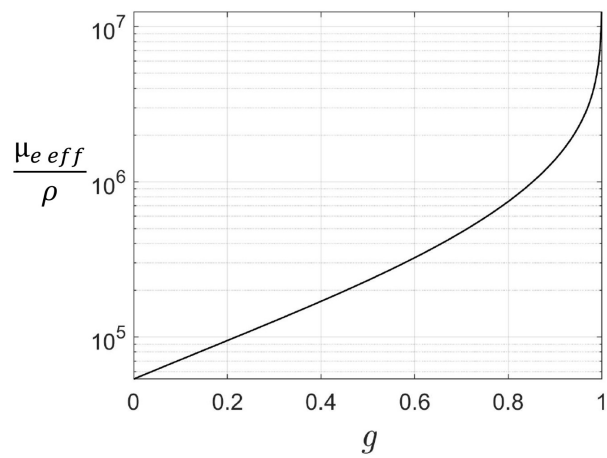


Figure 3.17 – Rapport de  $\frac{\mu_{eff}}{\rho}$  en fonction de  $g$ , calculé pour  $\lambda = 800 \text{ nm}$ ,  $\text{ON} = 0.5$  et  $\Delta z = 1.2 \text{ } \mu\text{m}$ .

est un plus pratique à implémenter car d'un point de vue calculs elle nécessite seulement de simuler  $\frac{\mu_{eff}}{\rho}$  fonction de  $g$  pour  $g$  allant de 0 à 1 ( $\mu_s$  pouvant être calculé directement à partir du système ci-dessus connaissant  $\rho, \mu_{eff}, g$ ) au lieu de générer un grille 2D fonction d'une gamme de valeurs de  $\mu_s$  et de  $g$ .

### 3.3.3.3 . Calibration

Pour obtenir le paramètre  $\rho$  à partir de  $I_0\rho$ , une étape de calibration est nécessaire. Pour cela, l'un des fantômes (fantôme n°0/calibration) est utilisé comme fantôme de calibration. D'une part, nous mesurons les valeurs de  $\mu_s$  et  $g$  du fantôme de calibration par sphères intégrantes et transmission collimatée. A l'aide du modèle de Jacques *et al.* [34], nous calculons le ratio  $r_{calib} = \frac{\mu_{eff\ calib}}{\rho_{calib}}$  à partir de la valeur de  $g$  mesurée pour ce fantôme. D'autre part, nous acquérons une image 3D du fantôme de calibration et nous mesurons la valeur de  $I_0\rho_{calib}$  et  $\mu_{eff\ calib}$  en appliquant une régression linéaire sur le profil d'intensité  $\ln I(z)$  moyen dans l'image. Connaissant la valeur du ratio  $r_{calib}$  attendu, il est alors possible d'accéder à la valeur de  $\rho_{calib}$  à partir de  $\mu_{eff\ calib}$  mesuré par régression sur le profil. Un facteur de calibration  $f$  peut alors être calculé en faisant le ratio de la valeur attendue pour  $\rho_{calib}$  en fraction d'intensité rétro-diffusée et de la valeur de  $I_0\rho_{calib}$  mesurée à partir de l'image 3D de LC-OCT :

$$f = \frac{\rho_{calib}}{I_0\rho_{calib}} \quad (3.30)$$

Cette façon de réaliser la calibration n'est pas l'unique possible, mais elle présente l'avantage de ne pas impliquer la valeur de  $\mu_s$  mesurée par sphères intégrantes et transmission collimatée. Ceci est un atout, car là où la valeur de  $g$  est indépendante de la densité de particules et des hétérogénéités de densité locales et devrait donc être identique qu'elle soit mesurée par sphères intégrantes et transmission collimatée ou par LC-OCT, la valeur de  $\mu_s$  pourrait différer entre la mesure obtenue par sphères intégrantes sur un champ de 6 mm de diamètre et la mesure obtenue plus localement par LC-OCT sur un champ de l'ordre du mm. Comme méthode de calibration alternative, l'utilisation d'une interface verre/liquide d'indice optique connu a également été envisagée au cours de cette thèse. Cependant nous avons préféré l'utilisation d'un fantôme diffusant en raison de difficultés évoquées par les auteurs du modèle dans [144] pour calibrer le modèle avec une interface réfléchive connue. Nous avons aussi rencontré des problèmes en testant cette méthode de calibration : en s'intéressant à des mesures de  $\mu_s$  et  $g$  résolues spatialement comme nous le présenterons plus tard dans ce chapitre, cette méthode de calibration débouchait sur une grande hétérogénéité de  $g$  dans le champ imagé par la LC-OCT avec une mauvaise estimation de  $g$  dans certaines zones de l'image, notamment sur les bords.

Le choix du fantôme de calibration est guidé par plusieurs facteurs. Premièrement, le fantôme 0 présente un coefficient de diffusion  $\mu_s$  intermédiaire parmi l'ensemble des fantômes fabriqués. Il est néanmoins relativement faible pour permettre sa caractérisation par transmission collimatée et donc obtenir, avec la mesure par sphères intégrantes, l'ensemble de ses propriétés optiques  $\mu_a, \mu_s$  et  $g$ . De plus, du fait que la calibration soit réalisée à partir des mesures par sphères intégrantes et transmission collimatée, l'incertitude sur cette mesure se répercute sur le facteur de calibration. Ainsi, nous avons intérêt à choisir un fantôme présentant de faibles incertitudes de mesure par sphères intégrantes et transmission collimatée. De plus, en appliquant le modèle de Jacques pour calculer  $\rho_{calib}$  à partir de  $\mu_s$  et  $g$  obtenus par sphères intégrantes et transmission collimatée, on peut montrer

que cette répercussion est d'autant plus importante que  $g$  est élevée, autrement dit que  $\rho_{calib}$  est faible, et ce en raison de la dépendance en  $g$  des fonctions  $a(g)$  et  $b(g)$  du modèle de Jacques. De ce fait, le fantôme 0 est bien adapté puisqu'il présente un  $g$  faible par rapport aux autres fantômes et a l'incertitude la plus faible sur  $\mu_s$ .

### 3.3.3.4 . Mesure de $\mu_s$ et $g$ - fantômes monocouches

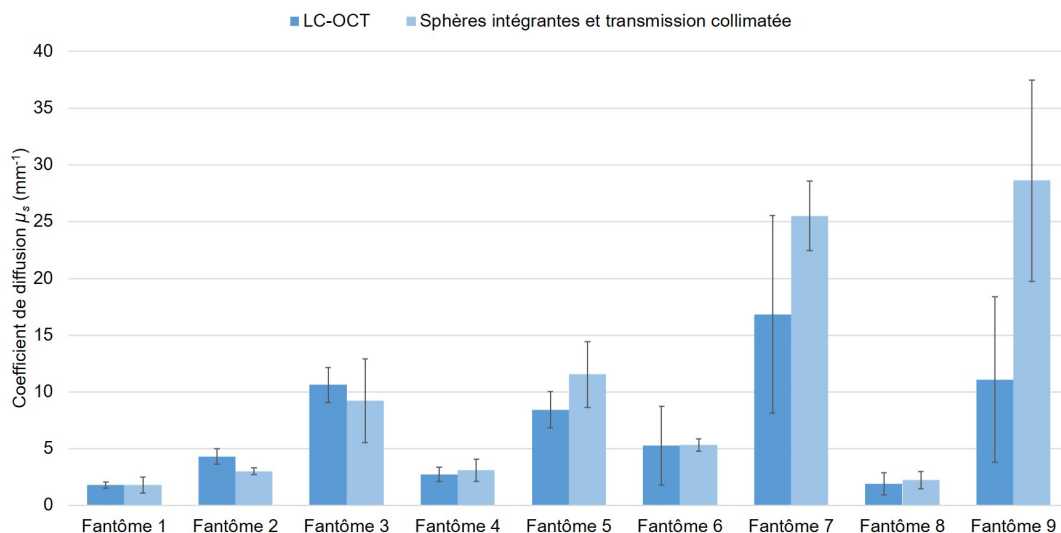


Figure 3.18 – Comparaison des valeurs de  $\mu_s$  obtenues par LC-OCT (bleu foncé) et des mesures combinées par sphères intégrantes et transmission collimatée (bleu clair) sur des fantômes monocouches.

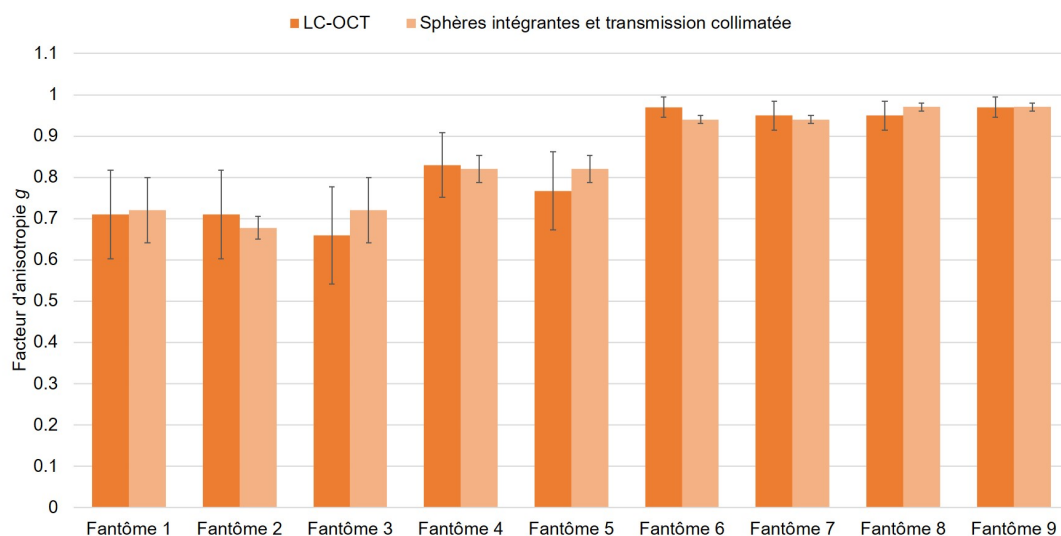


Figure 3.19 – Comparaison des valeurs de  $g$  obtenues par LC-OCT (orange foncé) et des mesures combinées par sphères intégrantes et transmission collimatée (orange clair) sur des fantômes monocouches.

Les comparaisons des valeurs de  $\mu_s$  et de  $g$  des fantômes monocouches obtenues à partir des profils

de profondeur d'intensité moyenne LC-OCT et des mesures par sphères d'intégrantes et transmission collimatée sont données dans les figures 3.18 et 3.19. Pour chaque fantôme, les valeurs obtenues pour  $\mu_s$  et  $g$  correspondent aux moyennes de  $\mu_s$  et  $g$  mesurés sur 3 images LC-OCT acquises à des temps différents, et potentiellement dans des régions différentes de l'échantillon. A chaque temps (*i.e.*, chaque session d'imagerie), l'échantillon de calibration a été imagé et la calibration réalisée.

Dans l'ensemble, les résultats montrent que la LC-OCT fournit des valeurs de propriétés optiques proches des valeurs obtenues par sphères intégrantes et transmission collimatée. Plus précisément, on peut noter un bon accord entre les deux méthodes de mesure à la fois pour  $\mu_s$  et  $g$  pour les fantômes 1 à 6 et 8, avec des barres d'erreur qui se chevauchent (ou presque pour la mesure de  $\mu_s$  pour le fantôme 2). En particulier, pour le fantôme 6, dont la valeur de  $g$  mesurée par sphères intégrantes et transmission collimatée ne correspondait pas à la valeur prédite par la théorie de Mie, on observe que la valeur de  $g$  obtenue par LC-OCT coïncide avec la valeur obtenue par sphères intégrantes. Ceci suggère donc qu'il y aurait bien potentiellement une erreur au niveau des paramètres qui ont permis d'établir la valeur cible par la théorie de Mie. De plus, en mesurant les intensités des particules individuelles dans les images de LC-OCT, nous avons pu remarquer que les particules de SiO<sub>2</sub> de 400 nm de diamètre présentent une intensité similaire aux particules de 1  $\mu\text{m}$ , alors que leurs intensités devraient être bien différentes si on se fie à la théorie de Mie. D'autres investigations seraient nécessaires pour obtenir une explication exacte.

Pour les fantômes 7 et 9, on observe un très bon accord des valeurs de  $g$  entre les deux méthodes. En revanche, on observe un écart conséquent entre la valeur de  $\mu_s$  mesurée à partir des sphères intégrantes et de la transmission collimatée et celle mesurée par LC-OCT. La calibration à l'aide du fantôme 0 ne semble pas être en cause, puisque les valeurs de  $g$  obtenus par LC-OCT sont en très bon accord avec les mesures par sphères intégrantes et transmission collimatée pour l'ensemble des neuf fantômes. Les valeurs de  $\mu_s$  sont également en bon accord pour les fantômes 1 à 6 et 8. La source des écarts sur ces fantômes semble en réalité être l'homogénéité des fantômes : nous avons pu remarquer que les fantômes 7 et 9 ne présentent pas la même décroissance du profil d'intensité s'ils sont imagés en LC-OCT par le dessus ou le dessous. Lorsqu'ils sont imagés par le dessus, la décroissance en logarithme est linéaire et nous permet d'appliquer une régression linéaire pour extraire les paramètres  $\rho$  et  $\mu_{eff}$ . En revanche, imagés par le dessous, ces fantômes présentent une décroissance en logarithme qui est plus forte et non-linéaire (la décroissance s'atténue avec la profondeur). Cela traduit le fait que les fantômes 7 et 9 ne sont en réalité pas bien homogènes et présentent une concentration de particules diffusantes plus importante dans le fond du fantôme. En LC-OCT, nous avons mesuré  $\rho$  et  $\mu_{eff}$  en imageant les fantômes 7 et 9 par le dessus afin de pouvoir appliquer une régression linéaire sur leurs profils en logarithme. En revanche, les mesures par sphères intégrantes et transmission collimatée se basent sur la transmission au travers de toute l'épaisseur du fantôme, ce qui explique sûrement l'écart entre les deux méthodes de mesure. Ce problème, qui touche les deux fantômes les plus concentrés en particules si on se réfère au tableau 3.1, montre les limites de notre processus de fabrication pour des fantômes concentrés en particules. Il serait ainsi nécessaire de revoir le processus de fabrication ou d'envisager d'autres approches. Par exemple, une idée qui pourrait être testée à l'avenir serait de découper les fantômes 7 et 9 dans leur épaisseur afin de ne garder par exemple que les 500 premiers  $\mu\text{m}$  à partir du dessus du fantôme, et de réaliser à nouveau les mesures par sphères intégrantes et transmission collimatée pour évaluer si les valeurs de  $\mu_s$  se rapprochent des valeurs obtenues en

LC-OCT.

Par ailleurs, on peut noter que les barres d'erreurs sur les mesures LC-OCT sont très variables d'un fantôme à un autre. Ces barres d'erreurs ont été calculées à partir de deux contributions : premièrement l'incertitude sur  $\rho$  due à la calibration par la mesure par sphères intégrantes et transmission collimatée sur le fantôme de calibration. A cette incertitude s'ajoute l'incertitude sur  $\rho$  et  $\mu_{eff}$  introduite à la fois par la régression linéaire sur le profil d'intensité moyen  $\ln I(z)$  extrait de l'image 3D et par de potentielles variations de  $\rho$  et  $\mu_{eff}$  d'une image à une autre d'un même fantôme. Les incertitudes totales sur  $\rho$  et  $\mu_{eff}$  ont ensuite été propagées dans le modèle de Jacques afin d'estimer pour chaque fantôme l'erreur résultante sur  $\mu_s$  et  $g$ . Lorsqu'elles sont propagées dans le modèle de Jacques *et al.*, les incertitudes sur  $g$  sont amplifiées pour des valeurs de  $g$  faibles. En revanche, les incertitudes sur  $\mu_s$  sont amplifiées pour des valeurs élevées de  $g$ , en raison du comportement des fonctions  $b(g)$  et  $a(g)$  du modèle, précédemment décrites. C'est pourquoi les barres d'erreurs dépendent fortement des propriétés optiques des fantômes. Ainsi, elles sont les plus larges pour les fantômes 6 à 9, présentant une valeur de  $g$  élevée.

Malgré les problèmes rencontrés avec les fantômes 7 et 9, on peut conclure que notre méthode de mesure s'applique bien aux échantillons présentant une anisotropie de diffusion moyenne à élevée ( $0.7 < g < 0.9$ ) et des coefficients de diffusion  $\mu_s$  allant jusqu'à  $12 \text{ mm}^{-1}$ , ce qui permet déjà l'application à des tissus biologiques. Pour des échantillons plus diffusants ou ayant une anisotropie plus élevée, plus de travaux seraient nécessaires pour revoir l'homogénéité des fantômes très concentrés.

### 3.3.3.5 . Mesure de $\mu_s$ et $g$ résolue par couche

Intéressons-nous désormais aux échantillons bicouches. Pour ces fantômes bicouches, deux zones distinctes de décroissance linéaire peuvent être observées sur le profil d'intensité moyen illustré à la figure 3.20. Ces deux zones correspondent aux deux couches de l'échantillon, présentant chacune des propriétés optiques distinctes. Comme pour les fantômes monocouches, le pic d'intensité en  $z = 0$  indique l'interface entre la lame de verre et le fantôme. Dans l'exemple de la figure 3.20, le pic d'intensité autour de  $110 \mu\text{m}$  de profondeur montre l'interface entre les deux couches. Pour extraire les valeurs de  $\mu_{eff}$  et de  $\rho$  dans chaque couche (notées  $\rho_{sup}$ ,  $\mu_{eff\ sup}$  et  $\rho_{inf}$ ,  $\mu_{eff\ inf}$ ), les deux couches sont segmentées en délimitant manuellement les deux zones de décroissance linéaire. Une régression linéaire est ensuite appliquée séparément sur chaque couche, comme le montre la figure 3.20.  $\rho_{sup}$  et  $\rho_{inf}$  sont convertis en fraction d'intensité rétro-diffusée tel que décrit dans le paragraphe 3.3.3.3. En raison de l'atténuation dans la couche supérieure d'épaisseur  $\delta z$ , l'intersection avec l'interface entre les deux couches (à la profondeur  $z = 110 \mu\text{m}$ ) correspond à  $\ln(\rho_{inf} e^{-2\mu_{eff\ sup}\delta z})$ .  $\rho_{inf}$  est alors obtenu en multipliant  $\rho_{inf} e^{-2\mu_{eff\ sup}\delta z}$  par un facteur de correction  $C = e^{2\mu_{eff\ sup}\delta z}$  compensant l'atténuation dans la couche supérieure. Les propriétés optiques  $\mu_s$  et  $g$  sont ensuite obtenues à partir des valeurs de  $\mu_{eff}$  et de  $\rho$  dans chaque couche en utilisant le modèle de Jacques tel que décrit dans le paragraphe 3.3.3.2.

Dans les figures 3.21 et 3.22, nous présentons les valeurs de  $\mu_s$  et  $g$  obtenus dans chaque couche pour les fantômes bicouches 1 et 2 décrits précédemment dans le tableau 3.2. Comme on peut le voir dans ce tableau, ces deux fantômes bicouches sont l'inverse l'un de l'autre et présentent des propriétés optiques distinctes. Les résultats montrent que pour chaque couche, la LC-OCT fournit des propriétés optiques qui sont cohérentes avec celles obtenues par la méthode des sphères intégrantes

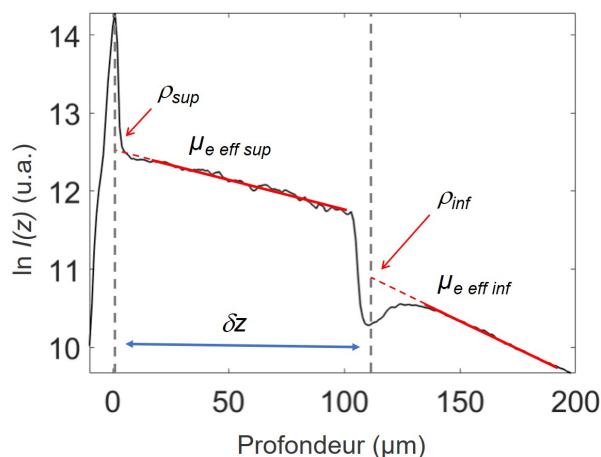


Figure 3.20 – Profil d'intensité moyenne  $I(z)$  dans l'image LC-OCT 3D d'un fantôme bicouche en fonction de la profondeur (en échelle logarithmique). Pour chaque couche, une régression linéaire (ligne rouge) est appliquée au profil d'intensité afin d'obtenir la mesure de la paire d'observables  $(\rho_{sup}, \mu_{e\text{ eff sup}})$  et  $(\rho_{inf}, \mu_{e\text{ eff inf}})$ . La valeur de  $\rho_{inf}$  est extraite de l'intersection de  $\ln I(z)$  avec l'interface entre les deux couches ( $z = 110 \mu\text{m}$ ) corrigée de l'atténuation dans la couche supérieure.

et de la transmission collimatée, les barres d'erreur des deux mesures se chevauchent. A noter que les barres d'erreurs dans les couches inférieures prennent en compte une incertitude supplémentaire due à l'erreur potentielle sur la compensation de l'atténuation dans la couche supérieure. En particulier, on peut noter un très bon accord des valeurs de  $g$  entre les deux méthodes de mesures, à la fois pour les couches supérieures et inférieures des deux fantômes bicouches. Concernant les valeurs de  $\mu_s$ , on observe également un bon accord pour l'ensemble des couches. Globalement, l'écart entre les deux méthodes de mesure sur  $\mu_s$  reste du même ordre que l'écart obtenu sur les fantômes monocouches. On peut remarquer que la valeur de  $\mu_s$  dans la couche inférieure du fantôme bicouche 2 est légèrement inférieure à la valeur de  $\mu_s$  obtenue sur le fantôme monocouche 5 seul, une légère différence qui peut éventuellement être expliquée par une contribution de la diffusion multiple plus importante que sur le fantôme monocouche 5 puisque la régression linéaire sur la couche inférieure est appliquée à des profondeurs plus élevées (de 100 à 200  $\mu\text{m}$ ) et après traversée de la couche supérieure.

Ces fantômes montrent le potentiel de la LC-OCT pour fournir des mesures par couche des valeurs distinctes de  $\mu_s$  et  $g$  à partir d'une seule image 3D, contrairement à la méthode par sphères intégrantes et transmission collimatée qui nécessite d'analyser les deux couches séparément. Par rapport à l'état de l'art actuel, l'application de notre méthode sur ces fantômes bicouches est novatrice car les fantômes multicouches rapportés dans la littérature présentent fréquemment des valeurs de  $\mu_s$  différentes d'une couche à une autre, mais une valeur de  $g$  identique dans toutes les couches. Le processus de fabrication resterait cependant à améliorer car, comme nous l'avons évoqué dans la section 3.3.1, il a été complexe d'obtenir des fantômes fins homogènes pour jouer le rôle de couche supérieure car comme sur les fantômes monocouches, nous avons pu observer la formation d'un dépôt d'agrégats dans le fond des couches fines. Une possibilité à l'avenir pourrait être d'envisager la découpe d'une couche fine au sein d'un échantillon plus épais déjà durci afin d'obtenir une couche fine homogène.



Echantillon bicouche n°1

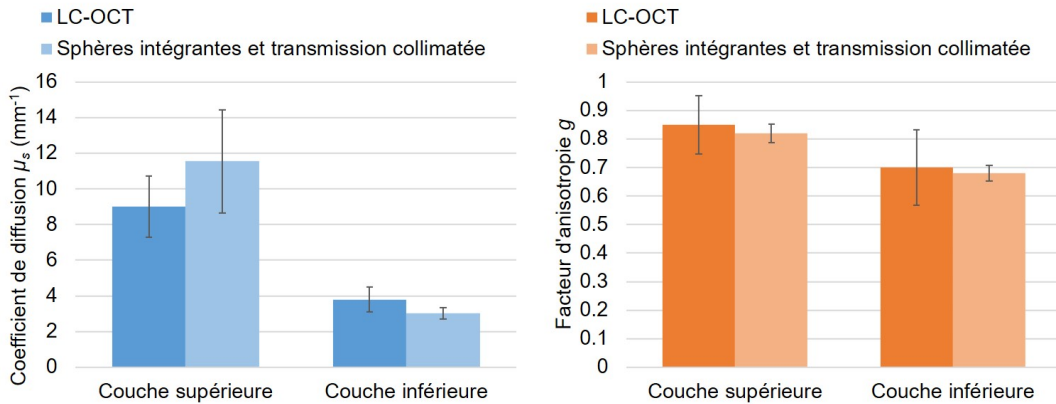


Figure 3.21 – Comparaison des valeurs de  $\mu_s$  et de  $g$  obtenues par LC-OCT et par des mesures combinées de sphères intégrantes et de transmission collimatée sur le fantôme bicouche n°1.

Echantillon bicouche n°2

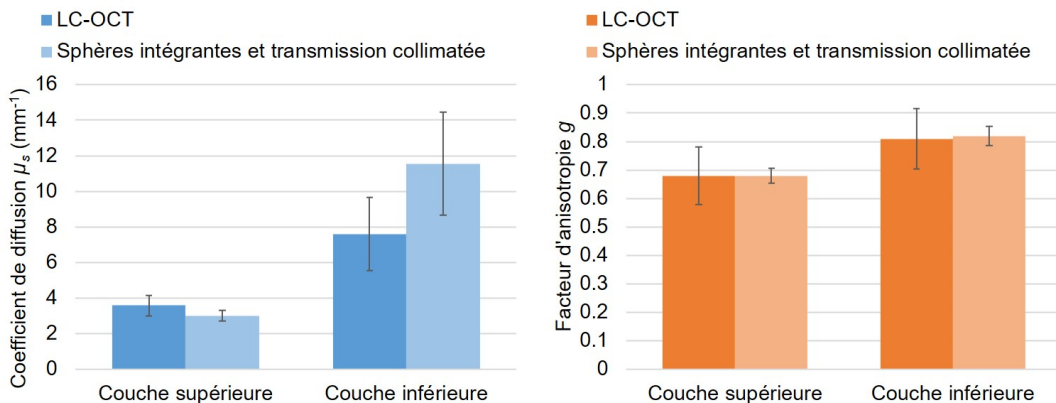


Figure 3.22 – Comparaison des valeurs de  $\mu_s$  et de  $g$  obtenues par LC-OCT et par des mesures combinées de sphères intégrantes et de transmission collimatée sur le fantôme bicouche n°2.

### 3.3.3.6 . Mesure de $\mu_s$ et $g$ résolue latéralement

Dans la section précédente, nous avons mis en évidence le potentiel de la LC-OCT pour mesurer les propriétés optiques de façon résolue par couche d'échantillon. Pour aller plus loin, nous proposons dans cette partie une méthode pour obtenir une mesure résolue latéralement des deux propriétés optiques  $\mu_s$  et  $g$ . Pour ce faire, l'idée est d'appliquer une moyenne glissante en convoluant chaque image horizontale de l'image 3D de LC-OCT par une région d'intérêt (ROI) définie dans le plan XY et de dimensions données. L'image résultant de la convolution est alors une image 3D dont chaque profil axial  $i$  correspond au profil d'intensité moyenné dans une ROI centrée sur le profil axial  $i$  de l'image LC-OCT originale. Les valeurs de  $\mu_s$  et  $g$  peuvent ensuite être extraites en appliquant une régression linéaire puis le modèle de Jacques à chaque profil axial  $i$  de l'image convoluée, pour obtenir une cartographie 2D des propriétés optiques sur l'ensemble du champ de vue latérale de l'image LC-OCT,

avec une résolution donnée par les dimensions de la ROI.

Pour choisir la taille de la ROI, nous avons mesuré les propriétés optiques  $\mu_s$  et  $g$  au sein d'une ROI centrée dans le champ de vue latéral de l'image, pour différentes tailles de ROI. Les résultats sont donnés à la figure 3.23. Ils montrent que les valeurs de  $\mu_s$  et  $g$  restent stables tant que la ROI a des dimensions supérieures à 150  $\mu\text{m}$  de côté. En dessous, l'estimation de  $\mu_s$  se dégrade nettement. En effet lorsque la ROI devient petite, le profil d'intensité devient trop bruité, résultant en une dégradation nette de la mesure de  $\rho$  et  $\mu_{eff}$  mesurés par régression linéaire, et par conséquent de  $\mu_s$  et  $g$ . Nous avons ainsi choisi une ROI de 150  $\mu\text{m}$  de côté, ce qui définit la résolution de notre mesure résolue spatialement.

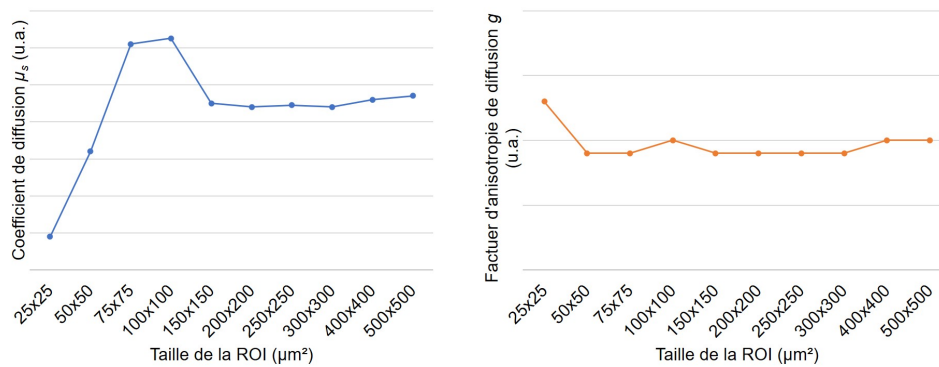


Figure 3.23 – Evolution qualitative de la mesure des propriétés optiques  $\mu_s$  et  $g$  réalisée au sein d'une ROI centrée dans l'image LC-OCT et de taille variable.

Pour montrer le potentiel de cette mesure résolue, nous avons pris l'exemple de deux fantômes de composition différente placés côte à côte. Nous avons acquis une image 3D de LC-OCT incluant ces deux fantômes dans le champ de vue du dispositif de LC-OCT, tel qu'illustré dans l'image en coupe horizontale à la figure 3.24. En appliquant la méthode décrite ci-dessus, nous avons obtenu une cartographie 2D des propriétés optiques  $\mu_s$  et  $g$ , figurant sous l'image LC-OCT à la figure 3.24. Les distributions spatiales de  $\mu_s$  et  $g$  montrent clairement deux zones aux propriétés optiques très différentes, correspondant aux deux fantômes visualisés dans le champ de vue de l'image LC-OCT. Bien que les fantômes apparaissent globalement homogènes dans l'image, quelques variations de  $\mu_s$  et  $g$  peuvent être observées, reflétant les hétérogénéités potentielles de chaque fantôme à l'échelle de la ROI choisie (150  $\mu\text{m}^2$ ). A noter que ces variations peuvent aussi être induites par des biais du dispositif de LC-OCT utilisé, si celui-ci n'est pas bien réglé sur l'ensemble du champ imagé. D'autres études sont nécessaires pour valider cette approche résolue spatialement, en utilisant par exemple des échantillons présentant des variations de propriétés optiques à l'échelle de la ROI choisie. Néanmoins cet exemple montre le potentiel de cette mesure pour apporter à la LC-OCT un outil de quantification des propriétés de diffusion de l'échantillon imagé à l'échelle de macro-pixels d'une centaine de  $\mu\text{m}$ , en complément des informations qualitatives fournies par l'image à haute résolution. En combinant cette mesure résolue latéralement avec la mesure par couche présentée dans la section précédente, il serait ainsi possible d'obtenir des mesures de propriétés optiques en 3D au sein de macro-voxels.

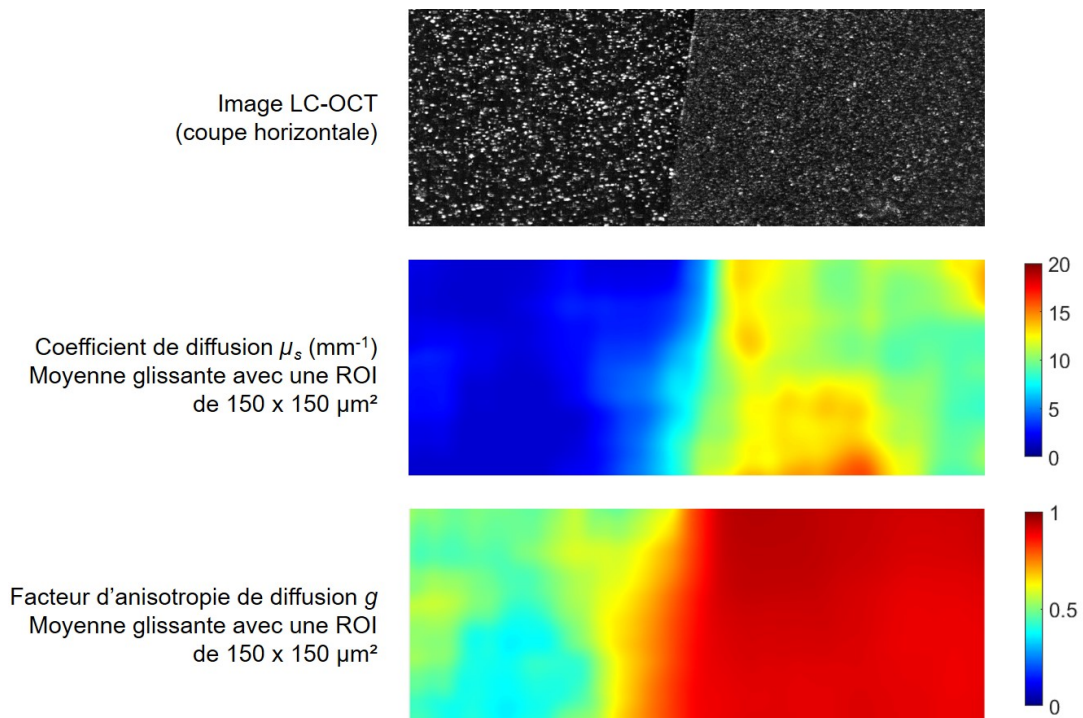


Figure 3.24 – Cartographie des propriétés optiques  $\mu_s$  et  $g$  obtenues à partir d'une unique image 3D de deux fantômes diffusants placés côte à côte.

### 3.4 . Application à la peau

Dans cette dernière partie, nous présentons des résultats préliminaires de l'application de notre méthode de mesure des propriétés optiques  $\mu_s$  et  $g$  à la peau *in vivo*. Nous avons acquis une image 3D de LC-OCT du dos de la main, et avons extrait le profil d'intensité résultant de la moyenne des profils d'intensité de toute l'image 3D. Après application d'un logarithme népérien, nous obtenons le profil d'intensité donné à la figure 3.25. Sur ce profil, trois principales zones de décroissance linéaire peuvent être observées, correspondant respectivement à la couche cornée (SC), à l'épiderme et au derme réticulaire (DR). Entre l'épiderme et le derme réticulaire se trouve une zone de remontée de l'intensité, correspondant au derme papillaire (DP) [108]. En appliquant notre méthode de mesure sur chacune des couches, nous avons extrait de ce profil les propriétés optiques  $\mu_s$  et  $g$  de la couche cornée, de l'épiderme et du derme réticulaires. En raison de la remontée d'intensité dans le derme réticulaire, les propriétés optiques de cette couche ne peuvent être mesurées par notre méthode. Les résultats sont donnés à la figure 3.26 pour une image LC-OCT 3D de peau. Les barres d'erreurs sont calculées en propageant l'incertitude sur  $\rho$  due à la calibration par le fantôme 0 dans le modèle de Jacques, pour obtenir les incertitudes résultantes sur  $\mu_s$  et  $g$ .

Les valeurs de  $\mu_s$  et  $g$  sont en bon accord avec la littérature [76, 77, 71, 68]. La couche cornée, comme nous pouvons le constater, est la couche la plus diffusante ( $\mu_s > 30 \text{ mm}^{-1}$ ) et présentant le facteur d'anisotropie de diffusion le plus élevé ( $g > 0.9$ ), des propriétés que nous avons déjà mentionnées dans le chapitre 1 à la section 1.2.4. L'épiderme présente un coefficient de diffusion de l'ordre de  $10 \text{ mm}^{-1}$  avec un facteur  $g$  de l'ordre de 0.8, également en accord avec des précédents travaux

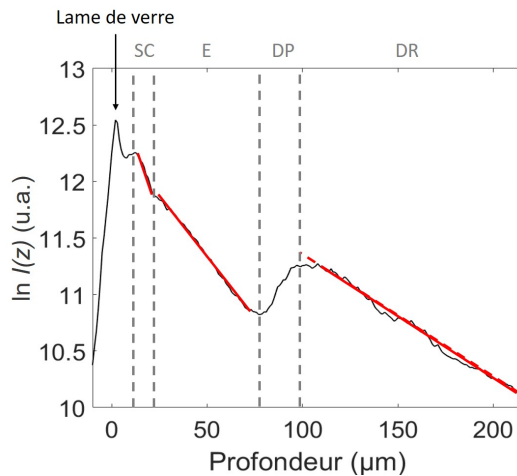


Figure 3.25 – Profil d'intensité moyenne  $I(z)$  dans une image LC-OCT 3D acquise sur le dos de la main *in vivo*.

[76, 77]. Enfin, le derme réticulaire présente un coefficient de diffusion  $\mu_s$  plus faible que l'épiderme mais toujours en accord avec la littérature [76, 77]. En revanche son facteur d'anisotropie de diffusion  $g$  semble un peu faible par rapport à la gamme de valeurs attendue, entre 0.7 et 0.95 [71, 68, 76]. En pratique, il faut noter que la mesure des propriétés optiques du derme réticulaire est impactée par la remontée de signal dans le derme papillaire situé au-dessus. En effet, l'extraction des propriétés optiques par couche est basée sur une régression linéaire et une compensation de l'atténuation dans les couches supérieures. Pour la mesure des propriétés optiques du derme réticulaire, il faut donc corriger l'atténuation de la lumière dans la couche cornée, l'épiderme et le derme papillaire. Or la remontée de signal dans le derme papillaire ne nous permet pas l'application de notre modèle basée sur la décroissance de l'intensité par diffusion. Cette remontée de signal traduit la transition entre les tissus de l'épiderme et des tissus du derme papillaire, plus hétérogènes car composé d'un mélange de matrice de fibres de collagène et d'élastine et de papilles remontant dans l'épiderme. En résulte une quantité croissante de lumière rétro-diffusée au niveau de cette couche. De ce fait, il n'est pas possible d'accéder aux propriétés optiques du derme papillaire et de compenser l'atténuation dans cette couche pour la mesure des propriétés optiques du derme réticulaire sous-jacent. La mesure des propriétés optiques du derme réticulaire est ainsi obtenue en compensant uniquement l'atténuation dans la couche cornée et dans l'épiderme. Néanmoins, si la compensation de l'atténuation du derme papillaire était possible, elle aurait plutôt tendance à augmenter la valeur de  $\rho$  mesurée dans le derme réticulaire, résultant en une valeur de  $g$  plus faible dans le derme réticulaire. Cet aspect reste à investiguer pour comprendre la nature des propriétés optiques du derme papillaire et son impact sur les propriétés optiques du derme réticulaire en dessous. D'autres explications peuvent être avancées pour cette sous-estimation du facteur d'anisotropie  $g$  du derme réticulaire, notamment la contribution de la diffusion multiple en profondeur dans le derme qui se traduit par une intensité rétro-diffusée plus importante qu'attendue en profondeur, résultant en une anisotropie  $g$  réduite.

Dans le derme, la présence d'une forte concentration de vaisseaux sanguins peut également mettre en défaut notre modèle. Bien que le coefficient d'absorption de la peau dans sa globalité soit négligeable devant le coefficient de diffusion dans la gamme du proche infrarouge (comme nous l'avions

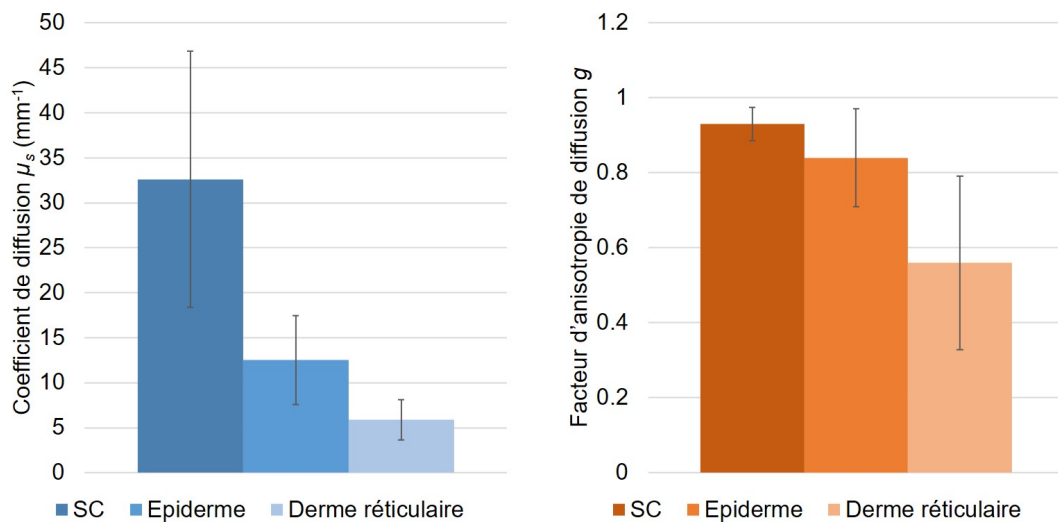


Figure 3.26 – Valeurs de  $\mu_s$  et  $g$  des différentes couches de la peau (couche cornée, épiderme et derme réticulaire) obtenues à partir d'une image LC-OCT 3D acquise sur le dos de la main *in vivo*.

mentionné en introduction), une forte concentration de vaisseaux sanguins peut résulter en une contribution significative de l'absorption au profil axial d'intensité. De façon similaire, l'absorption limite également potentiellement l'application aux peaux très pigmentées, présentant une forte concentration de mélanine. Cependant, une contribution de l'absorption, si on raisonne intuitivement, aurait plutôt tendance à résulter en une valeur de  $g$  surestimée, en raison d'un ratio  $\frac{\mu_{e\text{eff}}}{\rho}$  plus élevé dû à une atténuation plus forte de l'intensité incidente que sous l'effet de la diffusion seule.

Le modèle EHF a été investigué quelques temps au cours de cette thèse afin de voir s'il pouvait répondre à ces limitations de diffusion multiple et d'absorption. Cependant les tests réalisés jusqu'à présent sur les fantômes n'ont pas été concluants et montrent la difficulté à transposer ce modèle à la configuration d'imagerie de la LC-OCT.

Ces problématiques rencontrées dans le derme restent à investiguer avant de poursuivre dans les applications *in vivo*. Les résultats présentés ici sont donnés à titre indicatif car en pratique il faudrait appliquer la méthode sur plusieurs peaux différentes à l'avenir. Dans le cadre de ce projet, nous avons préféré nous concentrer sur la validation sur les fantômes de PDMS et, compte tenu des difficultés mentionnées au cours de ce chapitre, nous n'avons pas investigué plus applications *in vivo* pour le moment. Mais les résultats sont très encourageants quant au potentiel de notre méthode à proposer une mesure pertinente des propriétés optiques de la couche cornée et de l'épiderme *in vivo*.

### 3.5 . Conclusion et perspectives

Dans ce chapitre, nous avons présenté une méthode pour mesurer le coefficient de diffusion  $\mu_s$  et le facteur d'anisotropie de diffusion  $g$ , à partir d'une seule image LC-OCT 3D. Notre approche est basée sur l'extraction de deux observables,  $\rho$  et  $\mu_{eff}$ , de l'image LC-OCT, en appliquant une régression linéaire au profil de profondeur de l'intensité moyenne dans l'image 3D (en échelle logarithmique). À l'aide d'une calibration avec un fantôme aux propriétés optiques connues et un modèle précédemment introduit dans la littérature [34], les valeurs de  $\rho$  et  $\mu$  peuvent être mises en correspondance avec les valeurs des paramètres de diffusion  $\mu_s$  et  $g$ . Nous avons testé notre méthode sur des fantômes de PDMS contenant des nano- et micro-particules de diffusion imitant les propriétés optiques de tissus biologiques typiques, et l'avons comparée à une autre méthode couramment utilisée, basée sur des sphères intégrantes et des mesures de transmission collimatée. Les valeurs obtenues avec la LC-OCT sont cohérentes avec celles obtenues avec les sphères intégrantes et les mesures de transmission collimatée pour les fantômes présentant des coefficients de diffusion allant jusqu'à  $12 \text{ mm}^{-1}$  et des facteurs d'anisotropie  $0.7 < g < 0.9$ .

Par rapport aux mesures par sphères intégrantes et par transmission collimatée qui nécessitent de manipuler l'échantillon (le placer entre les sphères, puis le déplacer sur le banc de transmission collimatée) et impliquent des contraintes sur les caractéristiques physiques de l'échantillon (taille minimale correspondant au diamètre du faisceau des sphères intégrantes, épaisseur minimale pour être placé entre les deux sphères sans risque d'endommager l'échantillon, épaisseur maximale pour que la transmission collimatée soit possible), la LC-OCT ne nécessite pas de manipulation et de contraintes spécifiques sur l'échantillon, ce qui simplifie la procédure de mesure et faciliterait les mesures *in vivo* de  $\mu_s$  et  $g$ . De plus, la LC-OCT permet de mesurer des échantillons multicouches avec des propriétés optiques distinctes dans chaque couche, en utilisant une seule image 3D, contrairement aux sphères intégrantes et à la transmission collimatée qui nécessitent d'analyser les différentes couches séparément.

Notre approche basée sur les couches est également intéressante car peu d'articles en OCT ont rapporté la mesure de valeurs distinctes de  $\mu_s$  et  $g$  sur des échantillons multicouches [150, 166, 167]. Par rapport à ces travaux antérieurs, la méthode développée a l'avantage d'être très simple à mettre en œuvre puisqu'elle est basée sur un ajustement linéaire et un modèle de diffusion, et ne nécessite qu'une étape de calibration préliminaire, en utilisant un fantôme aux propriétés optiques connues. Puisque la LC-OCT est basée sur l'OCT dans le domaine temporel avec une mise au point dynamique, les mesures LC-OCT ne nécessitent pas de corrections pour tenir compte de la fonction confocale de la lentille de mise au point et du déclin de la sensibilité avec la profondeur, comme dans l'OCT conventionnel dans le domaine fréquentiel. C'est une autre raison pour laquelle la LC-OCT est particulièrement appropriée pour l'application du modèle de Jacques.

Pour des échantillons plus diffusants, la fabrication des fantômes devra être revue à l'avenir pour améliorer leur homogénéité et pouvoir évaluer jusqu'à quelle valeur de  $\mu_s$  notre méthode, basée sur le modèle de Jacques, permet une mesure correcte en LC-OCT. En effet, le modèle de Jacques *et al.* tient bien compte de la diffusion multiple lorsque la diffusion est fortement dirigée vers l'avant, mais il n'en tient pas compte de façon aussi extensive que le modèle Huygens-Fresnel étendu (EHF) [35]. De plus, le modèle de Jacques ne tient pas compte de l'absorption, ce qui limite l'application aux échantillons purement diffusants (excluant par exemple les tissus biologiques avec une forte concentration de

vaisseaux sanguins). Notre approche est également limitée par l'étape de calibration utilisant un fantôme de propriétés optiques déterminées par des sphères intégrant et des mesures de transmission collimatée. En particulier, la mesure de la transmission collimatée est complexe à mettre en œuvre, ce qui entraîne des incertitudes sur  $\mu_s$  et  $g$  d'autant plus importantes que  $\mu_s$  et  $g$  sont élevés. D'autres techniques de mesure de  $g$  (goniométrie) pourraient être étudiées afin de réduire les incertitudes des mesures par transmission collimatée. Cependant cette technique goniométrique, tout comme la transmission collimatée, est en réalité complexe à réaliser expérimentalement et impose des contraintes sur la géométrie des échantillons afin de pouvoir collecter l'intensité diffusée selon tous les angles [28].

Par la suite, nous avons proposé une extension de notre méthode pour obtenir les distributions spatiales des deux propriétés optiques  $\mu_s$  et  $g$  dans une image LC-OCT 3D. Cette approche nécessite une étude plus approfondie sur des échantillons hétérogènes pour mieux évaluer son potentiel. Bien qu'ayant une faible résolution par rapport à la résolution cellulaire de la LC-OCT, cette approche de mesure résolue spatialement fournit à la LC-OCT un outil pour quantifier les propriétés de diffusion de l'échantillon imagé à l'échelle macroscopique, en complément des informations qualitatives apportées par l'image de haute résolution. En combinant les mesures résolues par couche et les mesures résolues latéralement, il serait possible de cartographier en 3D les propriétés optiques  $\mu_s$  et  $g$  en découpant l'image LC-OCT en macro-voxels.

Enfin, nous avons présenté des travaux préliminaires sur la mesure des propriétés optiques des différentes couches de la peau *in vivo*. Les résultats montrent que la LC-OCT permet d'obtenir, à partir d'une unique image, les deux propriétés optiques  $\mu_s$  et  $g$  de trois principales couches de la peau (couche cornée, épiderme, derme) *in vivo* et à partir d'une unique image 3D de LC-OCT. Les valeurs obtenues sont, pour la couche cornée et l'épiderme, en très bon accord avec la littérature. Ces résultats sont prometteurs pour l'application de notre méthode à la caractérisation de la peau *in vivo*. Des travaux plus approfondis seraient nécessaires, notamment pour valider la mesure dans la couche cornée du fait de sa valeur  $\mu_s$  située au-delà de la gamme étudiée, et pour investiguer la fiabilité de la mesure dans le derme.

A terme, la mesure de propriétés optiques pourrait être utilisée comme métrique pour quantifier *in vivo* les changements dans les tissus biologiques, ou même pour observer les variations d'une zone à l'autre dans une même image 3D de LC-OCT. A partir de ces propriétés, des liens pourraient éventuellement être établis entre les changements de propriétés optiques, ayant lieu par exemple au cours du développement d'une pathologie, et les changements structuraux et organisationnels ayant lieu à l'échelle cellulaire et sub-cellulaire, comme cela a été récemment proposé par Cannon *et al.* [117]. Ces propriétés optiques pourraient également aider à la détection de changements difficilement quantifiables à partir des images morphologiques, soit car ces changements sont très subtils à l'image ou bien parce qu'ils s'effectuent à une échelle difficile à percevoir à l'œil nu. Enfin, la mesure des propriétés optiques présente également un intérêt en dermo-cosmétique pour caractériser des différences structurelles et organisationnelles entre différents types de peau, différentes catégories d'âge, ou encore pour évaluer l'effet d'un actif cosmétique sur les différentes structures de la peau [168, 169, 170].



## 4 - Couplage de la LC-OCT à la microspectroscopie Raman confocale (CRM)

### 4.1 . Introduction

Au chapitre précédent, nous avons proposé une technique permettant d'apporter à la LC-OCT des informations supplémentaires sur les propriétés optiques des tissus imagés. Ces informations sont extraites des images mêmes, à une échelle qualifiée de macroscopique par rapport à la résolution micrométrique de la LC-OCT. Dans ce chapitre, nous proposons d'apporter à la LC-OCT des informations nouvelles à l'image en couplant la LC-OCT à une autre modalité fournissant des informations d'ordre moléculaire : la spectroscopie Raman. Comme nous l'avons évoqué en introduction, la spectroscopie Raman est une modalité permettant de sonder les vibrations des liaisons chimiques des molécules du tissu analysé. Elle fournit une signature moléculaire de façon totalement non invasive et sans nécessiter de marquage.

La spectroscopie Raman a été utilisée pour la première fois pour l'étude de la peau en 1992 [171]. Les premières études se sont intéressées à l'analyse de peau *ex vivo* en raison de la faiblesse du signal Raman, impliquant des temps d'intégration de plusieurs minutes. Avec les progrès réalisés par la suite au niveau des détecteurs, les temps d'intégration ont pu être réduits, allant de l'ordre de la minute à quelques secondes, permettant l'utilisation *in vivo* de la spectroscopie Raman [172]. Depuis, de nombreux systèmes de spectroscopie Raman ont été proposés par différents groupes de recherche pour la dermatologie, notamment pour des applications de diagnostic des cancers cutanés *in vivo* [173, 174, 175, 98, 176, 177]. La plupart des systèmes Raman proposés sont des systèmes fibrés éclairant une zone de peau de dimension macroscopique, allant d'une échelle d'une centaine de  $\mu\text{m}$  pour le système développé par Philipsen *et al.* [173] à l'échelle du millimètre pour le système développé par Zhao *et al.* [98]. Ces systèmes à l'échelle macroscopique collectent un spectre Raman reflétant une moyenne de tous les composants cellulaires et extra-cellulaires présents dans le trajet du faisceau. Des changements moléculaires peuvent alors être observés au niveau d'une lésion cancéreuse, en comparaison à la peau saine adjacente. Ces systèmes fonctionnant à l'échelle macroscopique peuvent atteindre de temps d'intégration de quelques secondes [178], voire de une seconde pour le système proposé par Zhao *et al.* [98], facilitant l'utilisation en clinique.

Il y a quelques années, le potentiel de la spectroscopie Raman pour le diagnostic du cancer cutané *in vivo* a été démontré par une étude à grande échelle, menée sur près de 520 lésions cutanées par Zhao *et al.* [179], concluant en de très bonnes performances par rapport aux méthodes établies (analyse dermoscopique et histologique). Ces performances se doivent à la spécificité des informations sondées par la spectroscopie Raman. En sondant les vibrations moléculaires, la spectroscopie Raman permet d'identifier et caractériser de multiples constituants cellulaires de la peau : protéines et acides aminés les constituant, lipides, polysaccharides, pigments, acides nucléiques [49], sans se limiter aux composants porteurs de propriétés de fluorescence.

Comme nous l'avons évoqué au chapitre 1, la spectroscopie Raman peut également être implémentée dans une configuration confocale. C'est notamment ce qui a été proposé par Lieber *et al.* [177] avec un système portable de microspectroscopie Raman confocale permettant l'acquisition *in*



*in vivo* de spectres Raman dans un volume restreint à la dizaine de  $\mu\text{m}$  en extensions latérale et axiale. Ce type de système Raman confocal permet alors d'effectuer des mesures résolues spatialement. La microspectroscopie Raman confocale est un véritable outil de recherche en dermatologie, avec de nombreuses études *ex vivo* et *in vitro* visant par exemple à caractériser les changements biochimiques ayant lieu dans les tissus cutanés cancéreux [180, 181], à étudier les altérations à l'échelle cellulaire conduisant au développement de cancers cutanés [182] ou encore à étudier les mécanismes régissant la réponse thérapeutique des cellules cancéreuses en fonction de leur phénotype [183]. De récentes études *in vitro* ont également mis en lumière la capacité de la spectroscopie Raman à identifier certaines mutations impliquées dans les mélanomes, telles que les mutations du gène BRAF ou du gène NRAS [65, 184], faisant ainsi écho aux marqueurs immunohistochimiques évoqués au chapitre 1 permettant l'identification de ces mutations dans les coupes histologiques. Ces études, bien qu'effectuées *in vitro*, montrent que la spectroscopie Raman a le potentiel de fournir des informations hautement spécifiques. La microspectroscopie Raman confocale présente également un potentiel pour la délimitation des marges *in vivo* autour des lésions cutanées en amont de la chirurgie, et pour le contrôle des marges sur les échantillons *ex vivo* lors de la chirurgie [185, 186].

Par rapport aux systèmes de spectroscopie Raman fibrés opérant à l'échelle macroscopique, la microspectroscopie Raman confocale est beaucoup plus spécifique dans les informations fournies puisqu'elle permet de collecter le signal Raman provenant d'un volume restreint à l'échelle micrométrique. Elle permet ainsi d'obtenir des informations ciblées sur certaines structures données dans la peau. Cependant, la microspectroscopie Raman confocale est une modalité qui ne dispose en soi d'aucun outil de visée pour cibler ces structures d'intérêt, ce qui rend l'utilisation *in vivo* complexe. La microspectroscopie Raman confocale doit être guidée par une modalité d'imagerie pour localiser les structures d'intérêt dans la peau. Pour cela, la LC-OCT constitue une modalité idéale grâce à ses capacités d'imagerie en 3D et à sa résolution cellulaire. La combinaison de la microspectroscopie Raman et de la LC-OCT permet alors de coupler informations morphologiques à l'échelle cellulaire et informations moléculaires à la même échelle que l'image et ce dans un volume 3D de peau. La microspectroscopie Raman permettrait d'apporter à la LC-OCT des informations nouvelles, précisément localisées dans une image 3D, dans un esprit proche des marqueurs histologiques ou immunohistochimiques qui apportent des informations supplémentaires aux coupes histologiques morphologiques. Par rapport à l'histologie, la LC-OCT présente néanmoins l'avantage d'apporter une visualisation morphologique en 3D à la différence des coupes 2D. Il faut également avoir en tête que la microspectroscopie Raman confocale apporte une multitude d'informations biochimiques en parallèle (protéines, lipides, acides nucléiques et autres évoqués plus haut), plutôt qu'un marquage unique qui serait apporté par un marqueur immunohistochimique spécifique.

Dans ce chapitre, nous présentons les travaux menés au cours de cette thèse pour coupler la LC-OCT à la microspectroscopie Raman confocale. Ce couplage repose sur une approche de co-localisation entre un système de LC-OCT et un système de CRM distincts. Dans la première partie de ce chapitre, nous présentons l'état de l'art des couplages de systèmes d'imagerie OCT et RCM avec la spectroscopie Raman. En regard de cet état de l'art, nous introduisons dans une seconde partie le choix de la méthode de couplage de la LC-OCT à la CRM par co-localisation. La troisième partie de ce chapitre est consacrée à la description de l'instrumentation de ce système de CRM. Dans une quatrième partie, nous présentons la validation de ce système de CRM sur des échantillons de peau de

cochon *ex vivo*. Dans une cinquième partie, nous présentons le développement technique du couplage de la LC-OCT avec ce système de CRM par co-localisation, sa validation sur des échantillons de peau de cochon *ex vivo* puis son application à la caractérisation de biopsies de tatouage présentant des réactions cutanées. Dans une sixième partie, nous présentons les développements techniques menés pour intégrer le système de co-localisation LC-OCT/CRM sous la forme d'une plateforme motorisée, utilisable en clinique. Cette plateforme a été utilisée au CHU de Saint-Etienne pour la caractérisation de biopsies et chirurgies cutanées, et également en interne pour la caractérisation de modèles de peau *in vitro*, que nous présentons dans cette même partie. Enfin, dans une dernière partie, nous présentons les travaux réalisés pour transposer cette approche de co-localisation au couplage *in vivo* de la LC-OCT et de la CRM.

## 4.2 . Etat de l'art des couplages de systèmes d'imagerie OCT et RCM à la spectroscopie Raman

Plusieurs groupes de recherche ont proposé des systèmes combinant des modalités d'imagerie telles que l'OCT et la RCM avec la spectroscopie Raman pour des applications dermatologiques. On peut distinguer les systèmes couplés OCT/Raman et les systèmes couplés RCM/Raman. La plupart des systèmes couplés OCT-Raman ont été développés à des fins de diagnostic *in vivo* de cancers cutanés [187, 188, 189, 190]. Ces systèmes ont été conçus pour sonder de grandes surfaces de peau, avec une résolution spatiale limitée ( $> 3 \mu\text{m}$  pour l'OCT,  $> 100 \mu\text{m}$  pour la spectroscopie Raman) et de grands champs de vue (de l'ordre de plusieurs mm) [191, 189, 190, 192, 188]. L'OCT permet de repérer des zones d'intérêt macroscopiques à analyser moléculairement avec la spectroscopie Raman. Par rapport aux sondes de spectroscopie Raman seule, l'OCT apporte un guidage par l'imagerie qui permet de s'assurer que les zones d'intérêt sont effectivement ciblées. En effet, comme nous l'avons évoqué en introduction, les sondes de spectroscopie Raman ont l'inconvénient de ne pas fournir d'image, ce qui ne permet pas le ciblage de zones d'intérêt spécifiques dans la peau. Seul un spectre moyen reflétant l'ensemble de la lésion est collecté. De ce fait, le spectre résulte à la fois de tissus cancéreux mais potentiellement aussi de tissus sains inclus dans le volume sondé, ce qui risque de noyer le signal d'intérêt pour le diagnostic. Bien que l'OCT apporte un outil permettant de guider les acquisitions Raman, sa résolution n'est pas toujours suffisante pour repérer des structures suspectes à l'échelle cellulaire et le volume Raman sondé reste souvent macroscopique, incluant donc aussi potentiellement des tissus sains.

Pour accéder à un couplage à l'échelle microscopique, il faut se tourner vers les systèmes de RCM couplés à la microspectroscopie Raman confocale. Ces systèmes couplés permettent de cibler des structures à l'échelle cellulaire grâce à l'imagerie RCM. L'analyse Raman peut se faire avec une résolution allant de la mesure ponctuelle précisément localisée dans une image de RCM [193, 99], à une mesure réalisée dans une région d'intérêt (ROI) allant de quelques dizaines de  $\mu\text{m}$  à une centaine de  $\mu\text{m}$ , identifiée dans l'image de RCM [194, 195]. Contrairement aux systèmes OCT-Raman couplés, les systèmes RCM-CRM permettent d'acquérir des spectres Raman précisément localisés au niveau de cellules cancéreuses, sans être parasités par les tissus sains environnants. Le couplage à la RCM permet de cibler efficacement des structures d'intérêt avec la CRM, là où l'utilisation de la CRM seule se fait à l'aveugle. Au mieux, un balayage point par point de l'échantillon peut être effectué pour

cartographier l'échantillon, mais la faiblesse du signal Raman rend les acquisitions *in vivo* fastidieuses compte tenu de la faiblesse du signal Raman. Cependant, comme on l'a évoqué au chapitre 1, la RCM se limite à l'imagerie horizontale, ce qui peut complexifier la visualisation et l'identification de structures résolues en profondeur. Des images verticales peuvent être reconstruites à partir d'images 3D obtenues à partir d'une pile d'images RCM horizontales. Cependant, ces images verticales ne sont pas obtenues en temps réel et ont une résolution axiale plus faible que les images horizontales, elles ne permettent donc pas d'identifier facilement les micro-structures en profondeur.

Une autre approche pour combiner les modalités d'imagerie et de spectroscopie consiste à réaliser des acquisitions co-localisées, en utilisant deux systèmes distincts. Par rapport aux systèmes couplés en un même dispositif qui partagent des éléments optiques tout en ayant des spécifications techniques différentes, l'approche de co-localisation permet d'utiliser deux systèmes d'imagerie et de spectroscopie totalement indépendants. Cette approche permet donc d'utiliser chaque système dans des conditions optimales, sans faire de compromis sur leurs performances. Un système permettant l'acquisition d'images OCT et de spectres Raman co-localisés a été récemment proposé par Placzek *et al.* [196, 197] pour des applications *ex vivo*. Basée sur une translation de l'échantillon entre le système d'OCT et le système Raman à l'aide d'une platine motorisée de translation XY, la méthode proposée consiste à scanner une biopsie entière avec les deux modalités en utilisant des points d'échantillonnage prédéfinis. Cette approche permet de combiner des images OCT 3D et des cartes Raman 2D en face, mais avec des résolutions non-cellulaires et différentes entre les deux modalités (résolution latérale de 28  $\mu\text{m}$  et résolution axiale de 12  $\mu\text{m}$  pour l'OCT, zone de 100  $\mu\text{m}$  de diamètre sondée latéralement avec le système de spectroscopie en Raman).

### 4.3 . Choix de la méthode de couplage

Comme nous l'avons déjà présenté précédemment dans ce manuscrit, la LC-OCT est une modalité d'imagerie fournissant un niveau de détail cellulaire. A la différence du chapitre précédent où l'on apportait une information complémentaire à l'image LC-OCT à une échelle macroscopique, l'idée dans ce chapitre est de tirer parti de la spécificité de la spectroscopie Raman pour apporter des informations moléculaires locales, portant sur des structures cellulaires précisément identifiées dans une image de LC-OCT. Concrètement, l'objectif est par exemple de pouvoir identifier des zones et structures suspectes, dont la morphologie seule ne suffit pas à poser le diagnostic, ou bien de cibler des cellules cancéreuses dans le but d'obtenir des informations nouvelles, portant par exemple sur la mutation génétique impliquée dans un cancer cutané, information qui serait sûrement plus complexe à obtenir en sondant un volume Raman macroscopique mélangeant cellules saines et cancéreuses. Notre choix s'est donc porté sur le couplage de la LC-OCT à la microspectroscopie Raman focale afin d'obtenir des informations moléculaires spécifiques et ciblées. Par rapport aux systèmes couplés imagerie OCT-RCM/Raman, la LC-OCT présente l'avantage de disposer de modes d'imagerie 2D horizontal et vertical opérant en temps réel et tous deux avec une résolution cellulaire, ce qui permet d'identifier plus facilement des structures cellulaires, résolues en 3D dans la peau, qu'avec un système de RCM et d'OCT.

Dans un premier temps, plutôt que de coupler directement les deux modalités en un même dispositif, nous avons fait le choix de coupler la LC-OCT et la CRM par une approche de co-localisation.

Comme nous l'avons évoqué dans l'état de l'art précédent, l'approche par co-localisation permet d'utiliser deux systèmes totalement indépendants présentant chacun des performances optimales, là où le développement d'un système couplé nécessite des compromis sur les performances de chaque système, comme nous le verrons plus tard dans ce chapitre. L'idée de cette première étape de couplage par co-localisation est d'utiliser les deux modalités, optimisées chacune de leur côté, pour évaluer le potentiel du couplage, c'est-à-dire l'apport de la CRM à la LC-OCT. Bien que l'objectif ultime consiste à apporter à la LC-OCT des informations nouvelles *in vivo*, nous avons développé l'approche de co-localisation pour des applications *ex vivo* : l'idée est d'investiguer le potentiel du couplage sur des biopsies de peau ayant déjà été caractérisées conventionnellement par histologie, afin de se confronter à ce « gold standard », et ce sans s'imposer les contraintes de l'analyse *in vivo* en termes de durées d'acquisition ou de praticité de mise en œuvre par exemple. Pour développer cette approche de co-localisation, nous avons tout d'abord conçu notre propre système de microspectroscopie Raman confocale, dédiée à l'acquisition de spectres Raman de peau, que nous décrivons dans la section qui suit.

#### 4.4 . Instrumentation du système de microspectroscopie Raman confocale

Comme introduit précédemment, nous avons conçu au cours de cette thèse un montage optique de microspectroscopie Raman, dont un schéma descriptif est donné à la figure 4.1. Le montage Raman est essentiellement composé d'une source de lumière, d'un objectif de microscope, d'un jeu de filtres et d'un spectromètre. A ce montage de microspectroscopie Raman confocale, nous avons ajouté, comme en LC-OCT, une voie d'imagerie dermoscopique éclairée en lumière blanche, permettant de guider l'acquisition Raman par une image de surface de l'échantillon affichée en temps réel en parallèle de l'acquisition des spectres. En termes de spécifications, le système de CRM doit répondre à plusieurs critères : il doit permettre d'acquérir des spectres Raman à une échelle proche de celle de la LC-OCT afin de permettre un ciblage précis, il doit permettre l'acquisition en profondeur puisque la LC-OCT fournit des images en profondeur sur 500  $\mu\text{m}$ , et les acquisitions doivent se faire en des temps d'acquisition raisonnables pour espérer une utilisation future en clinique. Le choix des composants, présenté dans la suite, a été réalisé afin de répondre au mieux à ces spécifications.

##### 4.4.1 . Source

Les systèmes de spectroscopie Raman font le plus communément appel à des sources lasers comme source d'excitation Raman. Les sources lasers sont bien adaptées à cette application pour plusieurs raisons. Tout d'abord, la spectroscopie Raman nécessite théoriquement une source monochromatique, car chaque longueur d'onde du spectre de la source génère son propre spectre Raman, ce qui a pour conséquence d'élargir les raies Raman observées dans le spectre [198]. En pratique, la largeur de raie de la source est à choisir en fonction de la résolution spectrale du spectromètre utilisé : la largeur de raie doit être inférieure ou similaire à la résolution spectrale du spectromètre afin de ne pas dégrader cette dernière. Deuxièmement, la puissance de la source doit être assez élevée (quelques dizaines de mW) puisque l'effet Raman est un effet faible par nature, concernant un photon sur  $10^8$  environ. En pratique, il ne faut pas non plus endommager les échantillons en utilisant une puissance trop élevée. Au vu de la littérature, il est courant d'utiliser une puissance *in vivo* de l'ordre de 30 à 75 mW dans une

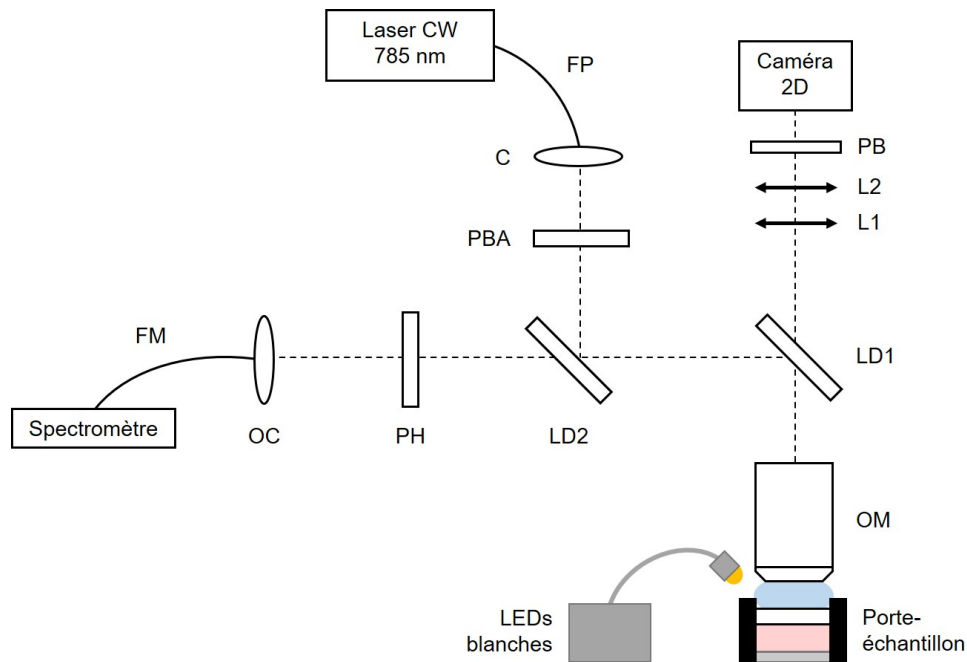


Figure 4.1 – Schéma du montage de microspectroscopie Raman. Laser CW : laser continu; FP : fibre monomode à maintien de polarisation; C : collimateur; PBA : filtre passe-bande; LD1 : lame dichroïque séparant la voie de spectroscopie Raman de la voie dermoscopique; LD2 : lame dichroïque séparant l'excitation du signal Raman; OM : objectif de microscope; PH : filtre passe-haut; OC : optique de collection; FM : fibre multimode; L1 : objectif de la voie dermoscopique; L2 : oculaire de la voie dermoscopique; PB : filtre passe-bas.

configuration confocale [199, 177, 180, 185]. Cette puissance doit être stable dans le temps afin de pouvoir comparer en intensité des spectres acquis à différents instants. De même, la longueur d'onde doit être stable dans le temps sous peine de fausser les décalages en longueur d'onde observés. Enfin, la source doit être cohérente spatialement afin de pouvoir la focaliser en un point de l'échantillon et optimiser l'efficacité du filtrage confocal. Les sources lasers monomode (longitudinal et transversal) répondent bien à l'ensemble de ces critères. La plupart des systèmes Raman modernes utilisent des lasers à l'état solide, tels que des lasers à cristaux pompés par diode ou des diodes laser, en raison de leur qualité spectrale et de leur stabilité [200].

En théorie, un spectre Raman peut être acquis à n'importe quelle longueur d'onde, le décalage Raman étant propre à la vibration sondée et indépendant de la longueur d'onde. Néanmoins, certaines longueurs d'onde sont plus optimales pour l'analyse d'échantillons biologiques. En pratique, le choix de la longueur d'onde d'excitation est guidé par quatre principaux paramètres : la quantité de signal Raman, la quantité de signal d'auto-fluorescence, la profondeur de pénétration et la plage de détection souhaitée. Bien que le décalage Raman soit indépendant de la longueur d'onde d'excitation, la section efficace de diffusion Raman dépend de la longueur d'onde  $\lambda$  et varie en  $1/\lambda^4$  [97]. L'intensité des raies Raman sera donc d'autant plus élevée que la longueur d'onde est faible. Néanmoins, il faut prendre en compte qu'aux courtes longueurs d'onde, l'auto-fluorescence de tissus biologiques est également importante. La plupart des fluorophores des tissus biologiques ont en effet une gamme d'excitation entre 200 et 500 nm [16]. Le signal d'auto-fluorescence émis par les fluorophores des tissus se caractérise généralement par un spectre d'émission relativement large et lisse, qui se superpose aux

raies Raman. Si l'auto-fluorescence est trop importante, les raies Raman peuvent être masquées. Pour minimiser l'auto-fluorescence, qui décroît avec la longueur d'onde [16], il convient d'aller vers des longueurs plus élevées, dans le rouge et le proche infrarouge. Un compromis doit alors être trouvé entre efficacité de diffusion Raman et intensité d'auto-fluorescence parasite.

Puisque nous souhaitons coupler la microspectroscopie Raman à la LC-OCT qui fournit des images 3D sur une profondeur allant jusqu'à 500  $\mu\text{m}$ , nous devons choisir une longueur d'onde qui nous permet de sonder l'échantillon en profondeur. Pour cela, comme en imagerie, les longueurs d'onde les plus adaptées sont celles comprises dans la fenêtre thérapeutique, précédemment introduite au chapitre 1. Cette fenêtre, comprise entre 600 et 1300 nm environ, garantit un minimum d'absorption qui permet de sonder les tissus en profondeur. Aller vers des longueurs d'onde plus élevées au sein de la fenêtre thérapeutique permet également de réduire la diffusion pour augmenter la pénétration.

Le choix de la longueur d'onde dépend également de la plage de détection souhaitée et des gammes de détection des capteurs disponibles. Dans le cas de tissus biologiques tels que la peau, comme on l'a vu, deux principales fenêtres d'intérêt peuvent être distinguées dans le spectre, la première allant de 600 à 1800  $\text{cm}^{-1}$  et la seconde de 2000 à 3400  $\text{cm}^{-1}$  [97]. Les détecteurs conventionnels sont des capteurs au silicium, ayant une gamme de détection allant jusqu'à  $\sim 1080$  nm [201]. Ainsi, une longueur d'onde d'excitation de 630 nm permettra de sonder le spectre Raman jusqu'à près de 5800  $\text{cm}^{-1}$ , tandis qu'une longueur d'onde de 830 nm sera limitée à 2000  $\text{cm}^{-1}$ . Il est possible d'utiliser des capteurs InGaAs (arséniure d'indium et de gallium) pour sonder des longueurs d'onde plus élevées, mais ceux-ci sont moins compacts et présentent des niveaux de bruit et des coûts plus élevés [200].

En tenant compte de tous ces paramètres, il résulte que les sources laser à 785 nm sont préférables pour l'application de la spectroscopie Raman aux tissus biologiques. Ces longueurs d'onde permettent d'avoir une faible absorption ainsi qu'une faible auto-fluorescence tout en conservant une efficacité Raman adéquate. Le proche infrarouge permet d'accéder à des profondeurs de pénétration proches de la LC-OCT tout en utilisant des détecteurs au silicium, permettant la détection du signal Raman jusqu'à 3480  $\text{cm}^{-1}$ . En cas d'échantillon avec un très haut niveau d'auto-fluorescence, des systèmes Raman à 1064 nm peuvent être utilisés [200].

Pour notre système de microspectroscopie Raman, nous avons choisi une diode laser monomode longitudinal (mono-fréquence) et monomode transversal ( $\text{TEM}_{00}$ ) à 785 nm (Micron Cheetah, Sacher Lasertechnik GmbH, Allemagne). La largeur spectrale inférieure à 0.001  $\text{cm}^{-1}$  garantit une résolution spectrale limitée par le spectromètre, comme nous le verrons dans la suite. La diode est fibrée, avec une puissance maximale de 120 mW en sortie de fibre, avec des variations de moins de 1 %.

#### 4.4.2 . Filtres

Un jeu de quatre filtres optiques est utilisé dans notre montage de microspectroscopie Raman confocale. Le premier filtre, situé en aval du collimateur, est un filtre passe-bande étroit (PB), ayant une longueur d'onde centrale de 785 nm et une largeur de bande de 3 nm. Ce filtre permet de purifier l'excitation laser en éliminant d'éventuels pics secondaires à des longueurs d'onde différentes de la longueur d'onde d'excitation, ainsi que d'éliminer la fluorescence ou le signal Raman générés au passage dans la fibre optique d'émission [202]. Si ces signaux parasites ne sont pas filtrés, ils peuvent par diffusion élastique ou diffusion Raman créer des signaux parasites dans le spectre collecté. Les deux éléments suivants sont deux lames dichroïques (LD1 et LD2). La lame LD1 est une lame

dichroïque permettant la séparation de la voie dédiée à la spectroscopie Raman de la voie d'imagerie dermoscopique. Elle présente une longueur d'onde de coupure de 750 nm, reflétant ainsi le signal Raman  $> 785$  nm et transmettant la lumière blanche utilisée pour l'imagerie dermoscopique. Nous reviendrons sur cette lame dans une des sections suivantes. La lame LD2 permet quant à elle de séparer le signal Raman du signal collecté à la longueur d'onde d'excitation. A l'émission, cette lame permet de réfléchir le faisceau Raman d'excitation en direction de l'échantillon. A la collection, la lame LD2 réfléchit la part de lumière correspondant à la diffusion élastique à 785 nm et transmet la part correspondant à la diffusion Raman  $> 785$  nm. La longueur d'onde de coupure de cette lame dichroïque doit être proche de la longueur d'onde d'excitation afin de ne pas perdre l'information aux faibles décalages Raman. La lame que nous avons choisie présente une longueur d'onde de coupure de 792.9 nm. Cependant l'atténuation de la longueur d'onde d'excitation à 785 nm par la lame dichroïque n'est pas toujours suffisante et l'intensité collectée à 785 nm peut saturer le capteur du spectromètre utilisé pour la collection. Pour éviter cela, on ajoute en aval de la lame dichroïque LD2 un filtre passe-haut (PH) permettant de filtrer plus sévèrement la longueur d'onde d'excitation tout en laissant passer l'entièreté du signal Raman  $> 785$  nm. En pratique, nous avons utilisé des filtres Semrock (LL01-785 pour le filtre passe-bande, LPD02-785RU pour la lame dichroïque, LP02-785RU pour le filtre passe-haut), dont les coefficients de transmission sont donnés à la figure 4.2.

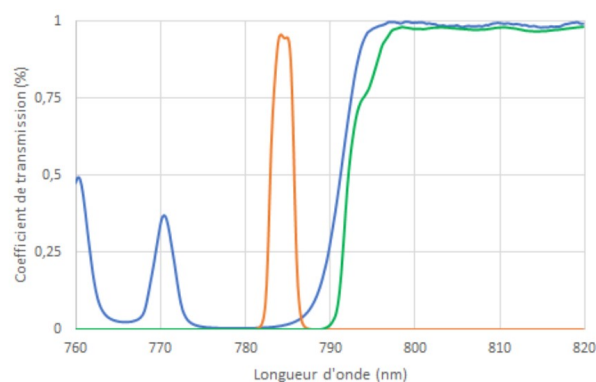


Figure 4.2 - Courbes de transmission des filtres utilisés dans le système de CRM : filtre passe-bande (orange), lame dichroïque (bleue), filtre passe-haut (vert). Figure extraite de [10].

#### 4.4.3 . Objectif de microscope

Dans notre montage, l'objectif de microscope permet à la fois de focaliser le faisceau d'excitation à 785 nm dans l'échantillon, et de collecter le signal diffusé par ce dernier, incluant la diffusion élastique et la diffusion Raman. Le choix de l'objectif va impacter les dimensions du volume Raman sondé mais également, via l'angle de collection, la quantité de signal Raman collecté. Le signal Raman étant par nature faible, il est donc intéressant d'utiliser des objectifs de microscope ayant un grand angle de collection, ou autrement dit une ouverture numérique élevée. En microspectroscopie Raman, les objectifs utilisés ont des ouvertures numériques allant en général de 0.75 à 1.2.

L'utilisation de très grandes ouvertures numériques ( $\geq 0.9$ ) permet de maximiser l'intensité Raman collectée. Néanmoins ces objectifs peuvent avoir des distances de travail assez courtes (jusqu'à 200  $\mu\text{m}$ ) afin d'atteindre de grands angles de collection. Dans le cas du couplage à la LC-OCT, cette faible



distance de travail risque de limiter la profondeur maximale pouvant être ciblée avec le système de CRM dans une image LC-OCT. Par ailleurs, les objectifs utilisés sont assez fréquemment des objectifs à immersion dans l'air, permettant d'acquérir des spectres à la surface et dans les couches les plus superficielles d'un échantillon sans introduire de bandes Raman parasites dues au milieu d'immersion (eau, huile). Cependant, une forte aberration sphérique est alors induite lors de la pénétration du point de focalisation en profondeur, du fait de la forte différence d'indice optique entre l'air et la peau. Comme illustré à la figure 4.3, le point de focalisation de l'excitation dans l'échantillon est situé plus profondément dans l'échantillon en raison de la réfraction à la surface de l'échantillon (phénomène précédemment illustré dans le chapitre 2 à la figure 2.4 en considérant  $n = 1.40$  et  $n_{im} = 1.00$ ) mais il est également situé à une profondeur différente selon que l'on considère les rayons paraxiaux (rayons rouges) ou marginaux (rayons verts). De ce fait, la distance  $DR$  entre le foyer des rayons paraxiaux et le foyer des rayons marginaux augmente avec la profondeur sondée, résultant en une distorsion du volume sondé et une dégradation de la résolution axiale avec la profondeur. En pratique, les objectifs de très haute ouverture numérique et à immersion dans l'air sont utilisés dans des systèmes de CRM dédiés à l'analyse de coupes d'échantillons *ex vivo*, où la profondeur d'imagerie n'est pas très élevée (quelques dizaines de  $\mu\text{m}$ ). Sur ces échantillons, ces objectifs permettent de maximiser le signal collecté et d'obtenir une très bonne résolution spatiale. Mais ils ne sont pas adaptés à notre objectif visant à sonder l'échantillon en profondeur.

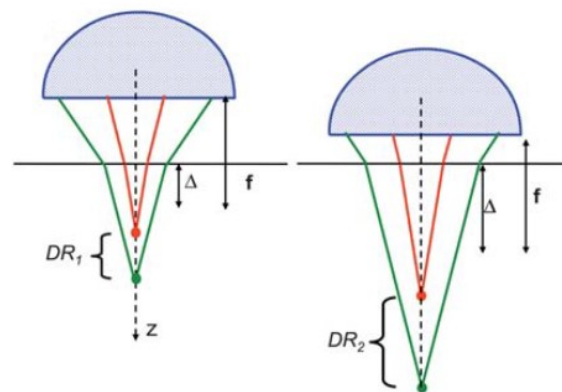


Figure 4.3 - Illustration de l'aberration sphérique pour une lentille de focale  $f$ . Lorsque l'on tente de focaliser le faisceau d'excitation à une distance  $\Delta$  au-dessous de la surface de l'échantillon, la réfraction déplace le point focal plus profondément dans l'échantillon, et la distance  $DR$  entre les foyers des rayons paraxiaux (en rouge) et marginaux (en vert) augmente avec  $\Delta$ . Figure extraite de [36].

Des objectifs à immersion à huile ont été développés, notamment par l'entreprise RiverD [203] commercialisant des systèmes CRM pour l'analyse moléculaire *in vivo* de la peau. Ces objectifs sont conçus sur mesure pour la microspectroscopie Raman dans le proche infrarouge avec une résolution micrométrique. Ces objectifs sur-mesure permettent également de sonder jusqu'à quelques centaines de microns grâce à une distance de travail de l'ordre du mm et une adaptation de l'indice grâce à l'huile d'immersion. L'utilisation de l'huile permet aussi l'accès à de très hautes ouvertures numériques ( $ON = n_{im} \sin \alpha$  avec  $n_{im}$  l'indice de l'huile et  $\alpha$  l'angle de collection). Dans ce cas, l'huile d'immersion est isolée de l'échantillon par une lame de verre contre laquelle est plaqué l'échantillon. Les systèmes Raman conçus avec ce type d'objectif ont un fort filtrage confocal, permettant d'at-



teindre une très haute résolution axiale et de minimiser la contribution du signal Raman provenant de l'immersion ou de la lame de verre.

Dans le cadre de notre application, nous avons choisi de travailler avec un objectif de microscope plus conventionnel du commerce. L'objectif choisi présente un grandissement 40x, une ouverture numérique de 0.8 et une distance de travail de 3.3 mm (LUMPLFLN40XW, Olympus, Japon). Il est conçu pour travailler à immersion dans l'eau. Le choix de l'objectif de microscope est le résultat d'un compromis entre l'ouverture numérique, la distance de travail et la présence d'aberrations. L'ouverture numérique élevée de 0.8 permet d'optimiser au mieux la collection du signal Raman tout en ayant une distance de travail suffisante pour sonder l'échantillon en profondeur. Le fait de travailler en immersion à eau permet de plus de limiter la dégradation de la résolution avec la profondeur sondée due à l'aberration sphérique. A noter qu'un objectif à immersion dans l'huile permettrait une meilleure limitation mais les objectifs à immersion dans l'huile du commerce présentent rarement une distance de travail importante. Comme nous le verrons dans la suite, une lame de  $\text{CaF}_2$  est utilisée dans notre montage en contact de l'échantillon. Du fait de la présence de cette lame, nous avons intérêt à travailler avec une grande distance de travail et une ouverture numérique raisonnable ( $< 1$ ) afin de limiter les aberrations distordant le volume Raman sondé.

#### 4.4.4 . Filtrage confocal

Comme on l'a précédemment introduit, l'objectif de microscope définit la quantité de signal collecté mais également les dimensions du volume Raman sondé en combinaison avec l'optique de collection (OC à la figure 4.1) et la fibre de collection (FM) conduisant le signal Raman au spectromètre. Dans le cadre du couplage à la LC-OCT, la résolution spatiale du système CRM doit permettre de cibler précisément une structure d'intérêt observée dans une image LC-OCT. Dans le cas d'un cancer cutané, les structures d'intérêt pourront notamment être des cellules atypiques ou des amas de cellules atypiques, dont le spectre pourra être comparé à celui de cellules saines adjacentes. Dans le cadre de notre objectif, il peut alors être intéressant de travailler à une échelle non pas micrométrique comme la LC-OCT, mais plutôt à l'échelle d'une cellule ou d'un amas de cellules ( $\sim$  une à quelques dizaines de  $\mu\text{m}$ ). En sondant un volume incluant une ou plusieurs cellules, la CRM fournit une information moléculaire reflétant la composition moyenne d'un certain type de cellule. Le fait de moyenniser cette information moléculaire à l'échelle d'une ou plusieurs cellules faciliterait ainsi la discrimination entre différents types de cellules, basées sur la signature moléculaire « typique » de chaque type de cellule.

D'un point de vue de la résolution latérale, il est néanmoins compliqué d'obtenir une résolution de l'ordre de la cellule du fait de l'ouverture numérique élevée de 0.8. La résolution latérale, dans le cas d'un faisceau laser gaussien, est définie par sa largeur à  $1/e^2$   $2w_0$  :

$$2w_0 = \frac{2\lambda}{\pi \arctan \theta} \approx \frac{2n\lambda}{\pi ON}$$

avec  $\lambda$  la longueur d'onde,  $\theta$  la divergence du faisceau,  $n$  l'indice optique du milieu et  $ON$  l'ouverture numérique de l'objectif. Pour un objectif d'ouverture numérique 0.8 et une immersion à eau, la résolution latérale théorique vaut alors  $0.83 \mu\text{m}$ , ce qui constitue en effet une résolution sub-cellulaire. Il est néanmoins préférable de travailler à haute ouverture numérique pour privilégier l'efficacité de collection du signal Raman.

Cependant, il est possible d'ajuster l'extension axiale du volume sondé en jouant sur le filtrage confocal. En effet, bien que l'objectif de microscope permette de focaliser le faisceau d'excitation en un point, l'ensemble de la profondeur de l'échantillon est éclairé et peut ainsi potentiellement générer du signal Raman. En jouant sur ce filtrage, on sélectionne non seulement l'échelle de mesure (cellulaire, tissulaire) mais on joue également sur la quantité de signal collecté. Afin d'accélérer les acquisitions, qui sont généralement longues (plusieurs dizaines de secondes) du fait de la faiblesse du signal Raman, il est intéressant d'augmenter l'extension axiale du volume sondé. L'extension axiale du volume Raman sondé est choisie en jouant sur le diamètre de la fibre de collection, guidant le signal Raman vers le spectromètre, et la focale de l'optique de collection (OC à la figure 4.1) permettant d'injecter le faisceau collimaté en sortie d'objectif dans la fibre de collection. Pour définir notre résolution axiale théorique, nous avons utilisé la définition proposée dans [204] pour la microscopie confocale, prenant comme convention la largeur à mi-hauteur ( $FWHM_{axiale}$ ) :

$$FWHM_{axiale} = 0.67 \frac{\lambda}{n - \sqrt{n^2 - ON^2}} \sqrt{1 + p^2}$$

avec  $n$  l'indice optique de l'échantillon et  $p$  une grandeur sans dimension définie comme le rapport du diamètre de la fibre de collection dans l'espace objet et le diamètre d'une tache de diffraction définie par l'expression  $1.22\lambda/ON$ . A noter que cette expression est valable dans le cas d'un éclairage par une onde plane, ce qui ne correspond pas réellement à notre système utilisant un faisceau laser gaussien. Dans le cadre de notre montage, le terme  $p$  est régi par le diamètre de la fibre de collection et par le grandissement formé par l'objectif de microscope et l'optique de collection utilisés. Pour notre montage, nous avons ciblé une résolution axiale de l'ordre de 20 à 30  $\mu\text{m}$ . Cette échelle de taille permet d'obtenir un volume Raman incluant 1-3 cellules mais également d'augmenter la quantité de signal Raman collecté par rapport à une collection purement confocale, tel que mentionné plus haut. Pour cela, nous avons choisi une fibre multimode de 105  $\mu\text{m}$  de cœur ainsi qu'une optique de collection de 33 mm de focale. En prenant en compte le grandissement  $g = f_{collec}/f_{obj} = 33/4.5$  avec  $f_{collec}$  la focale de l'optique de collection et  $f_{obj}$  la focale de l'objectif de microscope, nous obtenons un paramètre  $p \approx 14$  et une résolution axiale théorique ( $FWHM_{axiale}$ ) de 24  $\mu\text{m}$ . En pratique, la résolution axiale du montage de la figure 4.1 a été mesurée expérimentalement en translatant en  $z$  le point de focalisation au travers d'un échantillon de silicium cristallin, dont le spectre Raman est composé d'une raie quasiment unique à 521  $\text{cm}^{-1}$ . En acquérant une succession de spectres Raman au cours du balayage de l'échantillon, on peut extraire un profil d'intensité du pic à 521  $\text{cm}^{-1}$  en fonction de la profondeur balayée, tel qu'illustré à la figure 4.4. La résolution axiale est alors donnée par la largeur à mi-hauteur de ce profil. On mesure une résolution axiale expérimentale de 30  $\mu\text{m}$ , proche de la résolution théorique.

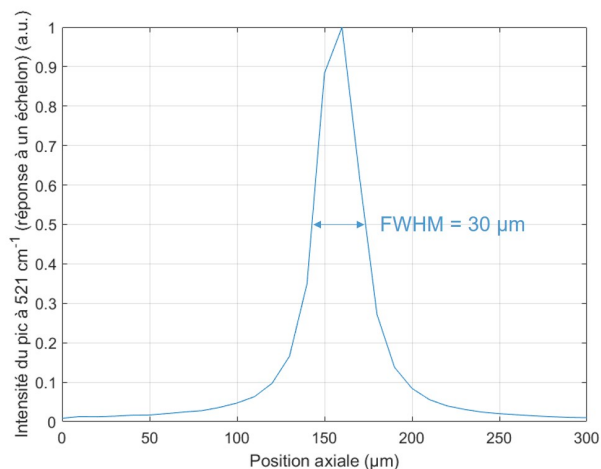


Figure 4.4 – Mesure de la résolution axiale du montage de CRM. Un échantillon de silicium cristallin est utilisé comme échantillon. Grâce à une platine de translation en  $z$ , l'échantillon de silicium est déplacé par pas de  $5 \mu\text{m}$  et le spectre collecté de l'échantillon est mesuré pour chaque position. On représente ici l'intensité du pic à  $521 \text{ cm}^{-1}$  du silicium, en fonction de la position axiale de la platine. La largeur à mi-hauteur permet d'obtenir une résolution axiale de  $30 \mu\text{m}$ .

#### 4.4.5 . Spectromètre

La lumière collectée par l'objectif est injectée dans la fibre de collection par l'optique de collection, puis guidée par la fibre jusqu'à un spectromètre. Un exemple de spectromètre est donné à la figure 4.5. Celui-ci est constitué de trois principaux éléments : une fente, un réseau de diffraction et un capteur. La fente permet de sélectionner la quantité de signal Raman envoyée dans le spectromètre en entrée de celui-ci. Sa largeur régit à la fois le flux envoyé sur le détecteur et la résolution spectrale maximale pouvant être atteinte puisque la taille du faisceau en entrée régit la taille du spot collecté sur le capteur du spectromètre. La taille de la fente résulte alors d'un compromis entre la quantité de flux transmis et la résolution spectrale.

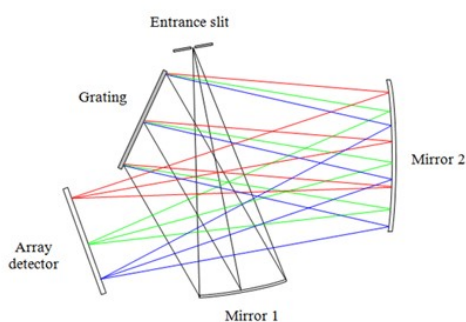


Figure 4.5 – Exemple d'architecture d'un spectromètre (configuration croisée Czerny-Turner). Celui-ci comporte une fente, un réseau, un détecteur ainsi qu'un ensemble d'optiques (ici des miroirs concaves) focalisant la lumière dispersée par le réseau sur le détecteur. Figure extraite de [37].

Le réseau de diffraction d'un spectromètre détermine la gamme de longueurs d'onde détectable, ainsi que la résolution spectrale atteignable. Le pouvoir dispersif du réseau est déterminé par le nombre de rainures par mm dans le réseau. La fréquence des rainures du réseau détermine la gamme

de longueurs d'onde couverte par le spectromètre et régit également la résolution spectrale. Pour une géométrie fixe donnée telle qu'illustrée à la figure 4.6 (taille de capteur fixe par exemple), la gamme spectrale couverte est d'autant plus grande que la dispersion est faible. Cependant la résolution spectrale à l'inverse sera d'autant plus élevée que le pouvoir dispersif du réseau est élevé, les longueurs d'ondes étant mieux séparées angulairement les unes des autres.

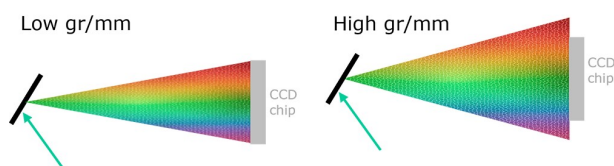


Figure 4.6 – Dispersion de la lumière par un réseau à faible (« Low gr/mm ») et à forte (« High gr/mm ») densité de rainures. Pour une taille de capteur donnée, une faible densité de rainures permet de couvrir une large gamme de longueurs d'ondes, tandis qu'une forte densité de rainures couvre une plage de longueurs d'onde plus faible, mais permet potentiellement d'accéder à une meilleure résolution spectrale. Figure extraite de [38].

Le détecteur d'un spectromètre est constitué d'une rangée de pixels, chacun d'entre eux collectant le signal correspondant à une longueur d'onde particulière (ou plutôt une petite gamme de longueurs d'onde définie par la résolution spectrale) grâce à la dispersion réalisée par le réseau, tel qu'illustré dans la figure 4.6 précédente. Chaque pixel génère un signal électrique d'intensité proportionnelle à la quantité de lumière qui l'atteint. Les dispositifs à couplage de charge (CCD) sont les détecteurs les plus fréquemment utilisés dans les spectromètres Raman en raison de leur gamme dynamique élevée et de leur réponse uniforme. Le signal Raman étant faible, ces détecteurs CCD sont généralement refroidis pour limiter le bruit d'obscurité et atteindre une haute sensibilité. Pour des longueurs d'onde d'excitation dans le visible jusqu'au proche infrarouge (785 nm), des capteurs au silicium sont couramment utilisés car ils sont sensibles à des longueurs d'onde allant un peu au-delà de 1000 nm, ce qui permet de couvrir une gamme de décalage Raman allant jusqu'à environ  $3000\text{ cm}^{-1}$ , tel que précédemment expliqué dans la section 4.4.1. La taille des pixels doit être choisie en accord avec le pouvoir dispersif du réseau afin de pouvoir correctement échantillonner chaque longueur d'onde. Des pixels plus petits permettront de travailler avec des réseaux plus dispersifs et d'atteindre une meilleure résolution spectrale. Enfin, des optiques sont utilisées pour focaliser le faisceau en entrée du spectromètre, ensuite dispersé par le réseau, sur les pixels de la caméra. Ces optiques peuvent être des lentilles ou des miroirs concaves selon la configuration de spectromètre choisie.

Le spectromètre choisi pour notre montage est conçu spécifiquement pour la spectroscopie Raman avec une excitation à 785 nm (QE Pro-Raman+, Ocean Insight, Etats-Unis). Il s'agit d'un spectromètre permettant de couvrir une plage de décalages Raman allant de 150 à  $3000\text{ cm}^{-1}$ . Ce spectromètre utilise un réseau ligné et un détecteur CCD éclairé par l'arrière et refroidi. Ce type de capteur présente une efficacité quantique élevée (90 %) et un faible niveau de bruit, permettant d'obtenir un rapport signal/bruit, une dynamique et une sensibilité adaptés à des applications Raman sur des longs temps d'acquisition. Le spectromètre est fibré et compact, ce qui facilitera le déplacement de notre montage Raman chez de potentiels laboratoires ou partenaires comme nous le verrons dans la suite. Il présente une résolution spectrale de  $11\text{ cm}^{-1}$ , qui constitue un bon compromis pour visualiser de façon satisfaisante les raies Raman de la peau (on trouve dans la littérature des systèmes Raman dédiés à l'analyse *in vivo* de la peau avec une résolution de l'ordre de  $8\text{ cm}^{-1}$  [98, 205, 206]), tout en

couvrant quasiment l'ensemble des deux bandes spectrales d'intérêt pour la peau ( $600\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$  et  $2000\text{-}3400\text{ cm}^{-1}$ ) avec des temps d'acquisition raisonnables (quelques dizaines de secondes). Bien sûr d'autres systèmes CRM pour la dermatologie *in vivo* ont été proposés avec des résolutions spectrales plus élevées, de  $1$  à  $4\text{ cm}^{-1}$  [207, 208] en utilisant des spectromètres généralement plus onéreux et moins compacts que celui utilisé dans le cadre de cette thèse. En résumé ce dernier constitue un bon choix à la fois en termes de résolution spectrale, couverture en longueur d'onde, performances de détection, compacité et coût.

#### 4.4.6 . Voie d'imagerie dermoscopique

Comme dans le dispositif LC-OCT, une voie d'imagerie de surface de l'échantillon a été intégrée dans le dispositif CRM. En effet, comme introduit au début de ce chapitre, un système de CRM conventionnel fournit un spectre en un point de l'échantillon analysé, mais aucune image ne permet de guider l'acquisition. Le ciblage est ainsi limité par la précision du positionnement du faisceau laser à l'œil nu sur l'échantillon, sans avoir aucune information sur la morphologie interne 3D à l'échelle microscopique des structures ciblées par le point de focalisation. Comme on le verra dans la suite de ce manuscrit, l'ajout d'une voie d'imagerie de surface au système CRM est bénéfique à la fois pour acquérir des spectres Raman précisément localisés au sein d'une image LC-OCT, mais également pour effectuer des acquisitions Raman seules, notamment *in vivo*. Cette image de surface, affichée en temps réel et en parallèle de l'acquisition des spectres, constitue à elle seule un véritable outil pour guider les acquisitions de spectres Raman en XY et à une échelle microscopique.

La voie d'imagerie de surface est identique dans son principe à celle implémentée dans le dispositif de LC-OCT, décrite dans le chapitre 2. Elle utilise une source à LED (8 W LED Dual Gooseneck Spot Light, Omano, Etats-Unis) placée en externe du montage pour éclairer l'échantillon en lumière blanche. La lumière réfléchiée par la surface de l'échantillon est collectée par le même objectif de microscope que celui utilisé pour l'acquisition de spectres Raman. Elle est séparée de l'excitation à  $785\text{ nm}$  et du signal Raman à l'aide d'une lame dichroïque (FF750-SDi02, Semrock Inc., Etats-Unis). À l'aide d'un relais afocal de deux lentilles similaire à celui utilisé dans le dispositif LC-OCT, l'image de surface est relayée jusqu'à une caméra 2D équipée d'une micro-lentille (uEye XS, IDS Imaging Development Systems GmbH, Obersulm, Allemagne). Cette micro-lentille à focalisation ajustable permet de projeter l'image sur le capteur de la caméra. L'image de surface couvre un champ de vision de  $1.4\text{ mm}$  de diamètre et a une résolution spatiale de  $3\text{ }\mu\text{m}$ , comme l'illustre la figure 4.7.

#### 4.5 . Acquisitions de spectres Raman de peau *ex vivo*

Pour valider ce montage de CRM pour l'acquisition de spectres Raman de peau, nous avons acquis des spectres sur des échantillons *ex vivo* de peau de cochon. La peau de cochon est souvent utilisée comme modèle de peau humaine pour la spectroscopie Raman, car sa structure et sa composition chimique sont proches de celles de la peau humaine [209].

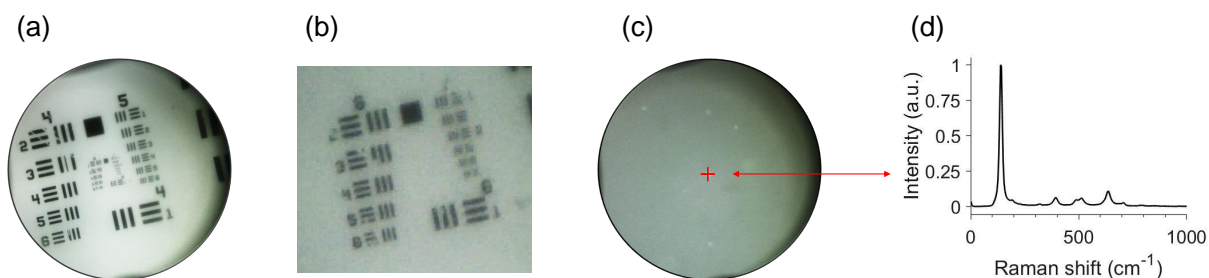


Figure 4.7 - Image de surface en couleur fournie du système de CRM. (a) Image de surface d'une cible de résolution USAF. L'image de surface couvre un champ de vision de 1.4 mm de diamètre. (b) Zoom de l'image de surface de (a), montrant une résolution de 3  $\mu\text{m}$ . (c) Image de surface d'un fantôme de PDMS comprenant des billes de dioxyde de titane ( $\text{TiO}_2$ ). La croix rouge représente l'emplacement latéral du point focal du système de CRM dans l'image de surface et cible ici une bille de  $\text{TiO}_2$ . (d) Spectre Raman associé à la bille de  $\text{TiO}_2$  ciblée en (c), faisant apparaître des raies Raman attribuées à la forme anatase du  $\text{TiO}_2$  à 143, 396, 512, 521 et 639  $\text{cm}^{-1}$ . Figure extraite de [39].

#### 4.5.1 . Porte-échantillon

Afin de faciliter l'acquisition de spectres sur des échantillons *ex vivo*, un porte-échantillon, illustré à la figure 4.8, a été conçu afin de maintenir les échantillons immobiles au cours des acquisitions. Ce porte-échantillon aura son importance pour les expérimentations de co-localisation, comme nous le verrons par la suite.

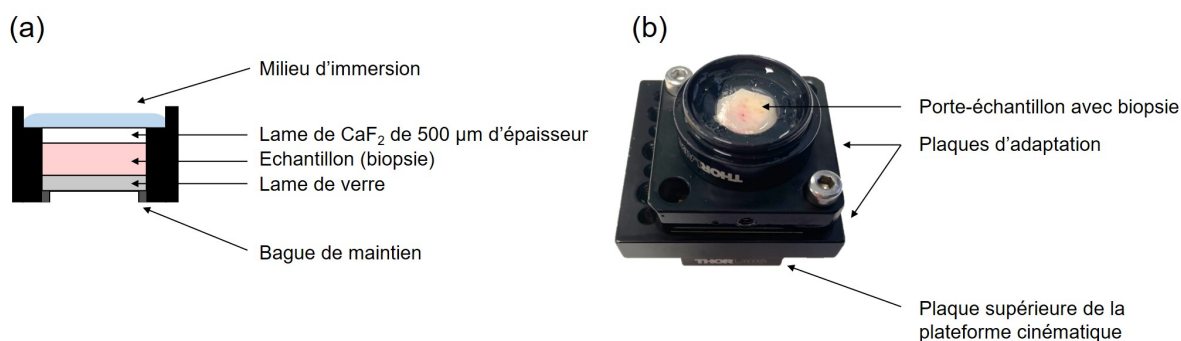


Figure 4.8 - a) Description schématique et b) photographie du porte-échantillon dédiée à la co-localisation LC-OCT/CRM.

Le haut du porte-échantillon est recouvert d'une lame de 500  $\mu\text{m}$  d'épaisseur faite de fluorure de calcium ( $\text{CaF}_2$ ) (Crystran Ltd, Poole, Royaume-Uni). Le  $\text{CaF}_2$  est un matériau très bien adapté à la spectroscopie Raman car contrairement à la silice fondue, sa signature Raman est composée d'un seul pic Raman à 321  $\text{cm}^{-1}$ , minimisant ainsi le signal Raman de fond superposé aux spectres Raman des échantillons de peau. Le contact optique entre la fenêtre  $\text{CaF}_2$  et l'échantillon de peau est obtenu en utilisant une très fine couche d'huile de paraffine. Du fait de la résolution axiale de 30  $\mu\text{m}$  de notre système de CRM, la contribution du spectre de cette fine couche impacte peu les spectres acquis dans la peau. L'échantillon est placé dans le porte-échantillon avec sa surface dirigée vers la lame  $\text{CaF}_2$ . Une lame de verre est ajoutée sous l'échantillon et sa position est ajustée à l'aide d'une bague permettant de presser doucement l'échantillon contre la fenêtre supérieure et ainsi empêcher tout déplacement de l'échantillon pendant les expériences de co-localisation. De l'eau est ajoutée sur le dessus du porte-échantillon comme milieu d'immersion.

Du fait de la présence de cette lame de  $\text{CaF}_2$  entre le milieu d'immersion et l'échantillon, la résolution axiale du système de CRM peut être impactée. De ce fait, nous l'avons à nouveau mesurée en conditions « réelles », c'est-à-dire en présence de cette lame de  $\text{CaF}_2$ . Pour cela, on utilise la méthode proposée par Caspers *et al.* [193]. Pour cela, on a placé un échantillon de PDMS, d'indice optique proche de la peau, dans le porte-échantillon. On positionne le porte-échantillon sur une platine de translation verticale placée sous l'objectif de microscope du système de CRM. Grâce à la platine de translation, on acquiert des spectres Raman sur un court temps d'intégration (1 s) tout en translatant axialement la position du point focal du système CRM au travers de l'interface entre la lame de  $\text{CaF}_2$  et l'échantillon de PDMS. Du fait de la différence d'indice optique entre le milieu d'immersion à eau  $n_{im} = 1.33$  et la lame de  $\text{CaF}_2$  et l'échantillon  $n_{\text{CaF}_2} \approx n = 1.43$ , le point focal du système CRM se déplace d'une quantité  $z_{foc} = \frac{n}{n_{im}}z$  lorsqu'un déplacement  $z$  est effectué sur la platine (comme expliqué dans le chapitre 2 à la section 2.3.1). On trace alors le profil de l'intensité du pic à  $321 \text{ cm}^{-1}$  du  $\text{CaF}_2$  en fonction de la position axiale du point focal du système CRM, tel qu'illustré à la figure 4.9a). En dérivant ce profil en fonction de la position axiale, on obtient la réponse à un plan infiniment fin (figure 4.9b), *i.e.*, une réponse similaire à celle obtenue lors de la mesure de résolution axiale sur silicium. La résolution axiale obtenue est alors donnée par la largeur à mi-hauteur du profil dérivé. On mesure une résolution axiale de  $29 \mu\text{m}$ , similaire à la résolution obtenue sur silicium, sans lame de  $\text{CaF}_2$ . La présence de la lame de  $\text{CaF}_2$  ne semble donc pas impacter la résolution axiale.

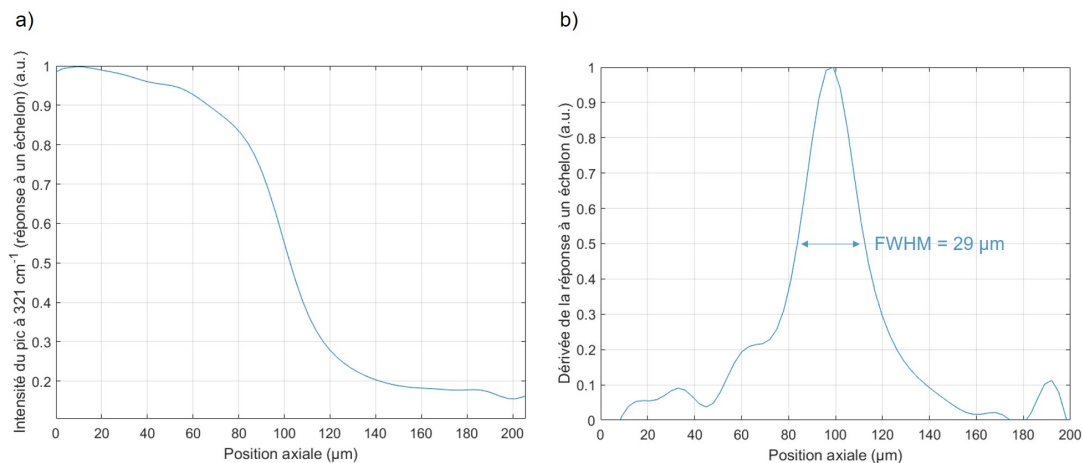


Figure 4.9 – Mesure de la résolution axiale du montage de CRM en conditions « réelles » en présence de la lame de  $\text{CaF}_2$  du porte-échantillon. Grâce à une platine de translation en  $z$ , la lame de  $\text{CaF}_2$  du porte-échantillon est déplacée par pas de  $5 \mu\text{m}$  et le spectre collecté pour chaque position axiale. On représente en a) l'intensité du pic à  $321 \text{ cm}^{-1}$  du  $\text{CaF}_2$ , en fonction de la position axiale de la platine. En dérivant ce profil, on obtient le graphique en b) dont la largeur à mi-hauteur indique une résolution axiale de  $29 \mu\text{m}$ .

#### 4.5.2 . Acquisition de spectres Raman

Une fois l'échantillon de peau de cochon placé dans le porte-échantillon, le porte-échantillon est placé sous l'objectif du microscope de système de CRM, tel qu'illustré à la figure 4.1. Pour ajuster la hauteur du porte-échantillon par rapport au point focal de l'objectif de microscope, le porte-échantillon est placé sur une platine de translation verticale. Afin de situer la profondeur à laquelle sont acquis les spectres dans l'échantillon, la surface de l'échantillon est tout d'abord repérée à l'aide du signal Raman de la lame de  $\text{CaF}_2$ . Pour ce faire, on procède comme pour la mesure de résolution axiale, en translatant axialement la platine de façon à translater le point focal du système CRM au travers de l'interface entre la lame de  $\text{CaF}_2$  et l'échantillon. On trace le profil de l'intensité du pic à  $321 \text{ cm}^{-1}$  du  $\text{CaF}_2$  en fonction de la position axiale sur la platine de translation. La position pour laquelle l'intensité du pic du  $\text{CaF}_2$  vaut la moitié de sa valeur maximale nous donne alors la position de la platine pour laquelle le point focal est positionné à la surface de l'échantillon. A partir de ce positionnement du point focal à la surface, il est alors possible de contrôler la profondeur sondée dans l'échantillon en le translatant à l'aide de la platine, en prenant en compte la différence d'indice optique entre le milieu d'immersion à eau ( $n_{im}$ ) et l'échantillon ( $n$ ) résultant en une translation du point focal d'une quantité  $z_{foc} = \frac{n}{n_{im}}z$  dans l'échantillon lorsqu'un déplacement  $z$  est effectué sur la platine.

Un exemple de spectre acquis à une profondeur de  $50 \mu\text{m}$  dans un échantillon de peau de cochon est donné à la figure 4.10. Ce spectre a été acquis avec une puissance de  $40 \text{ mW}$  envoyée sur l'échantillon, une puissance considérée comme raisonnable pour un échantillon *ex vivo* compte tenu des puissances comprises entre  $30$  et  $75 \text{ mW}$  utilisées *in vivo* dans des configurations confocales [199, 177, 180, 185]. Le signal Raman collecté de l'échantillon étant par nature faible, des temps d'intégration relativement longs (par rapport à la LC-OCT notamment) sont nécessaires. Ici, le temps d'intégration a été fixé à  $10 \text{ s}$  et 3 accumulations ont été réalisées. Le spectre affiché ici couvre une gamme de décalages Raman allant de  $400$  à  $3000 \text{ cm}^{-1}$ .

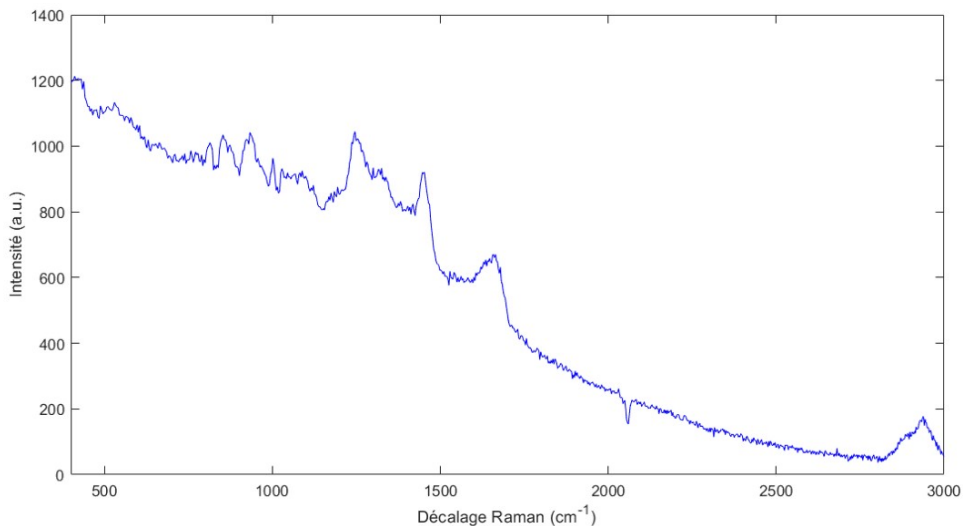


Figure 4.10 – Spectre brut collecté à  $50 \mu\text{m}$  de profondeur dans l'échantillon par le système de CRM, avec une puissance de  $40 \text{ mW}$ , un temps d'intégration de  $10 \text{ s}$  et 3 accumulations.



### 4.5.3 . Traitements des spectres

Le spectre de la figure 4.10 est un spectre brut dépourvu de tout traitement. On y distingue des raies et bandes à certains décalages, superposés à un fond continu correspondant au signal d'auto-fluorescence de l'échantillon. Afin de mieux visualiser le spectre de diffusion Raman, le fond d'auto-fluorescence est généralement soustrait du spectre brut. Pour ce faire, on utilise généralement des algorithmes consistant à approximer le fond d'auto-fluorescence par une fonction polynomiale dont on peut choisir le degré. Généralement, des polynômes d'ordre 4 à 6 sont utilisés pour approximer l'auto-fluorescence de tissus biologiques [210]. Un exemple est donné à la figure 4.11, où le signal d'auto-fluorescence du spectre brut est approximé sur la gamme 400-1800  $\text{cm}^{-1}$  par un polynôme d'ordre 5 représenté par la courbe rouge. En soustrayant le signal inférieur à cette courbe rouge, on obtient un spectre dit corrigé de la ligne de base, c'est-à-dire corrigé du fond dû à l'auto-fluorescence. Plusieurs algorithmes sont disponibles dans la littérature. Dans le cadre de cette thèse, nous avons utilisé l'algorithme MATLAB proposé par Mazet *et al.* [211] et disponible gratuitement en ligne.

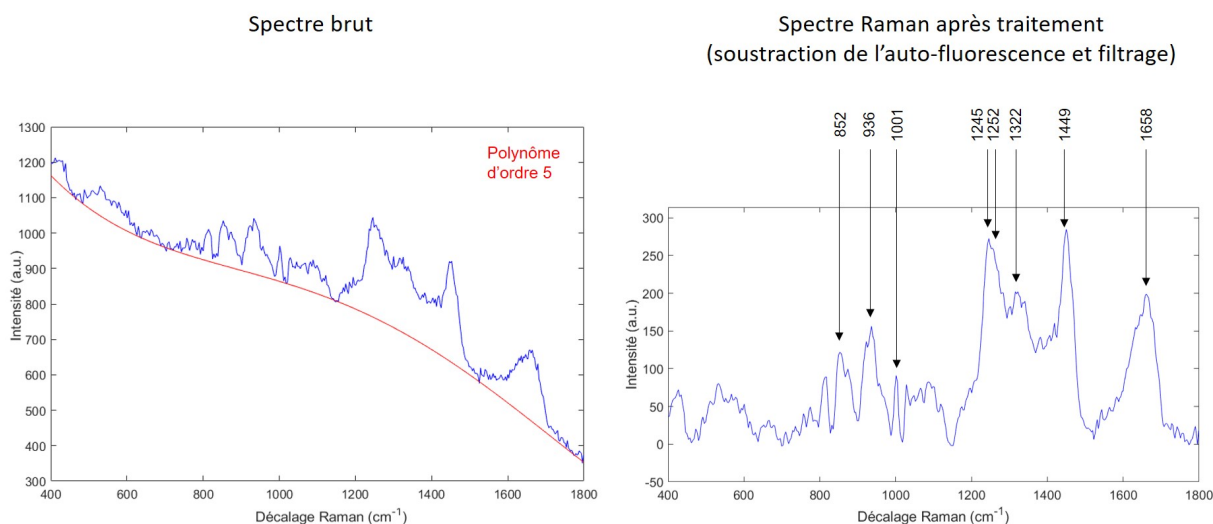


Figure 4.11 – Suppression de l'auto-fluorescence d'un spectre Raman. Le spectre de gauche correspond au spectre brut, réduit ici à la gamme 400-1800  $\text{cm}^{-1}$ . La courbe rouge représente le fond d'auto-fluorescence superposé au signal Raman, approximé ici par un polynôme d'ordre 5. On peut alors supprimer ce fond d'auto-fluorescence pour obtenir le spectre de droite. Le spectre de droite est de plus lissé par un filtre de Savitzky-Golay utilisant un polynôme d'ordre 3 sur une fenêtre de 5 points consécutifs. Les principales raies caractéristiques de la peau [40] sont pointées par des flèches.

Comme nous pouvons le constater sur le spectre brut de la figure 4.10, le spectre peut être entaché d'un bruit de haute fréquence. Celui-ci peut être lissé par différentes approches : filtrage par moyenne glissante, médiane glissante, filtrage de Savitzky-Golay ou encore filtrage dans l'espace de Fourier [212]. Le lissage du spectre augmente avec la taille de la fenêtre glissante. Le filtre de Savitzky-Golay est une technique de filtrage par « polynôme glissant ». Il consiste à approximer le spectre localement (sur quelques points consécutifs du spectre) par un polynôme [213]. Il s'agit d'un filtre fréquemment utilisé pour le débruitage des spectres Raman car il présente l'avantage de mieux conserver les formes de raies et bandes Raman que les filtres par moyenne ou médiane glissante par exemple. Le spectre de droite de la figure 4.11 est un exemple de spectre corrigé de l'auto-fluorescence puis lissé par un filtre de Savitzky-Golay utilisant un polynôme d'ordre 3 sur une fenêtre de 5 points consécutifs tel

que recommandé par Barton *et al.* [213].

#### 4.5.4 . Lecture des spectres Raman

Comme on l'a précédemment évoqué, la peau de cochon présente une structure et composition chimique proche de la peau humaine [209]. Son spectre, donné à la figure 4.11, présente plusieurs raies, pointées par les flèches noires (non exhaustives), situées à des décalages caractéristiques de la peau de cochon précédemment rapportées dans la littérature [40]. Ces raies correspondent à des modes de vibrations des liaisons moléculaires, comme nous l'avons introduit au chapitre 1. Il y a plusieurs niveaux de lecture de ces raies, allant d'une lecture détaillée, attribuant chaque raie au mode de vibration spécifique d'une liaison chimique précise, à une lecture plus « biomoléculaire », attribuant les raies aux biomolécules constitutives des cellules, telles que les protéines et les acides aminés les constituants (par exemple tyrosine, phénylalanine, tryptophane), les lipides ou l'ADN.

Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes limités pour les spectres de peau à une lecture biomoléculaire, en précisant éventuellement les groupements chimiques ou liaisons chimiques impliquées : par exemple les groupements CH<sub>2</sub> des lipides, groupes amide I (RCONH<sub>2</sub>, RCONHR' ou RCONR''R''') et amide III ((RCO)<sub>3</sub>N) des protéines, etc. Dans le tableau 4.1, nous présentons une attribution biomoléculaire indicative des raies Raman principales observées dans le spectre de la peau de cochon de la figure 4.11.

Raie Raman	Attribution biomoléculaire indicative (groupements impliqués) [40]
852 cm <sup>-1</sup>	Tyrosine (cycle)
936 cm <sup>-1</sup>	Protéines (liaisons C-C)
1001 cm <sup>-1</sup>	Phénylalanine (cycle)
1245 cm <sup>-1</sup>	Protéines (groupes amide III)
1252 cm <sup>-1</sup>	Protéines (groupes amide III) et ARN
1322 cm <sup>-1</sup>	Protéines et ADN
1449 cm <sup>-1</sup>	Protéines et lipides (liaisons C-H)
1658 cm <sup>-1</sup>	Protéines (groupes amide I)

Table 4.1 – Attribution biomoléculaire indicative des raies Raman principales observées dans le spectre de la peau de cochon.

#### 4.5.5 . Acquisitions en profondeur

Pour aller plus loin, nous avons acquis des spectres Raman à différentes profondeurs dans l'échantillon de peau de cochon. Les spectres acquis successivement en profondeur sont donnés à la figure 4.12. Les conditions d'acquisitions sont identiques à celles du spectre de la figure 4.10 (40 mW, 10 s, 3 accumulations). Les spectres ont été soustraits de l'auto-fluorescence à l'aide d'un polynôme d'ordre 5 [211] et lissés par un filtre de Savitzky-Golay utilisant un polynôme d'ordre 3 sur une fenêtre de 5 points consécutifs. Comme nous pouvons le voir, notre système de CRM permet de collecter un spectre Raman de la peau en profondeur. Bien que la qualité des spectres se dégrade avec la profondeur sondée, les raies Raman de la peau, précédemment pointées à la figure 4.11 restent majoritairement visibles dans les spectres. On notera par exemple que le pic autour de 1000 cm<sup>-1</sup> attribué à la phénylalanine reste clairement discernable du bruit jusqu'à 300 µm de profondeur. Ces acqui-

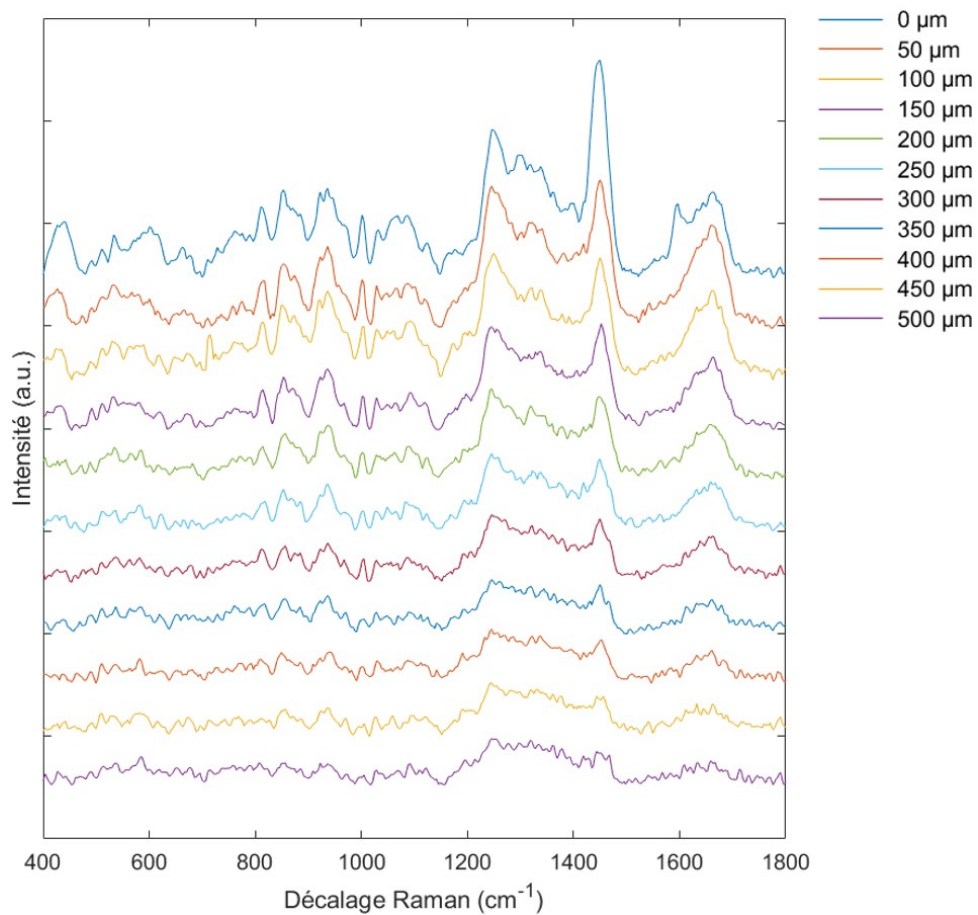


Figure 4.12 – Spectres Raman acquis dans la peau de cochon pour des profondeurs allant de la surface de l'échantillon (0  $\mu\text{m}$ ) à 500  $\mu\text{m}$  de profondeur. Spectres acquis avec une puissance de 40 mW sur l'échantillon, un temps d'intégration de 10 s et 3 accumulations. Les spectres ont été soustraits de l'auto-fluorescence, puis lissés par un filtre de Savitzky-Golay utilisant un polynôme d'ordre 3 sur une fenêtre de 5 points consécutifs. Les spectres sont volontairement décalés en ordonnée pour faciliter la visualisation.

tions valident ainsi notre montage de CRM pour l'acquisition de spectres Raman de la peau sur des profondeurs allant jusqu'à quelques centaines de  $\mu\text{m}$ .

## 4.6 . Co-localisation LC-OCT/CRM *ex vivo* avec deux systèmes distincts

A l'aide du montage de CRM décrit dans la section précédente, nous avons développé une méthode permettant de co-localiser les données acquises par des dispositifs LC-OCT et CRM distincts. Comme nous allons le voir dans la suite, cette méthode permet d'acquérir des spectres Raman à des endroits spécifiques ciblés dans une image LC-OCT 3D, avec une précision de  $\pm 20 \mu\text{m}$  et pour des échantillons de peau *ex vivo*. Cette partie sera consacrée à la description technique de la méthode de co-localisation.

### 4.6.1 . Montage et principe de la co-localisation LC-OCT/CRM

Une représentation schématique du montage dédié à la co-localisation LC-OCT/CRM est donnée à la figure 4.13. Pour donner une idée du système de co-localisation en pratique, une photographie du montage est également donnée à la figure 4.14. Ce montage comprend un système de LC-OCT et le montage de CRM présenté dans la partie précédente et décrit par la figure 4.1. Les deux systèmes sont totalement indépendants.

Le dispositif de LC-OCT est utilisé dans sa configuration *ex vivo*, tel que décrit dans la section 2.3.2 du chapitre 2 : l'embout amovible dédié à l'imagerie *in vivo* est enlevé, la lame de  $500 \mu\text{m}$  d'épaisseur de cet embout étant remplacée par la lame de  $500 \mu\text{m}$  du porte-échantillon lors de l'imagerie *ex vivo*. Afin d'assurer une dispersion optique identique dans les deux bras de l'interféromètre, une lame de  $\text{CaF}_2$  identique à celle du porte-échantillon remplace également une des deux lames de silice fondue du bras de référence.

Le dispositif est maintenu fixe avec l'objectif du bras objet à la verticale par l'utilisation d'un porte-sonde spécifique figurant à la figure 4.14.

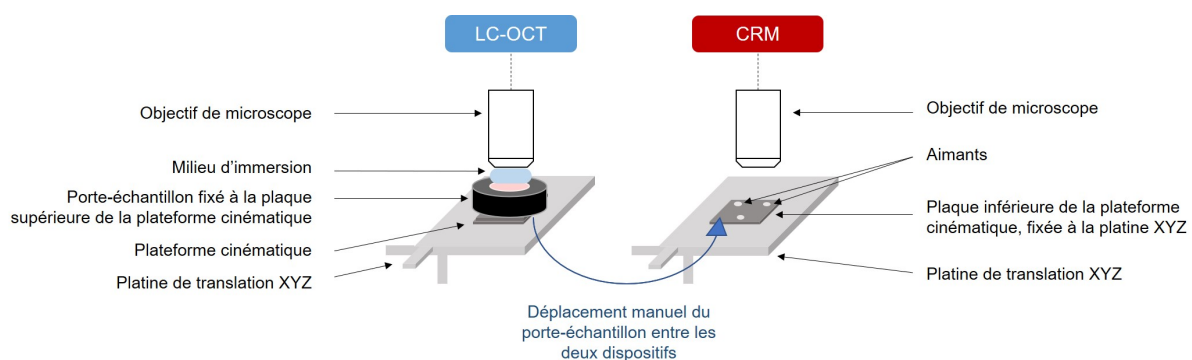


Figure 4.13 – Schéma du montage de co-localisation LC-OCT/CRM. Les deux dispositifs (LC-OCT et CRM) sont indépendants. Des platines de translation XYZ sont placées sous l'objectif du microscope de chaque dispositif. L'échantillon est placé dans un porte-échantillon qui est successivement placé sur la platine XYZ sous chaque dispositif. Le porte-échantillon est fixé sur les platines XYZ par l'intermédiaire d'une plateforme cinématique magnétique permettant de le positionner avec une grande répétabilité sur chaque platine.

Des platines de translations XYZ identiques sont placées sous l'objectif du microscope du bras objet de la LC-OCT et sous l'objectif du système de CRM. L'échantillon *ex vivo* de peau est placé dans le porte-échantillon décrit précédemment dans la partie 4.5.1. Pour effectuer des acquisitions

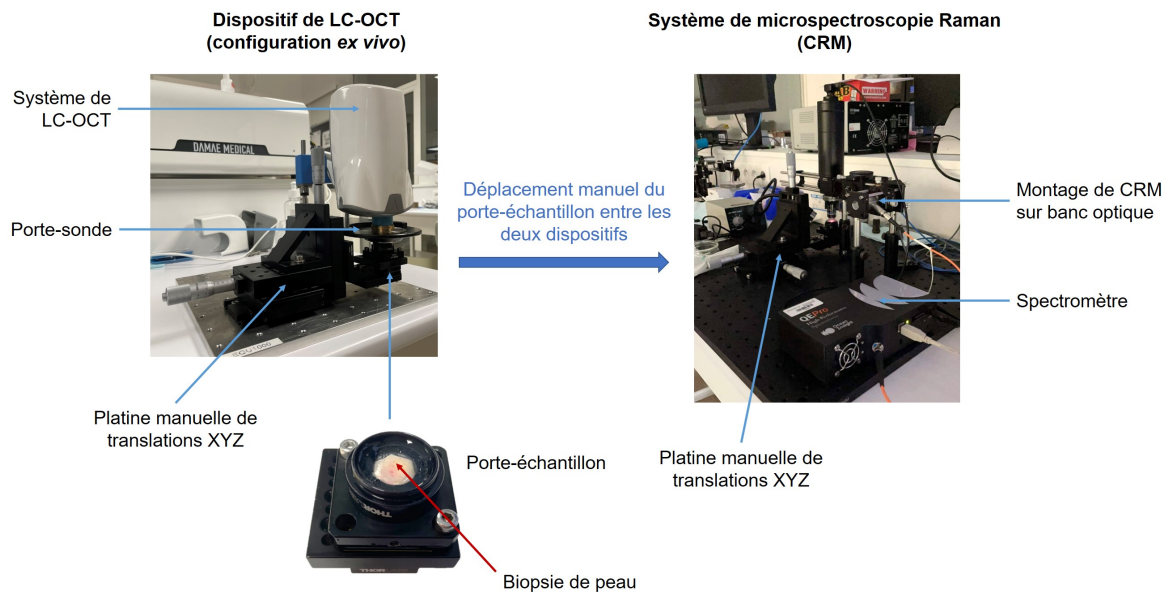


Figure 4.14 – Photographie du montage de co-localisation LC-OCT/CRM.

LC-OCT/CRM co-localisées, le porte-échantillon est d'abord placé sur la platine de translation sous le dispositif de LC-OCT. De l'huile de silicone est utilisée comme milieu d'immersion entre l'objectif du bras objet de la LC-OCT et la lame de  $\text{CaF}_2$  du porte-échantillon. En utilisant les translations XYZ manuelles, l'échantillon peut être déplacé par rapport à l'objectif LC-OCT afin de se déplacer en 3D dans l'échantillon tout en l'imageant. L'imagerie 2D horizontale et verticale, réalisée en temps réel, permet de repérer facilement des points d'intérêts (POIs) dans l'échantillon. Une fois ces POIs identifiés, une image 3D de LC-OCT, incluant ces POIs, est acquise. On relève alors les coordonnées  $(X, Y, Z)_{LC-OCT}$  affichées sur la platine de translation lors de l'acquisition de cette image 3D. Dans cette image 3D, on relève les coordonnées, notées  $(X, Y, Z)_{image}$ , de chaque POI dans le repère de l'image 3D de LC-OCT. Le porte-échantillon est ensuite déplacé sur la platine de translation XYZ située sous le système de CRM. L'huile de silicone, utilisée comme milieu d'immersion lors de l'imagerie LC-OCT, est remplacée par de l'eau afin de limiter les aberrations qui pourraient être introduites par l'objectif de haute ouverture numérique utilisée en CRM. Sur la base d'une calibration effectuée en amont des expérimentations, on calcule alors, pour chaque POI identifié dans l'image 3D, les coordonnées, notées  $(X, Y, Z)_{CRM}$ , à atteindre sur la platine située sous le système CRM permettant de positionner chaque POI au point focal du système CRM. Pour chaque POI, la platine est donc déplacée aux coordonnées calculées correspondantes  $(X, Y, Z)_{CRM}$ . Un spectre Raman est alors acquis au niveau de chaque POI. Les coordonnées  $(X, Y, Z)_{CRM}$  sont calculées via une matrice de passage, à partir des coordonnées  $(X, Y, Z)_{LC-OCT}$  associée à l'image 3D, relevées sur la platine sous le dispositif de LC-OCT, et des coordonnées individuelles de chaque POI,  $(X, Y, Z)_{image}$ , dans le repère de l'image 3D de LC-OCT. La relation de passage entre la platine de la LC-OCT et la platine du système CRM est obtenue grâce à une calibration préalable, qui sera décrite dans la suite de ce chapitre.

#### 4.6.2 . Calibration des platines de translations XYZ

La calibration vise à trouver la relation de passage entre les coordonnées  $(X, Y, Z)_{image}$  de n'importe quel POI dans une image LC-OCT 3D (acquise pour des coordonnées  $(X, Y, Z)_{LC-OCT}$  données sur la platine LC-OCT) et les coordonnées  $(X, Y, Z)_{CRM}$  sur la platine CRM auxquelles ce même POI se trouve positionné au point focal du système de CRM. La relation de passage peut être exprimée par une combinaison d'une matrice de rotation  $R$  (les axes des platines de translation n'étant pas nécessairement alignés lors de la mise en place du montage de co-localisation) et d'une matrice de translation  $T$ . En pratique on ne considère qu'une rotation des axes XY de chaque platine autour de l'axe Z, l'axe Z étant considéré comme vertical et identique pour les deux platines.

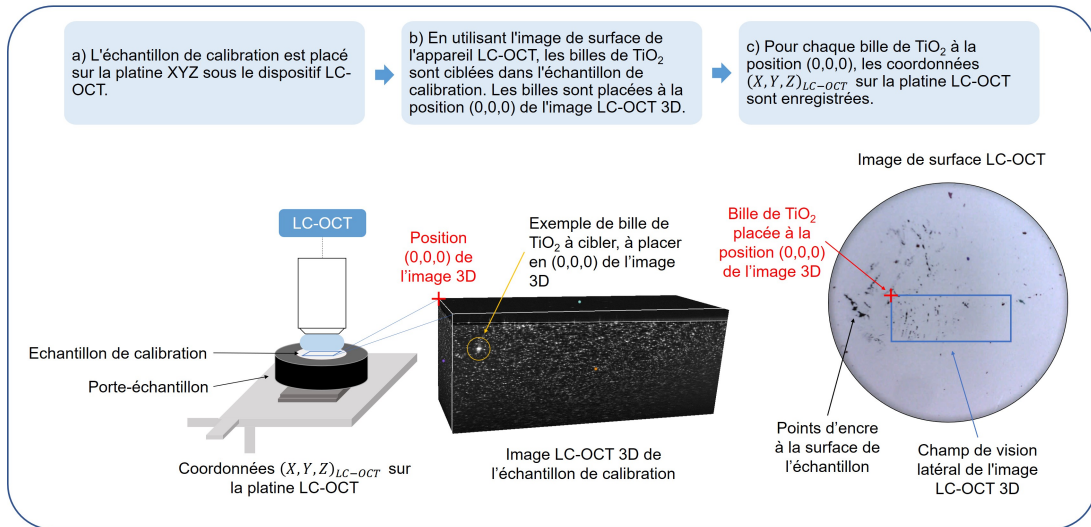
La calibration est effectuée à l'aide d'un échantillon de calibration. L'échantillon de calibration est composé d'une matrice de polydiméthylsiloxane (PDMS) (Sylgard 184 Silicone Elastomer, Dow Corning, USA) contenant des billes de dioxyde de titane ( $TiO_2$ ) (forme anatase, Sigma-Aldrich Corporation, USA). Cet échantillon est bien adapté à la spectroscopie Raman et à l'imagerie LC-OCT car le PDMS et le  $TiO_2$  ont des signatures Raman différentes et des indices de réfraction différents, ce qui génère un fort contraste dans l'image LC-OCT permettant de visualiser nettement les billes de  $TiO_2$ . Cet échantillon est en réalité similaire aux échantillons utilisés dans le cadre de la mesure de propriétés optiques en LC-OCT, décrite dans le chapitre précédent. Les billes choisies ont néanmoins des tailles plus grosses (quelques  $\mu m$  à une dizaine de  $\mu m$ ).

Le processus de calibration est décrit de manière schématique à la figure 4.15 et comporte trois principales étapes. Tout d'abord, l'échantillon de calibration est placé dans le porte-échantillon dédié à la co-localisation (le même porte-échantillon est utilisé pour la calibration et les expérimentations). Dans une première étape, le porte-échantillon est placé sur la platine XYZ située sous le dispositif de LC-OCT et l'échantillon de calibration est imagé en LC-OCT. Grâce à l'image LC-OCT, on repère alors dans l'échantillon des billes de  $TiO_2$  d'une dizaine de  $\mu m$  de diamètre. En utilisant les translations manuelles de la platine, on déplace l'échantillon afin de positionner la bille de  $TiO_2$  ciblée à la position  $(X, Y, Z)_{image} = (0, 0, 0)$  du repère de l'image 3D de LC-OCT. Cette position, choisie comme origine du repère de l'image, correspond au coin en haut à gauche de l'image 3D (illustré à la figure 4.15). On relève alors les coordonnées  $(X, Y, Z)_{LC-OCT}$  sur la platine LC-OCT, associées cette bille de  $TiO_2$  positionné en  $(0, 0, 0)$  dans le repère de l'image 3D LC-OCT. On réitère cette étape pour quatre billes de  $TiO_2$ .

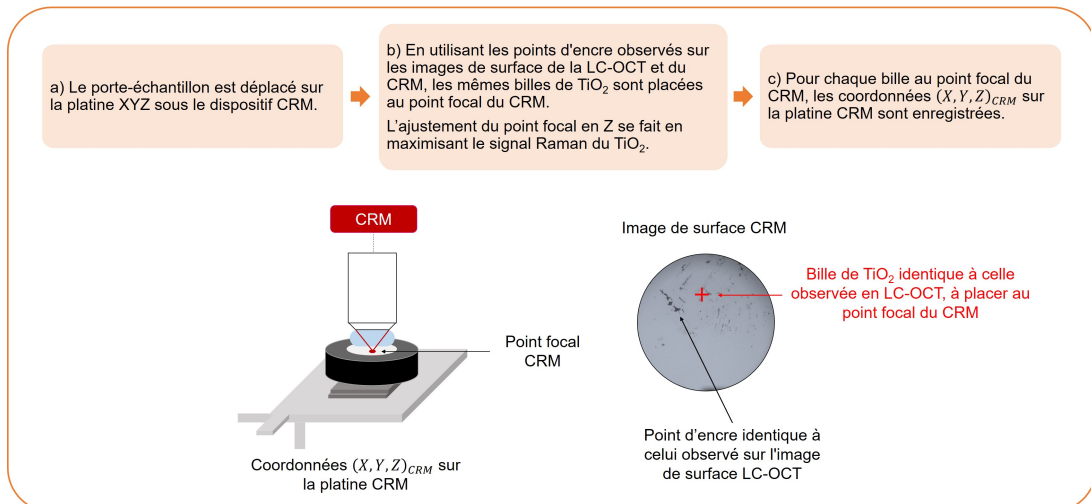
Dans une seconde étape, le porte-échantillon contenant l'échantillon de calibration est déplacé sur la platine située sous le système de CRM. L'objectif de cette étape est de placer les mêmes billes de  $TiO_2$  repérées en LC-OCT au point focal du dispositif de CRM. Pour identifier les mêmes billes avec les deux systèmes, on utilise les images de surface de la LC-OCT et de la CRM. Cependant, comme le montre la figure 4.7, les billes de  $TiO_2$  sont bien visibles dans les images de surface, mais elles apparaissent toutes similaires (billes blanches). Pour que les billes puissent être différenciées les unes des autres, des points d'encre, réalisés au stylo, sont ajoutés au préalable de la calibration à la surface de l'échantillon de calibration. Grâce à ces points d'encre, les mêmes billes peuvent être identifiées dans les images de surface du dispositif LC-OCT et du dispositif CRM en fonction de leur position par rapport aux points d'encre, tel qu'illustré sur les images de surface de la figure 4.15. L'image de surface permet alors de guider la CRM pour placer les billes identifiées en LC-OCT au point focal du système CRM. Plus précisément, l'image de surface permet le positionnement en XY de la bille au



### Etape 1



### Etape 2



### Etape 3

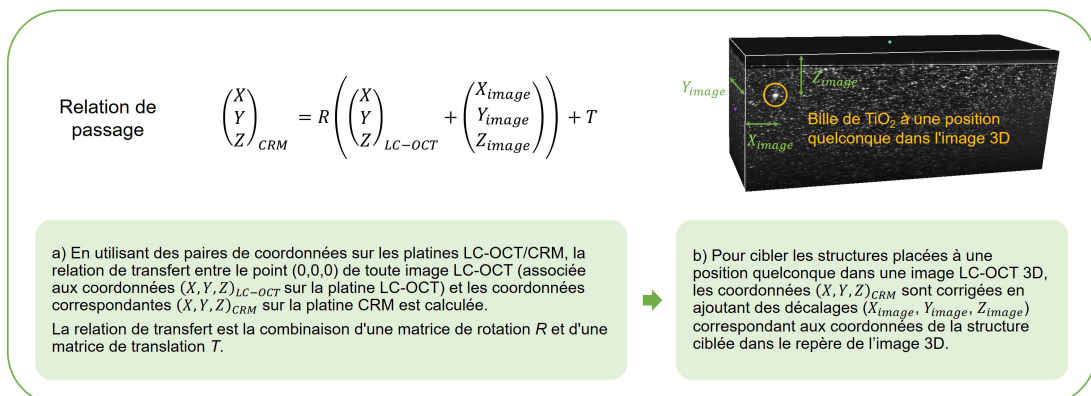


Figure 4.15 – Description, en trois étapes, de la calibration réalisée en amont des expériences de co-localisation LC-OCT/CRM.

point focal. Le positionnement en Z de la bille au point focal est quant à lui effectué en translatant l'axe Z de la platine jusqu'à maximiser le signal Raman du  $\text{TiO}_2$ , signe que le point focal est placé au cœur de la bille. On obtient alors des paires de coordonnées  $(X, Y, Z)_{LC-OCT}$  et  $(X, Y, Z)_{CRM}$  qui nous permettent d'établir la relation de passage (matrices  $R$  et  $T$ ) entre les coordonnées  $(0, 0, 0)$  de toute image LC-OCT associée à des coordonnées  $(X, Y, Z)_{LC-OCT}$  sur la platine de translation et les coordonnées  $(X, Y, Z)_{CRM}$  sur la platine de translation du système de CRM. Cette relation de passage nous permet donc, pour un POI placé aux coordonnées  $(0, 0, 0)$  d'une image 3D de LC-OCT, de calculer les coordonnées sur la platine CRM permettant d'en acquérir le spectre Raman. Pour acquérir le spectre de plusieurs POIs situés à des positions quelconques dans le repère de l'image 3D, il faut rajouter aux coordonnées  $(X, Y, Z)_{LC-OCT}$  des décalages  $(X, Y, Z)_{image}$  correspondants aux coordonnées de chaque POI dans le repère de l'image 3D. A noter que ceci est valable dans le cas où l'échantillon a un indice optique similaire à celui de l'huile de silicone et où les axes XYZ de la platine sous la LC-OCT sont alignés avec les axes XYZ du repère de l'image 3D. Cet alignement est effectué manuellement lors de l'installation de la platine de translation sous le dispositif de LC-OCT. Si besoin des corrections peuvent être calculées pour corriger un potentiel désalignement des axes. Par ailleurs, nous avons pu remarquer sur certains dispositifs que la platine piézoélectrique de la LC-OCT, permettant de translater les plans de cohérence et de focalisation, ne se déplace pas toujours parfaitement à la verticale mais peut se translater légèrement en XY avec la profondeur Z sondée. Dans ce cas, une étape de calibration supplémentaire est nécessaire pour quantifier cette translation de la platine piézoélectrique et la prendre en compte dans la relation de passage.

Pour que la calibration soit valable, l'échantillon de calibration, puis l'échantillon de peau, doivent être immobiles dans le porte-échantillon lors du passage de la platine LC-OCT à la platine CRM. Le fait de comprimer doucement l'échantillon entre les deux lames ( $\text{CaF}_2$  et lame de verre) dans le porte-échantillon permet justement de bien le maintenir immobile. Une fois réalisée, la calibration doit être maintenue valable lors des acquisitions sur des échantillons de peau. Pour cela, il faut que le porte-échantillon soit repositionné sur chaque platine exactement à la même position que lors de la calibration, sous peine d'affecter la relation de passage entre les coordonnées des deux platines. Cependant, l'échantillon de peau peut être positionné dans le porte-échantillon sans précaution particulière tant qu'il reste immobile dans le porte-échantillon lorsqu'il est déplacé de la platine LC-OCT à la platine CRM. Pour assurer un repositionnement identique du porte-échantillon sur chaque platine comme lors de la calibration, une plateforme cinématique (KB25/M, Thorlabs, Etats-Unis) est utilisée. Cette plateforme est composée de deux plaques maintenues solitaires par des aimants et positionnées précisément l'une par rapport à l'autre grâce à un système de billes et de rainures. La plaque de base est fixée à chaque platine XYZ, tandis que la plaque supérieure est fixée au porte-échantillon tel qu'illustré à la figure 4.8b) de la section 4.5.1. La plateforme cinématique permet de repositionner le porte-échantillon sur chaque platine avec une grande répétabilité ( $\leq 3 \mu\text{m}$ ). Avec la configuration utilisée, la précision de la co-localisation est théoriquement limitée par le pas de  $10 \mu\text{m}$  des deux platines de translation utilisées.

La précision de la procédure de co-localisation a été évaluée expérimentalement par une étude de répétabilité : une fois la calibration réalisée, 10 billes de  $\text{TiO}_2$  à différentes positions XYZ dans l'échantillon de calibration ont été ciblées à l'aide de la LC-OCT. L'échantillon de calibration a ensuite été déplacé sur la platine du système de CRM. Pour chaque bille identifiée avec la LC-OCT, les



coordonnées à atteindre sur la platine CRM pour acquérir le spectre Raman de cette bille ont été calculées, en utilisant la calibration préalable. En utilisant l'image de surface du dispositif de CRM et le signal Raman du  $\text{TiO}_2$ , nous avons quantifié l'erreur de positionnement, définie comme l'écart entre les coordonnées théoriques de la platine CRM données par la calibration et les coordonnées réelles de la platine permettant de placer effectivement la bille au point focal du système de CRM. Les résultats expérimentaux sont donnés dans le tableau 4.2. La précision de la co-localisation a été évaluée comme l'erreur de positionnement maximale, *i.e.*,  $\pm 20 \mu\text{m}$  en X/Y et  $\pm 10 \mu\text{m}$  en Z, ce qui permet de combiner informations morphologiques et biochimiques à l'échelle cellulaire. On observe que la précision de la co-localisation est bien limitée par le pas de  $10 \mu\text{m}$  des deux platines manuelles utilisées.

En pratique, après chaque session de calibration, une étape de vérification est réalisée en ciblant quelques billes de  $\text{TiO}_2$  dans l'échantillon de calibration afin de vérifier qu'il n'y a pas eu d'erreur lors de la réalisation de la calibration.

Bille n°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Erreur de positionnement selon X ( $\mu\text{m}$ )	0	0	20	10	10	10	10	10	20	10
Erreur de positionnement selon Y ( $\mu\text{m}$ )	0	0	10	0	10	10	10	0	20	0
Erreur de positionnement selon Z ( $\mu\text{m}$ )	10	10	10	10	0	0	10	10	0	0

Table 4.2 – Évaluation de la précision de la co-localisation. Pour 10 billes de  $\text{TiO}_2$  incluses dans l'échantillon de calibration et ciblées avec LC-OCT, nous avons mesuré l'erreur de positionnement définie comme l'écart entre les coordonnées théoriques de la platine CRM données par la calibration et les coordonnées réelles de la platine permettant de placer la bille au point focal du système de CRM. Une erreur maximale de  $20 \mu\text{m}$  et  $10 \mu\text{m}$  a été mesurée en X/Y et Z respectivement. Cette précision de la co-localisation est limitée comme on peut le constater par le pas de  $10 \mu\text{m}$  des platines de translation manuelles utilisées.

Pour rendre la procédure de co-localisation facile d'utilisation, une application MATLAB (MATLAB R2020a, MathWorks, Etats-Unis) dédiée à la co-localisation a été conçue. Les données de calibration (*i.e.*, la relation de passage) sont stockées dans l'application. Une interface graphique permet à l'utilisateur de télécharger une image LC-OCT 3D et ses coordonnées  $(X, Y, Z)_{LC-OCT}$ , et de sélectionner plusieurs points d'intérêt dans cette image à l'aide d'un réticule. Sur la base de la calibration initiale, l'application calcule les coordonnées  $(X, Y, Z)_{CRM}$  à atteindre sur la platine CRM pour cibler chaque POI. Une capture de l'interface utilisateur de cette application est donnée à la figure 4.16.

#### 4.6.3 . Validation de la co-localisation LC-OCT/CRM sur peau de cochon tatouée

Avant d'appliquer la co-localisation à la caractérisation de biopsies de peau tatouée humaine, nous avons testé notre méthode sur des échantillons de peau de cochon contenant de l'encre de tatouage. L'objectif de ces expériences sur peau de cochon tatouée est d'évaluer les performances de la procédure de co-localisation sur des échantillons bien caractérisés, en vue d'une application ultérieure à des biopsies de peau humaine tatouée.

Pour cela, nous avons inséré à l'aide d'une aiguille de l'encre de tatouage jaune (encre Sunflower, Eternal Ink EUROPE UG, Allemagne) dans un échantillon *ex vivo* de peau de cochon. Une image LC-OCT 3D de cet échantillon a été acquise, dans laquelle plusieurs POIs ont été ciblés et analysés par co-localisation avec la CRM. Un exemple est donné dans la figure 4.17, représentant une image

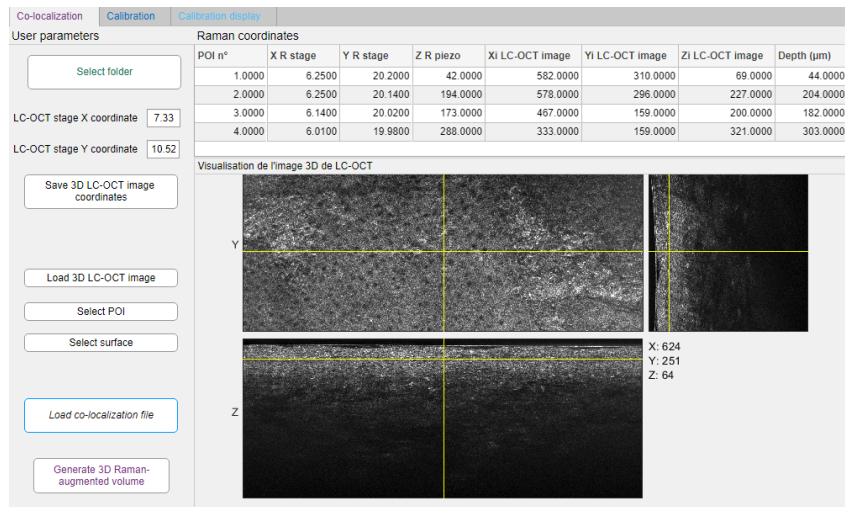


Figure 4.16 – Interface utilisateur de l'application MATLAB dédiée à la co-localisation LC-OCT/CRM. Les données de calibration (*i.e.*, la relation de passage) sont stockées dans l'onglet « Calibration ». L'interface graphique permet à l'utilisateur de télécharger une image LC-OCT 3D et ses coordonnées sur la platine, puis de sélectionner plusieurs points d'intérêt dans cette image à l'aide du réticule jaune. Sur la base de la calibration initiale, l'application calcule les coordonnées à atteindre sur la platine CRM pour cibler chaque POI et les affiche dans le tableau situé au-dessus de l'image 3D.

3D LC-OCT (coupes orthogonales) de l'échantillon de peau de cochon tatouée, dans laquelle les POIs ciblés moléculairement sont matérialisés par des ellipsoïdes jaunes. Les ellipsoïdes représentent le volume dans lequel l'acquisition Raman est incluse. Ce volume est de dimensions  $40 \times 40 \times 30 \mu\text{m}^3$  ( $x \times y \times z$ ), tenant compte à la fois du volume sondé par la CRM ( $\sim 1 \times 1 \times 30 \mu\text{m}^3$  ( $x \times y \times z$ )) et de l'incertitude de la procédure de co-localisation ( $\pm 20 \mu\text{m}$  en XY et de  $\pm 10 \mu\text{m}$  en Z inclus dans l'étendue axiale de  $30 \mu\text{m}$ ). A noter que l'extension axiale de ce volume est basée sur la mesure de résolution définie comme largeur mi-hauteur, comme nous l'avons exprimée dans la section 4.4.4. De ce fait, il n'est pas exclu que du signal Raman soit collecté dans une extension axiale au-delà des  $30 \mu\text{m}$ , et ce d'autant plus si un composant présentant un signal Raman très fort est présent au dessus ou en dessous du volume sondé. De plus, la forme des ellipsoïdes est ici théorique mais il faut avoir en tête qu'elle se déforme probablement avec la profondeur du fait de la présence d'aberrations.

La figure 4.18 illustre les résultats de co-localisation LC-OCT/CRM obtenus sur l'échantillon de peau de cochon tatoué à l'encre jaune. Une image LC-OCT 3D de cet échantillon a été acquise, dans laquelle trois POIs ont été ciblés et analysés moléculairement avec le système de CRM. Pour une meilleure visualisation, ces POIs sont affichés sur des images 2D horizontales et/ou verticales extraites de l'image 3D. Les spectres ont été acquis avec une puissance de 50 mW sur l'échantillon, un temps d'intégration de 10 s et 3 accumulations. Ils ont été soustraits de la fluorescence à l'aide d'un polynôme d'ordre 5 [211] et lissés à l'aide d'une moyenne glissante.

L'échantillon de peau de cochon présente un épiderme fin et un derme superficiel composé de nombreuses fibres bien visibles. Dans l'image LC-OCT 3D de cet échantillon, on peut observer des régions brillantes, correspondant probablement à l'encre de tatouage. Ces zones partent de l'épiderme où l'encre a été injectée avec l'aiguille, avec des structures hyper-réfléchissantes. Elles pénètrent dans le derme où elles forment des zones brillantes diffuses, avec des intensités proches des fibres du derme. Ainsi, l'identification des régions contenant de l'encre en profondeur sur la seule base de l'image LC-

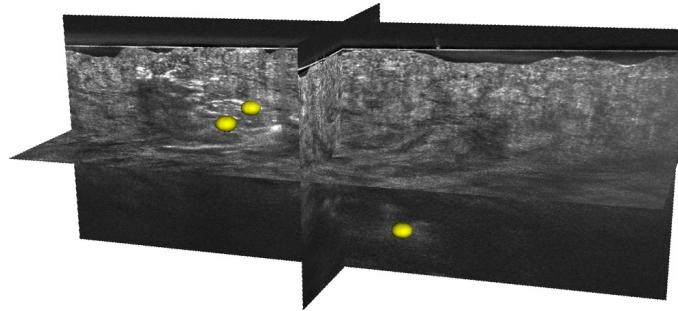


Figure 4.17 – Image LC-OCT 3D en vues orthogonales d'un échantillon de peau de cochon contenant de l'encre de tatouage jaune, avec trois POIs matérialisés par des ellipsoïdes jaunes. Les ellipsoïdes représentent le volume dans lequel l'acquisition Raman est incluse, de dimensions  $40 \times 40 \times 30 \mu\text{m}^3$  ( $x \times y \times z$ ). Des zones hyper-réfléchissantes peuvent être observées dans l'échantillon, suggérant la présence d'encre de tatouage jaune.

OCT peut être ambiguë ; la CRM fournira les informations biochimiques nécessaires pour différencier l'encre des fibres du derme. Les POIs 1 et 2 ont été choisis dans des régions hyper-réfléchissantes, situées à des profondeurs différentes ( $150 \mu\text{m}$  pour le POI 1 et  $360 \mu\text{m}$  pour le POI 2). Le POI 3 a été choisi dans une région adjacente au POI 1, à  $150 \mu\text{m}$  de profondeur, uniquement composée de fibres bien définies. A l'aide de la procédure de co-localisation précédemment décrite, les spectres Raman de chaque POI ont été acquis. En accord avec l'image LC-OCT, le spectre du POI 3 montre des bandes Raman typiques de la peau de cochon à  $815, 853, 933, 1001, 1252, 1450$  et  $1662 \text{ cm}^{-1}$  (mis en évidence par des flèches bleues superposées sur le spectre) [214, 40]. Les spectres des POIs 1 et 2 montrent des raies Raman fines et intenses à  $1252, 1287, 1331, 1397$  et  $1594 \text{ cm}^{-1}$ . Ces raies correspondent à la signature moléculaire de l'encre de tatouage, et sont plus précisément attribuées au pigment jaune C.I.21095 de l'encre (pointées par des flèches jaunes sur les spectres) [215, 214]. Malgré le fort signal Raman du pigment, quelques bandes correspondant au derme autour de  $1001, 1450$  et  $1662 \text{ cm}^{-1}$  peuvent encore être observées dans les spectres des POIs 1 et 2 (flèches bleues) puisque les POIs 1 et 2 comprennent aussi du tissu dermique. On peut également remarquer que les raies les plus intenses du pigment jaune (à  $1397$  et  $1594 \text{ cm}^{-1}$ ) sont légèrement visibles dans le spectre du POI 3. Cependant, leur intensité est très faible par rapport à leur intensité dans les POIs 1 et 2, ce qui suggère qu'une très petite quantité d'encre, qui n'apparaît pas dans l'image LC-OCT, pourrait être présente dans le POI 3. Une courbe représentant l'intensité Raman du pigment jaune le long de l'axe Z au niveau du POI 2 est superposée sur l'image verticale 2D. Cette courbe est obtenue en acquérant des spectres Raman de la surface de la peau jusqu'à  $450 \mu\text{m}$  de profondeur avec un pas de  $30 \mu\text{m}$  au niveau du POI 2, puis en extrayant l'intensité de la raie Raman à  $1594 \text{ cm}^{-1}$  de l'encre de tatouage en fonction de la profondeur. La courbe montre un maximum à  $360 \mu\text{m}$  de profondeur, en accord avec la profondeur de la zone brillante repérée sur l'image LC-OCT. Les images dermoscopiques de chaque système sont également données à la figure 4.18. Les deux images ont des aspects différents car la colorimétrie n'est pas la même sur les deux systèmes. On peut visuellement reconnaître que la même région de l'échantillon est imagée avec les deux appareils.

Ces expériences sur des échantillons de peau de cochon démontrent le potentiel de la co-localisation pour l'analyse morphologique et chimique combinée d'échantillons de peau tatouée. L'encre de ta-

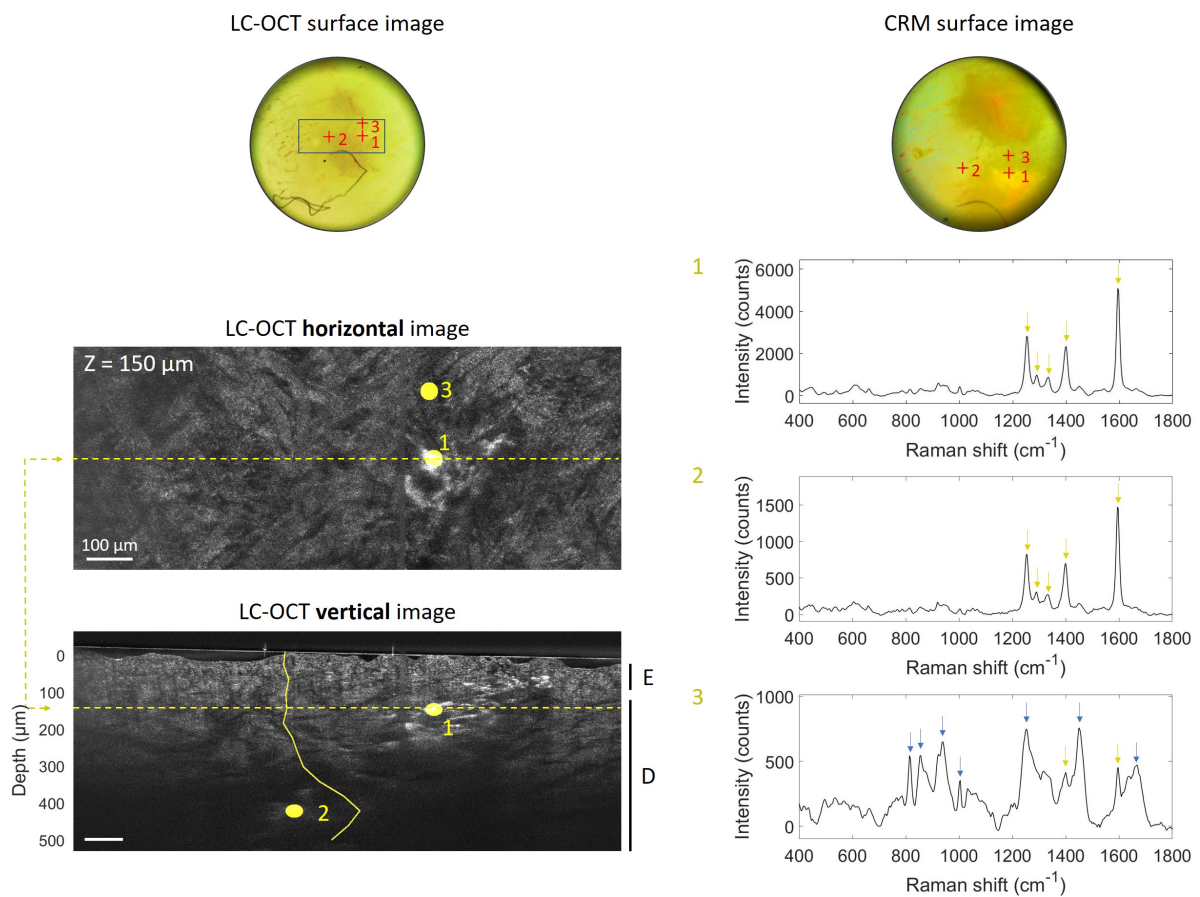


Figure 4.18 – Image LC-OCT 3D (vues orthogonales) d'un échantillon de peau de cochon tatouée à l'encre jaune, avec les spectres Raman associés acquis pour trois POIs identifiés dans l'image LC-OCT 3D et matérialisés par des ellipsoïdes jaunes. La LC-OCT fournit des images des deux couches principales de la peau de cochon, l'épiderme (E) et le derme (D). La ligne pointillée sur l'image horizontale montre la position de l'image verticale au-dessus par rapport au plan horizontal de l'image 3D, et vice versa. La profondeur Z de l'image horizontale est indiquée par rapport à la surface de la peau. La courbe pleine sur l'image verticale représente la distribution 1D de l'encre jaune avec la profondeur au niveau du POI 2. Les emplacements des POI dans les images de surface LC-OCT et CRM sont indiqués par des croix rouges. Le rectangle bleu sur l'image de surface LC-OCT représente l'emplacement de l'image 3D dans l'image de surface. Les flèches bleues sur les spectres Raman représentent les bandes Raman correspondant au derme de la peau de cochon et les flèches jaunes montrent les raies Raman attribuées à l'encre jaune. Figure extraite de [41].

touage peut clairement être identifiée dans les régions hyper-réfléchissantes du derme, sur la base de la signature Raman du pigment jaune contenu dans l'encre. La CRM a permis de lever l'ambiguïté potentielle entre les régions contenant de l'encre et les régions comprenant uniquement des fibres dermiques observées en profondeur avec la LC-OCT, ces deux régions ayant une apparence et des intensités similaires dans l'image. Les dimensions du volume sondé par le système de CRM permettent de localiser précisément l'origine du signal Raman dans l'image, tout en collectant une quantité suffisante de signal sur les échantillons de peau pour visualiser les principales raies Raman du derme avec des temps d'acquisition raisonnables (30 s). La CRM permet une identification précise du pigment d'encre utilisé, même à des profondeurs allant jusqu'à 360  $\mu\text{m}$ . La combinaison des deux modalités permet également d'obtenir une distribution spatiale 1D de l'encre de tatouage, corrélée à l'image LC-OCT de résolution cellulaire. Ces résultats valident et illustrent la valeur de la méthode de co-localisation développée pour la caractérisation morpho-moléculaire d'échantillons de peau *ex vivo*.

#### 4.6.4 . Application de la co-localisation LC-OCT/CRM à la caractérisation de biopsies de tatouage

##### 4.6.4.1 . Description des biopsies de tatouage et intérêt clinique

Suite aux expérimentations sur peau de cochon, nous avons appliqué notre méthode de co-localisation LC-OCT/CRM à la caractérisation de trois biopsies de peau humaine tatouée. Ces biopsies ont été prélevées sur des patients ayant déclaré une réaction cutanée au tatouage, et nous ont été fournies par le service de dermatologie du CHU de Saint-Etienne.

La première biopsie a été prélevée sur un patient de 40 ans ayant fait une réaction à l'encre rouge de son tatouage multicolore, dont une illustration est donnée à la figure 4.19. La réaction s'est déclarée 8 mois après la réalisation du tatouage et s'est traduite par l'apparition de plaques au sein du tatouage. Préalablement à nos analyses, le patient avait été examiné *in vivo* par dermoscopie, LC-OCT, ultrasons à haute fréquence (HFUS). Des signes d'inflammation (présences d'amas de cellules inflammatoires et vaisseaux sanguins dilatés) ont été mis en évidence par les images LC-OCT et HFUS. Une biopsie a été réalisée dans la zone d'encre rouge. L'analyse par immunohistochimie a révélé la présence de lymphocytes B et T. Ce cas n'est malheureusement pas isolé car certains pigments rouges et métaux (tels que le cadmium, le mercure, le nickel, le fer) contenus dans les encres rouges ont été signalés comme agents sensibilisants et allergènes chroniques [216, 217].

La seconde biopsie a été prélevée chez un patient de 33 ans présentant des nodules au sein de son tatouage réalisé à l'encre noire exclusivement. Ces nodules sont apparus 6 mois après l'exécution du tatouage. Une biopsie a été réalisée et l'analyse histologique a permis de diagnostiquer une sarcoïdose. La sarcoïdose est une maladie du système immunitaire, caractérisée par la présence d'un grand nombre de cellules inflammatoires regroupées en amas (appelés granulomes). Ces granulomes touchent le plus souvent les poumons mais peuvent aussi se former dans tout autre organe. Sa cause reste inconnue mais elle peut notamment être causée par une infection ou une réponse anormale du système immunitaire à une substance rencontrée dans l'environnement, ou étrangère au corps humain tels que des pigments de tatouage. Plusieurs cas de sarcoïdose déclarée suite à un tatouage ont déjà été rapportés [218, 219]. En particulier, une étude menée sur les réactions au tatouage par Sepehri *et al.* [220] a révélé que les tatouages réalisés à l'encre noire et ayant déclenché des réactions papulo-nodulaires peuvent être considérés comme des marqueurs de la sarcoïdose. Dans le cas de cette



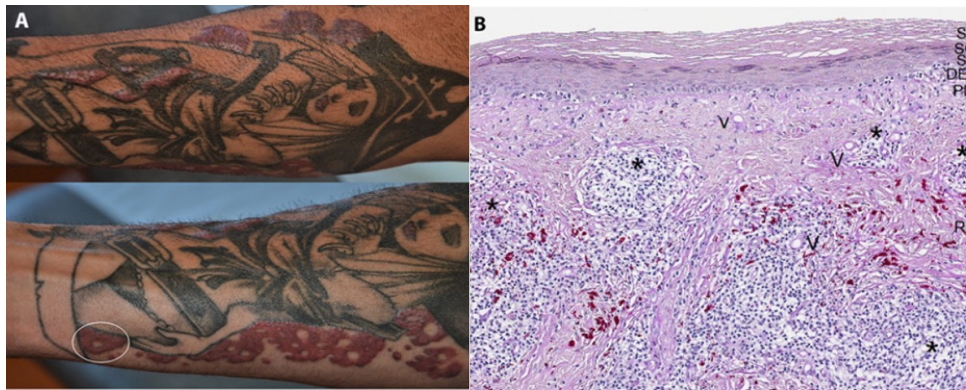


Figure 4.19 – A) Image clinique d'un tatouage multicolore présentant une réaction inflammatoire dans les zones rouges du tatouage. Une biopsie a été prélevée au niveau de la zone de tatouage rouge entourée en blanc. B) Coupe histologique obtenue à partir de la biopsie prélevée. Cette coupe révèle la présence de pigments de tatouage rouge, ainsi que d'amas de cellules inflammatoires pointés par les astérisques. Illustrations tirées de [42].

biopsie, l'apport de la CRM pourrait être l'identification du pigment noir impliqué dans la réaction papulo-nodulaire ainsi que l'identification et caractérisation des granulomes, ce qui pourrait aider à comprendre les phénomènes sous-jacents entre le tatouage et le développement de la sarcoïdose.

La dernière biopsie a été prélevée chez un patient de 45 ans ayant frappé par la foudre, un cas précédemment rapporté dans la littérature [43]. Le patient portait une chaîne en argent autour de son cou lorsqu'il a été foudroyé. Le patient a survécu au foudroiement, mais suite à cela il présentait une pigmentation au niveau de son cou, tel qu'illustré à la figure 4.20. Le patient a été examiné au CHU de Saint-Etienne par dermoscopie, RCM et LC-OCT. Les images RCM et LC-OCT ont révélé la présence de particules rondes très réfléchissantes d'environ 20-40  $\mu\text{m}$  de diamètre dans le derme, suggérant que des particules provenant du collier en argent se sont déposées dans le derme du patient suite à la fonte du collier sous l'effet du foudroiement. Sur cet exemple, la co-localisation LC-OCT-CRM permettrait d'obtenir des informations supplémentaires sur la composition chimique de ces petites particules brillantes repérées *in vivo* dans l'image LC-OCT, ce qui pourrait permettre de mieux comprendre le phénomène de fusion qui s'est produit lors du foudroiement.

Sur ces trois patients, un même constat revient : l'analyse cutanée *in vivo* par LC-OCT permet de révéler des structures morphologiques d'intérêt (groupes de cellules inflammatoires supposées, corps étrangers métalliques dans le cas du patient foudroyé) tandis que l'analyse histologique et plus particulièrement immunohistochimique apporte une information à la fois morphologique et moléculaire, permettant par exemple d'identifier spécifiquement la nature des cellules présentes (lymphocytes identifiés dans la première biopsie). De ce fait, la technique de co-localisation LC-OCT/CRM *ex vivo* décrite précédemment peut être vue comme un trait d'union entre l'imagerie LC-OCT *in vivo* et l'histologie réalisée sur des coupes *ex vivo*. Par rapport à l'histologie, la CRM présente l'avantage de pouvoir apporter des informations moléculaires du même ordre que l'histologie, sans nécessiter de préparation des biopsies. Par rapport aux analyses histologiques réalisées jusqu'à présent sur ces biopsies, la CRM fournirait des informations supplémentaires notamment sur la composition chimique de l'encre de tatouage utilisée. Cela permettrait notamment d'identifier les pigments sensibilisants ou dans le cas de la seconde biopsie, d'apporter une information potentiellement utile pour comprendre l'origine du déclenchement de la sarcoïdose.

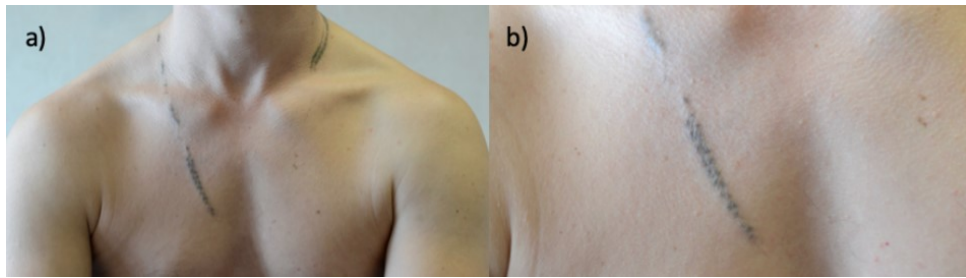


Figure 4.20 – a) Image clinique d'un tatouage par fulguration. Le patient étudié portait une chaîne en argent autour de son cou lorsqu'il a été foudroyé. Sous l'effet du foudroiement, les particules de sa chaîne se sont incrustées au niveau de son cou, visibles sur l'image clinique agrandie en b). Illustrations tirées de [43].

#### 4.6.4.2 . Caractérisation morpho-moléculaire de biopsies de tatouage

Pour chaque biopsie, une image LC-OCT 3D de la biopsie a été acquise, dans laquelle plusieurs POIs ont été ciblés et analysés par co-localisation avec la CRM. Un exemple est donné dans la figure 4.21, représentant une image 3D LC-OCT de la biopsie de tatouage à l'encre rouge, dans laquelle les POIs ciblés moléculairement sont matérialisés par des ellipsoïdes rouges.

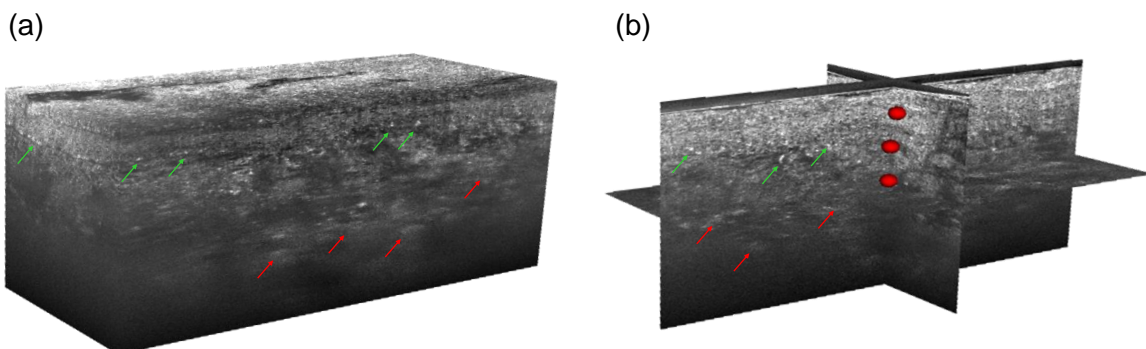


Figure 4.21 – (a) Image LC-OCT 3D et (b) vues orthogonales d'une biopsie de tatouage à l'encre rouge avec de multiples POI matérialisés par des ellipsoïdes rouges. Des zones claires et diffuses peuvent être observées dans le derme, représentées par des flèches rouges. Des structures hyper-réfléchissantes d'environ 10-40  $\mu\text{m}$  sont visibles proches de la jonction derme-épiderme, indiquées par des flèches vertes.

Pour les trois biopsies, tous les spectres ont été acquis avec une puissance de 50 mW sur l'échantillon, un temps d'intégration de 10 s et 6 accumulations. Au préalable des acquisitions, le bruit de fond ambiant a été acquis par le spectromètre. Lors des acquisitions, ce bruit de fond est ensuite soustrait automatiquement des spectres par le spectromètre. En post-traitement, les spectres ont été corrigés de l'auto-fluorescence à l'aide d'un polynôme d'ordre 5 [211] et lissés à l'aide d'une moyenne glissante. Concernant l'interprétation des spectres Raman, seules les raies pertinentes pour l'attribution biochimique ont été sélectionnées, sur la base des données Raman disponibles dans la littérature. Les raies sélectionnées sont représentées par des flèches sur les spectres Raman. Les raies qui n'ont pas pu être identifiées avec précision n'ont pas été incluses. La sélection n'est pas exhaustive mais suffit à démontrer le potentiel et la valeur de la combinaison des informations morphologiques fournies

par LC-OCT et des informations moléculaires fournies par CRM.

## Biopsie de tatouage à l'encre rouge

Les résultats obtenus sur la biopsie de tatouage à l'encre rouge sont présentés dans la figure 4.22. Pour une meilleure visualisation, les POIs sont affichés sur des images 2D horizontales et/ou verticales extraites de l'image 3D. Dans l'image LC-OCT, des zones claires et diffuses dans le derme peuvent être observées dans le derme (représentées par des flèches rouges dans les figures 4.21 et 4.22), suggérant la présence d'encre de tatouage dans ces zones. Des structures hyper-réfléchissantes d'environ 10-40  $\mu\text{m}$  sont observées près de la jonction derme-épiderme (flèches vertes dans les figures 4.21 et 4.22). Cinq POI ont été ciblés dans l'image LC-OCT 3D de cette biopsie. Le POI 1 est situé dans l'épiderme (E) ; les POIs 2 et 4 ont été choisis dans le derme (D) à des profondeurs de 200  $\mu\text{m}$  et 185  $\mu\text{m}$  respectivement ; le POI 3 cible une structure hyper-réfléchissante située près de la jonction derme-épiderme (à une profondeur de 120  $\mu\text{m}$ ) ; le POI 5 a été choisi dans le derme à une profondeur de 305  $\mu\text{m}$ , dans une région diffuse et plus lumineuse que le POI 4. En utilisant la procédure de co-localisation, des spectres Raman ont été acquis au niveau de chaque POI.

Le spectre acquis au POI 1 présente la signature Raman de l'épiderme seul, avec les principales bandes Raman typiques à 852, 895, 936, 1001, 1300-1350, 1443 et 1650  $\text{cm}^{-1}$  [49] représentées par des flèches bleues. Le spectre du POI 1 ne montre aucun signe d'encre de tatouage, ce qui pourrait être attendu puisque l'encre est conventionnellement injectée directement dans le derme.

Le spectre acquis au POI 2, situé dans le derme et sous le POI 1, montre de multiples raies nettes au-dessus de 1200  $\text{cm}^{-1}$ , avec des raies Raman majeures à 1239, 1284, 1360, 1422, 1486, 1550 et 1612  $\text{cm}^{-1}$  représentés par des flèches rouges. Ces raies sont caractéristiques de la signature moléculaire d'une encre de tatouage rouge. Plus précisément, ce spectre est caractéristique d'un colorant azoïque : [221, 222]. Les colorants rouges azoïques sont des pigments organiques qui ont déjà été impliqués dans des réactions au tatouage [217, 223, 224]. En particulier, un cas de réaction inflammatoire similaire au cas de ce patient a été rapporté dans le cas d'un tatouage exécuté avec un pigment azoïque rouge [225]. Il est donc fort probable que là aussi, le pigment rouge azoïque soit à l'origine de la réaction cutanée. Les raies Raman attribuées à l'encre sont également clairement visibles dans le spectre des POIs 4 et 5 (flèches rouges). D'autres raies fines à de 585, 967, 1028 et 1194  $\text{cm}^{-1}$  peuvent également être remarqués dans les spectres des POIs 4 et 5. Ces raies correspondent malheureusement à un bruit introduit par une mauvaise soustraction du bruit de fond par le spectromètre, dont nous nous sommes rendu compte trop tard au cours des acquisitions. Par ailleurs, on peut remarquer que les raies Raman de l'encre rouge sont plus intenses dans le POI 5 que dans le POI 4, malgré le fait que le POI 5 soit situé beaucoup plus profondément. Sur l'image LC-OCT, le POI 5 est situé dans une région plus claire du derme que le POI 4, suggérant ainsi que les zones plus claires du derme contiennent une quantité d'encre plus importante.

Le POI 3 présente un spectre différent de celui de la peau et de l'encre, avec un pic large et intense centré sur 565  $\text{cm}^{-1}$  (flèche verte) ainsi que des raies communes au spectre de l'encre de tatouage rouge (flèches rouges). Ces raies nettes sont incluses dans une large bande de 1200 à 1650  $\text{cm}^{-1}$  (crochet vert). Le même spectre a été obtenu pour plusieurs autres particules brillantes (signalées par les flèches vertes sur l'image horizontale LC-OCT de la figure 4.22). Deux pistes d'interprétations ont été envisagées. Une première hypothèse suggère que ces particules brillantes sont des agrégats de



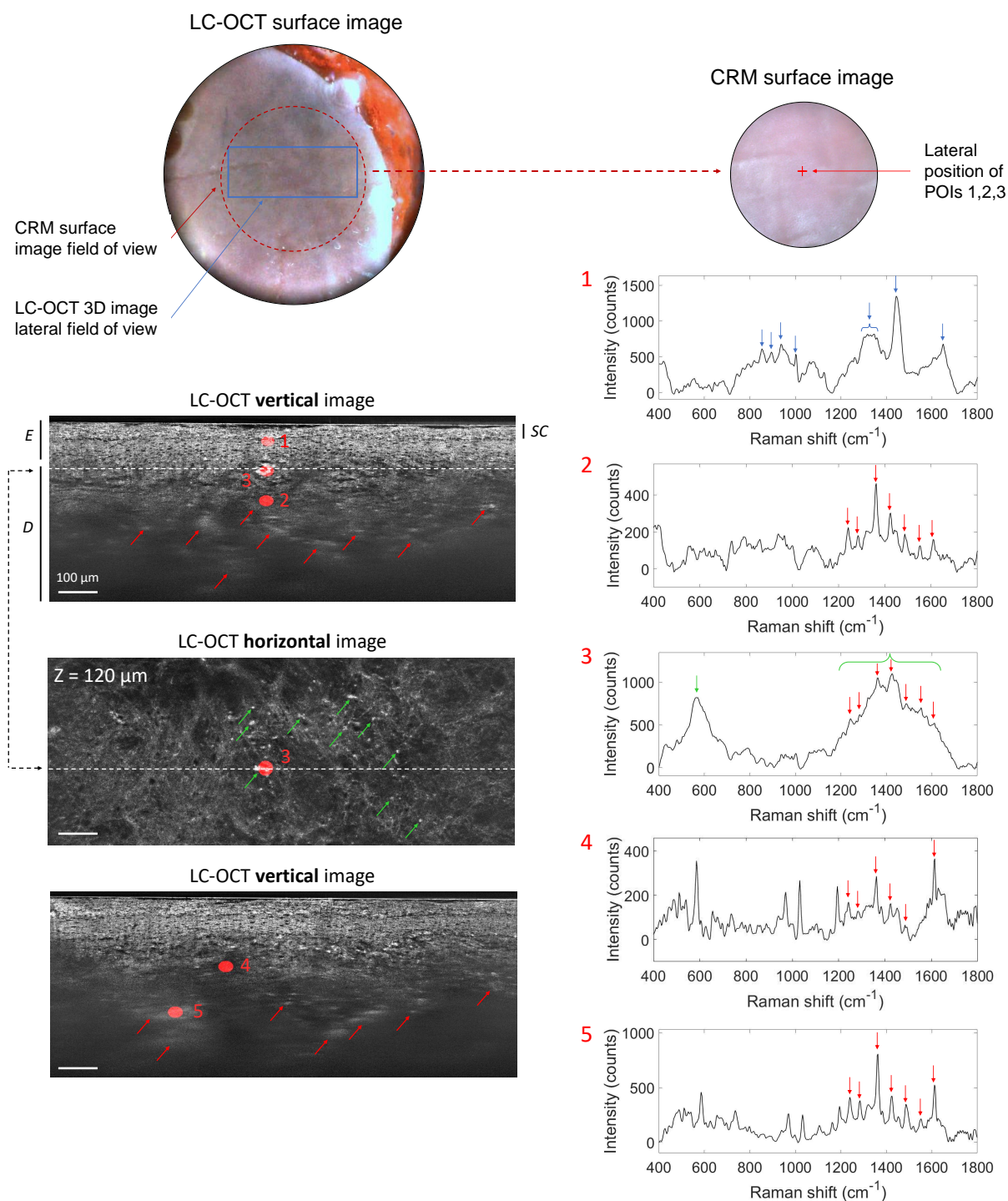


Figure 4.22 – Image LC-OCT 3D (vues verticale et horizontale) de la biopsie de tatouage à l'encre rouge, et spectres Raman associés obtenus pour cinq POI identifiés dans l'image LC-OCT 3D et matérialisés par les ellipsoïdes rouges. La ligne pointillée sur l'image horizontale montre la position de l'image verticale au-dessus par rapport au plan horizontal de l'image 3D, et vice-versa. La profondeur Z de l'image horizontale est indiquée par rapport à la surface de la peau. Les différentes couches superficielles de la peau sont visualisées : le stratum corneum (SC), l'épiderme (E) et le derme (D). Sur les images LC-OCT, les flèches rouges indiquent les zones brillantes contenant de l'encre de tatouage et les flèches vertes montrent les particules brillantes observées près de la jonction derme-épiderme. Sur les spectres Raman, les flèches bleues représentent les bandes Raman correspondant à l'épiderme et les flèches rouges les raies Raman attribuées à l'encre rouge. La flèche verte et le crochet représentent les principales bandes Raman associées aux particules brillantes observées près de la jonction derme-épiderme dans l'image LC-OCT 3D. Les images de surface fournies par les dispositifs LC-OCT et CRM sont également représentées. Figure extraite de [39].

pigments spécifiques ou des particules métalliques contenues dans l'encre, comme mentionné précédemment. Une deuxième hypothèse suggère que ces particules sont en réalité des cellules biologiques, et notamment des cellules inflammatoires, telles que des lymphocytes préalablement détectés dans la biopsie par immunohistochimie [42]. Les réactions dans les tatouages peuvent également impliquer des macrophages, qui sont des globules blancs ayant la capacité d'ingérer et de détruire des particules étrangères. Plusieurs publications [44, 226, 227] étudiant des tatouages en RCM ont montré leur présence près de la jonction derme-épiderme et dans le derme de la peau tatouée, dans le cadre d'une réaction inflammatoire. Ces macrophages englobent le pigment de l'encre et apparaissent comme des groupes de particules hyper-réfléchissantes, de forme irrégulière ou fusiforme. Cette description correspond à celle de nos particules brillantes observées en LC-OCT. On peut notamment noter une bonne correspondance morphologique entre les particules observées en LC-OCT et les images de RCM de mélanophages, qui sont macrophages ingérant de la mélanine, obtenues par Guitera *et al.* [44] tel qu'illustré à la figure 4.23. Les cellules inflammatoires ont été étudiées en CRM, mais généralement à une échelle plus petite (micrométrique) que celle du volume sondé par notre système et dans des conditions différentes de celles d'une biopsie de tatouage, rendant la recherche d'une correspondance avec notre spectre complexe. Une correspondance a pu être trouvée avec le spectre rapporté dans [45]. Ce spectre, acquis sur des macrophages, montre de façon intéressante une bande centrée autour de  $570\text{ cm}^{-1}$  ainsi qu'une large bande allant de  $\sim 1200$  à  $1650\text{ cm}^{-1}$ . Cependant, nous avons compris a posteriori que le spectre rapporté correspondait en réalité à un signal de photoluminescence générée par le substrat de mesure (du verre) utilisé dans [45], plutôt qu'à un signal Raman de cellules biologiques. Ceci suggère la présence de composés non biologiques générant de la photoluminescence au niveau des particules hyper-réfléchissantes. Etant donné la forte ressemblance morphologique de ces particules avec les macrophages, il pourrait hypothétiquement s'agir de macrophages ayant ingéré des pigments ou autres composés générant cette photoluminescence, leur fonction étant de phagocyter les corps étrangers.

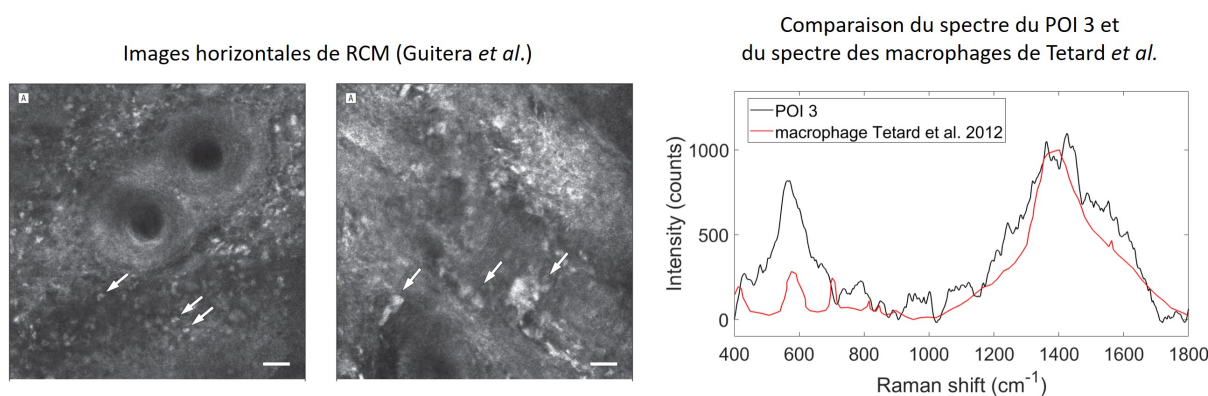


Figure 4.23 – Identification des particules brillantes observées en LC-OCT, notamment au POI 3, en comparaison à la littérature. On observe une bonne correspondance morphologique entre les particules observées en LC-OCT et les images de RCM de mélanophages, qui sont macrophages ingérant de la mélanine, obtenues par Guitera *et al.* [44]. D'un point de vue du spectre obtenu pour ces mêmes particules, on observe une bonne correspondance avec le spectre obtenu par Tetard *et al.* [45], avec une bande centrée autour de  $570\text{ cm}^{-1}$  ainsi qu'une large bande allant de  $\sim 1200$  à  $1650\text{ cm}^{-1}$ .

Le tableau 4.3 rassemble les principales observations faites sur cette biopsie de tatouage rouge. Pour résumer, sur cette biopsie, la co-localisation LC-OCT/CRM a révélé la présence d'encre de

tatouage rouge dans des zones claires et diffuses du derme. La CRM a permis d'identifier le type de pigment utilisé et de caractériser son abondance dans les différentes zones du derme. La combinaison des informations morphologiques et moléculaires suggère la présence hypothétique de macrophages correspondant aux petites particules hyper-réfléctives, repérées près de la jonction derme-épiderme en LC-OCT.

POI	Profondeur	Caractéristiques en LC-OCT	Raies Raman d'intérêt	Attribution
1	45 µm	Kératinocytes	852, 895, 936, 1001, 1300-1350, 1443, 1650 cm <sup>-1</sup>	Tissu épidermal [49]
2	200 µm	Région claire et diffuse du derme	1239, 1284, 1360, 1422, 1486, 1550, 1612 cm <sup>-1</sup>	Pigment rouge de type azoïque de l'encre de tatouage [222, 221]
3	120 µm	Particule hyper-réfléchissante de forme irrégulière (40 µm de taille) proche de la jonction derme-épiderme	565, 1200-1650 cm <sup>-1</sup>	Hypothétique cellule inflammatoire (macrophage) [44, 226, 227, 45]
4	185 µm	Derme	1239, 1284, 1360, 1422, 1486, 1550, 1612 cm <sup>-1</sup>	Pigment rouge en faible quantité
5	305 µm	Région claire et diffuse du derme	1239, 1284, 1360, 1422, 1486, 1550, 1612 cm <sup>-1</sup>	Pigment rouge en plus grande quantité par rapport au POI 4

Table 4.3 – Résumé de l'analyse morpho-moléculaire réalisée par LC-OCT/CRM co-localisées sur la biopsie du tatouage à l'encre rouge. Les raies Raman sélectionnées font uniquement référence aux raies Raman utilisées pour l'attribution biochimique.

## Biopsie de tatouage à l'encre noire

La figure 4.24 rassemble les résultats des expériences de co-localisation sur la biopsie de tatouage exécuté avec une encre noire inconnue. L'image LC-OCT 3D a été acquise directement dans le derme du fait du positionnement de biais de la biopsie dans le porte-échantillon. L'image montre les fibres de collagène et d'élastine constituant le derme, ainsi que les zones hypo-réfléchissantes où la lumière est complètement atténuée. Trois POIs ont été ciblés et analysés avec la CRM dans cette image 3D. Le POI 1 est situé dans une région comprenant des fibres dermiques bien définies à 20 µm de profondeur ; le POI 2 a été choisi dans une zone sombre relativement petite à 80 µm de profondeur et le POI 3 dans une vaste région sombre à 225 µm de profondeur.

Le spectre du POI 1 montre clairement des raies Raman liées au derme de la peau uniquement, avec des raies majeures à 815, 853, 884, 939, 1001, 1250-1340, 1452 et 1659 cm<sup>-1</sup> (flèches bleues) [49]. Le spectre Raman du POI 2 montre deux larges bandes centrées à 1320 et 1600 cm<sup>-1</sup> (flèches noires), avec des raies supplémentaires à 585, 1032, 1194 et 1614 cm<sup>-1</sup> malheureusement là aussi causées par une mauvaise soustraction du bruit de fond par le spectromètre. Les deux grandes bandes autour de 1320 et 1600 cm<sup>-1</sup> sont attribuées au carbone amorphe et sont typiques d'un pigment noir de carbone [222, 214]. Ce type de pigment a déjà été identifié dans réactions inflammatoires [217]. Plus intéressant encore, dans l'étude de Sepehri *et al.* [220] précédemment mentionnée, les auteurs

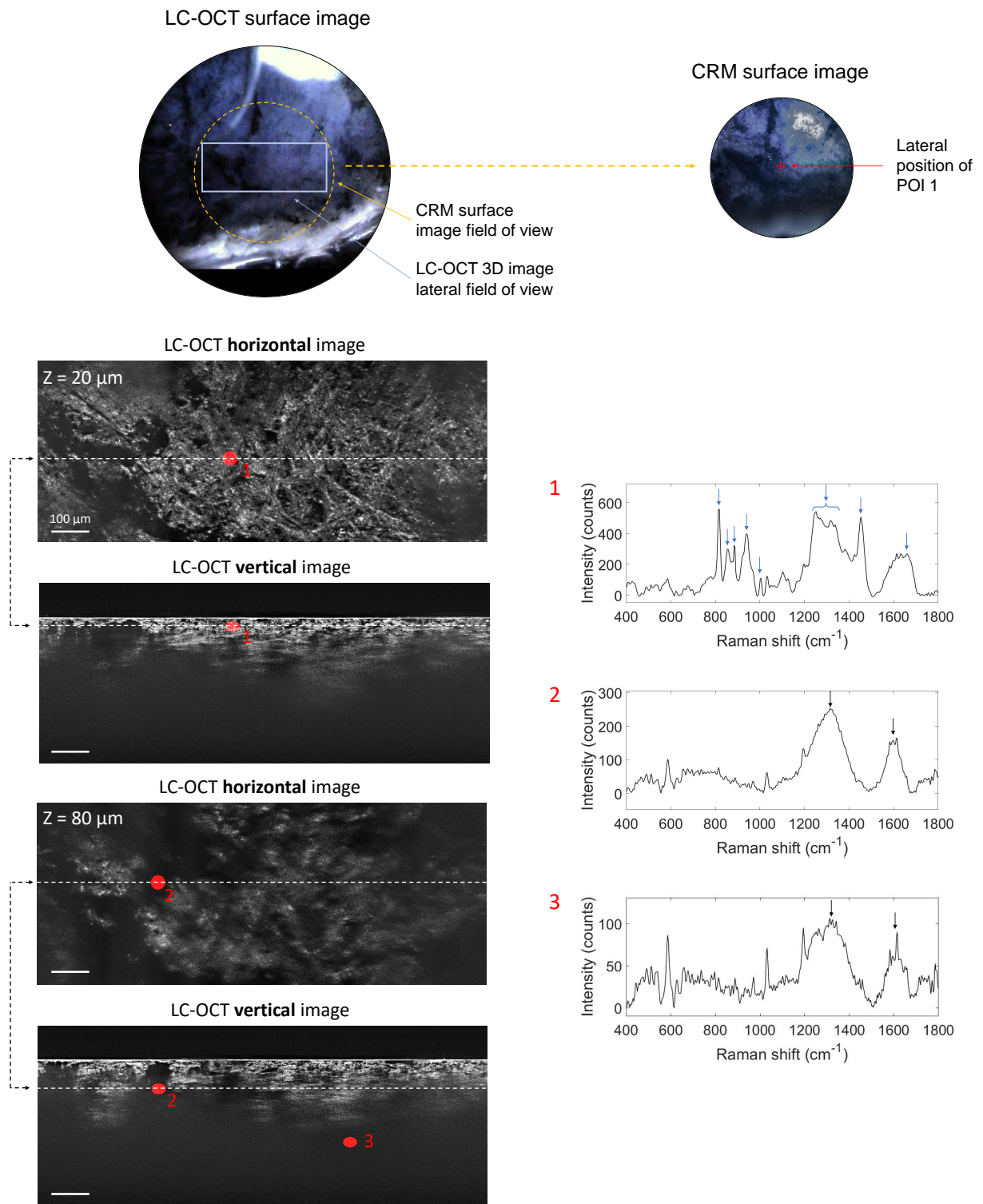


Figure 4.24 – Image LC-OCT 3D (vues orthogonales) d'une biopsie d'un tatouage de couleur noire, avec les spectres Raman associés obtenus avec le dispositif de CRM pour trois POIs identifiés dans l'image LC-OCT 3D et matérialisés par des ellipsoïdes rouges. Les lignes pointillées sur les images horizontales montrent la position de l'image verticale en dessous par rapport au plan horizontal de l'image 3D, et vice-versa. La profondeur Z de l'image horizontale est indiquée par rapport à la surface de la peau. Les flèches bleues sur les spectres Raman représentent les bandes Raman correspondant au derme et les flèches noires montrent les bandes Raman attribuées à l'encre noire. Les images de surface fournies par les appareils LC-OCT et CRM sont également représentées. Figure extraite de [39].



suggèrent que le pigment noir de carbone précisément pourrait avoir un effet adjuvant, c'est-à-dire stimulant la réaction du système immunitaire, potentiellement impliqué dans le développement de la sarcoïdose chez les individus présentant des prédispositions à la maladie. Ces interprétations sont à considérer avec précaution car peu d'études ont été publiées sur le sujet, mais cet exemple montre néanmoins l'intérêt clinique apporté par la CRM dans ce cas. Le POI 3, situé plus profondément dans une large région noire, présente également la signature Raman du pigment noir de carbone, mais avec une intensité plus faible en raison de la diffusion et de l'absorption de la lumière avec la profondeur. Cet exemple est intéressant car malgré l'absence de signal dans l'image LC-OCT (l'image est noire), on est capable de collecter un signal Raman jusqu'à cette profondeur de 225  $\mu\text{m}$ .

Le tableau 4.4 reprend les principaux résultats obtenus sur la biopsie du tatouage de couleur noire. Comme nous l'avons montré, la combinaison de la LC-OCT et CRM a permis d'identifier l'encre noire du tatouage dans les zones hypo-réfléchissantes du derme). La CRM a permis d'identifier le type de pigment noir (noir de carbone) utilisé dans l'encre, malgré l'absence de signal dans les zones contenant l'encre de l'image LC-OCT 3D. Le pigment a pu être identifié jusqu'à 225  $\mu\text{m}$  de profondeur avec la CRM, soulignant ainsi sa valeur pour l'identification des encres de tatouage en profondeur.

POI	Profondeur	Caractéristiques en LC-OCT	Raies Raman d'intérêt	Attribution
1	20 $\mu\text{m}$	Fibres dermiques bien définies	815, 853, 884, 939, 1001, 1250-1340, 1452, 1659 $\text{cm}^{-1}$	Derme [49]
2	80 $\mu\text{m}$	Zone hypo-réfléchissante du derme	Larges bandes centrées à 1320, 1600 $\text{cm}^{-1}$	Pigment noir de carbone [222, 214]
3	225 $\mu\text{m}$	Zone hypo-réfléchissante du derme	Larges bandes centrées à 1320, 1600 $\text{cm}^{-1}$	Pigment noir de carbone [222, 214]

Table 4.4 – Résumé des résultats morphologiques et biochimiques obtenus sur la biopsie du tatouage à l'encre noire. Les raies Raman sélectionnées font uniquement référence aux raies Raman utilisées pour l'attribution biochimique.

## Biopsie de tatouage par fulguration

Enfin, nous avons appliqué l'approche de co-localisation à la biopsie du tatouage induit par la fulguration. Comme pour la biopsie de tatouage de couleur noire, l'acquisition LC-OCT a été réalisée directement dans le derme. La biopsie comprend de grandes particules rondes et sombres de 20 à 100  $\mu\text{m}$  de diamètre et de petites particules brillantes de quelques  $\mu\text{m}$  à 40  $\mu\text{m}$  de diamètre. Il est supposé que ces particules proviennent de la fusion de l'argent contenu dans le collier du patient lors du foudroiement. 4 POIs ont été ciblés dans une image LC-OCT 3D et analysés avec le système de CRM. Les résultats sont donnés dans la figure 4.25. Le POI 1 a été choisi à 50  $\mu\text{m}$  de profondeur dans le derme ; le POI 2 cible quant à lui une grande particule sombre et arrondie située sous le POI 1, à 130  $\mu\text{m}$  de profondeur ; les POIs 3 et 4 ciblent tous deux de petites particules brillantes (d'une taille de  $\sim 20 \mu\text{m}$ ) situées à 5  $\mu\text{m}$  de profondeur dans le derme.

Pour faciliter la visualisation des raies Raman utilisées pour l'identification chimique, nous avons volontairement défini différentes plages de décalages Raman pour chaque POI dans la figure 4.25.

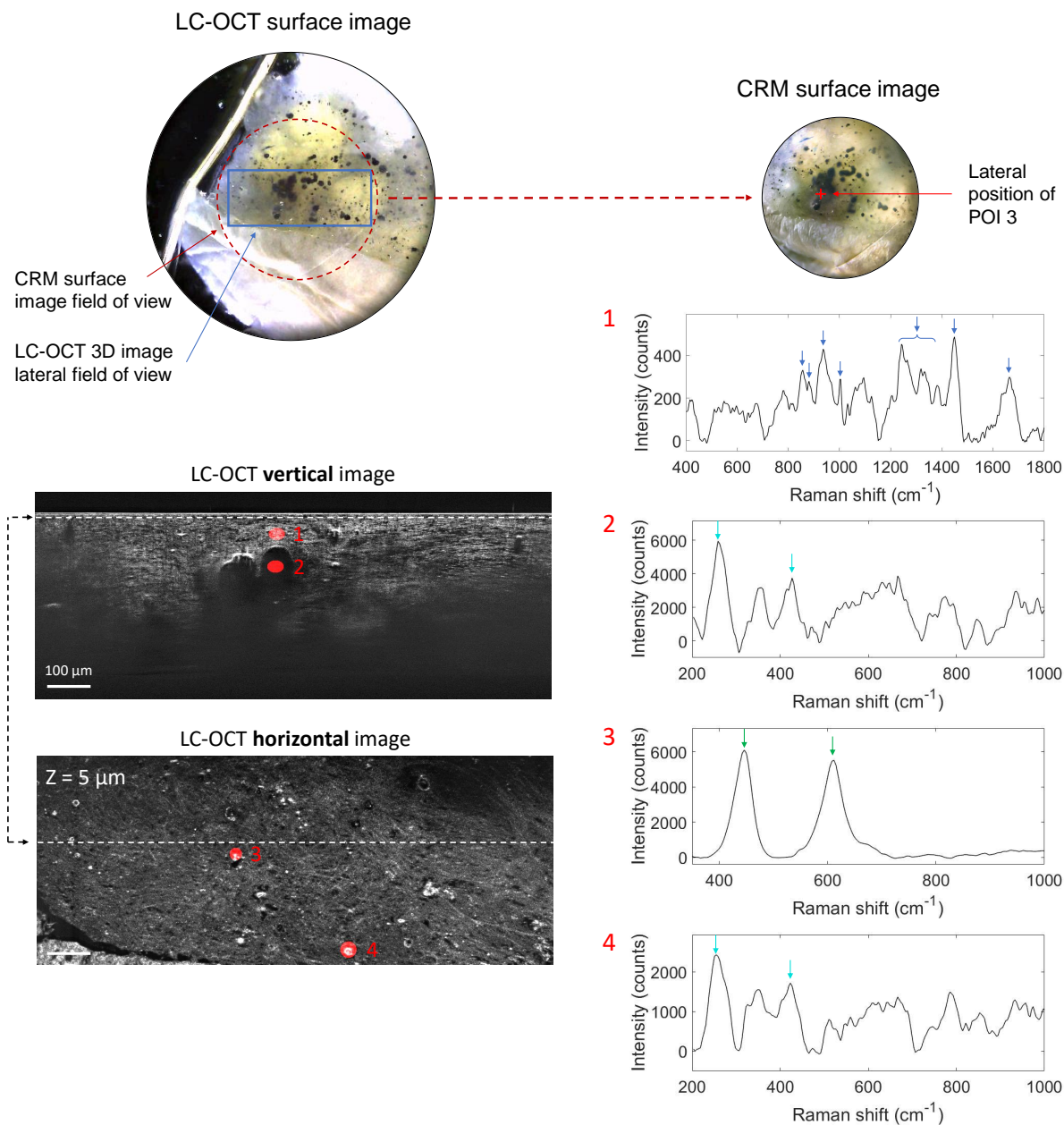


Figure 4.25 – Image LC-OCT 3D (vues orthogonales) d'une biopsie d'un tatouage induit par la fulguration, avec les spectres Raman associés obtenus par CRM pour quatre POIs choisis dans l'image LC-OCT 3D et matérialisés par des ellipsoïdes rouges. La ligne pointillée sur l'image horizontale montre la position de l'image verticale au-dessus par rapport au plan horizontal de l'image 3D, et vice-versa. La profondeur Z de l'image horizontale est indiquée par rapport à la surface de la peau. Les flèches bleu foncé sur les spectres Raman représentent les bandes Raman correspondant au derme, les flèches bleu clair correspondent aux bandes principales des matériaux hypothétiques dérivés de l'argent et les flèches vertes représentent les deux raies Raman attribuées au  $\text{TiO}_2$ . Les images de surface fournies par les dispositifs LC-OCT et CRM sont également présentées. Figure extraite de [39].

Le spectre Raman du POI 1 incluant le tissu dermique, montre les principales bandes Raman du derme, mises en évidence par des flèches bleu foncé [49]. En comparaison, le spectre du POI 2, ciblant une particule ronde et sombre, ne montre aucun pic correspondant au derme mais des raies autour de 258, 357, 429, 530-670, 775, 845  $\text{cm}^{-1}$ . Le spectre du POI 4, visant une petite particule brillante ( $\sim 20 \mu\text{m}$  de taille), présente un spectre similaire à celui du POI 2. Cette observation suggère que les deux particules sont probablement composées d'un matériau similaire, malgré des caractéristiques morphologiques différentes. Cependant cela reste cohérent avec l'imagerie LC-OCT car si les particules sont homogènes, il est logique que pour une grosse particule, la LC-OCT visualise une interface brillante mais un intérieur sombre. L'identification de ce matériau est difficile. La chaîne du patient est supposée être composée d'argent [43] mais l'argent, comme tous les métaux purs, n'est pas un matériau actif du point de vue Raman [228], mais il est souvent utilisé comme exalteur du signal Raman en spectroscopie Raman exaltée de surface (SERS) [229]. Néanmoins, selon les travaux précédents, quelques bandes dans les spectres des POI 2 et 4, représentées par des flèches bleu clair, semblent se retrouver dans les spectres des matériaux contenant de l'argent. Le décalage de 258  $\text{cm}^{-1}$  pourrait être attribué à la liaison C-O-Ag [230] ou à l'oxyde d'argent  $\text{Ag}_2\text{O}$  [231]. La bande de 429  $\text{cm}^{-1}$  a été rapportée dans le spectre de l'AgO [232]. Ces résultats sont donc cohérents avec l'hypothèse initiale selon laquelle le collier est composé d'argent ou de matériaux dérivés de l'argent. Le pic de 258  $\text{cm}^{-1}$  pourrait également être attribué aux produits de corrosion des alliages argent/cuivre [233], ce qui pourrait également être une interprétation potentielle puisque le cuivre est souvent associé à l'argent dans les bijoux et que la corrosion pourrait s'être produite lors du foudroiement. Les autres raies Raman dans les spectres des POIs 2 et 4 n'ont pas encore été identifiées. D'autres particules se sont avérées être composées d'un autre matériau, comme le montre le spectre du POI 3. Bien que visant une petite particule brillante d'environ 20  $\mu\text{m}$  de taille et morphologiquement similaire à la POI 4, le POI 3 présente un spectre différent, avec deux bandes à 446 et 611  $\text{cm}^{-1}$  révélant la présence de  $\text{TiO}_2$  sous sa forme rutile (flèches vertes) [234]. Le titane est un métal utilisé en bijouterie car il possède des propriétés de légèreté, de résistance à la corrosion et d'hypoallergénicité. Il peut être recouvert d'une fine couche d'oxyde de titane pour le protéger [235], ce qui pourrait expliquer la présence de  $\text{TiO}_2$  dans la biopsie. Il est également possible que l'oxydation du titane se soit produite lors du foudroiement.

Le tableau 4.5 reprend les principaux résultats obtenus sur la biopsie de tatouage induite par la fulguration. En résumé, la co-localisation LC-OCT-CRM a permis de repérer des particules de corps étrangers en 3D dans l'échantillon en utilisant l'imagerie LC-OCT, et d'analyser leur composition chimique en utilisant le dispositif de CRM. La précision de la co-localisation, combinée à la résolution cellulaire de la LC-OCT, a permis de cibler des particules d'une taille inférieure à 20  $\mu\text{m}$ . Des particules de matériaux différents (matériaux dérivés de l'argent,  $\text{TiO}_2$ ) ont été identifiées avec la CRM malgré des caractéristiques morphologiques identiques dans l'image LC-OCT. D'autre part, des particules présentant des caractéristiques morphologiques différentes ont pu être identifiées comme étant en réalité composées d'un matériau similaire. Ainsi, l'analyse de cette biopsie de tatouage induite par la fulguration, bien que complexe, démontre une fois de plus la complémentarité des deux modalités au niveau cellulaire, chacune apportant un bénéfice à l'autre.

En résumé, les résultats obtenus sur ces biopsies démontrent la valeur de notre méthode de co-localisation LC-OCT/CRM pour la caractérisation d'échantillons de peau humaine *ex vivo*. La co-

POI	Profondeur	Caractéristiques en LC-OCT	Raies Raman d'intérêt	Attribution
1	50 $\mu\text{m}$	Fibres dermiques	856, 880, 936, 1001, 1240-1380, 1450, 1664 $\text{cm}^{-1}$	Derme [49]
2	125 $\mu\text{m}$	Grosse (80 $\mu\text{m}$ ) particule sombre dans le derme	258, 429 $\text{cm}^{-1}$	Matériaux dérivés de l'argent : liaison C-O-Ag, $\text{Ag}_2\text{O}$ , AgO, alliages Cu-Ag [230, 231, 232, 233]
3	5 $\mu\text{m}$	Petite (20 $\mu\text{m}$ ) particule brillante dans le derme	446, 611 $\text{cm}^{-1}$	Dioxyde de titane $\text{TiO}_2$ [234]
4	5 $\mu\text{m}$	Petite (20 $\mu\text{m}$ ) particule brillante dans le derme	258, 429 $\text{cm}^{-1}$	Matériaux dérivés de l'argent : liaison C-O-Ag, $\text{Ag}_2\text{O}$ , AgO, alliages Cu-Ag [230, 231, 232, 233]

Table 4.5 – Résumé des résultats morphologiques et biochimiques obtenus sur la biopsie du tatouage induit par la fulguration. Les raies Raman sélectionnées correspondent aux raies Raman utilisées pour l'attribution biochimique.

localisation apporte à la LC-OCT un nouveau niveau de caractérisation de la peau, en apportant des informations moléculaires locales localisées précisément dans une image 3D : présence et quantité d'encre de tatouage dans des régions spécifiques des échantillons, identification de la composition chimique de l'encre, identification des cellules inflammatoires et des corps étrangers de différents matériaux, ce qui a permis de lever les ambiguïtés dues à leur aspect morphologique dans l'image. Par ailleurs, la co-localisation procure à la CRM un guidage par l'imagerie à haute résolution, ce qui permet de s'assurer que les structures d'intérêt (telles que les cellules inflammatoires de la biopsie de tatouage à colorant rouge) ont effectivement été bien ciblées avec le système de CRM. L'identification des micro-structures à analyser moléculairement est grandement facilitée par les modes d'imagerie LC-OCT 2D horizontal et vertical.

#### 4.6.5 . Co-localisation entre la LC-OCT et un système de CRM commercial

L'avantage de l'approche de co-localisation LC-OCT/CRM développée est qu'elle fait appel à des dispositifs de LC-OCT et de CRM totalement distincts et indépendants. Elle peut donc être mise en œuvre en utilisant un autre système de CRM que celui conçu au cours de cette thèse, sous couvert que le système de CRM dispose d'une voie d'imagerie de surface pour permettre la calibration entre les deux dispositifs. Au cours de cette thèse, nous avons validé la possibilité d'appliquer notre méthode de co-localisation à d'autres systèmes de CRM en réalisant des expérimentations de co-localisation LC-OCT/CRM avec un système de CRM commercial.

Le système de CRM que nous avons utilisé est un microscope Raman confocal XploRA PLUS commercialisé par Horiba Scientific. Une photographie du système est donnée à la figure 4.26. Ce type de système est utilisé par des laboratoires de recherche et des industries (pharmaceutiques, cosmétiques, etc.) à des fins de recherche ou de contrôle qualité. Il s'agit d'un système sur table permettant dans le domaine biomédical l'analyse d'échantillons *ex vivo*. Sa platine de translation XYZ motorisée permet de faire de l'imagerie Raman confocale à haute résolution. Ce système est



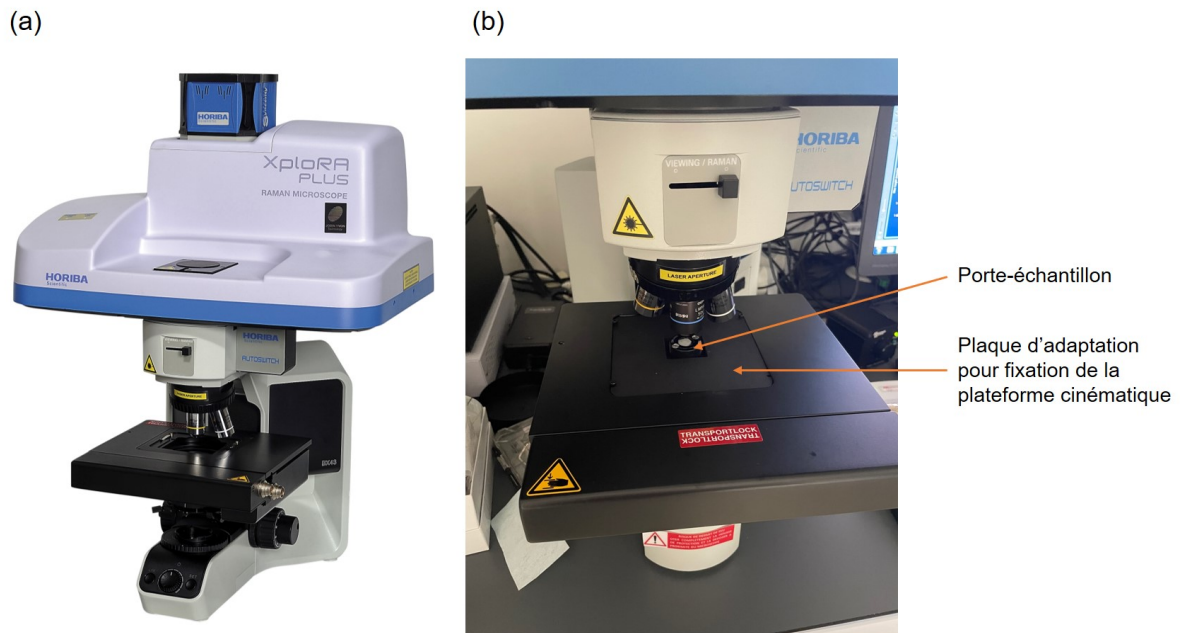


Figure 4.26 – a) Photographie du système commercial de microscopie Raman confocal XploRA PLUS commercialisé par Horiba Scientific. b) Zoom sur la platine de translation motorisée sur laquelle est clipsée une plaque d'adaptation permettant de fixer la plateforme cinématique et le porte-échantillon.

paramétrable sur de nombreux aspects. Il dispose de trois lasers d'excitation (532, 638 et 785 nm) permettant de sélectionner la longueur d'onde la plus adaptée à l'échantillon à analyser selon les critères précédemment mentionnés dans la section 4.4.1. Les objectifs de microscope et la taille du trou confocal peuvent être choisis en fonction de la quantité de signal à collecter et de la résolution spatiale souhaitée. Plusieurs réseaux de diffraction sont également disponibles, permettant de jouer sur la résolution spectrale. Le système XploRA PLUS dispose de plus d'une voie d'imagerie de surface destinée à positionner l'échantillon au point focal de l'objectif via la platine de translation XYZ motorisée.

Ce système étant un microscope sur table, la co-localisation ne peut être réalisée avec la plateforme motorisée présentée dans la section 4.7.2. La co-localisation est donc réalisée dans une configuration similaire à celle de la figure 4.13, avec deux platines de translations XYZ (une sous chaque dispositif). L'avantage ici par rapport au montage sur banc optique est que la platine motorisée du système de CRM commercial peut être directement utilisée pour les expérimentations de co-localisation.

Comme on l'a vu dans la section 4.6.2 dédiée à la calibration des platines de translation, le porte-échantillon doit être positionné toujours de la même manière sur chacune des deux platines. Ceci nécessite donc de fixer sur la platine du système de CRM commercial une plateforme cinématique. Le centre de la platine du système XploRA PLUS étant creuse, nous avons conçu une plaque d'adaptation avec une plateforme cinématique et un porte-échantillon spécifiquement conçus aux dimensions de la platine. La plaque d'adaptation vient se « clipser » dans le creux de la platine du système XploRA PLUS, tel qu'illustré à la figure 4.26b). Au centre de cette plaque, un renforcement est prévu pour y insérer la plateforme cinématique. Cette plaque d'adaptation a été conçue avec le logiciel SolidWorks (Dassault Systèmes, France). En raison des dimensions limitées de ce renforcement, contraintes par le

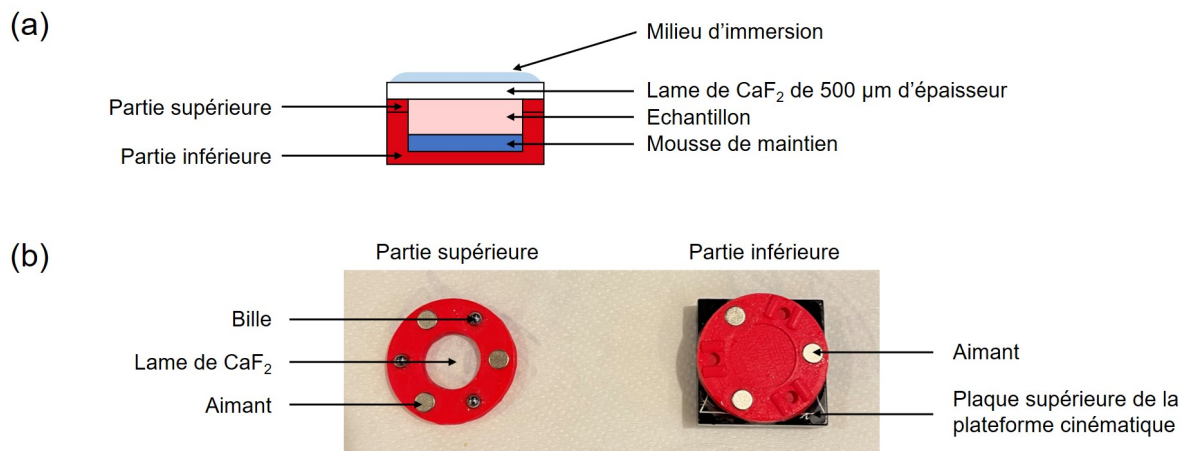


Figure 4.27 – a) Description schématique et b) photographie du porte-échantillon dédiée à la co-localisation LC-OCT/CRM adapté au système de CRM commercial XploRA PLUS.

système d'éclairage par le dessous de la platine, nous avons conçu un porte-échantillon de dimensions plus petites que celui décrit précédemment dans la section 4.5.1. Ce porte-échantillon, décrit à la figure 4.27, est composé de deux parties : la partie supérieure est évidée en son centre et une lame de  $\text{CaF}_2$  de 500  $\mu\text{m}$  d'épaisseur est collée par-dessus. La partie inférieure constitue un simple fond. Les deux plaques sont maintenues solidaires grâce à des aimants et des billes. L'échantillon à analyser est placé de façon à ce que sa surface soit en contact avec la lame de  $\text{CaF}_2$ . Une mousse est placée sous l'échantillon pour combler un éventuel vide entre les deux parties du porte-échantillon, et ainsi assurer que l'échantillon soit légèrement pressé contre la lame de  $\text{CaF}_2$  une fois les deux parties assemblées. De cette façon, l'échantillon reste immobile tout au long des expérimentations. Ce porte-échantillon a été conçu par un ingénieur de DAMAE Medical et fabriqué à l'aide d'une imprimante 3D.

Côté LC-OCT, une platine de translation XYZ a été placée sous la sonde de LC-OCT, cette dernière étant maintenue à la verticale par un support, tel qu'illustré à la figure 4.28. Sur la platine de translation est fixée une plateforme cinématique (partie inférieure), sur laquelle vient se positionner le porte-échantillon illustré à la figure 4.27.

Les platines des deux systèmes, placés dans deux pièces différentes, ont été calibrées suivant la procédure décrite dans la section 4.6.2. La calibration a été validée par une étude de répétabilité réalisée en ciblant plusieurs billes de  $\text{TiO}_2$  dans l'échantillon de calibration. A l'aide de ce montage, des expérimentations de co-localisation ont été réalisées en collaboration avec l'entreprise Chanel, partenaire de DAMAE Medical. L'objectif des expérimentations était d'investiguer les changements morphologiques et moléculaires induits par l'application d'un actif cosmétique sur des explants de peau saine. Comme introduit plus haut, le système de microscopie Raman XploRA PLUS est entièrement paramétrable. Classiquement, il est utilisé pour une analyse de coupes de peau fines, et travaille ainsi avec des objectifs très ouverts et à immersion dans l'air, comme nous l'avons évoqué au début de ce chapitre. Afin d'étudier l'effet de l'actif sur l'ensemble des couches de la peau, nous avons préféré utiliser un objectif 40x, d'ouverture numérique 0.8 et à immersion à eau, identique à celui utilisé sur le système de CRM présenté précédemment, afin de favoriser la collection de signal en profondeur et limiter les aberrations. Les paramètres (longueurs d'onde, trou confocal, résolution spectrale) ont été

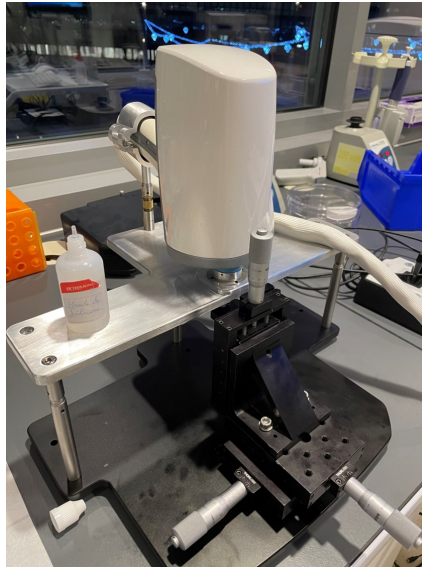


Figure 4.28 – Dispositif de LC-OCT dédié à l'imagerie *ex vivo*, placé dans un support maintenant la sonde à la verticale. Une platine de translation XYZ manuelle est placée sous la sonde.

optimisés pour l'application visée, mais malheureusement, la qualité des spectres Raman ne s'est pas révélée suffisante pour l'obtention de résultats, principalement en raison d'un manque de puissance au niveau de l'échantillon et de soucis d'optimisation de ces paramètres. Des investigations sont en cours pour améliorer la qualité des acquisitions.

#### 4.6.6 . Conclusion sur la co-localisation LC-OCT/CRM avec deux systèmes distincts

Pour résumer, nous avons présenté dans cette partie une méthode permettant de co-localiser les données acquises par des appareils LC-OCT et CRM séparés. Cette méthode permet l'acquisition de spectres Raman en des points ciblés dans une image 3D LC-OCT, avec une précision de  $\pm 20 \mu\text{m}$  en XY et  $\pm 10 \mu\text{m}$  en Z. La co-localisation LC-OCT/CRM repose sur l'utilisation d'un porte-échantillon spécifique qui peut être positionné sous chaque appareil avec une grande répétabilité et d'une calibration préalable de deux platines de translations XYZ placées sous chaque appareil.

Nous avons validé cette méthode sur des échantillons de peau de cochon tatouée, puis l'avons appliqué à la caractérisation de biopsies de tatouages présentant des réactions cutanées. L'application à ces biopsies de tatouage nous a permis de mettre en lumière la complémentarité des deux modalités, chacune apportant un bénéfice à l'autre : la CRM apporte des informations moléculaires supplémentaires que la LC-OCT seule ne peut fournir, permettant de lever des ambiguïtés dans l'image et d'identifier des structures spécifiques, d'une manière similaire à l'immunohistochimie, mais sans nécessiter de préparation spécifique de la biopsie. La LC-OCT quant à elle apporte à la CRM un guidage à l'échelle cellulaire, permettant une analyse moléculaire de structures précisément localisées en 3D dans les échantillons. La combinaison des deux techniques permet de ce fait une meilleure caractérisation des échantillons analysés.

Par ailleurs, l'avantage de l'approche de co-localisation est sa modularité puisqu'elle peut être

adaptée à d'autres systèmes de CRM que celui développé dans cette thèse, sous couvert de disposer d'une voie d'imagerie de surface nécessaire pour l'étape de calibration. Nous avons effectué la preuve de concept de cette modularité sur un système de CRM commercial, et d'autres applications de cette co-localisation pourront être envisagées à l'avenir, sous couvert de quelques améliorations pour faciliter la procédure de co-localisation.

#### 4.7 . Co-localisation LC-OCT/CRM *ex vivo* avec une plateforme motorisée

Le montage avec les platines manuelles et la procédure de co-localisation développés présentent néanmoins des limites : les expériences de co-localisation sont relativement longues à mettre en place car elles nécessitent une étape de calibration réalisée en  $\sim 2$  h. La procédure de co-localisation nécessite également que l'opérateur lise et enregistre les coordonnées sur la platine XYZ manuelle. Il doit déplacer manuellement le porte-échantillon du dispositif de LC-OCT vers le système de CRM. Ces étapes peuvent être un peu fastidieuses et chronophages. Ce montage a permis d'effectuer la preuve de concept de la co-localisation LC-OCT/CRM et les premières expérimentations sur biopsies, mais il est en l'état difficilement transportable et utilisable en clinique. Pour répondre à ces limitations techniques, nous avons par la suite développé un prototype de plateforme dédiée à la co-localisation LC-OCT/CRM *ex vivo*, compacte et mobile. Pour concevoir une plateforme de co-localisation compacte et transportable, nous avons dans un premier temps intégré le montage de CRM présenté dans la partie 4.4 dans un dispositif de sonde portable. Dans les sections qui suivent, nous présentons la conception de cette sonde portable de CRM, puis son intégration au sein d'une plateforme dédiée à la co-localisation LC-OCT/CRM.

##### 4.7.1 . Conception d'une sonde de microspectroscopie Raman

La sonde de CRM conçue au cours de cette thèse est d'un point de vue externe, tout à fait identique à une sonde de LC-OCT. On peut d'ailleurs le constater à la figure 4.29 montrant les deux sondes, LC-OCT et CRM, l'une en face de l'autre. La conception opto-mécanique de la sonde a été effectuée avec les ingénieurs de DAMAE Medical. L'architecture optique de la sonde CRM est similaire à l'architecture du montage sur banc optique de la figure 4.1. Les composants utilisés sont les mêmes que ceux utilisés dans ce montage, à la différence près que l'éclairage externe par la source à LEDs blanches utilisée sur le montage CRM sur banc optique pour l'imagerie dermoscopique a été remplacé par une couronne de LEDs positionnée au niveau de l'objectif de microscope de la sonde CRM. Cette sonde de CRM est conçue pour des applications à la fois *ex vivo* et *in vivo* et reprend ainsi le même concept que pour la modularité *in vivo/ex vivo* de la sonde de LC-OCT, décrit à la section 2.3.2 du chapitre 2 : l'objectif de microscope est contenu dans une cuve en deux parties identique à celle utilisée sur le dispositif de LC-OCT, à la différence que la partie inférieure de la cuve (l'embout amovible) comporte une lame de CaF<sub>2</sub> au lieu d'une lame de silice fondue. Afin d'effectuer des acquisitions en profondeur dans la peau *in vivo*, une platine piézoélectrique ayant une course de 500  $\mu\text{m}$  a été ajoutée dans la sonde de CRM afin de translater l'objectif de microscope dans la cuve et ainsi déplacer le point focal du système CRM en profondeur dans la peau.

Afin de s'assurer qu'aucune dégradation des performances du système de CRM n'a été introduite par l'intégration dans une sonde portable, nous avons comparé les caractéristiques de la sonde de CRM

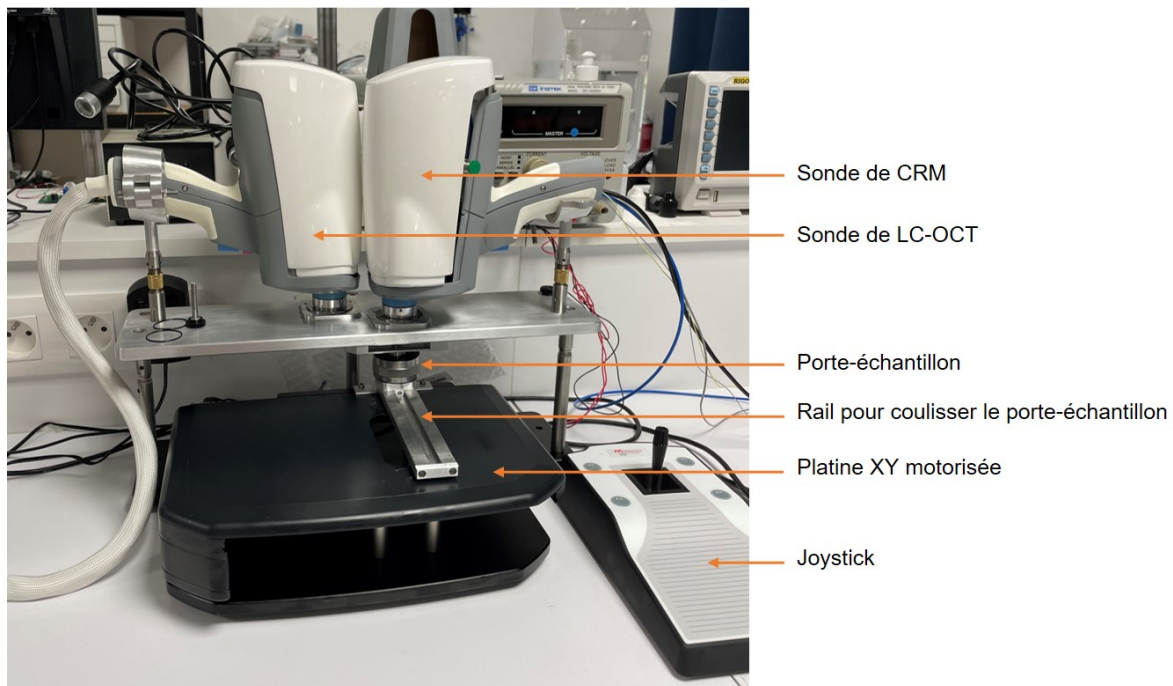


Figure 4.29 – Photographie de la plateforme compacte dédiée à la co-localisation LC-OCT/CRM *ex vivo*.

(résolution axiale, qualité des spectres) à celles du montage sur banc optique. Pour cela, nous avons tout d'abord comparé le montage de sonde au montage sur banc optique dans les mêmes conditions, c'est-à-dire en utilisant le montage sonde sans cuve (avec l'objectif à nu comme dans le montage sur banc) à une immersion à eau. Cela nous permet de vérifier qu'aucune dégradation n'est introduite par la configuration compacte du montage optique en lui-même dans la sonde. La résolution axiale a été mesurée en translatant le point focal de la sonde au travers d'un échantillon de silicium, tel que précédemment décrit dans la partie 4.4.4. Nous avons alors mesuré une résolution axiale de  $29\ \mu\text{m}$ , similaire à celle du montage sur banc optique. Ensuite, nous avons mesuré la résolution axiale de la sonde de CRM en rajoutant la cuve dans sa configuration *ex vivo*, c'est à-dire avec uniquement la partie supérieure de la cuve (sans la partie inférieure, *i.e.*, l'embout amovible) ; de l'eau est introduite comme immersion dans la partie supérieure de la cuve et entre la lame de silice fondue de la cuve et la lame de  $\text{CaF}_2$  du porte-échantillon. Ici, la résolution axiale a été mesurée en translatant le point focal de la sonde au travers de l'interface entre la lame de  $\text{CaF}_2$  du porte-échantillon et un échantillon de PDMS, tel que précédemment décrit dans la partie 4.5.1. Une résolution axiale de  $39\ \mu\text{m}$  a été mesurée, plus faible que la résolution mesurée sur banc optique. Cette dégradation est probablement due à l'introduction d'une lame de silice fondue de  $500\ \mu\text{m}$  dans la cuve contenant l'objectif de microscope, en plus de la lame de  $\text{CaF}_2$  du porte-échantillon. En pratique, nous avons fait le choix de changer le milieu d'immersion utilisé pour la sonde de CRM : l'eau a été remplacée par de l'huile de silicone. Ce choix permet d'éviter le changement de milieu d'immersion au cours des expériences de co-localisation, l'étape de nettoyage étant chronophage et fastidieuse. Ce changement de milieu d'immersion allège la procédure de co-localisation, au détriment de la résolution axiale, mesurée de  $50\ \mu\text{m}$ . Néanmoins, nous avons considéré cette dégradation comme acceptable puisqu'elle reste de

l'ordre de la taille de quelques cellules.

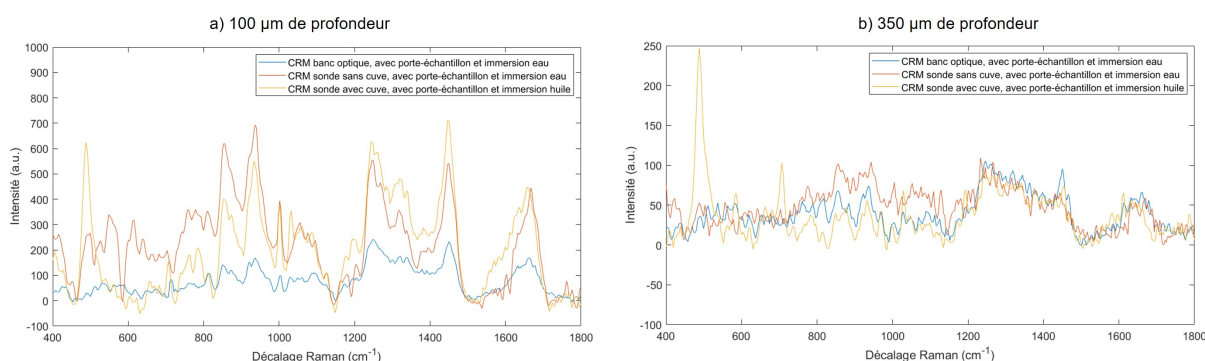


Figure 4.30 – Comparaison des spectres collectés dans un échantillon de peau de cochon *ex vivo* par le système de CRM sur banc optique à immersion eau (spectre bleu), par le système sonde de CRM sans cuve à immersion à eau (orange), et par le système sonde de CRM avec cuve à immersion huile (jaune). Les spectres sont acquis avec une puissance de 40 mW, un temps d'intégration de 10 s et 3 accumulations. Les spectres sont soustraits de l'auto-fluorescence et lissés. a) Spectres acquis à 100 µm de profondeur dans l'échantillon et b) spectres acquis à 350 µm de profondeur dans l'échantillon.

Nous avons ensuite comparé la qualité des spectres. Pour cela, comme précédemment, nous avons tout d'abord comparé le montage de sonde au montage sur banc optique dans les mêmes conditions, c'est-à-dire en utilisant le montage de sonde sans cuve (avec l'objectif à nu) et avec une immersion à eau. Nous avons alors comparé le signal Raman obtenu en focalisant le faisceau d'excitation sur du silicium dans cette configuration et avec le montage sur banc optique, dans les mêmes conditions d'acquisitions (mêmes puissance laser, temps d'intégration). Nous avons obtenu la même intensité de signal Raman du silicium à  $521\text{ cm}^{-1}$ , montrant ainsi qu'aucune dégradation n'a été introduite par la compacité du montage dans la sonde. Nous avons ensuite comparé les spectres de peau. Pour ce faire, nous avons acquis avec le montage de sonde (toujours sans cuve et à immersion à eau) un spectre dans un échantillon de peau de cochon *ex vivo*, placé dans le porte-échantillon. Nous l'avons alors comparé à un spectre de peau de cochon (placé également dans le porte-échantillon), acquis avec le système de CRM sur banc optique à immersion eau et dans les mêmes conditions (40 mW, 10 s, 3 accumulations, même profondeur de 100 µm). Enfin, afin d'évaluer l'impact de l'ajout de la cuve et du changement de milieu d'immersion, nous avons acquis, avec la sonde de CRM avec cuve dans sa configuration *ex vivo* et à immersion huile, un spectre Raman dans un échantillon de peau de cochon *ex vivo* (placé dans le porte-échantillon), toujours dans les mêmes conditions (40 mW, 10 s, 3 accumulations, même profondeur de 100 µm). La comparaison des spectres par chacun des systèmes est donnée à la figure 4.30a). Entre le montage de sonde sans cuve (avec l'objectif à nu) à immersion à eau (spectre orange) et le montage sur banc optique à immersion eau (spectre bleu), aucune dégradation n'est constatée ; au contraire même, on peut même noter une intensité du signal acquis avec le montage de sonde plus élevée que celle du signal acquis avec le montage sur banc optique. De plus, aucune dégradation nette n'est observée entre la sonde de CRM avec cuve dans sa configuration *ex vivo* et à immersion huile (spectre jaune) et la sonde sans cuve (avec l'objectif à nu) à immersion à eau (spectre orange), suggérant ainsi que l'ajout sur le chemin optique d'une lame de silice fondue dans la cuve n'impacte pas la qualité des spectres. On peut noter l'apparition de bandes Raman à  $488\text{ cm}^{-1}$  et  $708\text{ cm}^{-1}$  dans le spectre acquis avec la sonde de CRM avec cuve dans sa configuration *ex vivo* et à immersion huile, correspondant à des pics résiduels de l'huile de silicone,



cette dernière ayant un très fort signal Raman comparé à la peau. La comparaison a été réitérée à différentes profondeurs et n'a pas montré de dégradation du signal Raman de la peau avec la sonde de CRM par rapport au montage sur banc optique. A 350  $\mu\text{m}$  de profondeur, telle qu'illustré à la figure 4.30b), on observe en effet cette fois le même niveau de signal Raman pour l'ensemble des 3 configurations étudiées. Le prototype de sonde CRM validé, celui-ci a été intégré sur une plateforme dédiée à la co-localisation, présentée dans la section suivante.

#### 4.7.2 . Intégration au sein d'une plateforme motorisée de co-localisation

Une photographie de la plateforme de co-localisation est donnée à la figure 4.29. Cette plateforme a été conçue par les ingénieurs de DAMAE Medical. Elle est composée d'une plaque présentant deux supports dans lesquels les deux sondes, LC-OCT et CRM, viennent se positionner à  $180^\circ$  l'une de l'autre, avec leur objectif de microscope orienté à la verticale. Sous ces deux sondes, une platine de translation XY motorisée, contrôlable par un logiciel ou à l'aide d'un joystick, permet de déplacer un porte-échantillon entre les deux dispositifs. Cette platine motorisée est montée sur une platine motorisée en Z (ne figurant pas à la figure 4.29). Le porte-échantillon est fixé sur un rail coulissant permet de l'extraire de la plateforme pour insérer un échantillon ou changer d'échantillon dans le porte-échantillon. Cette plateforme constitue un prototype compact, intégré, facilement démontable et transportable pour l'installer dans un laboratoire ou hôpital. Cette plateforme facilite grandement la procédure de co-localisation : le déplacement de l'échantillon entre les deux dispositifs est motorisé et la lecture des coordonnées se fait directement via le logiciel des platines motorisée. L'utilisation d'un même milieu d'immersion pour les deux modalités permet de gagner du temps lors du déplacement du porte-échantillon de la sonde LC-OCT à la sonde CRM.

En amont des expérimentations, la plateforme avec les deux sondes est calibrée selon une procédure similaire à celle décrite dans la section 4.6.2. Quelques étapes se trouvent simplifiées : les translations motorisées en XYZ facilitent le déplacement de l'échantillon de calibration pour cibler avec la LC-OCT des billes de  $\text{TiO}_2$  et les placer à la position  $(X, Y, Z)_{image} = (0, 0, 0)$  du repère de l'image 3D LC-OCT tel que décrit dans la section 4.6.2. L'utilisation d'une platine de translation XY commune permet de s'affranchir de la rotation d'angle  $\theta$  auparavant présente entre les deux platines de translation. Ces simplifications permettent de réduire de moitié le temps nécessaire pour effectuer la calibration. L'ajustement en Z du point focal du système CRM est désormais effectué à l'aide de la platine piézo-électrique de la sonde CRM, ce qui permet, une fois la calibration réalisée, de s'affranchir de l'utilisation de la platine motorisée en Z (elle est maintenue fixe à une position donnée) ce qui facilite le processus de co-localisation.

Tout comme pour la preuve de concept réalisée sur banc optique, nous avons validé la plateforme de co-localisation LC-OCT/CRM par une étude de répétabilité telle que celle rapportée dans la section 4.6.2. Nous l'avons également validée sur les échantillons de peau de cochon tatouée, de façon similaire aux expérimentations rapportées dans la section 4.6.3. Une fois la plateforme validée, nous l'avons transportée au CHU de Saint-Etienne pour appliquer la co-localisation LC-OCT/CRM à la caractérisation de chirurgies, incluant des chirurgies de cancers cutanés.



### 4.7.3 . Expérimentations au CHU de Saint-Etienne avec la plateforme de co-localisation LC-OCT/CRM

Deux jours d'expérimentations ont été menés au CHU de Saint-Etienne. Au cours de ces deux jours, nous avons eu l'occasion de caractériser plusieurs échantillons, comprenant à la fois des échantillons frais issus de chirurgies réalisées le jour même et des échantillons congelés. Parmi les chirurgies, quelques cas de carcinomes basocellulaires et spinocellulaires ont pu être caractérisés. L'analyse des résultats est cependant toujours en cours en raison du grand nombre de données générées et nous ne pouvons pas présenter tous les cas étudiés. Ainsi, nous allons dans cette partie nous focaliser sur un cas pathologique : une chirurgie de carcinome basocellulaire.

Sur cette chirurgie, l'objectif premier visait à évaluer le potentiel de notre montage de CRM et méthode de co-localisation LC-OCT/CRM pour différencier des tissus cancéreux de tissus sains. Par rapport à la validation précédemment effectuée sur les biopsies de tatouage, l'enjeu est là d'évaluer si la CRM, guidée par l'imagerie LC-OCT, permet l'identification de marqueurs tumoraux potentiellement bien plus subtils que les différences observées entre la peau et l'encre de tatouage. Pour cela, notre démarche a consisté à imager en LC-OCT des zones saines et des zones clairement identifiées comme cancéreuses basée sur leur morphologie, et à acquérir des spectres Raman dans ces deux zones grâce au guidage via la co-localisation. Dans ces spectres, nous avons alors cherché à identifier des marqueurs moléculaires permettant de différencier les tissus sains des tissus identifiés comme clairement cancéreux basés sur l'image LC-OCT. Cette approche constitue un bon point de départ pour valider le potentiel de la CRM pour l'identification de tissus cancéreux. Une fois cette validation réalisée, il nous sera possible d'investiguer si de nouvelles informations ou de nouveaux marqueurs, qui ne sont donnés par l'image LC-OCT, peuvent être apportés par la CRM en complémentarité des informations morphologiques fournies par les images.

Pour ce faire, nous nous sommes tout d'abord intéressés à la caractérisation de la peau saine, en acquérant des spectres des différentes couches de peau dans une zone saine de cette chirurgie de BCC. Puis nous avons réalisé des acquisitions Raman dans la zone cancéreuse de la chirurgie, que nous avons analysées en comparaison aux spectres de la zone saine de cette même chirurgie. L'analyse des spectres Raman a été réalisée en collaboration avec Ali Tfayli du laboratoire Lipsys<sup>2</sup>, qui a été d'une grande aide de par son expertise en analyse de données spectrales.

#### 4.7.3.1 . Acquisitions et traitements des spectres Raman

Pour chaque échantillon, plusieurs images LC-OCT 3D ont été acquises, dans lesquelles plusieurs POIs ont été ciblés et analysés par CRM. Les spectres Raman ont été acquis dans les conditions suivantes : 60 mW envoyés sur l'échantillon, 20 s de temps d'intégration et 3 accumulations.

Le traitement des spectres a été réalisé à l'aide d'un logiciel spécifique dédié à l'analyse de spectres Raman (LabSpec 6 software, Horiba Scientific, France). L'analyse s'est pour le moment concentrée sur la gamme allant de 400 à 1800  $\text{cm}^{-1}$ , zone comportant la majorité des raies et bandes Raman d'intérêt de la peau. Les spectres ont été corrigés de l'auto-fluorescence à l'aide d'une fonction polynomiale d'ordre 4. Par la suite, les spectres ont été normalisés afin de faciliter la comparaison entre spectres sans différence d'échelle d'intensité. La méthode de normalisation choisie (« vecteur unitaire ») consiste à considérer chaque spectre comme un vecteur dont chaque point représente une composante du vecteur et à normaliser le spectre de façon à rendre sa norme égale à 1. En d'autres termes, si l'on

note  $\sigma_i$  chaque nombre d'onde du spectre et  $I(\sigma_i)$  l'intensité associée à chaque nombre d'onde dans le spectre initial, l'intensité  $I_{norm}(\sigma_i)$  associée à chaque nombre d'onde après normalisation s'écrit :

$$I_{norm}(\sigma_i) = \frac{I(\sigma_i)}{\sqrt{\sum I(\sigma_j)^2}} \quad (4.1)$$

Où  $\sqrt{\sum I(\sigma_j)^2}$  représente la norme du spectre. De cette façon, la norme du spectre normalisé, s'écrivant  $\sqrt{\sum I_{norm}(\sigma_j)^2} = 1$ . Cette méthode de normalisation par la norme du spectre fournit ainsi un spectre normalisé dont l'intensité de chaque raie ou bande reflète leur « poids » par rapport au poids total du spectre, ce qui permet facilement de comparer leur contribution d'un spectre à un autre. D'autres méthodes existent, comme la normalisation par rapport à une raie ou bande donnée du spectre, cependant cela nécessite d'avoir des raies ou bandes inchangées d'un spectre à un autre et une connaissance *a priori* de ces raies ou bandes. Les spectres normalisés ont ensuite été multipliés par une constante égale à 10 000 afin de travailler avec des intensités du même ordre de grandeur que les spectres initiaux. Les spectres ont finalement été lissés à l'aide d'un filtre polynomial d'ordre 4 sur une fenêtre de 7 points consécutifs.

#### 4.7.3.2 . Caractérisation des différentes couches de peau saine

Comme introduit précédemment, nous nous sommes tout d'abord intéressés à la caractérisation des différentes couches de peau saine, caractérisation qui nous servira de référence pour l'analyse des spectres dans la zone cancéreuse. Pour cela, nous avons acquis des spectres Raman dans une zone saine de la chirurgie de BCC. Grâce à la co-localisation LC-OCT/CRM, nous avons acquis des spectres dans l'épiderme et le derme sains, donnés à la figure 4.31. Les deux spectres ont été normalisés par leur norme, tel que décrit dans la section précédente. Les deux spectres présentent des différences clairement visibles. Les principales différences observées sont listées dans le tableau 4.6 avec leurs attributions indicatives. On peut observer des différences au niveau des protéines (groupes amide I et III), des acides aminés constituant des protéines (tryptophane, la tyrosine, proline, phénylalanine), et des lipides. Les différences observées ont été confrontées à la littérature et confirmées par de précédentes études [49, 23].

Au niveau de la bande amide I, on peut observer que l'épiderme présente un maximum à 1654  $\text{cm}^{-1}$ , caractéristique de la kératine structurée en hélices alpha. Dans le derme, le collagène est à l'origine d'un élargissement de cette bande amide I vers 1661  $\text{cm}^{-1}$  [49, 23]. Au niveau des acides aminés, le tryptophane présente une raie de vibration à 750  $\text{cm}^{-1}$  dans l'épiderme et décalée à 761  $\text{cm}^{-1}$  dans le derme [49]. Concernant la tyrosine, le maximum de la bande Raman est observé à 853  $\text{cm}^{-1}$  pour l'épiderme, tandis que la bande est élargie et présente un maximum à 856  $\text{cm}^{-1}$  dans le derme [23]. A 925  $\text{cm}^{-1}$ , on observe une bande Raman dans le derme, absente dans l'épiderme, due à la proline du collagène du derme [49, 23]. La bande à 1002  $\text{cm}^{-1}$ , associée à la phénylalanine, présente une intensité plus faible dans le derme que l'épiderme, en accord avec [23]. Au niveau de la bande des lipides autour de 1110-1130  $\text{cm}^{-1}$ , on peut observer une bande présentant deux maxima à 1118  $\text{cm}^{-1}$  et 1125  $\text{cm}^{-1}$  dans l'épiderme, tandis que seule la raie à 1118  $\text{cm}^{-1}$  est visible dans le derme, traduisant une différence dans l'organisation des lipides [49]. Concernant la bande à 1445-1450  $\text{cm}^{-1}$ , attribuée aux liaisons CH des protéines et des lipides, on peut observer un maximum à 1447  $\text{cm}^{-1}$  dans l'épiderme, décalé à 1450  $\text{cm}^{-1}$  dans le derme en raison de la présence de collagène et d'élastine

[49]. Enfin, on peut également observer entre l'épiderme et le derme une différence au niveau du ratio d'intensités de la bande à  $1258\text{ cm}^{-1}$ , associée aux groupes amide III des protéines, et de la bande entre  $1306$  et  $1320\text{ cm}^{-1}$ , associée aux lipides. Ce ratio est plus faible dans l'épiderme (ratio  $< 1$ ) que dans le derme (ratio  $> 1$ ), en accord avec [23].

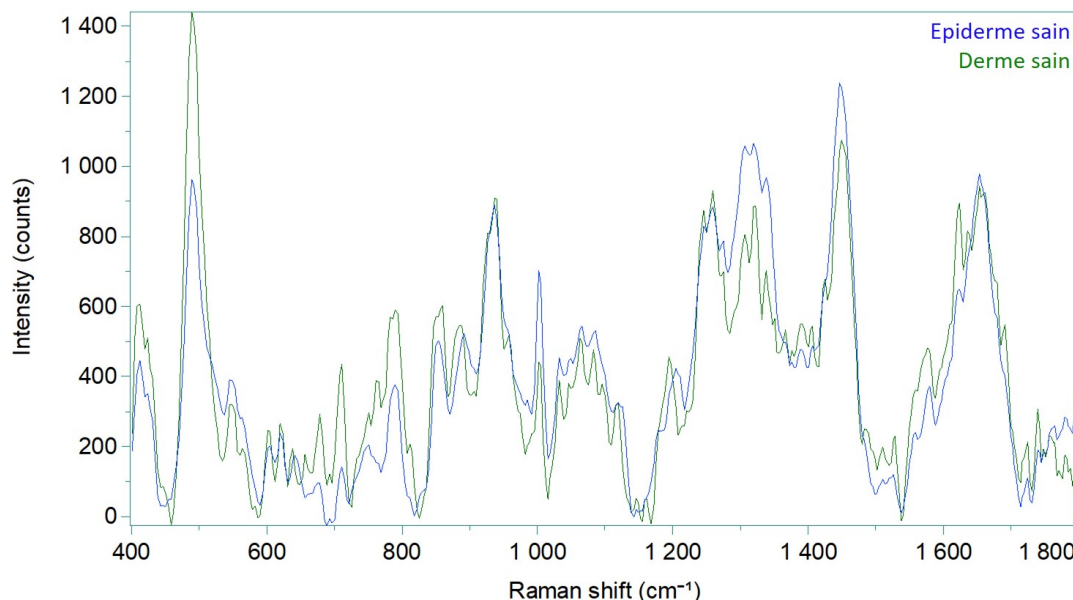


Figure 4.31 – Spectres Raman de l'épiderme (en bleu) et du derme (vert) sains, acquis dans une zone saine de chirurgie cutanée. Les deux spectres ont été normalisés par leur norme.

au-delà de la caractérisation de l'épiderme et du derme sain, nous avons eu l'occasion de caractériser un échantillon d'hypoderme (*i.e.*, la couche située sous le derme), constitué principalement de tissus adipeux. Sur cet échantillon, nous avons utilisé la co-localisation LC-OCT pour cibler deux structures différentes, illustrées à la figure 4.32. L'image LC-OCT montre une architecture alvéolée de l'échantillon, constitué d'une multitude de lobules sombres, séparés les uns des autres par des structures plus claires à l'image. Cette organisation alvéolée peut également bien s'observer sur l'image de surface du système de LC-OCT. Dans cet échantillon, nous avons acquis deux spectres Raman : le premier spectre a été acquis dans un des lobules sombres, représenté par le POI 1 situé à  $75\ \mu\text{m}$  de profondeur dans l'échantillon. Le second spectre a été acquis au niveau d'une zone claire située entre plusieurs lobules, indiquée par le POI 2 également situé à  $75\ \mu\text{m}$  de profondeur. Les spectres ne sont ici pas normalisés. Le spectre du POI 1, situé dans le lobule, fait clairement apparaître la signature Raman des lipides, avec plusieurs bandes intenses à  $871\text{ cm}^{-1}$ ,  $1079\text{ cm}^{-1}$ ,  $1301\text{ cm}^{-1}$ ,  $1439\text{ cm}^{-1}$  et  $1655\text{ cm}^{-1}$  correspondant aux vibrations moléculaires des lipides [49]. En comparant les résultats à la littérature, on retrouve une très bonne correspondance de ce spectre Raman avec celui du tissu adipeux sous-cutané [236], confirmant la nature du tissu analysé.

Dans le spectre acquis au niveau du POI 2, situé dans une zone inter-lobules claire à l'image LC-OCT, on retrouve, dans une intensité moindre, les bandes Raman des lipides ( $871\text{ cm}^{-1}$ ,  $1079\text{ cm}^{-1}$ ,  $1301\text{ cm}^{-1}$ ,  $1439\text{ cm}^{-1}$  et  $1655\text{ cm}^{-1}$ ). On peut également observer la présence de raies Raman supplémentaires à  $1005\text{ cm}^{-1}$ ,  $1155\text{ cm}^{-1}$  et  $1524\text{ cm}^{-1}$ . Ces bandes, qui ne sont pas présentes dans

Raie/bande Raman	Attribution indicative	Observations dans l'épiderme	Observations dans le derme	Références
754-760 cm <sup>-1</sup>	Tryptophane et phospholipides	Maximum de la bande à 750 cm <sup>-1</sup>	Maximum de la bande à 760 cm <sup>-1</sup>	[49]
853 cm <sup>-1</sup>	Tyrosine	Maximum de la bande à 853 cm <sup>-1</sup>	Maximum de la bande à 856 cm <sup>-1</sup>	[23]
925 cm <sup>-1</sup>	Proline du collagène	Absence de la bande	Présence d'un épaulement	[49]
1002 cm <sup>-1</sup>	Phénylalanine		Intensité plus faible dans le derme que l'épiderme	[23]
1125 cm <sup>-1</sup>	Lipides (chaîne hydrocarbonée)	Présence de la bande	Absence de la bande	[49]
1205 cm <sup>-1</sup>	Phénylalanine, tryptophane, tyrosine, polysaccharides	Présence de la bande	Absence de la bande	[49]
1258 cm <sup>-1</sup> et 1306-1320 cm <sup>-1</sup>	Protéines (groupes amide III) et ARN à 1258 cm <sup>-1</sup> et protéines, lipides et ADN à 1306-1320 cm <sup>-1</sup>	Ratio < 1	Ratio > 1	[23]
1445-1450 cm <sup>-1</sup>	Protéines et lipides	Maximum à 1447 cm <sup>-1</sup>	Maximum à 1450 cm <sup>-1</sup> et intensité plus faible que dans l'épiderme	[49]
1650-1660 cm <sup>-1</sup>	Protéines (groupes amide I)	Maximum à 1653 cm <sup>-1</sup>	Maximum élargi jusqu'à 1661 cm <sup>-1</sup>	[23]

Table 4.6 – Différences observées entre le spectre Raman de l'épiderme et du derme sains, avec leur confirmation dans la littérature. Les spectres de l'épiderme et du derme analysés ici ont été acquis dans une zone saine de chirurgie.

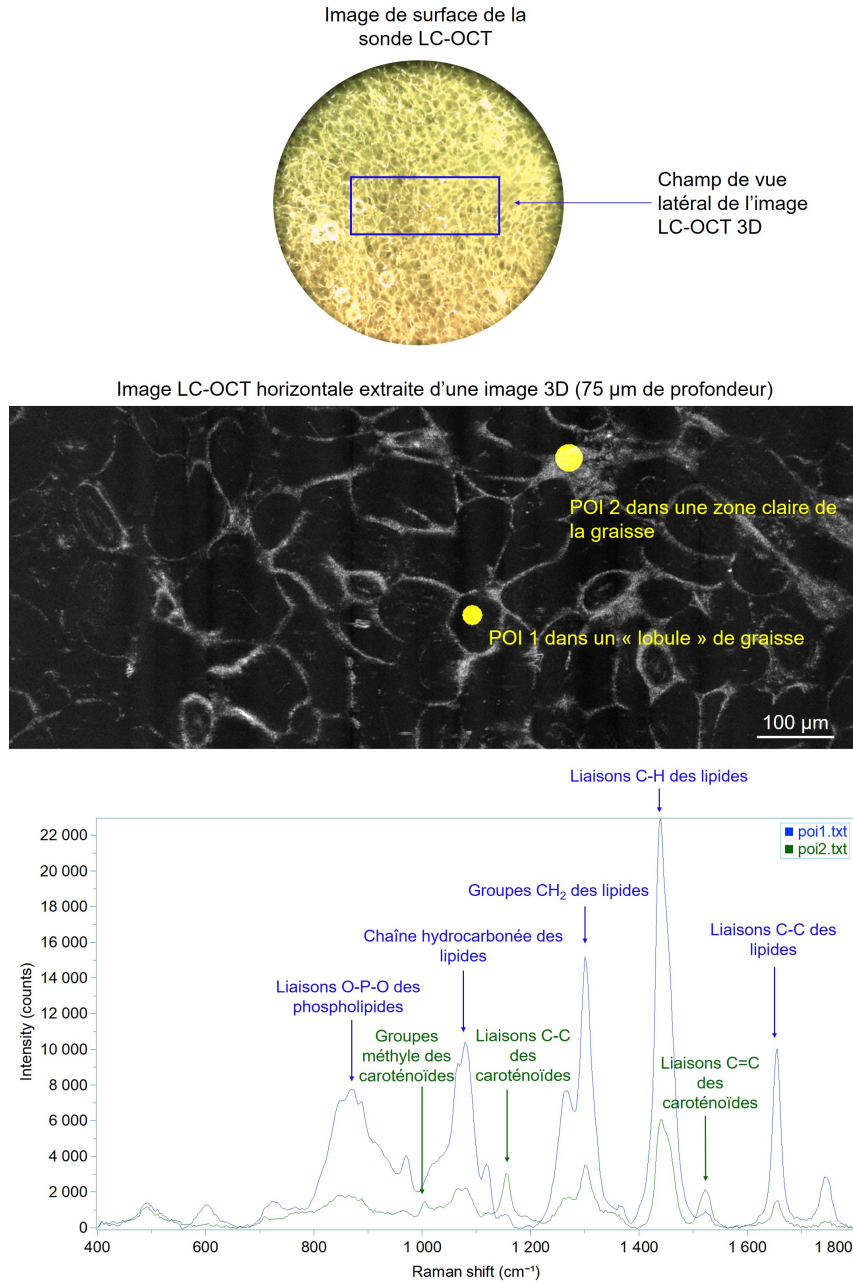


Figure 4.32 – Image LC-OCT horizontale d'un échantillon de tissu adipeux, acquise à 75  $\mu\text{m}$  de profondeur, avec les spectres Raman associés obtenus par CRM pour deux POIs choisis dans l'image LC-OCT et matérialisés par des ellipsoïdes jaunes. Le spectre bleu correspond au spectre du POI 1 et est associé aux lipides du tissu adipeux. Le spectre vert, correspondant au spectre du POI 2, fait apparaître des raies associées aux caroténoïdes, des molécules jouant un rôle antioxydant et donnant au tissu adipeux sa coloration jaune. L'image de surface fournie par le dispositif LC-OCT est également présentée.

le spectre du POI 1, sont caractéristiques des caroténoïdes [237, 238]. Les caroténoïdes sont des molécules lipophiles (*i.e.*, qui retiennent les substances grasses) et pigmentées, de couleur orangée. Elles agissent comme antioxydants protégeant les acides gras insaturés de la peroxydation [239] et sont en effet présentes en grande quantité dans les tissus adipeux [238]. Ainsi, cet échantillon constitue un bel exemple de la complémentarité entre la LC-OCT et la CRM pour distinguer différents constituants biochimiques au sein d'un échantillon biologique.

#### 4.7.3.3 . Caractérisation d'une chirurgie de carcinome basocellulaire

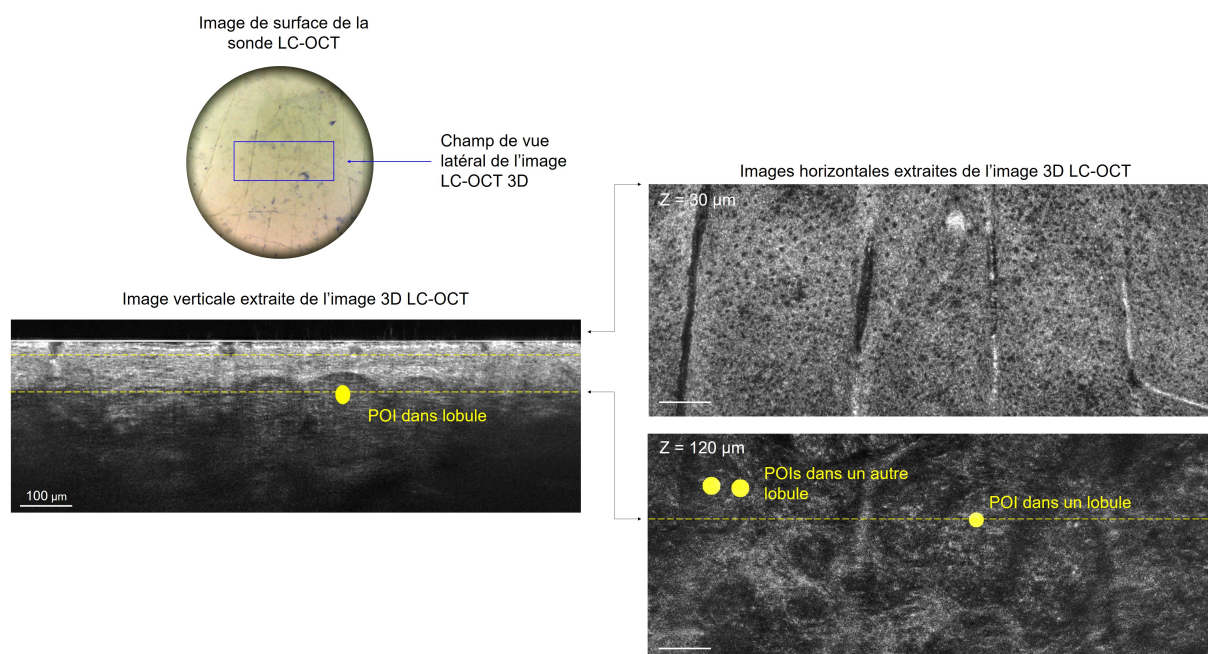


Figure 4.33 – Image LC-OCT 3D (vues orthogonales) d'une chirurgie de carcinome basocellulaire (BCC). Plusieurs POIs ont été choisis dans l'image LC-OCT 3D pour l'analyse moléculaire par CRM, matérialisés par des ellipsoïdes jaunes. Les lignes pointillées sur l'image verticale montrent la position des différentes images horizontales par rapport au plan horizontal de l'image 3D, et vice-versa. La profondeur Z de l'image horizontale est indiquée par rapport à la surface de la peau. L'image de surface fournie par le dispositif LC-OCT est également présentée.

Suite à cette caractérisation des couches de peau saine, nous nous intéressons dans cette partie au cas de chirurgie de carcinome basocellulaire. Le carcinome basocellulaire (BCC) représente le cancer de la peau le plus fréquent. A l'image LC-OCT, le BCC est reconnaissable sur la base de plusieurs critères morphologiques [240], le principal critère étant la présence de lobules. Ces lobules correspondent à des agrégats de cellules basales de l'épiderme se développant dans le derme. La figure 4.33 présente des images orthogonales extraites d'une image 3D LC-OCT acquise dans la chirurgie de BCC analysée au CHU de Saint-Etienne. On peut remarquer sur les images que l'épiderme apparaît normal, avec des cellules régulières. En revanche dans le derme, on remarque la présence de trois larges lobules. Ces lobules sont caractérisés par un intérieur gris assez sombre, et sont composés de cellules basales toutes alignées le long d'un même axe, résultant en une structuration de l'intérieur des lobules selon un motif de « mille-feuille » [240]. Ces lobules présentent un bord supérieur plus clair, causé par la compression des lobules sur les fibres du derme, et un bord inférieur sombre. Dans cette



chirurgie, nous avons acquis plusieurs spectres Raman précisément localisés en certains POIs repérés dans l'image 3D LC-OCT, illustrés à la figure 4.33. Nous avons notamment acquis trois spectres dans deux lobules de BCC différents (POIs en jaune à l'image). La figure 4.33 présente les trois spectres acquis dans les lobules de BCC (en rouge), ainsi que les spectres de l'épiderme (en bleu) et du derme (en vert) précédemment présentés, acquis dans une zone saine de cette même chirurgie. Nous avons volontairement décalé les spectres en ordonnée afin de permettre une meilleure visualisation. Visuellement, on peut constater que les spectres des lobules de BCC présentent une allure similaire aux

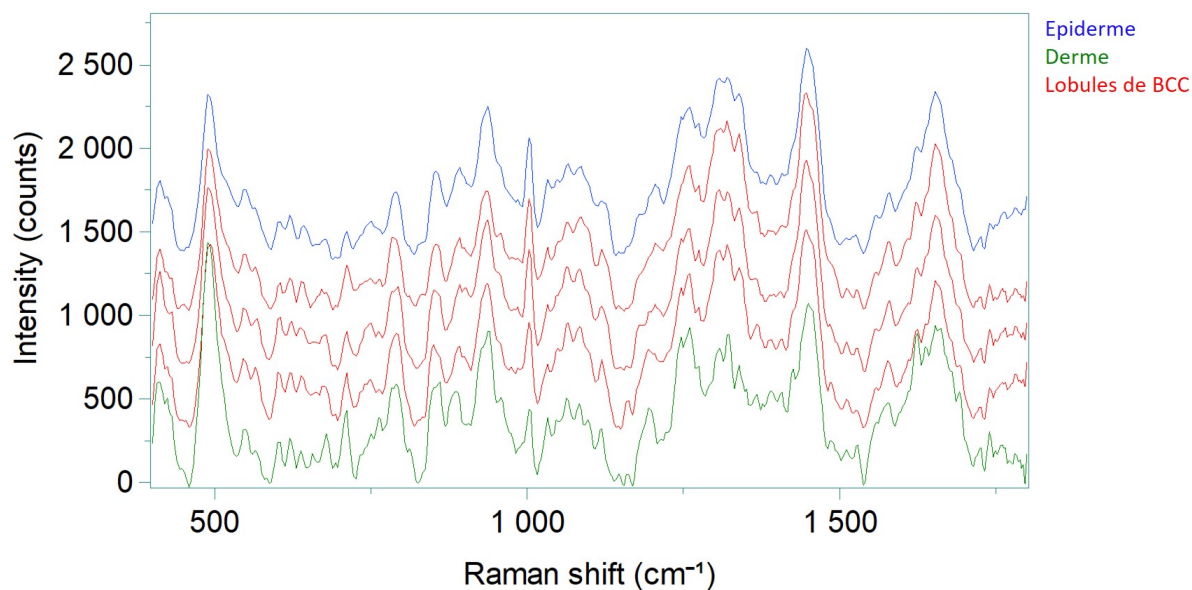


Figure 4.34 – Spectres Raman normalisés de l'épiderme sain (en bleu), du derme sain (vert) et des lobules de BCC (rouge).

spectres de l'épiderme et du derme, avec une ressemblance plus forte avec le spectre de l'épiderme, notamment au niveau des bandes allant de  $1230\text{ cm}^{-1}$  à  $1380\text{ cm}^{-1}$ . Dans le tableau 4.7, une analyse plus détaillée des raies Raman des spectres des lobules est donnée, en comparaison aux raies Raman de l'épiderme et du derme précédemment rapportées dans le tableau 4.6. En bleu sont indiquées les bandes pour lesquelles les lobules et l'épiderme présentent des caractéristiques communes. On peut ainsi constater que pour la majorité des raies Raman précédemment identifiées comme différentes entre l'épiderme et le derme (tableau 4.6), les lobules présentent des caractéristiques communes à l'épiderme, malgré le fait qu'ils soient situés dans le derme. Cette observation est cohérente avec la nature des lobules, constitués comme on l'a mentionné plus haut de cellules basales de l'épiderme. Cette similarité entre les spectres de l'épiderme et des lobules a également été soulignée dans [241].

Toutefois, on peut noter quelques différences entre le spectre de l'épiderme et les spectres des lobules de BCC. Ces différences sont représentées par des flèches sur les spectres de la figure 4.35. Sur cette figure, on a superposé les trois spectres des lobules et le spectre de l'épiderme afin de mieux visualiser les différences. Plus précisément, on peut observer des différences d'intensité portant sur des bandes présentes à la fois dans les spectres de l'épiderme et des lobules. Ces différences sont représentées par les flèches jaunes. Par ailleurs, on peut observer des raies Raman qui sont présentes uniquement dans l'un des deux spectres. Ces différences sont pointées par les flèches vertes.



Raie/bande Raman	Attribution indicative	Observations dans l'épiderme	Observations dans le derme	Observations dans les lobules
754-760 cm <sup>-1</sup>	Tryptophane et phospholipides	Maximum de la bande à 750 cm <sup>-1</sup>	Maximum de la bande à 760 cm <sup>-1</sup>	Maximum de la bande à 748 cm <sup>-1</sup>
853 cm <sup>-1</sup>	Tyrosine	Maximum de la bande à 853 cm <sup>-1</sup>	Maximum de la bande à 856 cm <sup>-1</sup>	Maximum de la bande à 851 cm <sup>-1</sup>
925 cm <sup>-1</sup>	Proline du collagène	Absence de la bande	Présence d'un épaulement	Absence de la bande
1125 cm <sup>-1</sup>	Lipides (chaîne hydrocarbonée)	Présence de la bande	Absence de la bande	Absence de la bande
1205 cm <sup>-1</sup>	Phénylalanine, tryptophane, tyrosine, polysaccharides	Présence de la bande	Absence de la bande	Présence de la bande
1258 cm <sup>-1</sup> et 1306-1320 cm <sup>-1</sup>	Protéines (groupes amide III) et ARN à 1258 cm <sup>-1</sup> et protéines, lipides et ADN à 1306-1320 cm <sup>-1</sup>	Ratio < 1	Ratio > 1	Ratio < 1
1445-1450 cm <sup>-1</sup>	Protéines et lipides	Maximum à 1447 cm <sup>-1</sup>	Maximum à 1450 cm <sup>-1</sup>	Maximum à 1446 cm <sup>-1</sup>
1650-1660 cm <sup>-1</sup>	Protéines (groupes amide I)	Maximum à 1653 cm <sup>-1</sup>	Maximum élargi jusqu'à 1661 cm <sup>-1</sup>	Maximum à 1653 cm <sup>-1</sup>

Table 4.7 – Comparaison des raies Raman dans les spectres des lobules avec les raies Raman de l'épiderme et du derme. En bleu sont indiquées les bandes pour lesquelles les lobules et l'épiderme présentent des caractéristiques communes.

Les différences en termes d'intensité (flèches jaunes) sont présentées en détail dans le tableau 4.8. Le signe + indique une différence d'intensité positive entre les spectres des lobules et le spectre de l'épiderme, tandis que le signe - indique une différence d'intensité négative. La liste des différences n'est pas nécessairement exhaustive, nous avons considéré uniquement les différences épiderme/lobules qui se retrouvent pour les trois spectres des lobules. Les différences observées en termes d'intensité ont pu être mises en lien avec des études précédentes [242, 241, 243, 244] portant sur l'analyse Raman des carcinomes en regard de l'épiderme et du derme sain. Notamment, on peut constater une augmentation de l'intensité de la bande à 788 cm<sup>-1</sup>, associée à l'ADN. Cette observation est cohérente avec les études précédentes de Nijssen *et al.* [241] et Larraona-Puy *et al.* [243], dans lesquelles les auteurs indiquent une quantité d'ADN plus importante dans le spectre des BCC que dans le spectre de l'épiderme. Cette augmentation serait causée par une densité de cellules plus grande et un ratio noyau/cytoplasme plus faible dans la tumeur. D'un point de vue des lipides, on peut observer que les bandes à 1082 cm<sup>-1</sup> et 1118 cm<sup>-1</sup> sont plus intenses dans les lobules de BCC que dans l'épiderme, en accord avec l'étude de Bodanese *et al.* [242] rapportant une intensité plus élevée des bandes associées aux lipides dans les BCC que dans la peau saine. D'un point de vue des acides aminés, on peut observer une intensité plus élevée de la bande de la tyrosine à 853 cm<sup>-1</sup> dans les spectres des lobules que le spectre de l'épiderme. On retrouve une différence d'intensité à 853 cm<sup>-1</sup> entre le spectre du BCC et le spectre de l'épiderme dans la publication de Nijssen *et al.* [241]. Concernant la bande amide III à 1273 cm<sup>-1</sup>, Gniadecka *et al.* [244] rapportent une intensité plus faible dans le BCC en comparaison

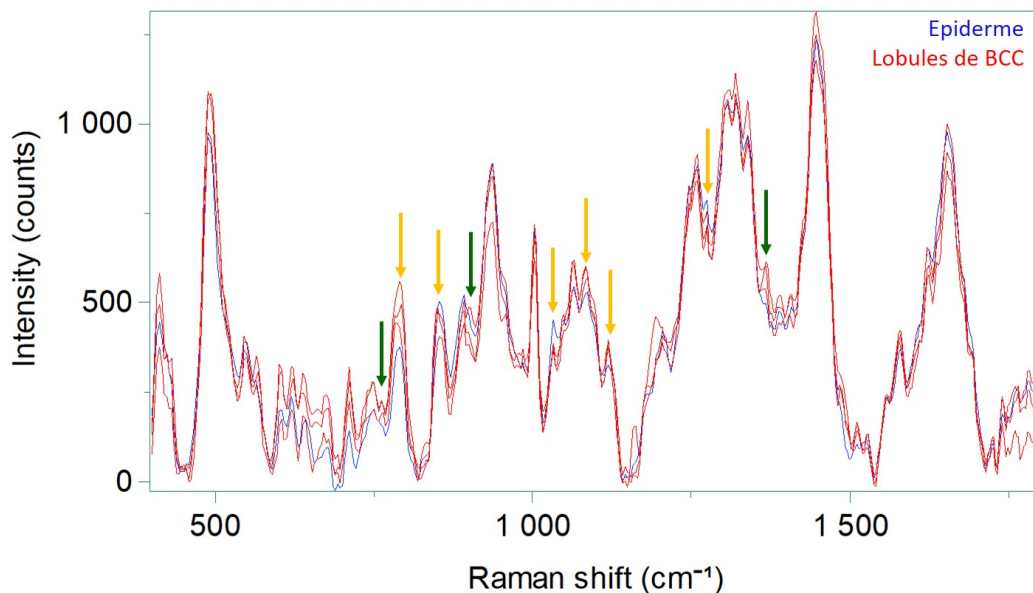


Figure 4.35 – Différences observées entre les spectres Raman normalisés de l'épiderme (en bleu) et des lobules de BCC (rouge). Les flèches pointent les différences observables entre le spectre de l'épiderme et le spectre des lobules de BCC : les flèches jaunes indiquent des différences d'intensité sur des bandes présentes à la fois dans les spectres de l'épiderme et des lobules; les flèches vertes pointent quant à elles des raies Raman qui sont présentes uniquement dans l'un des deux spectres.

à la peau saine (sans distinction de l'épiderme et du derme), une diminution que l'on retrouve dans les spectres acquis dans les lobules de BCC par rapport au spectre de l'épiderme. En revanche, nous n'avons pas pu confirmer la différence observée à  $1031\text{ cm}^{-1}$ , associée aux lipides et à la phénylalanine. Puisque les lipides semblent augmenter, cette différence suggère une diminution de la phénylalanine. En effet, si l'on porte attention à la bande à  $1002\text{ cm}^{-1}$ , également associée à la phénylalanine, on peut constater que deux des trois spectres acquis dans les lobules de BCC présentent une intensité plus faible que dans le spectre de l'épiderme. Ceci est en accord avec les spectres rapportés par [241], dans lesquels on retrouve une différence positive entre le BCC et l'épiderme pour ces raies à  $1002\text{ cm}^{-1}$  et  $1031\text{ cm}^{-1}$ .

En plus de ces différences d'intensité, on peut noter quelques bandes qui apparaissent dans les spectres des lobules mais ne semblent pas présentes dans le spectre de l'épiderme, pointées par les flèches vertes à la figure 4.35. A  $762\text{ cm}^{-1}$ , on peut observer une petite bande dans les trois spectres des lobules, qui n'apparaît que très peu dans le spectre de l'épiderme. Cette bande est associée au tryptophane et aux phospholipides, et on la retrouve dans le spectre du derme (figure 4.34 et tableau 4.7). A  $898\text{ cm}^{-1}$ , on observe également une bande, associée à l'ADN et aux protéines, présente dans les spectres des lobules mais très peu visible dans le spectre de l'épiderme. Enfin, à  $1365\text{ cm}^{-1}$ , on voit apparaître dans les spectres des lobules une bande, ou plutôt un épaulement, bien net, associé au tryptophane, porphyrines et lipides [49]. Nous avons également pu vérifier l'absence de ces trois bandes spécifiques dans d'autres spectres de l'épiderme, acquis sur d'autres chirurgies. Ces bandes n'ont pour le moment pas pu être mises en relation avec de précédentes études mais les investigations sont toujours en cours.

Les résultats obtenus sur cette chirurgie de BCC sont encourageants car premièrement, les spectres

Raie/bande Raman	Attribution indicative	Différence d'intensité entre le spectres des lobules et le spectre de l'épiderme	En accord avec la littérature?
788 cm <sup>-1</sup>	ADN, ARN et phospholipides	+	Oui [241, 243]
853 cm <sup>-1</sup>	Tyrosine	+	Oui [243]
1031 cm <sup>-1</sup>	Lipides et phénylalanine	-	
1082 cm <sup>-1</sup>	Lipides (chaîne hydrocarbonée)	+	Oui [242]
1118 cm <sup>-1</sup>	Lipides (chaîne hydrocarbonée)	+	Oui [242]
1273 cm <sup>-1</sup>	Protéines (groupes amide III)	-	Oui [244]

Table 4.8 – Identification des raies et bandes Raman présentant des différences d'intensité entre les lobules de BCC et l'épiderme sain. + indique une différence d'intensité positive entre les spectres des lobules et le spectre de l'épiderme, - indique une différence d'intensité négative.

Raman nous ont effectivement permis d'identifier une nette ressemblance moléculaire entre l'épiderme et les lobules de BCC, un résultat attendu compte tenu de la composition des lobules de BCC proche de l'épiderme. Par ailleurs, des différences spectrales, cohérentes avec la littérature, ont pu être identifiées entre les spectres de l'épiderme sain et des lobules de BCC, suggérant le potentiel de la CRM pour différencier l'épiderme sain des lobules de BCC. Néanmoins, ces résultats sont à prendre avec précaution en raison du petit nombre de spectres acquis et de l'analyse limitée à un seul patient, qui ne permet pas de généraliser les observations faites. En effet, en raison de la succession des chirurgies et du besoin d'envoyer rapidement les échantillons en analyse histologique, nous avons peu de temps pour caractériser chaque échantillon, ce qui explique le nombre limité de spectres acquis. Ces expérimentations au CHU de Saint-Etienne nous ont permis de constater que les différences entre tissu sain et tissu cancéreux sont effectivement subtiles, et de prendre conscience du besoin d'acquérir un certain volume de données spectrales afin d'évaluer le véritable apport de la CRM à la LC-OCT sur les cancers cutanés. C'est un constat que l'on retrouve également dans la littérature, avec un grand nombre de publications recourant à des méthodes de machine learning sur des bases de données spectrales pour établir un diagnostic à partir de spectres Raman [179, 245].

Malgré cela, les résultats obtenus nous encouragent à poursuivre les expérimentations de co-localisation pour mieux évaluer l'apport de la CRM sur les cancers cutanés. Pour cela, nous allons installer durablement la plateforme de co-localisation LC-OCT/CRM au CHU de Saint-Etienne afin de permettre l'acquisition continue de données LC-OCT/CRM co-localisées sur des chirurgies de cancers cutanés, en collaboration avec une postdoctorante. La poursuite du projet de co-localisation LC-OCT/CRM se fera dans le cadre d'un projet de recherche financé par l'agence nationale de la recherche (ANR), portant sur les développements de multimodalité en LC-OCT et regroupant plusieurs partenaires (laboratoires Charles Fabry, Lipsys<sup>2</sup> et CRAN, DAMAE Medical et le CHU de Saint-Etienne). L'idée sera alors premièrement de passer plus de temps sur chaque chirurgie (quitte à prélever un petit échantillon d'une chirurgie pour pouvoir envoyer le reste en histologie sans perte de temps) afin d'acquérir un nombre de spectres plus conséquent par patient et de confirmer ou

non les différences observées jusqu'à présent en tenant compte de la variabilité intra-patient. En parallèle, l'installation durable au CHU permettra d'acquérir des données sur des chirurgies provenant de différents patients afin de construire une base de données de spectres Raman. Cette base de données nous permettra d'évaluer la généralisation inter-patient et ainsi d'avoir une meilleure idée des performances de la CRM pour différencier les tissus sains des tissus cancéreux. Dans une seconde étape, cette base de données nous servira pour évaluer l'apport de la CRM par rapport à la LC-OCT sur les cas de cancers difficiles à diagnostiquer à partir de l'image : l'idée sera notamment d'évaluer son apport pour la différenciation des pathologies imitatrices en LC-OCT, pour l'identification de zones présentant des lésions précoces ou pré-tumorales (*i.e.*, allant évoluer en lésions malignes), la définition et l'évaluation de marges en chirurgie ou encore l'apport d'informations génétiques permettant une meilleure prise en charge via l'utilisation de thérapies ciblées. Concernant ce dernier point portant sur l'identification de mutations génétiques, quelques travaux ont été débutés au cours de cette thèse sur des modèles de mélanomes porteurs de mutations génétiques différentes. Ces travaux sont présentés dans la section qui suit.

#### **4.7.4 . Expérimentations sur modèles *in vitro* de mélanomes avec la plateforme de co-localisation LC-OCT/CRM**

Au cours de cette thèse, nous avons eu l'opportunité d'appliquer notre méthode de co-localisation LC-OCT/CRM à la caractérisation de modèles *in vitro* de mélanomes. Ce projet a été effectué avec l'institut Fraunhofer-Institut für Silicatforschung ISC, un institut de recherche allemand dont un des axes de recherche est le développement de modèles de peau incluant des mélanomes [246]. Ces modèles ont pour objectif de permettre une meilleure compréhension du développement et de la progression du mélanome et développer de nouvelles thérapies efficaces. Des modèles animaux sont couramment utilisés mais ceux-ci ne reflètent pas correctement la physiologie humaine. D'autres approches basées sur des cultures cellulaires humaines existent mais elles ne sont pas capables de reproduire le micro-environnement tumoral, ce qui est pourtant crucial pour la modélisation du mélanome. Pour remédier à ces limitations, l'institut de recherche a développé un modèle de peau humaine *in vitro* incluant des mélanomes [247]. Le modèle proposé est basé sur un modèle d'épiderme stratifié reconstruit, dans lequel des lignées cellulaires de mélanome avec différentes mutations différentes ont été incorporées, formant des agrégats tumoraux distincts dans l'épiderme. La description détaillée de la fabrication de ces modèles peut être trouvée dans [247].

##### **4.7.4.1 . Description des modèles de mélanome et imagerie LC-OCT**

Dans le cadre du projet entre l'institut Fraunhofer ISC et DAMAE Medical, trois différents modèles de peau ont été caractérisés à l'aide de la méthode de co-localisation LC-OCT/CRM :

- Un modèle de peau saine incluant épiderme et derme (modèle appelé ftSE pour « full-thickness skin equivalent »),
- Un modèle de peau ftSE incluant des mélanocytes de la lignée SK-MEL-28,
- Un modèle de peau ftSE incluant des mélanocytes de la lignée MeWo.

Les deux lignées cellulaires de mélanomes, SK-MEL-28 et MeWo, correspondant à des cellules humaines présentant des mutations génétiques différentes : la lignée SK-MEL-28 est porteuse de la mutation V600E du gène BRAF, mutation couramment impliquée dans le mélanome, que nous avons

évoquée au début de ce manuscrit dans la section 1.1.3 du chapitre 1. La lignée MeWo est quant à elle porteuse d'une mutation sur le gène CDKN2A [247]. Pour chaque modèle, des échantillons présentant trois stades de développement différents nous ont été fournis afin d'observer la genèse et progression du mélanome : après 7, 14 puis 21 jours de développement. Pour chaque modèle et chaque stade de développement, des images LC-OCT ont été acquises, données à la figure 4.36. Toutes les acquisitions ont été réalisées avec une ingénieure de DAMAE Medical. Sur l'échantillon de peau saine (ftSE), nous pouvons observer une couche cornée (ou stratum corneum) très brillante, dont l'épaisseur croît avec le stade de développement. Sous la couche cornée, l'épiderme viable (*i.e.*, l'épiderme excluant la couche cornée) fait apparaître des kératinocytes, présentant des noyaux sombres à l'image. Le derme quant à lui apparaît relativement homogène, dans lequel on devine la présence de fibres alignées les unes par rapport aux autres. Dans les modèles de mélanomes, on voit apparaître des amas sombres composés de mélanocytes cancéreux, dont la taille augmente rapidement avec le stade de développement (flèches jaunes à la figure 4.36). Ces amas sont situés au niveau de la jonction entre l'épiderme et le derme. Ces amas de cellules de mélanome apparaissent sombres à l'image car les cellules sont issues de lignées cellulaires ne produisant pas de mélanine, à la différence de mélanomes réels. Comme nous pouvons le voir sur les images LC-OCT, les amas de mélanocytes cancéreux ont une morphologie et une évolution identiques pour les deux lignées cellulaires. Pourtant, elles ne sont pas porteuses de la même mutation génétique. Comme nous l'avons introduit dans la section 1.1.3 du chapitre 1, l'identification de la mutation impliquée dans le mélanome est une information très précieuse car elle peut informer sur la réponse du patient à un traitement et orienter le traitement vers des thérapies ciblées, basées sur l'inactivation de mutations génétiques spécifiques [5]. Sur ces modèles de peau, nous avons ainsi investigué l'apport de la CRM à la LC-OCT pour la caractérisation des mélanomes. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la capacité de la CRM à différencier les kératinocytes sains des mélanocytes cancéreux, afin de valider que la CRM permet de retrouver les informations observées dans les images LC-OCT. Dans un second temps, nous avons investigué le potentiel de la CRM à distinguer les deux lignées cellulaires, afin d'apporter dorénavant des informations moléculaires nouvelles à l'imagerie LC-OCT.

#### 4.7.4.2 . Acquisitions Raman

Les acquisitions Raman ont été réalisées sur l'échantillon de peau saine, l'échantillon de mélanome de la lignée SK-MEL-28 et l'échantillon de mélanome de la lignée MeWo correspondant tous trois à un stade de 14 jours de développement. Ce stade de développement a été choisi car les échantillons de mélanome à 7 jours présentaient des amas de cellules petits et peu nombreux, limitant le nombre de spectres pouvant être acquis sur ces échantillons ; les échantillons de mélanomes à 21 jours comportaient quant à eux des amas très larges et nombreux, mais également une couche cornée très épaisse, atténuant, de par ses propriétés de diffusion très élevées, une grande partie de la lumière incidente. De ce fait les spectres Raman acquis dans les amas sous la couche cornée étaient de faible intensité. Le stade de développement de 14 jours constituait ainsi le meilleur compromis entre taille et densité des amas cancéreux et l'épaisseur de la couche cornée.

Grâce à la procédure de co-localisation LC-OCT/CRM, nous avons acquis des spectres Raman précisément localisés dans les trois modèles de peau :

- Dans le modèle de peau saine ftSE, nous avons acquis 9 spectres dans l'épiderme,

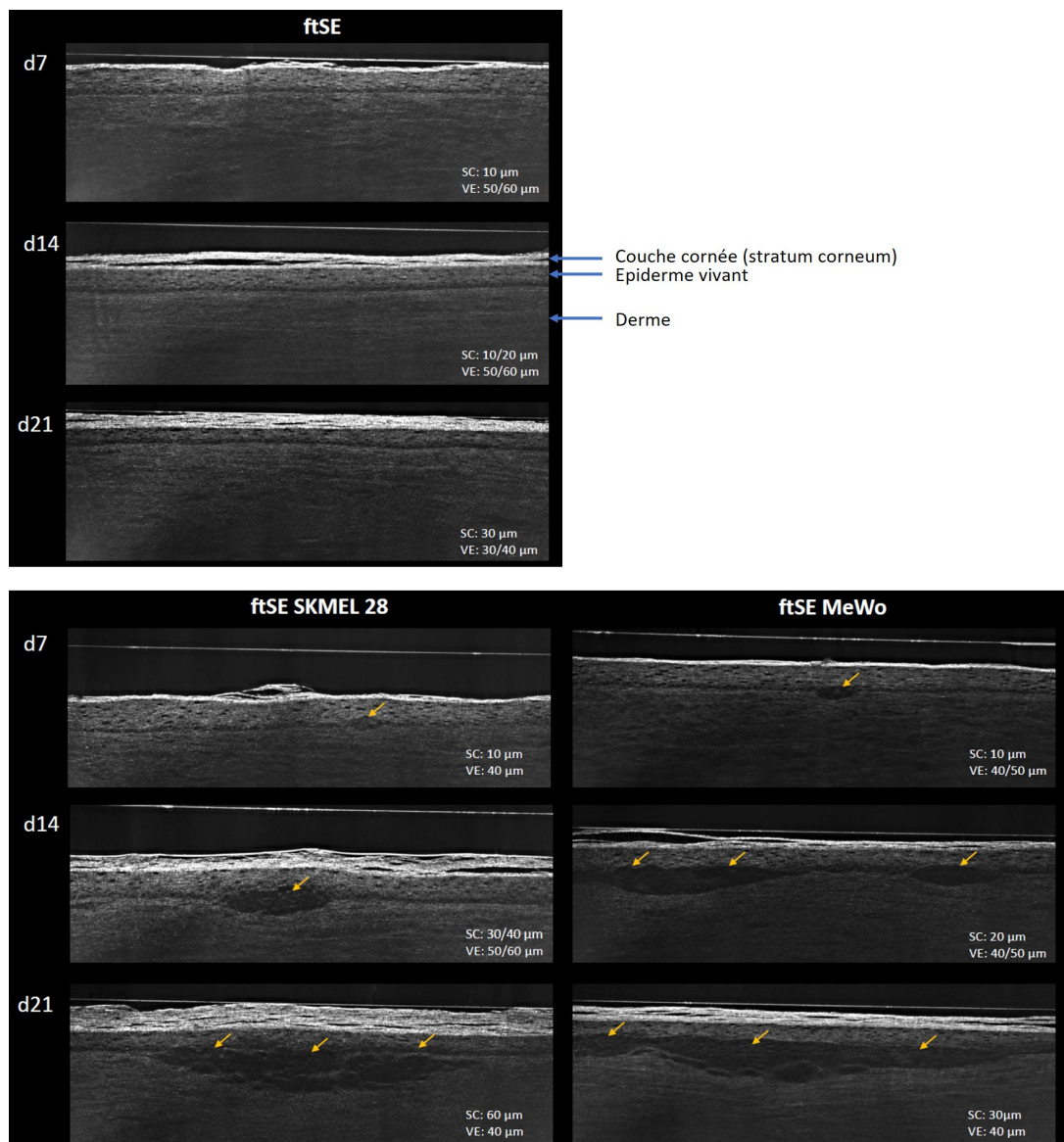


Figure 4.36 – Images LC-OCT en coupe verticale des modèles de peau saine (ftSE) et des deux modèles de mélanomes (ftSE SKMEL28 et ftSE MeWo), à différents stades de développement (7, 14 et 21 jours de développement). Pour chaque échantillon, l'épaisseur de la couche cornée (SC) est donnée, ainsi que l'épaisseur de l'épiderme vivant (VE), c'est-à-dire l'épiderme excluant la couche cornée. Les flèches jaunes dans les modèles de mélanome montrent les amas de cellules cancéreuses.



- Dans le modèle ftSE MeWo, nous avons acquis une trentaine de spectres dans les amas de cellules de mélanomes,
- Dans le modèle ftSE SK-MEL-28, nous avons acquis 9 spectres.

Les modèles de peau étant fixés, nous n'étions pas limités dans le temps en termes d'acquisition, ce qui nous a permis d'acquérir un volume de données Raman plus conséquent que sur les chirurgies au CHU de Saint-Etienne. L'ensemble des spectres a été acquis avec une puissance de près de 60 mW sur les échantillons, avec un temps d'intégration de 20 s et 3 accumulations. Le traitement des spectres a été réalisé sous MATLAB. Les spectres ont été corrigés de l'auto-fluorescence à l'aide d'une fonction polynomiale d'ordre 5. Les spectres ayant été acquis à diverses profondeurs, ils ont ensuite été normalisés par leur norme (en suivant la méthode décrite dans la section 4.7.3 précédente) afin de pouvoir les comparer sans différence d'échelle d'intensité. Les spectres normalisés ont ensuite été multipliés par une constante égale à 10 000 puis lissés à l'aide d'un filtre polynomial de Savitzky-Golay d'ordre 4 sur une fenêtre de 7 points consécutifs.

#### 4.7.4.3 . Caractérisation moléculaire des modèles de mélanome

La figure 4.37 présente le spectre moyen avec l'écart-type obtenu pour l'épiderme sain du modèle ftSE, le spectre moyen avec l'écart-type obtenu pour les amas de cellules SK-MEL-28 et le spectre moyen avec l'écart-type obtenu pour les amas de cellules MeWo.

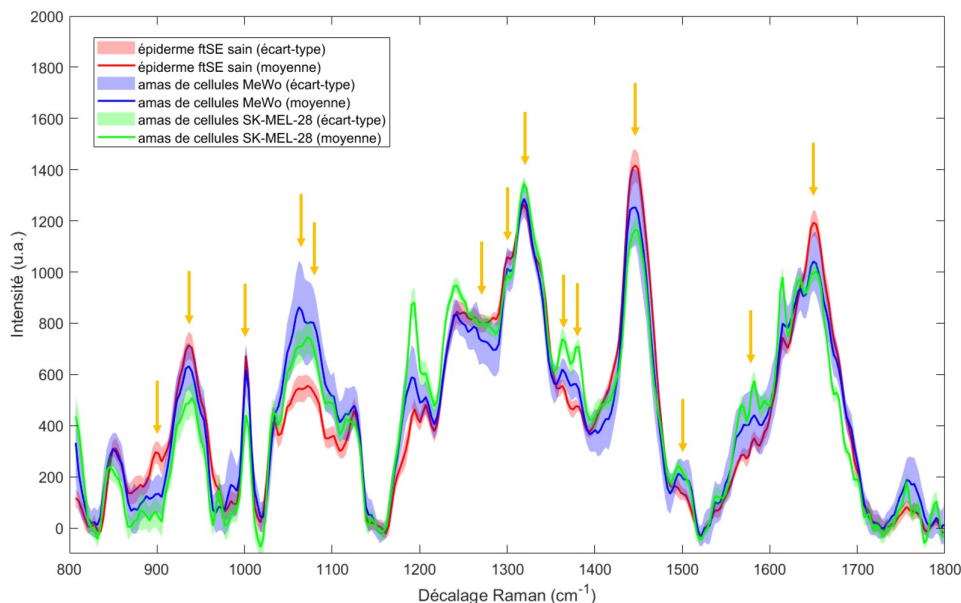


Figure 4.37 – Spectres moyens obtenus pour l'épiderme sain du modèle ftSE, pour les amas de cellules SK-MEL-28 et pour les amas de cellules MeWo. L'écart-type est affiché en transparence autour du spectre moyen pour chaque spectre. Les flèches jaunes pointent les raies ou bandes Raman faisant apparaître des différences visibles entre le spectre moyen de l'épiderme ftSE sain et les spectres des amas de cellules de mélanomes.

Suite aux acquisitions, nous nous sommes rendus compte que pour certains spectres, notamment ceux acquis dans les lobules de cellules SK-MEL-28, le spectromètre a à nouveau introduit des raies parasites lors de sa soustraction automatique du bruit de fond. Ces raies parasites ont été identifiées à 970, 1035, 1190 et 1614  $\text{cm}^{-1}$ , identiques aux raies parasites identifiées précédemment sur les biopsies



de tatouage. Des travaux sont en cours pour corriger ce problème pour les acquisitions futures, et il faudrait en toute rigueur corriger a posteriori ces raies parasites dans les spectres acquis. Dans toute la suite, ces raies parasites ont été exclues des analyses qualitatives et quantitatives menées.

En excluant ces raies parasites, il est malgré tout possible d'observer de nettes différences entre les spectres des modèles d'épiderme ftSE sain et les spectres des amas de cellules de mélanomes, pointées par les flèches jaunes à  $898\text{ cm}^{-1}$ ,  $940\text{ cm}^{-1}$ ,  $1060\text{ cm}^{-1}$ ,  $1080\text{ cm}^{-1}$ , entre  $1240$  et  $1290\text{ cm}^{-1}$ , à  $1320\text{ cm}^{-1}$ ,  $1362\text{ cm}^{-1}$ ,  $1382\text{ cm}^{-1}$ ,  $1446\text{ cm}^{-1}$ ,  $1500\text{ cm}^{-1}$ ,  $1580\text{ cm}^{-1}$  et  $1650\text{ cm}^{-1}$ . Cette liste n'est pas exhaustive mais reflète les principales différences visibles. Le tableau 4.9 présente les attributions biomoléculaires associées à chaque raie ou bande faisant apparaître des différences entre les spectres acquis dans l'épiderme sain du modèle ftSE, dans les amas de cellules SK-MEL-28 et dans les amas de cellules MeWo (flèches jaunes de la figure 4.37). Ce tableau permet de constater que des différences s'observent à la fois au niveau des protéines, des lipides et de l'ADN. Qualitativement, on peut également noter des différences entre les spectres de la lignée MeWo et les spectres de la lignée SK-MEL-28, par exemple au niveau des bandes à  $1060\text{ cm}^{-1}$ , entre  $1230$  et  $1280\text{ cm}^{-1}$ , à  $1362\text{ cm}^{-1}$ ,  $1382\text{ cm}^{-1}$ ,  $1446\text{ cm}^{-1}$  et  $1650\text{ cm}^{-1}$ .

Afin d'évaluer l'étendue des différences entre l'épiderme sain et les cellules de mélanome, nous avons mesuré l'aire sous la courbe du spectre, pour chaque raie ou bande figurant dans le tableau 4.9. Un test statistique de Wilcoxon-Mann-Whitney a été appliqué pour évaluer si les aires des différentes bandes présentent des différences significatives. Ce test permet de tester l'hypothèse selon laquelle les distributions de deux groupes de données sont proches, les deux groupes étant indépendants (non appariés). Ce test a été appliqué pour évaluer les différences entre les groupes suivants :

- L'ensemble des spectres acquis dans l'épiderme ftSE sain *versus* l'ensemble des spectres acquis dans les cellules de mélanomes (regroupant les deux lignées),
- L'ensemble des spectres acquis dans les cellules MeWo *versus* l'ensemble des spectres acquis dans les cellules SK-MEL-28.

Les résultats du test de Wilcoxon-Mann-Whitney appliqué à chaque bande Raman sont donnés dans le tableau 4.9. Nous indiquons les raies et bandes Raman pour lesquelles la p-value est inférieure à 0.05, critère pour lequel on considère les différences entre les groupes significatives. Nous pouvons constater que plusieurs différences significatives ressortent de ce test statistique. Ces résultats sont préliminaires mais très encourageants. Notamment, on peut observer que l'épiderme ftSE sain et les cellules de mélanomes présentent des différences significatives sur quasiment l'ensemble des raies et bandes Raman identifiées qualitativement comme différentes entre les deux groupes. Les différences s'observent ainsi à la fois au niveau des protéines, des lipides et de l'ADN. Ces différences montrent que la spectroscopie Raman permet ici clairement de différencier des cellules saines de l'épiderme (kératinocytes) des cellules de mélanomes, ce qui est une belle démonstration de la spécificité moléculaire de la spectroscopie Raman. Plus intéressant encore, les spectres font ressortir des différences significatives entre les deux lignées de mélanome, avec des différences touchant principalement des raies et bandes Raman attribuées à l'ADN, aux acides aminés et protéines. Ces résultats sont très prometteurs ! L'interprétation de ces différences est cependant complexe car les études précédemment menées sur le sujet sont peu nombreuses [65, 184] et ont été effectuées dans des conditions différentes. En effet, les études effectuées en CRM sur les lignées de mélanome [65, 184] ont été conduites sur des cultures de cellules et avec des systèmes de CRM très résolus (à l'échelle de la cellule voire en

dessous), tandis que notre étude est réalisée à l'échelle de plusieurs cellules (extension axiale de 45  $\mu\text{m}$  pour notre système de CRM), regroupées en amas, et incluses dans un modèle d'épiderme et de derme. Ainsi, il n'est pas exclu que l'environnement autour des cellules de mélanome joue un rôle dans les différences spectrales.

Des pistes d'interprétation peuvent être trouvées dans des études de recherche oncologique. Par exemple, une étude de Rossi *et al.* [248] a montré que les lignées SK-MEL-28 et MeWo sont caractérisées par un niveau d'agressivité différent. Cette différence d'agressivité pourrait éventuellement se traduire par une activité cellulaire différente en termes de quantité de protéines/lipides produites, se reflétant dans les spectres Raman.

Une autre technique pour évaluer le potentiel de différenciation entre les différents groupes est l'analyse en composantes principales (PCA pour « Principal Component Analysis » en anglais). La PCA est l'une des techniques multidimensionnelles couramment utilisées pour l'analyse de spectres Raman, permettant la classification des spectres en fonction de leur similarité. Lorsque qu'un ensemble de spectres est fourni en entrée de la PCA, la PCA permet de trouver un ensemble de composantes principales qui sont capables de décrire tous les spectres fournis en entrée par une combinaison linéaire de ces composantes principales. L'ensemble des composantes principales est ordonné de manière à ce que la première composante décrive la plus grande variation spectrale des données fournies. La deuxième composante principale décrit la deuxième plus forte variation spectrale tout en étant orthogonale à la première composante et ainsi de suite. Chaque spectre mesuré peut être caractérisé par un ensemble de coefficients linéaires, appelés scores, qui reconstruisent le spectre comme une somme des composantes principales pondérée par ces scores. En représentant graphiquement pour chaque spectre le score associé à la première composante principale versus le score associé à la seconde composante principale, on obtient une représentation 2D simplifiée de l'ensemble des spectres fournis en entrée de la PCA, où les spectres similaires se regroupent dans certaines régions.

Nous avons appliqué la PCA à l'ensemble de nos spectres, incluant les spectres acquis dans l'épiderme sain du modèle ftSE, les spectres acquis dans les amas de cellules de la lignée MeWo et les spectres acquis dans les amas de cellules de la lignée SK-MEL-28. A la figure 4.38, nous représentons les scores obtenus pour les deux premières composantes principales (les deux premières composantes principales générées par la PCA étant celles décrivant la plus grande variation dans les spectres). Pour ne pas biaiser le résultat de la PCA par les raies de bruit parasites introduites par le spectromètre, nous les avons exclues des spectres avant de les fournir à la PCA. La PCA fait apparaître trois principaux groupes : un groupe en bleu correspondant aux spectres acquis dans l'épiderme sain du modèle ftSE, un groupe en orange correspondant aux spectres acquis dans les amas de cellules de la lignée MeWo et un groupe en jaune correspondant aux spectres acquis dans les amas de cellules de la lignée SK-MEL-28. La PCA confirme ainsi la possibilité de différencier les différents groupes cellulaires. En fournissant l'ensemble du spectre à la PCA, la PCA base sa décomposition sur un ensemble de caractéristiques extraites des spectres qui sont plus complètes que les aires sélectionnées manuellement. Potentiellement, il serait donc intéressant d'investiguer également d'autres critères de différenciation que les aires des bandes, par exemple investiguer la présence de différences dans les valeurs des décalages Raman associées à ces bandes. Ce travail est actuellement en cours et sera poursuivi au-delà de cette thèse.

En conclusion, ces résultats obtenus sur les modèles de mélanome sont très encourageants quant

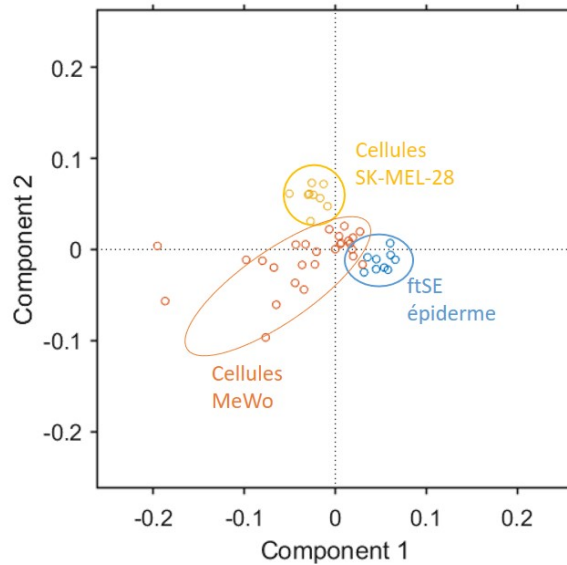


Figure 4.38 – Graphique représentant les scores associés aux deux premières composantes principales obtenues par l'analyse en composantes principales (PCA) appliquée à l'ensemble des spectres acquis dans l'épiderme sain du modèle ftSE (en bleu), des spectres acquis dans les amas de cellules de mélanomes de la lignée MeWo (en orange) et des spectres acquis dans les amas de cellules de mélanomes de la lignée SK-MEL-28 (en jaune).

à la capacité de la CRM à différencier des cellules saines de l'épiderme (kératinocytes) de cellules de mélanomes. Nous avons pu observer de nettes différences moléculaires dans les spectres Raman entre les cellules de l'épiderme sain et les amas de cellules de mélanomes. Plus prometteur encore, nous avons pu constater des différences dans les spectres Raman des deux lignées de cellules de mélanome, suggérant le potentiel de la CRM pour distinguer des cellules de mélanome porteuses de différentes mutations génétiques. Du fait qu'ils soient fixés, les modèles de peau permettent l'acquisition d'un grand nombre de données Raman et une analyse moléculaire plus robuste que réalisée précédemment sur les chirurgies. La connaissance exacte de leur composition (type de cellule, mutation impliquée, stade d'avancement) en fait des échantillons idéaux pour investiguer l'apport de la CRM à la LC-OCT pour la caractérisation de cancers cutanés. Il faut cependant garder en tête que ces échantillons restent des modèles *in vitro*. Ils sont notamment dépourvus de mélanine, à la différence des mélanomes réellement rencontrés en clinique. De ce fait, les conditions d'acquisition Raman sur ces modèles correspondent à des conditions optimales, car la mélanine génère une forte auto-fluorescence, même avec une excitation à 785 nm, qui peut masquer les raies Raman. Il faudra donc s'attendre à un degré de difficulté supplémentaire sur de vraies chirurgies de mélanome. A noter qu'il existe quelques cas, rares, de mélanomes non pigmentés, que nous pourrions investiguer si l'occasion se présente lors des futures expérimentations au CHU de Saint-Etienne. Ces mélanomes étant plus difficiles à diagnostiquer en raison de leur absence de mélanine, ils sont généralement détectés à un stade avancé et nécessitent une prise en charge rapide. La CRM, guidée par la LC-OCT, présente Le couplage LC-OCT/CRM pourrait ainsi éventuellement aider au diagnostic et faciliter la prise en charge de ces cas.

Raie ou bande Raman	Attribution indicative [49, 249, 40]	P-value épiderme ftSE sain versus cellules de mélanomes	P-value cellules MeWo versus cellules SK-MEL-28
898 cm <sup>-1</sup>	Protéines et ADN	p < 0.05	p < 0.05
940 cm <sup>-1</sup>	Protéines	p < 0.05	p < 0.05
1001 cm <sup>-1</sup>	Protéines		p < 0.05
1060 cm <sup>-1</sup>	Lipides (chaîne hydrocarbonée <i>trans</i> ) et ADN ARN	p < 0.05	
1080 cm <sup>-1</sup>	Lipides (chaîne hydrocarbonée <i>gauche</i> ) et polysaccharides	p < 0.05	
1240-1290 cm <sup>-1</sup>	Protéines (groupes amide III), phospholipides, polysaccharides et ARN		p < 0.05
1303 cm <sup>-1</sup>	Lipides et ADN ARN	p < 0.05	
1320 cm <sup>-1</sup>	ADN et protéines		p < 0.05
1362 cm <sup>-1</sup>	Tryptophane, porphyrines et lipides	p < 0.05	p < 0.05
1382 cm <sup>-1</sup>	Lipides et ARN	p < 0.05	p < 0.05
1446 cm <sup>-1</sup>	Protéines et lipides	p < 0.05	p < 0.05
1500 cm <sup>-1</sup>		p < 0.05	
1580 cm <sup>-1</sup>	ADN et protéines	p < 0.05	p < 0.05
1650 cm <sup>-1</sup>	Protéines (groupes amide I)	p < 0.05	p < 0.05

Table 4.9 – Attribution indicative des raies et bandes Raman faisant apparaître des différences entre les spectres acquis dans l'épiderme sain du modèle ftSE, dans les amas de cellules SK-MEL-28 et dans les amas de cellules MeWo, et résultats du test de Wilcoxon-Mann-Whitney appliqué à l'aire de chaque raie ou bande Raman pour les différents groupes testés.

#### 4.7.5 . Conclusion sur la co-localisation LC-OCT/CRM *ex vivo* avec la plateforme motorisée

En conclusion de cette partie, nous avons présenté le développement et l'utilisation d'une plateforme motorisée dédiée à la co-localisation LC-OCT/CRM pour des applications *ex vivo*. Pour concevoir cette plateforme, nous avons tout d'abord intégré le système de CRM initialement développé sur banc optique dans une sonde de CRM portable, similaire en apparence à la sonde de LC-OCT. Par rapport au montage sur banc optique, seul le milieu d'immersion a été modifié, passant de l'immersion dans l'eau à l'immersion dans l'huile de silicone, afin d'éviter le changement d'immersion fastidieux entre l'imagerie LC-OCT et l'analyse par CRM lors des expérimentations de co-localisation avec la plateforme. La plateforme de co-localisation permet d'automatiser, dans une certaine mesure, la procédure de co-localisation grâce à l'utilisation de moteurs XYZ permettant de translater facilement l'échantillon entre le dispositif de LC-OCT et le dispositif de CRM. Ces moteurs facilitent également la procédure de calibration et permettent de gagner du temps lors des expérimentations en s'affranchissant de la lecture et de l'ajustement manuels des coordonnées sur les platines.

Grâce à sa compacité, la plateforme peut facilement être installée en clinique. Nous l'avons installée pour quelques jours au CHU de Saint-Etienne, afin de mener des premières expérimentations sur des chirurgies cutanées. D'un point de vue plus technique, les expérimentations menées au CHU ont confirmé la valeur de la plateforme motorisée dédiée à la co-localisation LC-OCT/CRM pour une utilisation en clinique : les déplacements motorisés permettent un gain de temps conséquent par rapport au système manuel précédent et la compacité du système permet facilement de lui trouver une place dans le service de dermatologie. Cependant, des efforts sont à prévoir pour améliorer l'utilisation en pratique car plusieurs logiciels doivent en effet être gérés en parallèle : logiciel d'imagerie LC-OCT, logiciel d'acquisition des spectres, logiciel d'ajustement du focus de la sonde CRM. De plus, certaines étapes restent manuelles, notamment pour faire le lien entre les noms de fichiers acquis par le spectromètre et les points ciblés dans les images LC-OCT. Enfin, il faut être conscient que malgré les améliorations, la co-localisation reste une procédure un peu lourde de mise en œuvre : la co-localisation nécessite une étape de calibration qui, bien que simplifiée par la conception d'une plateforme motorisée dédiée, ne peut en pratique être réalisée par un médecin par manque de temps et besoin de formation, et doit être réalisée par un opérateur dédié. L'opérateur doit également contrôler que la calibration ne se dégrade pas au cours du temps, en raison de mouvements accidentels des sondes par exemple.

D'un point de vue clinique, nous avons caractérisé une chirurgie de carcinome basocellulaire. Sur ce cas, l'objectif visait à évaluer la capacité de la CRM à identifier des marqueurs tumoraux Raman dans des zones clairement identifiées comme cancéreuses dans l'image LC-OCT (présence de lobules de BCC). L'analyse des spectres Raman, bien que préliminaire, a permis d'obtenir des résultats encourageants sur ce cas : nous avons pu observer une grande similarité entre les spectres acquis dans l'épiderme et dans les lobules de BCC, un résultat cohérent en regard de la nature des lobules de BCC composés de cellules basales, bien que situés dans le derme. Par ailleurs, des différences spectrales, cohérentes avec la littérature, ont pu être identifiées entre l'épiderme et les lobules de BCC. Ces résultats sont préliminaires car ils sont issus d'un nombre limité de spectres et ont été obtenus sur un unique patient. Ils demandent à être généralisés sur une base de spectres plus conséquente pour véritablement évaluer la capacité de la CRM à différencier les tissus sains des tissus cancéreux.

Avec cette même plateforme, nous avons eu l'opportunité de caractériser des modèles *in vitro* de mélanomes issus de deux lignées cellulaires différentes. Ces modèles étant fixés, nous avons pu acquérir un plus grand volume de spectres que sur la chirurgie de carcinome basocellulaire. L'analyse des spectres a révélé de nombreuses différences significatives entre les spectres de kératinocytes de l'épiderme sain et les spectres des cellules de mélanomes, mettant ainsi en lumière la capacité de la CRM à distinguer différents types cellulaires. Des différences ont également pu être observées entre les deux lignées de mélanome, porteuses de mutations génétiques différentes, un résultat très prometteur quant au potentiel de la CRM à apporter des informations nouvelles à la LC-OCT sur les mutations impliquées dans le développement de cancers. Ces modèles *in vitro* constituent une bonne manière d'investiguer l'apport de la LC-OCT à la CRM du fait de la connaissance exacte de leur composition, en lien avec les acquisitions réalisées en conditions réelles sur chirurgies.

En conclusion, les résultats obtenus sur la chirurgie de BCC et les modèles de mélanome encouragent à poursuivre l'investigation du couplage LC-OCT/CRM pour l'aide au diagnostic dans le cas de pathologies difficiles et l'apport d'informations supplémentaires à l'image. Par rapport à d'autres techniques moléculaires utilisées *ex vivo*, telles que les modalités de fluorescence, la caractérisation d'échantillons par LC-OCT/CRM dispose de plusieurs atouts : les pièces excisées peuvent être analysées directement après chirurgie et ne nécessitent pas de préparation ni de découpe de l'échantillon comme c'est le cas en analyse histologique. Il n'est pas non plus nécessaire d'utiliser des traceurs ou marqueurs spécifiques, la CRM étant une modalité basée sur les vibrations des liaisons chimiques. En contrepartie, l'analyse des données Raman peut s'avérer complexe en raison de la superposition d'une grande quantité d'informations moléculaires au sein d'un même spectre Raman. Comme nous avons pu voir sur les chirurgies et les modèles de mélanome, les raies Raman sont rarement attribuées à un unique composant moléculaire, ce qui peut rendre difficile l'interprétation des changements observés.

A l'avenir, les investigations sur le potentiel du couplage LC-OCT/CRM pour la caractérisation des cancers cutanés seront poursuivies avec une installation durable de la plateforme de co-localisation au CHU de Saint-Etienne. En parallèle de ces investigations *ex vivo*, nous gardons en tête l'objectif d'apporter à terme des informations moléculaires à la LC-OCT *in vivo*. Au cours de cette thèse, nous avons ainsi réalisé en parallèle quelques travaux sur l'utilisation *in vivo* de la sonde de CRM et sur la transposition de la co-localisation LC-OCT/CRM à l'*in vivo*, que nous décrivons dans la dernière section de ce chapitre.

#### **4.8 . Applications *in vivo* de la sonde de CRM**

Comme nous l'avons introduit dans la section présentant l'architecture de la sonde de CRM, la conception mécanique de la sonde a été réalisée de façon à permettre son utilisation à la fois pour des applications *ex vivo* avec la plateforme de co-localisation et des applications *in vivo* grâce à un embout amovible placé en aval de la partie supérieure de la cuve contenant l'objectif de microscope. Dans cette partie, nous présentons des acquisitions Raman réalisées sur la peau *in vivo* avec la sonde de CRM développée au cours de cette thèse.

Lors des acquisitions *in vivo*, la peau est plaquée contre la lame de CaF<sub>2</sub> de l'embout amovible (avec éventuellement une très fine couche d'huile de paraffine entre la peau et la lame). L'image dermoscopique donnée par la sonde de CRM, générée pour rappel en temps réel, permet de guider

l'acquisition Raman par rapport à la surface de la peau. Elle permet également de contrôler si la peau reste bien immobile au cours de l'acquisition des spectres. L'ajustement de la profondeur sondée dans l'échantillon par le point focal est réalisé en utilisant la platine piézo-électrique. Au préalable, la position de la platine piézo-électrique est calibrée par rapport à l'interface entre la lame de CaF<sub>2</sub> et la peau, en utilisant le profil d'intensité de la raie Raman à 321 cm<sup>-1</sup> du CaF<sub>2</sub> en fonction de la position axiale de la platine, tel que précédemment décrit dans la section 4.5.2.

#### 4.8.1 . Acquisitions *in vivo* en profondeur

Grâce à cette platine piézo-électrique, des profils Raman axiaux peuvent être acquis. Un exemple est donné à la figure 4.39, où des spectres Raman ont été acquis sur le dos de la main, de la surface de la peau jusqu'à 500 µm de profondeur, avec un pas de 50 µm. Les spectres *in vivo* ont été acquis avec une puissance de 25 mW, un temps d'intégration de 30 s et 2 accumulations. Les spectres ont été soustraits de la fluorescence à l'aide d'un polynôme d'ordre 5 [211] et lissés par un filtre de Savitzky-Golay utilisant un polynôme d'ordre 3 sur une fenêtre de 5 points consécutifs. La figure 4.39 confirme la capacité de notre sonde de CRM à acquérir des spectres Raman *in vivo* et en profondeur, avec la raie de la phénylalanine visible jusqu'à environ 350 µm de profondeur dans la peau. Il est également possible d'observer la transition entre l'épiderme et le derme autour de 150 µm de profondeur, avec entre autres une inversion du ratio d'intensité des bandes à 1260 et 1320 cm<sup>-1</sup> entre l'épiderme et le derme, mise en évidence précédemment dans la section 4.7.3. La puissance a ici été réduite par précaution à 25 mW pour l'utilisation *in vivo* de la sonde, mais il serait envisageable d'augmenter la puissance (par exemple jusqu'à 50 mW), ce qui laisse présager une bonne augmentation de l'intensité des raies Raman en profondeur.

Ces spectres démontrent le potentiel de notre sonde de CRM pour l'acquisition de spectres Raman *in vivo*, guidée par l'image dermoscopique de surface de la peau. Pour aller plus loin, nous proposons d'investiguer la possibilité de guider les acquisitions Raman en 3D par co-localisation de l'image dermoscopique de la sonde CRM avec l'image dermoscopique du dispositif d'imagerie LC-OCT *in vivo*.

#### 4.8.2 . Co-localisation LC-OCT/CRM *in vivo*

Comme on l'a vu dans la section 4.6 consacrée à la co-localisation *ex vivo*, l'acquisition de spectres Raman en certains points précisément localisés dans une image 3D se base sur une calibration des platines de translation XYZ, réalisée à l'aide des images dermoscopiques du dispositif de LC-OCT et du système de CRM. Cette calibration ne se prête évidemment pas bien à l'*in vivo*, cependant il est possible de co-localiser des acquisitions Raman dans une image 3D de LC-OCT via un recalage des images dermoscopiques des deux dispositifs.

Pour présenter le processus de co-localisation LC-OCT/CRM *in vivo*, nous prenons l'exemple, illustré à la figure 4.40, d'un angiome cutané situé sur le bras. Les angiomes cutanés sont des malformations vasculaires de la peau caractérisées par la présence anormalement élevée de capillaires dilatés dans le derme superficiel. L'angiome a été dans un premier temps imagé avec la sonde de LC-OCT. Sur l'image dermoscopique du dispositif de LC-OCT, l'angiome apparaît sous la forme de tâches rosées à violines et sans relief. Sous l'image dermoscopique, une image 3D de LC-OCT (image en coupe horizontale à 100 µm de profondeur et image en coupe verticale extraites d'une image 3D) permet de



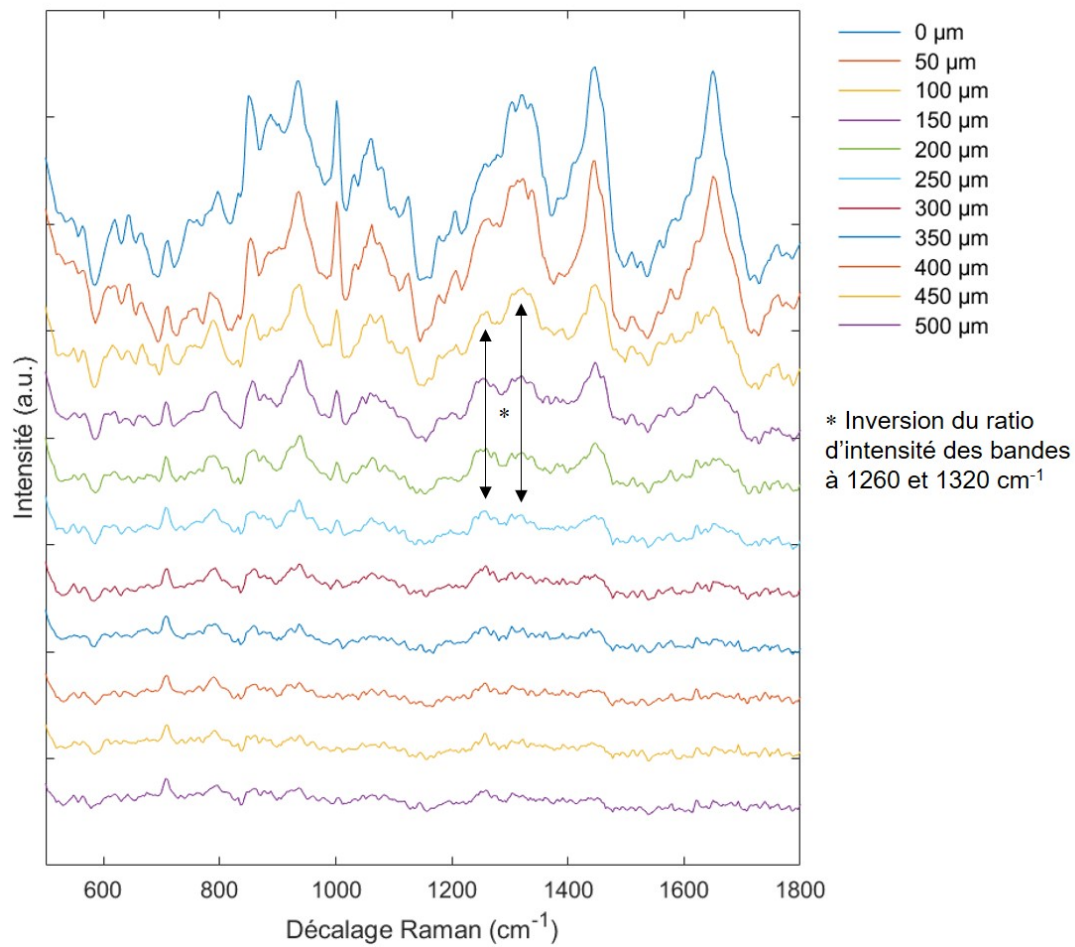


Figure 4.39 – Spectres Raman acquis *in vivo* sur le dos de la main, pour des profondeurs allant de la surface de l'échantillon (0  $\mu\text{m}$ ) à 500  $\mu\text{m}$  de profondeur. Spectres acquis avec une puissance de 25 mW sur l'échantillon, un temps d'intégration de 30 s et 2 accumulations. Les spectres ont été soustraits de l'auto-fluorescence et lissés par un filtre de Savitzky-Golay utilisant un polynôme d'ordre 3 sur une fenêtre de 5 points consécutifs. Les spectres sont volontairement décalés en ordonnée pour faciliter la visualisation. Les flèches noires pointent les bandes amide III à 1260 et 1320  $\text{cm}^{-1}$ , avec une inversion du ratio d'intensité de ces bandes lors du passage de l'épiderme au derme à environ 150  $\mu\text{m}$  de profondeur.

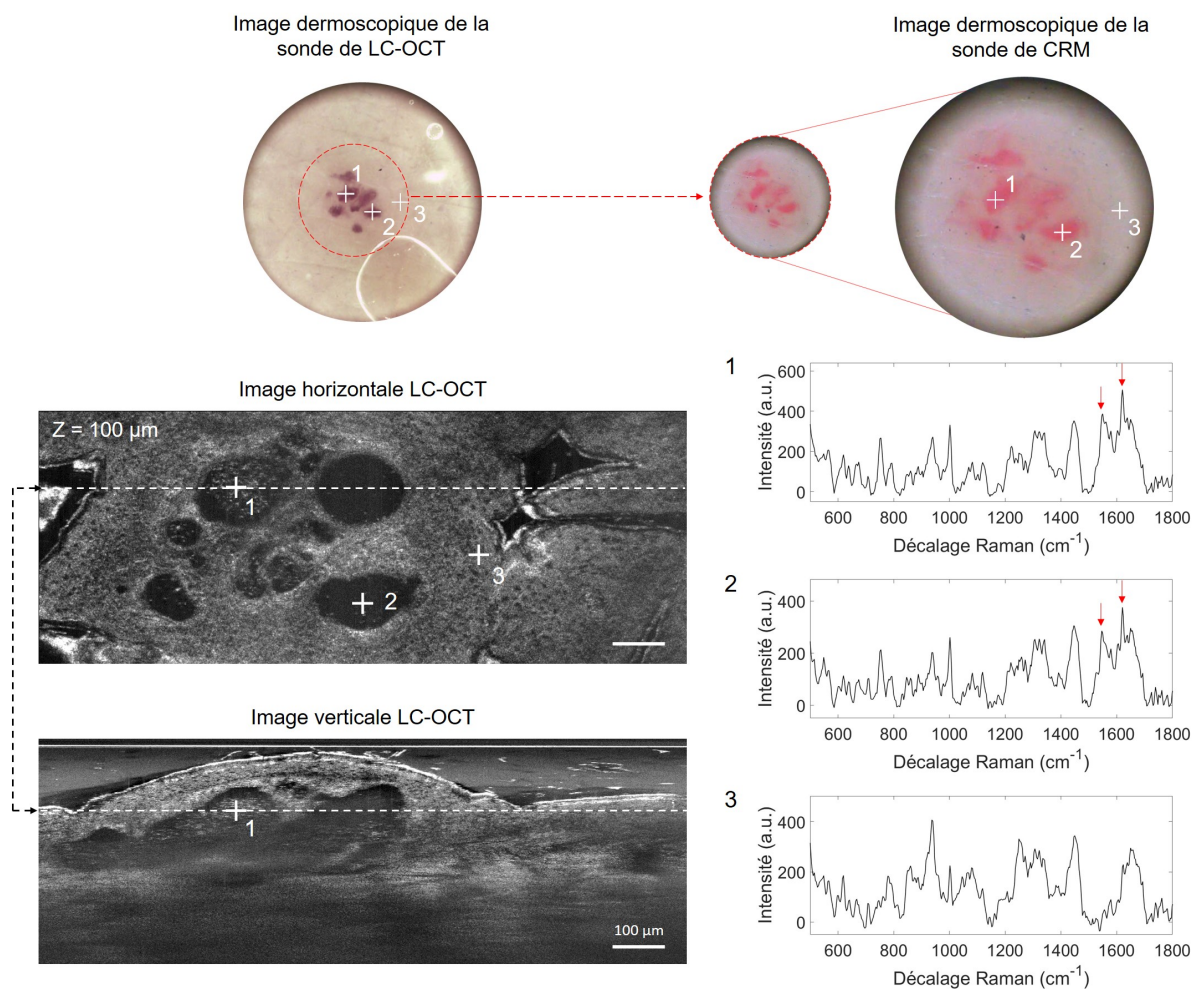


Figure 4.40 – Exemple d'expériences de co-localisation LC-OCT/CRM *in vivo*. Une image 3D de LC-OCT d'un angiome cutané a été acquise, représentée ici en coupes orthogonales. Dans cette image, trois POIs ont été ciblés. La ligne pointillée sur l'image horizontale montre la position de l'image verticale en dessous par rapport à l'image horizontale, et vice-versa. La profondeur Z de l'image horizontale est indiquée par rapport à la surface de la peau. Les flèches rouges sur les spectres Raman représentent les raies Raman correspondant au sang. Grâce à un recalage des images dermoscopiques des dispositifs de LC-OCT et de CRM, les spectres des trois mêmes POIs peuvent être acquis. Ils font apparaître la signature moléculaire du sang dans les deux POIs localisés à l'intérieur d'un capillaire sanguin.

visualiser les capillaires sanguins, hypo-réfléchissants (le sang étant un milieu très absorbant), dans le derme superficiel. Une nette corrélation peut être observée en comparant l'image dermoscopique et l'image horizontale de LC-OCT. Des POIs, notés 1, 2 et 3, dans l'image 3D de LC-OCT peuvent ainsi être ciblés et facilement corrélés à leur position latérale dans l'image dermoscopique. Ce même angiome a ensuite été analysé avec la sonde de CRM. Grâce à l'image dermoscopique de la sonde de CRM, également donnée dans la figure 4.40, il est aisé de repositionner la sonde CRM au niveau de l'angiome, et plus précisément de retrouver la position latérale des trois POIs identifiés avec la LC-OCT. Pour chaque POI, on peut alors positionner la sonde latéralement sur la peau de façon à le cibler (en pratique, une croix rouge, ne figurant pas à la figure 4.40, est affichée en temps réel sur l'image dermoscopique afin d'indiquer la position latérale du point focale de la sonde CRM dans l'image dermoscopique, tel qu'illustré précédemment à la figure 4.7). La profondeur du point focal de la sonde de CRM est ensuite ajustée afin de cibler axialement le POI, en se basant sur sa profondeur dans l'échantillon, mesurée à partir de l'image 3D de LC-OCT. Le spectre de chaque POI, localisé en 3D dans une image de LC-OCT, peut alors être acquis *in vivo*. L'acquisition Raman est ainsi guidée par l'imagerie LC-OCT à l'échelle cellulaire, via le recalage de la sonde de CRM par rapport à la sonde de LC-OCT basé sur l'imagerie dermoscopique.

Dans cet exemple, les deux premiers POIs ont été ciblés dans les capillaires sanguins de l'angiome, à 100  $\mu\text{m}$  de profondeur dans la peau. Le POI 3 a quant à lui été choisi dans la peau adjacente de l'angiome. La présence de sang au niveau des POIs 1 et 2 est confirmée par les spectres Raman qui exhibent deux raies Raman à 1547 et 1622  $\text{cm}^{-1}$  caractéristiques du sang [250], et qui ne se retrouvent pas dans le spectre du POI 3 situé dans une zone de peau adjacente. Cet exemple démontre le potentiel de l'imagerie dermoscopique pour effectuer des acquisitions LC-OCT et CRM co-localisées *in vivo*. La précision du recalage des deux sondes doit encore être évaluée. Elle n'est potentiellement pas aussi élevée que dans le cas de la co-localisation *ex vivo* utilisant des platines de translation calibrées, mais la résolution de quelques  $\mu\text{m}$  des images dermoscopiques suffit, dans le cas de l'angiome, à identifier de nettes structures à la surface de la peau. Le recalage est ici aisé du fait de la présence de ces structures colorées reconnaissables sur l'image dermoscopique de chaque dispositif. Mais ce n'est pas toujours le cas, comme on peut le voir sur la biopsie de tatouage à l'encre rouge présentée dans la section 4.6.4 ou les chirurgies de BCC et SCC présentées dans la section 4.7.3. Les images dermoscopiques obtenues (figures 4.22 et 4.33) montrent une surface de peau homogène, rendant la co-localisation via les images dermoscopiques complexe. Malgré tout, l'exemple de l'angiome démontre le potentiel de l'imagerie dermoscopique pour effectuer des acquisitions LC-OCT et CRM co-localisées sur la peau *in vivo*, dans le cas où des structures d'intérêt peuvent être corrélées à des points de repère en surface de la peau.

A noter que l'imagerie dermoscopique constitue à elle seule une modalité à part entière. Une analyse tri-modale *in vivo* est ainsi proposée, permettant de corréler trois types d'informations complémentaires : les informations morphologiques en surface et à l'échelle « tissulaire » apportées par l'imagerie dermoscopique, les informations morphologiques en profondeur et à l'échelle cellulaire apportées par la LC-OCT et les informations moléculaires à l'échelle quasi-cellulaire apportées par la CRM.

### 4.8.3 . Conclusion sur les applications *in vivo* de la sonde de CRM

Dans la partie de ce chapitre, nous avons démontré le potentiel de notre sonde de CRM pour une utilisation *in vivo*. La sonde de CRM permet d'obtenir des spectres Raman jusqu'à environ 350  $\mu\text{m}$  de profondeur avec des temps d'acquisition relativement raisonnables ( $2 \times 30$  s). Grâce à l'image de surface intégrée dans la sonde de CRM et la sonde de LC-OCT, nous avons proposé une méthode permettant, via un recalage des images de surface des deux dispositifs, d'effectuer une co-localisation *in vivo* des spectres Raman dans une image 3D de LC-OCT. Par rapport à la co-localisation *ex vivo*, la co-localisation *in vivo* apporte une analyse morphologique et moléculaire totalement non invasive.

Cependant, l'approche par co-localisation *in vivo* est difficile à mettre en œuvre : les deux sondes doivent être utilisées successivement, ce qui peut être fastidieux et chronophage. La co-localisation *in vivo* nécessiterait le développement d'algorithmes permettant de recalibrer les images de surface des deux sondes, un développement en pratique difficile sur des pathologies présentant peu de structures reconnaissables en surface. Pour des applications *in vivo*, un système couplant LC-OCT et CRM en un unique dispositif serait plus adapté. Nous travaillons actuellement sur le développement d'un tel système couplé. Ce développement nécessite des compromis en termes de spécifications. Le premier prototype nous permettra alors d'évaluer les performances que l'on pourrait obtenir *in vivo* à la fois du point de vue qualité image en LC-OCT et qualité spectrale et durée d'acquisition en CRM. A noter que par ailleurs, ce système couplé LC-OCT/CRM pourra également être utilisé *ex vivo* et permettrait de s'affranchir du besoin de calibration de deux dispositifs distincts, étape qui rend la co-localisation *ex vivo* actuelle un peu lourde de mise en œuvre.

Au-delà de ce couplage de la CRM à l'imagerie LC-OCT, le développement d'une sonde de CRM portable guidée par l'imagerie dermoscopique constitue en elle-même un dispositif novateur. Aujourd'hui, les systèmes commerciaux de CRM guidée par une image dermoscopique ou du moins une image macroscopique de surface sont peu nombreux : il s'agit principalement de systèmes de CRM non-portatifs dédiés à l'analyse *ex vivo*, tels que les microscopes Raman confocaux commercialisés par des entreprises telles que ceux de Horiba précédemment évoqués, ou le système de CRM sur table développé par RiverD pour des applications *in vivo*, principalement dermo-cosmétiques. Dans la littérature, seuls quelques prototypes de sondes Raman fibrées (non confocales) guidées par une image de surface ont été rapportés pour des applications dermatologiques [251]. Dans le domaine de la dermo-cosmétique, la CRM est une modalité répandue car elle permet d'accéder à une compréhension fine de la physiologie de la peau à l'échelle cellulaire. Elle est ainsi utilisée pour diverses applications, telles que l'étude des effets de formulations cosmétiques sur la peau [100], l'évaluation de la pénétration des actifs cosmétiques dans la peau [252] ou encore l'étude du vieillissement cutané [253]. Pour ces applications dermo-cosmétiques, disposer d'un système de CRM sous forme de sonde peut être un atout pour acquérir des spectres sur différentes zones du corps, en comparaison à un système sur table limité en termes d'accessibilité. Bien que l'image de surface ne permette pas à elle seule un ciblage en 3D, elle constitue un outil de visée pour positionner la sonde au niveau de zones d'intérêt repérées en surface (on peut par exemple imaginer des zones identifiées à l'aide d'un marqueur, des zones présentant des variations de pigmentations, etc) et contrôler les potentiels mouvements lors des acquisitions. L'information en profondeur est ensuite apportée par l'acquisition de profils Raman, un mode d'acquisition Raman fréquemment utilisé en dermo-cosmétique. La sonde de CRM développée au cours de cette thèse ouvre ainsi la voie à de potentielles applications dermo-cosmétiques.

## 4.9 . Conclusion et perspectives

En conclusion de ce chapitre, nous avons présenté les travaux menés au cours de cette thèse pour coupler la LC-OCT à la microspectroscopie Raman confocale (CRM), dans le but d'apporter à la LC-OCT des informations nouvelles d'ordre moléculaire. Ces travaux ont constitué premièrement en des développements techniques, visant à coupler la LC-OCT et la CRM, puis en des applications cliniques, visant à valider le système de couplage développé et à évaluer la valeur clinique du couplage LC-OCT/CRM.

D'un point de vue technique, nous avons tout d'abord fait le choix de coupler LC-OCT et CRM par une approche par co-localisation, en utilisant deux dispositifs (LC-OCT et CRM) totalement distincts et indépendants. Cette approche permet de travailler avec deux systèmes ayant des performances optimisées, contrairement à un système couplant les deux modalités en un même dispositif, qui nécessiterait des compromis sur les performances des deux modalités. Bien que l'objectif ultime consiste à apporter à la LC-OCT des informations nouvelles *in vivo*, nous avons développé une méthode de couplage dédiée à des applications *ex vivo* dans le but d'investiguer l'intérêt et le potentiel du couplage LC-OCT/CRM sans les contraintes de l'analyse *in vivo* (en termes de temps, de praticité et autres) et sur des échantillons caractérisés par histologie, pour lesquels le diagnostic précis a été posé.

Pour développer la méthode de couplage par co-localisation, nous avons dans un premier temps conçu notre propre système de CRM sur banc optique, travaillant à une longueur d'onde d'excitation de 785 nm, avec une ouverture numérique de 0.8 et permettant de sonder un volume Raman confocal évalué à  $\sim 1 \times 1 \times 30 \mu\text{m}^3$  ( $x \times y \times z$ ), *i.e.*, permettant de sonder un volume de l'ordre de quelques cellules. Le système de CRM développé dispose également d'une voie d'imagerie dermoscopique, permettant de localiser latéralement le point ciblé par le système de CRM par rapport à la surface de l'échantillon. Notre système a été validé par des acquisitions en profondeur sur des échantillons de peau de cochon *ex vivo*, qui ont permis d'obtenir un signal Raman jusqu'à environ 300  $\mu\text{m}$  de profondeur.

A l'aide de ce système de CRM, nous avons développé une méthode permettant de co-localiser des spectres Raman au sein d'une image 3D de LC-OCT. Le système de co-localisation est constitué d'un dispositif de LC-OCT et du système de CRM totalement indépendants, sous lesquels sont placées des platines de translation XYZ. Le principe de la co-localisation repose alors sur une calibration préalable de ces platines de translation et sur l'utilisation d'un porte-échantillon spécifique qui est manuellement translaté entre les deux systèmes. Grâce à ce système, il est possible d'acquérir des spectres Raman précisément localisés au sein d'une image 3D de LC-OCT, avec une précision de co-localisation évaluée à  $\pm 20 \mu\text{m}$  en XY et  $\pm 10 \mu\text{m}$  en Z. Cette approche a été développée avec le système de CRM conçu au cours de cette thèse mais présente l'avantage de pouvoir être adapté à d'autres systèmes de CRM, voire éventuellement transposée à d'autres modalités.

Nous avons validé cette approche sur des échantillons de peau de cochon tatouée et l'avons ensuite appliquée à la caractérisation de biopsies de tatouages présentant des réactions cutanées, fournies par le CHU de Saint-Etienne. Suite à ces premières expériences, nous avons développé un prototype de plateforme de co-localisation LC-OCT/CRM, toujours dédié à des applications *ex vivo*, dans le but de pouvoir réaliser des expérimentations en clinique. Pour cela, nous avons tout d'abord intégré le système de CRM initialement développé sur banc optique dans une sonde de CRM portable, similaire en apparence à la sonde de LC-OCT. La plateforme de co-localisation facilite la procédure de

co-localisation grâce à l'utilisation de moteurs XYZ permettant de translater facilement l'échantillon entre le dispositif de LC-OCT et le dispositif de CRM. Ces moteurs facilitent également la procédure de calibration et permettent de gagner du temps lors des expérimentations en s'affranchissant de la lecture et de l'ajustement manuels des coordonnées sur les platines. Malgré cette intégration qui facilite la co-localisation, il faut être conscient que la co-localisation reste un peu lourde de mise en œuvre du fait du besoin d'une calibration par un opérateur dédié et formé. Il faut également contrôler que la calibration ne se dégrade pas dans le temps. Par ailleurs, des efforts d'intégrations logiciels sont à prévoir pour faciliter la gestion des différents logiciels utilisés pour les acquisitions LC-OCT/CRM.

D'un point de vue applicatif, les expérimentations menées au cours de cette thèse sur les biopsies et chirurgies de peau nous ont permis de mettre en lumière la complémentarité de la LC-OCT et de la CRM, sur deux types d'applications différents : la caractérisation de corps étrangers dans la peau et la caractérisation de cancers cutanés. Sur les échantillons porteurs de corps étrangers (biopsies de tatouage), l'apport de la CRM à la LC-OCT a clairement été mis en évidence pour fournir des informations moléculaires supplémentaires que la LC-OCT seule ne peut fournir, permettant de lever des ambiguïtés dans l'image et d'identifier des structures spécifiques. La LC-OCT quant à elle apporte à la CRM un guidage à l'échelle cellulaire, permettant une analyse moléculaire de structures précisément localisées en 3D dans les échantillons. Chaque modalité permet alors d'accéder à une meilleure caractérisation des échantillons, mais également de mieux comprendre et interpréter chaque modalité. Du fait de la présence de corps étrangers, ces échantillons constituaient des échantillons idéaux pour démontrer l'intérêt du couplage LC-OCT/CRM.

Sur les échantillons de cancers cutanés, les résultats sont également très prometteurs quant au potentiel de la CRM à apporter des informations supplémentaires à la LC-OCT. L'analyse des spectres Raman acquis sur une chirurgie de carcinome basocellulaire a notamment permis de retrouver des marqueurs tumoraux Raman en accord avec la littérature, bien que les différences soient bien plus subtiles que sur les échantillons de corps étrangers. Nous avons par ailleurs pu caractériser des modèles *in vitro* de mélanomes en collaboration avec un institut de recherche allemand. L'analyse des spectres a révélé de nombreuses différences significatives entre les spectres de kératinocytes de l'épiderme sain et les spectres des cellules de mélanomes, mettant ainsi en lumière la capacité de la CRM à distinguer différents types cellulaires. Des différences ont également pu être observées entre deux lignées de mélanome différentes, porteuses de mutations génétiques différentes, un résultat très prometteur quant au potentiel de la CRM à apporter des informations nouvelles à la LC-OCT sur les mutations impliquées dans le développement de cancers.

Les expérimentations menées sur les échantillons de cancers cutanés nous ont permis de prendre conscience du besoin d'acquérir une base de données Raman plus conséquent pour pouvoir réellement évaluer quelles nouvelles informations peut apporter la CRM à la LC-OCT sur les cancers cutanés. En termes de perspectives, nous allons ainsi continuer les expérimentations de co-localisation au CHU de Saint-Etienne en y installant durablement la plateforme de co-localisation LC-OCT/CRM au CHU afin de réaliser une collecte de données LC-OCT/CRM co-localisées sur des chirurgies de cancers cutanés. La collecte de données sera réalisée en collaboration avec une postdoctorante au CHU dans le cadre d'un projet de recherche financé par l'agence nationale de la recherche (ANR), portant sur des développements de multimodalité en LC-OCT. Des efforts seront mis en œuvre pour répondre aux limitations de la co-localisation précédemment évoquées, afin de faciliter les acquisitions LC-OCT/CRM dans

la durée. Ceci nous permettra de générer une base de données Raman plus conséquente. Dans une première étape, l'objectif sur cette base de données sera d'évaluer les différences spectrales entre les tissus sains et les tissus cancéreux, en se focalisant sur des cas de cancers évidents pour la LC-OCT. Cela permettra de confirmer (ou non) la capacité de la CRM à identifier des marqueurs tumoraux sur ces cas évidents, en tenant compte des variations d'un individu à un autre. Dans une seconde étape, cette base de données nous servira pour évaluer l'apport de la CRM par rapport à la LC-OCT sur les cas de cancers difficiles à diagnostiquer à partir de l'image : l'idée sera notamment d'évaluer son apport pour la différenciation des pathologies imitatrices en LC-OCT, pour l'identification de zones présentant des lésions précoces ou pré-tumorales, la définition et l'évaluation de marges en chirurgie ou encore l'apport d'informations génétiques permettant une meilleure prise en charge via l'utilisation de thérapies ciblées. En générant une telle base de données Raman, il nous sera également possible d'aller vers des méthodes de machine learning pour proposer une aide à l'analyse des spectres et à plus long terme une aide au diagnostic, basée sur la combinaison des informations apportées par la LC-OCT et la CRM.

Si les résultats s'avèrent concluants, l'objectif sera de transposer tout ce travail aux applications *in vivo*, l'avantage conséquent du Raman étant l'absence de marquage. Au cours de cette thèse, quelques investigations ont été menées pour transposer l'approche de co-localisation LC-OCT/CRM à l'*in vivo*, en utilisant un recalage successif des deux sondes à l'aide des images de surface des dispositifs de LC-OCT et de CRM. Cependant cette approche reste complexe à mettre en œuvre expérimentalement. Pour aller vers l'*in vivo*, nous travaillons actuellement sur un système couplant LC-OCT et CRM en un unique dispositif. Ce système sera intégré sous la forme d'une sonde portable similaire aux sondes de LC-OCT et CRM présentées dans ce manuscrit. A terme, le couplage LC-OCT/CRM permettra éventuellement de lever des doutes dans l'image, améliorer la précision du diagnostic ou encore apporter des informations complémentaires *in vivo*. Le guidage de la CRM par la LC-OCT permettra de cibler efficacement certaines structures ou zones d'intérêt dans la peau *in vivo*, limitant alors le temps d'acquisition Raman, qui constitue actuellement un frein à l'utilisation de la CRM seule en clinique. A noter que ce système couplé LC-OCT/CRM pourra également être utilisé dans une configuration *ex vivo*, et qu'il pourrait ainsi répondre aux limitations de l'approche de co-localisation en s'affranchissant du besoin de calibration entre deux sondes séparées.



## Conclusion générale

Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés à des développements de multimodalité autour de la technologie d'imagerie LC-OCT (tomographie par cohérence optique confocale à balayage de ligne). La LC-OCT est une technique d'imagerie optique permettant d'obtenir des images en profondeur et à haute résolution de la peau *in vivo*. Inventée au laboratoire Charles Fabry à l'Institut d'Optique, la LC-OCT a été développée puis commercialisée par l'entreprise DAMAE Medical pour des applications dermatologiques. L'objectif de cette technologie est d'améliorer la prise en charge du cancer cutané, qui représente l'un des types de cancers les plus répandus dans le monde. Actuellement, le diagnostic du cancer de la peau est basé sur un examen visuel de la surface de la peau suivi d'une éventuelle biopsie analysée par histologie. Ce processus de diagnostic est invasif, long et limité en termes de détection des lésions précoces du fait de l'examen visuel en surface. La LC-OCT est une technique d'imagerie totalement non invasive, qui permet d'imager la peau en profondeur jusqu'à 500  $\mu\text{m}$  et en 3D avec une résolution cellulaire de  $\sim 1 \mu\text{m}$ , fournissant ainsi un niveau de détail morphologique similaire à l'histologie. Cependant, elle reste limitée à l'apport d'informations structurales, à la différence de l'histologie qui peut apporter des informations fonctionnelles supplémentaires grâce à l'application de colorants ou marqueurs cellulaires spécifiques. Or dans certains cas, le diagnostic précis peut être complexe à établir à partir d'informations morphologiques uniquement, notamment dans le cas de lésions ambiguës ou imitatrices et de lésions précoces. Afin d'améliorer la précision du diagnostic, nous avons investigué au cours de cette thèse comment de nouvelles informations, complémentaires aux images, peuvent être apportées à la LC-OCT, en considérant deux approches différentes. Dans une première approche, nous avons cherché à extraire des images LC-OCT des informations complémentaires, par une approche de traitement d'images et modélisation du signal en LC-OCT. Notre choix s'est porté sur l'extraction des propriétés optiques de diffusion des tissus imagés, informations intrinsèquement comprises dans les images de LC-OCT. Dans une seconde approche, nous avons cherché à coupler la LC-OCT à une autre modalité pour apporter à la LC-OCT des informations moléculaires. La modalité choisie pour le couplage est la spectroscopie Raman, une méthode de spectroscopie capable d'identifier la composition moléculaire d'un échantillon en sondant les vibrations de ses liaisons chimiques.

Ce manuscrit s'est articulé selon quatre chapitres. Le premier chapitre a consisté en un chapitre introductif, visant premièrement à introduire le contexte clinique dans lequel s'est inscrite cette thèse, à savoir la peau, les différents types de cancers cutanés et la procédure de diagnostique actuelle avec ses principaux inconvénients. Du fait du besoin d'une prise en charge plus efficace du cancer cutané, plusieurs modalités non invasives d'imagerie microscopique et de spectroscopie optique ont vu le jour. Ces modalités optiques se basent sur les interactions entre la lumière et les tissus pour caractériser la peau de façon non invasive. Dans ce premier chapitre, nous avons ainsi présenté les différentes interactions de la lumière avec la peau (absorption, diffusion). Puis nous avons dressé l'état de l'art de ces modalités dédiées à l'étude *in vivo* de la peau avec leurs principes de fonctionnement en lien avec les interactions lumière/peau précédemment présentées.

Le deuxième chapitre a été consacré à la description de la LC-OCT. La LC-OCT est une modalité optique reposant sur la combinaison des principes de l'OCT et de la microscopie confocale en réflec-

tance. Ainsi, nous avons débuté ce chapitre en retraçant l'origine de cette technologie. Le principe de fonctionnement de l'OCT est ainsi présenté, puis celui de la microscopie par cohérence optique à balayage et plein champ. Cette première partie nous a permis de dresser le constat des limites de chacune de ces deux technologies pour l'utilisation en dermatologie : résolution insuffisante en OCT pour la visualisation des cellules de la peau, vitesse d'acquisition limitante en OCM à balayage, profondeur de pénétration insuffisante en OCM plein champ pour la visualisation des couches profondes de la peau. La LC-OCT émerge alors comme une réponse à ces limitations et aux besoins de la dermatologie *in vivo*. Son principe repose sur l'éclairage de la peau selon une ligne, permettant la parallélisation des acquisitions selon une direction, sur une illumination par des objectifs de microscope permettant l'imagerie à haute résolution et sur une détection par un capteur ligne assurant un filtrage confocal dans une direction. La LC-OCT permet de générer des images verticales, horizontales et 3D de la peau *in vivo*, avec une résolution cellulaire de  $\sim 1 \mu\text{m}$  et sur un champ de  $1.2 \text{ mm} \times 0.5 \times 0.5 \text{ mm}^3$  ( $x \times y \times z$ ). Enfin, nous terminons ce chapitre en présentant les limites de l'imagerie morphologique. Malgré son niveau de détails cellulaires, l'imagerie LC-OCT peut s'avérer insuffisante pour la pose du bon diagnostic dans le cas de lésions précoces ou ambivalentes. De ce constat découle un besoin d'informations supplémentaires pour améliorer le diagnostic et la prise en charge personnalisée du patient ; besoin auquel nous avons tenté de répondre au cours de cette thèse en suivant deux approches distinctes, présentées en détails dans les chapitres 3 et 4.

Dans le troisième chapitre, nous avons présenté les travaux menés dans le cadre de la première approche, consistant à extraire d'images LC-OCT existantes les propriétés optiques de diffusion des échantillons imagés. Ces propriétés optiques, à savoir le coefficient d'absorption  $\mu_a$ , le coefficient de diffusion  $\mu_s$  et le facteur d'anisotropie de diffusion  $g$ , régissent l'intensité collectée par le système de LC-OCT et sont ainsi des informations intrinsèquement comprises dans les images. Ces propriétés optiques sont elles-mêmes déterminées par les propriétés structurales et organisationnelles des échantillons (taille, densité, indice optique). Elles présentent donc un intérêt pour quantifier des changements structuraux dans les images, pouvant être indicateur du développement ou de la progression d'une pathologie. Au cours de cette thèse, nous avons développé une méthode pour mesurer le coefficient de diffusion  $\mu_s$  et le facteur d'anisotropie de diffusion  $g$ , à partir d'une seule image LC-OCT 3D. Notre approche repose sur l'extraction de deux observables,  $\rho$  et  $\mu_{eff}$ , de l'image LC-OCT, en appliquant une régression linéaire au profil de profondeur de l'intensité moyenne dans l'image 3D (en échelle logarithmique). À l'aide d'une calibration avec un fantôme aux propriétés optiques connues et un modèle précédemment introduit dans la littérature, les valeurs de  $\rho$  et  $\mu_{eff}$  peuvent être mises en correspondance avec les valeurs des paramètres de diffusion  $\mu_s$  et  $g$ . Nous avons testé notre méthode sur des fantômes monocouches et bicouches de PDMS contenant des nano- et micro-particules imitant les propriétés optiques de diffusion de tissus biologiques typiques, et l'avons comparée à une autre méthode couramment utilisée, basée sur des sphères intégrantes et des mesures de transmission collimatée. Malgré des difficultés expérimentales, nous avons obtenu des valeurs de propriétés optiques en LC-OCT cohérentes avec celles obtenues avec les sphères intégrantes et les mesures de transmission collimatée, pour les fantômes présentant des coefficients de diffusion allant jusqu'à  $12 \text{ mm}^{-1}$  et des facteurs d'anisotropie  $0.7 < g < 0.9$ . Par rapport à la mesure par sphères intégrantes et transmission collimatée, notre méthode présente l'avantage d'être applicable *in vivo* et de permettre la distinction de différentes couches de tissus ayant des propriétés optiques différentes. Par la suite, nous avons

proposé une extension de notre méthode pour obtenir les distributions spatiales des deux propriétés optiques  $\mu_s$  et  $g$  dans une image LC-OCT 3D avec une résolution macroscopique. Ces informations apportent une mesure résolue à l'échelle de la centaine de  $\mu\text{m}$ , complémentaire aux informations qualitatives de résolution micrométrique apportées par l'image LC-OCT. Enfin, nous avons présenté des travaux préliminaires sur la mesure des propriétés optiques des différentes couches de la peau (couche cornée, épiderme et derme) *in vivo*, en bon accord avec la littérature. En termes de perspectives, des travaux supplémentaires seraient à prévoir pour investiguer l'applicabilité de notre méthode pour des fantômes plus diffusants, ce qui n'a pu être réalisé en raison de difficultés expérimentales à fabriquer des échantillons concentrés homogènes. Cela permettrait de mieux valider l'applicabilité à la peau, dont la couche cornée présente un coefficient de diffusion au-delà de la gamme étudiée dans ce manuscrit. Une étude plus approfondie serait également nécessaire pour évaluer la fiabilité de la mesure dans le derme, notamment la compréhension des propriétés optiques du derme papillaire, la contribution de la diffusion multiple en profondeur dans le derme et l'impact d'éventuels vaisseaux sanguins. Enfin, on pourrait imaginer combiner les mesures résolues par couche et les mesures résolues latéralement pour cartographier en 3D les propriétés optiques  $\mu_s$  et  $g$  en découpant l'image LC-OCT en macro-voxels. A terme, la mesure de propriétés optiques pourrait être vue comme une métrique permettant de quantifier *in vivo* des changements difficilement quantifiables à partir de l'image LC-OCT, par exemple dans le cas de lésions précoces où les changements sont peu discernables, ou d'évaluer des différences à une échelle imperceptible à l'œil nu, qui permettraient par exemple d'identifier une pathologie parmi plusieurs pathologies imitatrices, *i.e.*, similaires morphologiquement à l'échelle de l'image.

Enfin, le quatrième chapitre de ce manuscrit est consacré au couplage de la LC-OCT et de la microspectroscopie Raman confocale dans le but d'apporter des informations d'ordre moléculaire à l'imagerie LC-OCT. La microspectroscopie Raman confocale est basée sur l'effet de diffusion inélastique Raman. Le spectre diffusé de manière inélastique est caractéristique des vibrations des liaisons chimiques présentes dans une molécule et peut donc être utilisé pour identifier la composition moléculaire des tissus analysés. Grâce un effet de filtrage confocal, la microspectroscopie Raman confocale est une modalité permettant d'obtenir des informations moléculaires en un point précis de l'échantillon. Par rapport à d'autres modalités d'ordre moléculaire comme la microscopie confocale de fluorescence, la microspectroscopie Raman confocale fournit des informations de haute spécificité (à l'échelle des liaisons chimiques) sans nécessiter de propriétés intrinsèques de fluorescence ou de marquage exogène ciblant certaines structures moléculaires, ce qui rend son utilisation *in vivo* facilitée. Afin d'investiguer le potentiel du couplage LC-OCT/CRM pour l'apport d'informations nouvelles à la LC-OCT, nous avons fait le choix de proposer un couplage pour des applications *ex vivo*, basé sur une approche de co-localisation entre un système de LC-OCT et un système de CRM indépendants. L'analyse *ex vivo* se prête en effet plus facilement à ces investigations car les échantillons étudiés sont alors caractérisés par histologie, ce qui permet d'avoir le diagnostic exact et de s'y confronter, tout en s'affranchissant de contraintes liées à l'analyse *in vivo* en termes de durées d'acquisition et de praticité notamment. Pour développer la méthode de couplage par co-localisation, nous avons dans un premier temps conçu notre propre système de CRM sur banc optique, dédié à l'analyse Raman au sein d'un volume confocal de  $\sim 1 \times 1 \times 30 \mu\text{m}^3$  ( $x \times y \times z$ ), *i.e.*, à l'échelle de l'ordre de quelques cellules. Une fois ce système conçu, nous l'avons utilisé pour développer une méthode permettant de co-localiser des spectres Raman au sein d'une image 3D de LC-OCT. La co-localisation repose sur une calibration des

deux platines de translation XYZ situées sous chaque système, LC-OCT et CRM, réalisée, en amont des expériences, et sur l'utilisation d'un porte-échantillon spécifique qui est déplacé manuellement du dispositif de LC-OCT au dispositif de CRM. Cette approche permet d'acquérir des spectres Raman précisément localisés au sein d'une image 3D, avec une précision de  $\pm 20 \mu\text{m}$  en XY et  $\pm 10 \mu\text{m}$  en Z. Après validation sur des échantillons de peau de cochon, nous avons appliqué notre méthode à la caractérisation de biopsies de tatouage présentant des réactions cutanées. Ces biopsies ont permis de mettre en lumière la complémentarité de la LC-OCT et de la CRM : la CRM permet de fournir des informations moléculaires supplémentaires que la LC-OCT seule ne peut fournir, permettant de lever des ambiguïtés dans l'image et d'identifier des structures spécifiques. La LC-OCT, quant à elle, apporte à la CRM un guidage à l'échelle cellulaire, permettant une analyse moléculaire de structures précisément localisées en 3D dans les échantillons. Chaque modalité permet alors d'accéder à une meilleure caractérisation des échantillons, mais également de mieux comprendre et interpréter chaque modalité. Par la suite, nous avons développé une plateforme de co-localisation LC-OCT/CRM, compacte et transportable, dans le but de pouvoir réaliser des expérimentations en clinique. Pour cela, nous avons tout d'abord intégré le système de CRM initialement développé sur banc optique dans une sonde de CRM portable, similaire en apparence à la sonde de LC-OCT. Nous avons ensuite intégré cette sonde de CRM au sein d'une plateforme de co-localisation motorisée, permettant le déplacement automatique de l'échantillon entre les deux dispositifs. A l'aide de cette plateforme de co-localisation, nous avons réalisé des premières expérimentations sur des cancers cutanés, incluant une chirurgie de carcinome basocellulaire analysée au CHU de Saint-Etienne, et des modèles *in vitro* de mélanome développés par un institut de recherche allemand. Les résultats issus des analyses Raman sont très prometteurs puisque des marqueurs tumoraux ont pu être identifiés dans les spectres en comparaison à des tissus sains. Cependant ces résultats restent préliminaires, notamment sur la chirurgie de BCC étudiée au CHU, en raison du nombre limité de spectres acquis. Ces expérimentations cliniques nous encouragent à poursuivre les investigations sur le couplage LC-OCT/CRM sur une base de données de cancers cutanés plus large, afin de mieux cerner la valeur du couplage LC-OCT/CRM. D'un point de vue technique, elles nous ont montré que l'approche de co-localisation est bien adaptée à ces investigations *ex vivo*, malgré quelques limitations intrinsèques à cette approche, notamment le besoin d'une calibration par un opérateur expérimenté. En termes de perspectives, les investigations seront effectivement poursuivies au CHU de Saint-Etienne suite à cette thèse, grâce à l'attribution par l'agence nationale de la recherche d'un projet de recherche collaboratif portant sur la multimodalité en LC-OCT. La plateforme de co-localisation sera installée au CHU pour effectuer une plus grande collecte de données, qui nous permettra de mieux cerner l'apport de la CRM à la LC-OCT sur les cancers cutanés. En parallèle, nous travaillons actuellement sur un prototype couplant LC-OCT et CRM en un même dispositif, dans l'idée de transposer le couplage des deux modalités à des applications *in vivo*. Ce prototype nous permettra d'évaluer la dégradation des performances LC-OCT et CRM en raison de compromis nécessaires pour le couplage et d'évaluer la transposition des investigations menées *ex vivo* à l'*in vivo*. A terme, le couplage LC-OCT/CRM permettra éventuellement d'améliorer la précision du diagnostic établi en LC-OCT, ou encore apporter des informations complémentaires *in vivo* permettant une meilleure prise en charge des patients.

## A - Interférences à deux ondes

### A.1 . Lumière monochromatique

Considérons le cas d'un interféromètre de Michelson tel qu'illustré à la figure A.1. A l'entrée de l'interféromètre, le faisceau incident est séparé en deux faisceaux : l'un est envoyé dans un bras dit de référence, où il est réfléchi par une surface de référence avec un coefficient de réflexion en amplitude  $r_1$ , tandis que l'autre est envoyé dans un bras objet où il illumine l'échantillon à imager. Dans le cas le plus simple où l'échantillon constitue une surface réfléchissante de coefficient de réflexion en amplitude  $r_2$ , le faisceau du bras objet est réfléchi par l'échantillon et se recombine avec le faisceau du bras de référence. Dans le cas d'une onde plane monochromatique caractérisée par un champ  $E = E_0 e^{j\omega t + kz}$ , les champs  $E_1$  et  $E_2$  revenant se combiner au niveau du cube séparateur peuvent s'écrire :

$$E_1 = \frac{E_0}{2} r_1 e^{j\omega t + k(2L_1)}$$
$$E_2 = \frac{E_0}{2} r_2 e^{j\omega t + k(2L_2)}$$

Avec  $L_i$  la longueur de chaque bras, telle qu'illustrée à la figure A.1 et en prenant l'origine des phases au niveau de la lame séparatrice. L'intensité collectée par le détecteur, résultant de la combinaison des deux champs, peut alors s'écrire :

$$I_{mono} = \frac{I_0}{4} (r_1^2 + r_2^2 + r_1 r_2 \cos(\Delta\phi)) \quad (\text{A.1})$$

Où  $\Delta\phi$  représente le déphasage entre les deux ondes :  $\Delta\phi = k\delta$  avec  $\delta = 2(L_1 - L_2)$  la différence de marche entre les deux bras prenant en compte l'aller-retour dans l'interféromètre. En translatant par exemple la surface du bras de référence, on fait varier  $\delta$  et le signal  $I_{mono}(\delta)$  collectée par le détecteur suit une évolution sinusoïdale, telle que représentée à la figure A.1.

### A.2 . Lumière polychromatique

Dans le cas d'une onde polychromatique, décrite comme la somme d'une multitude d'ondes monochromatiques, l'intensité  $I_{poly}$  collectée sur le détecteur correspond à la somme des intensités  $I_{mono}$  résultant des interférences produites par chaque longueur d'onde, pondérée par la densité spectrale de puissance notée  $S(k)$  reflétant la proportion de chaque longueur d'onde dans le spectre total :

$$I_{poly} = \int_0^\infty S(k) \frac{I_0}{4} (r_1^2 + r_2^2 + r_1 r_2 \cos(k\delta)) dk$$
$$I_{poly} = \frac{I_0}{4} (r_1^2 + r_2^2 + r_1 r_2 \int_0^\infty S(k) \cos(k\delta) dk)$$

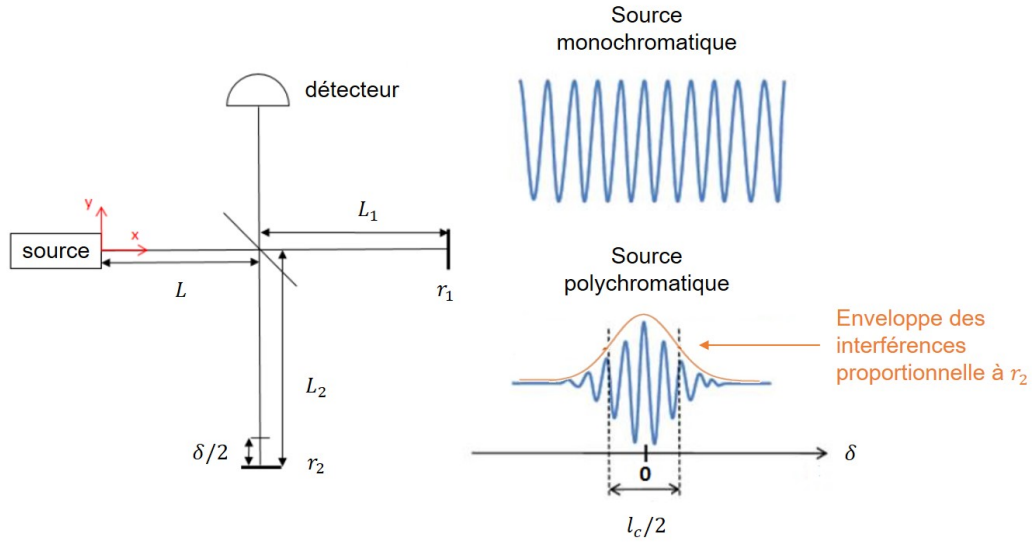


Figure A.1 – Schéma d'un interféromètre de Michelson et signaux d'interférences collectés par le détecteur en lumière monochromatique et polychromatique. Figure adaptée de [24, 46].

Le terme  $\int_0^\infty S(k) \cos(k\delta) dk$  correspond au terme d'interférence et en supposant que  $S(k) = 0$  pour  $k < 0$ , il vient :

$$\begin{aligned}
 \int_0^\infty S(k) \cos(k\delta) dk &= \int_{-\infty}^\infty S(k) \cos(k\delta) dk \\
 &= \int_{-\infty}^\infty S(k) \cos(-k\delta) dk \\
 &= \Re\left(\int_{-\infty}^\infty S(k) e^{-jk\delta} dk\right) \\
 &= \Re(TF[S(k)](\delta))
 \end{aligned}$$

$\Re(TF[S(k)](\delta))$  représente alors la modulation des franges d'interférences. Dans le cas d'un spectre monochromatique de vecteur d'onde  $k_0$ , on a  $S(k) = \delta_{dirac}(k - k_0)$  avec  $\delta_{dirac}$  la fonction Dirac dans l'espace des fréquences spatiales. La modulation est alors donné par la partie réelle de cette fonction de Dirac, et on retrouve une modulation en  $\cos(k_0\delta)$  de l'expression 2.1. Prenons désormais l'exemple d'un spectre polychromatique gaussien de barycentre  $k_0$  tel que  $k_0 = \int_{-\infty}^\infty kS(k)dk$  et de largeur à mi hauteur  $\Delta k$ . La densité spectrale de puissance s'écrit :

$$S(k) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{(k - k_0)^2}{2\sigma^2}\right)$$

avec  $\sigma = \Delta k/2\sqrt{2\ln 2}$ . La modulation s'écrit dans ce cas :

$$\begin{aligned}
 \int_0^\infty S(k) \cos(k\delta) dk &= \Re(TF[S(k)](\delta)) \\
 &= \Re(\exp(-jk_0\delta)TF(\frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \exp(-\frac{k^2}{2\sigma^2})) \\
 &= \Re(\exp(-jk_0\delta) \exp(-\frac{\sigma^2\delta^2}{2})) \\
 &= \cos(k_0\delta) \exp(-\frac{\Delta k^2\delta^2}{16\ln 2})
 \end{aligned}$$

Ainsi, les interférences sont modulées par une enveloppe gaussienne  $V_{coh} = \exp(-\frac{\Delta k^2\delta^2}{16\ln 2})$ . Le contraste des franges se trouve maximal pour une différence marche  $\delta$  nulle, et diminue avec progressivement avec l'augmentation de la différence de marche, tel qu'illustré à la figure A.1.  $V_{coh}$  joue donc le rôle d'une enveloppe cohérente au sein de laquelle les interférences sont visibles. Plus la largeur spectrale  $\Delta k$  est grande et plus l'enveloppe  $V_{coh}$  sera fine, autorisant ainsi l'observation d'interférences uniquement pour des différences de marche très faibles entre les deux bras.





## B - OCT temporel et OCT fréquentiel

L'OCT en domaine fréquentiel constitue la deuxième implémentation possible de l'OCT. En OCT dans le domaine temporel, la surface de référence est translatée « temporellement » pour scanner les différentes profondeurs de l'échantillon. L'intensité rétro-diffusée est collectée avec un capteur standard intégrant l'ensemble des longueurs d'onde du spectre de la source. En OCT dans le domaine fréquentiel, l'intensité rétro-diffusée est collectée par un spectromètre afin d'isoler l'intensité collectée pour chaque longueur d'onde individuellement. Dans ce cas, l'intensité collectée pour chaque longueur d'onde se rapproche de l'expression de  $I_{mono}$  de l'équation 2.1 avec un échantillon diffusant quelconque au lieu d'une surface réfléchissante dans le bras objet. Du fait de considérer chaque longueur d'onde individuellement, les interférences obtenues pour chaque longueur d'onde présentent une très grande longueur de cohérence. Pour chaque longueur d'onde, le terme d'interférence  $I_{int\ FD-OCT}(k)$  résulte des interférences collectées sur l'ensemble de la profondeur de champ de l'optique utilisée pour focaliser le faisceau dans l'échantillon :

$$I_{int\ FD-OCT}(k) = S(k) \frac{I_0}{2} \sqrt{R_{ref}} \iiint_V \sqrt{R_{ech}(x, y, z)} \cos(k\delta(z)) dx dy dz \quad (B.1)$$

Avec  $V = \Delta x \times \Delta y \times \Delta z$  et  $\Delta z$  la profondeur de champ de l'optique, illustrée à la figure 2.2 pour rappel.

Dans le cas simple d'un faisceau infiniment fin en  $XY$  et d'une profondeur de champ infinie, on peut montrer que le terme d'interférences  $I_{int\ FD-OCT}(k)$  fait apparaître la transformée de Fourier de  $\sqrt{R_{ech}}$  :

$$\begin{aligned} I_{int\ FD-OCT}(k) &= S(k) \frac{I_0}{2} \sqrt{R_{ref}} \iiint_V \sqrt{R_{ech}(x, y, z)} \cos(k\delta(z)) dx dy dz \\ &= S(k) \frac{I_0}{2} \sqrt{R_{ref}} \int_{-\Delta z}^{\Delta z} \sqrt{R_{ech}(\delta)} \cos(k\delta) d\delta \\ &= S(k) \frac{I_0}{2} \sqrt{R_{ref}} \int_{-\infty}^{\infty} \sqrt{R_{ech}(\delta)} e^{jk\delta} d\delta \\ &= S(k) \frac{I_0}{2} \sqrt{R_{ref}} TF[\sqrt{R_{ech}(\delta)}](k) \end{aligned} \quad (B.2)$$

En effectuant un changement de variable entre  $z$  et  $\delta$ . La transformée de Fourier de  $I_{FD-OCT}(k)$  permet alors de retrouver  $\sqrt{R_{ech}(\delta)}$  et donc  $\sqrt{R_{ech}(z)}$ . Un A-scan peut donc être acquis sans nécessiter de balayage mécanique dans l'interféromètre, ce qui permet d'accéder à des vitesses d'acquisitions très élevées.

Une autre implémentation de la FD-OCT est l'OCT balayée en longueur d'onde dans le temps, appelée « Swept-Source OCT » (SS-OCT) en anglais. En SS-OCT, la source est en fait monochromatique et sa longueur d'onde est balayée dans le temps. L'intensité collectée sur l'ensemble de la profondeur de champ est collectée au cours du balayage dans le temps de la longueur d'onde. On peut montrer que dans ce cas, le terme d'interférence est égal à la transformée de Fourier temporelle de  $\sqrt{R_{ech}(\delta)}$ . En prenant la transformée de Fourier de l'intensité collectée dans le temps, il est

ainsi possible de remonter à  $\sqrt{R_{ech}(z)}$ . L'avantage de cette méthode est de ne pas nécessiter de spectromètre puisque la longueur d'onde est balayée dans le temps. Une photodiode suffit donc, ce qui permet d'augmenter encore plus la vitesse d'acquisition d'un A-scan par rapport à un système de FD-OCT. Par ailleurs, les systèmes SS-OCT ont une sensibilité accrue par rapport aux systèmes FD-OCT. Pour l'expliquer, prenons l'exemple d'un échantillon correspondant à une unique surface réfléchissante de coefficient  $R_2$ . Dans ce cas, le terme d'interférences en FD-OCT se simplifie sous la forme  $I_{int\ FD-OCT}(k) = S(k) \frac{I_0}{2} \sqrt{R_{ref}} \sqrt{R_2} \cos(k\delta(z))$ . Le spectre du terme d'interférence présente donc une modulation dont la fréquence est d'autant plus grande qu'est la différence de marche, autrement dit la distance entre la surface réfléchissante et le plan de cohérence. Lorsque la distance devient grande, la résolution du spectromètre devient trop faible pour échantillonner correctement les modulations. En SS-OCT, la largeur de raie du laser balayé détermine la perte de sensibilité avec la distance au plan de cohérence. Comme la largeur de ligne laser peut être beaucoup plus étroite que la résolution d'un spectromètre, la SS-OCT peut permettre d'accéder à une meilleure sensibilité.

Aujourd'hui, l'OCT en domaine fréquentiel est l'implémentation la plus répandue de l'OCT dans les systèmes commercialisés cliniquement. L'OCT fréquentielle, en utilisant l'ensemble du signal collecté sur la profondeur de champ de l'optique de focalisation, présente un rapport signal à bruit meilleur que l'OCT temporelle, qui, bien que collectant le signal sur l'ensemble de la profondeur de champ, n'utilise que le signal interférométrique contenu dans un volume restreint autour du plan de cohérence. Comme nous l'avons mentionné, l'OCT en domaine fréquentiel permet d'accéder à une vitesse d'acquisition plus élevée que l'OCT temporelle puisqu'elle ne nécessite pas de déplacement mécanique contrairement à l'OCT temporelle.

En OCT en domaine fréquentiel, l'optique de focalisation est fixe et le signal doit être collecté sur tout la profondeur de champ pour obtenir un A-scan. De ce fait, l'OCT fréquentielle nécessite l'utilisation d'optiques de focalisation de faible ouverture numérique, c'est-à-dire ayant une grande profondeur de champ, afin de maximiser la profondeur d'imagerie. Cependant cela se fait au détriment de la résolution latérale et un compromis doit être trouvé.

## Liste de publications

### Article publié dans une revue avec comité de lecture

- L. Waszczuk, J. Ogien, J.-L. Perrot, and A. Dubois, "Co-localized line-field confocal optical coherence tomography and confocal Raman microspectroscopy for three-dimensional high-resolution morphological and molecular characterization of skin tissues ex vivo," *Biomed Opt Express*, vol. 13, no. 4, p. 2467, Apr. 2022, doi : 10.1364/BOE.450993.

### Communications à des congrès avec publication des actes

- L. Waszczuk, J. Ogien, J.-L. Perrot, and A. Dubois, "Co-localized line-field confocal optical coherence tomography (LC-OCT) and confocal Raman microspectroscopy for ex vivo analysis of skin tissues," *Multimodal Biomedical Imaging XVII*, Mar. 2022, no. March, p. 38. doi : 10.1117/12.2607278.
- L. Waszczuk, J. Ogien, J.-L. Perrot, and A. Dubois, "Morpho-molecular characterization of a tattooed skin biopsy using co-localized line-field confocal optical coherence tomography (LC-OCT) and confocal Raman microspectroscopy," *Photonics in Dermatology and Plastic Surgery 2022*, Mar. 2022, vol. 1193403, no. March, p. 7. doi : 10.1117/12.2607277.
- L. Waszczuk, J. Ogien, F. Pain, and A. Dubois, "Measurement of optical scattering properties using line-field confocal optical coherence tomography (LC-OCT)," *Biomedical Applications of Light Scattering XII*, Mar. 2022, vol. 1197404, no. March, p. 10. doi : 10.1117/12.2607279.
- J. Ogien *et al.*, "Optical skin biopsy using multimodal line-field confocal optical coherence tomography (LC-OCT)," *Optical Coherence Tomography and Coherence Domain Optical Methods in Biomedicine XXVI*, Mar. 2022, vol. 1194806, no. March, p. 29. doi : 10.1117/12.2612808.

### Communications à des congrès sans publication des actes

- L. Waszczuk, J. Ogien, et A. Dubois, "Avancées techniques et applications de la LC-OCT pour l'imagerie in vivo de la peau à haute résolution", *Journées Imagerie Optique Non Conventiionnelle*, Mar. 2021.
- L. Waszczuk, J. Ogien, J.-L. Perrot, et A. Dubois, "Tomographie par cohérence optique confocale à balayage de ligne (LC-OCT) et microspectroscopie Raman confocale co-localisées pour l'analyse morphologique et moléculaire de biopsies de peau", *Journées Imagerie Optique Non Conventiionnelle*, Mar. 2022.
- L. Waszczuk, J. Ogien, J.-L. Perrot, and A. Dubois, "Morpho-molecular characterization of tattooed skin biopsies with adverse reactions using co-localized line-field confocal optical coherence tomography (LC-OCT) and confocal Raman microspectroscopy (CRM)", *LE STUDIUM Conference - Skin Models in Cosmetic Science : Bridging Established Methods and Novel Technologies*, Apr. 2022.
- J. Ogien *et al.*, "Non-invasive characterization of skin in depth using LC-OCT", *LE STUDIUM*

*Conference - Skin Models in Cosmetic Science : Bridging Established Methods and Novel Technologies*, Dec. 2019.

## Bibliographie

- [1] <https://my.clevelandclinic.org/health/body/21901-epidermis>.
- [2] <https://veroskinnotes.com/categories-skin-anatomy/>.
- [3] [https://dermosclopedia.org/Overview\\_principles\\_of\\_dermoscopy#/media/File:Fig.\\_1\\_seven-point\\_checklist.jpg](https://dermosclopedia.org/Overview_principles_of_dermoscopy#/media/File:Fig._1_seven-point_checklist.jpg).
- [4] <https://scienceprog.com/histological-skin-structure-diagram/>.
- [5] M. T. Tetzlaff, P. Pattanaprichakul, J. Wargo, P. P. Fox, P. Patel, J. S. Estrella, R. R. Broaddus, M. D. Williams, M. A. Davies, M. J. Routbort, A. J. Lazar, S. E. Woodman, W.-J. Hwu, J. E. Gershenwald, V. G. Prieto, C. A. Torres-Cabala, and J. L. Curry, "Utility of braf v600e immunohistochemistry expression pattern as a surrogate of braf mutation status in 154 patients with advanced melanoma hhs public access," *Hum Pathol*, vol. 46, pp. 1101–1110, 2015.
- [6] R. Samatham and S. L. Jacques, "Determine scattering coefficient and anisotropy of scattering of tissue phantoms using reflectance-mode confocal microscopy," vol. 7187, p. 718711, 2 2009.
- [7] J. Jönsson and E. Berrocal, "Multi-scattering software : part i : online accelerated monte carlo simulation of light transport through scattering media," *Opt. Express*, vol. 28, pp. 37612–37638, Dec 2020.
- [8] <https://omlc.org/classroom/ece532/class3/musp.html>.
- [9] "Absorption de la lumière par les différents tissus de la peau." <http://www.fluomin.org/fr/uv-danger.php>.
- [10] A. Davis, "Tomographie par cohérence optique confocale en ligne multimodale pour le diagnostic non invasif des cancers cutanés," 2019.
- [11] <https://caliberid.com/vivascope-system.html>.
- [12] <https://vivosight.com/bcc-scc/>.
- [13] [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Jablonski\\_Diagram\\_of\\_Fluorescence\\_Only.png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Jablonski_Diagram_of_Fluorescence_Only.png).
- [14] G. A. Wagnieres, W. M. Star, and B. C. Wilson, "In vivo fluorescence spectroscopy and imaging for oncological applications," *Photochemistry and Photobiology*, vol. 68, no. 5, pp. 603–632, 1998.
- [15] S. Astner, S. Dietterle, N. Otberg, H.-J. Röwert-Huber, E. Stockfleth, and J. Lademann, "Clinical applicability of in vivo fluorescence confocal microscopy for noninvasive diagnosis and therapeutic monitoring of nonmelanoma skin cancer," *Journal of Biomedical Optics*, vol. 13, p. 014003, 2008.
- [16] E. G. Borisova, L. P. Angelova, and E. P. Pavlova, "Endogenous and exogenous fluorescence skin cancer diagnostics for clinical applications," *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, vol. 20, pp. 211–222, 3 2014.

- [17] E. R. Tkaczyk, "Innovations and developments in dermatologic non-invasive optical imaging and potential clinical applications," *Acta Dermato-Venereologica*, vol. 97, pp. 5–13, 2017.
- [18] M. Y. Berezin and S. Achilefu, "Fluorescence lifetime measurements and biological imaging," *Chemical Reviews*, vol. 110, pp. 2641–2684, 5 2010.
- [19] L. Marcu, "Fluorescence lifetime techniques in medical applications," *Annals of Biomedical Engineering*, vol. 40, pp. 304–331, 2 2012.
- [20] M. S. Roberts, Y. Dancik, T. W. Prow, C. A. Thorling, L. L. Lin, J. E. Grice, T. A. Robertson, K. König, and W. Becker, "Non-invasive imaging of skin physiology and percutaneous penetration using fluorescence spectral and lifetime imaging with multiphoton and confocal microscopy," 4 2011.
- [21] G. Zonios and A. Dimou, "Modeling diffuse reflectance from semi-infinite turbid media : application to the study of skin optical properties," *Optics Express*, vol. 14, p. 8661, 2006.
- [22] [https://digital.laserfocusworld.com/laserfocusworld/201701?article\\_id=1252818&pg=NaN#pgNaN](https://digital.laserfocusworld.com/laserfocusworld/201701?article_id=1252818&pg=NaN#pgNaN).
- [23] T. T. Nguyen, C. Gobinet, J. Feru, S. B. Pasco, M. Manfait, and O. Piot, "Characterization of type i and iv collagens by raman microspectroscopy : Identification of spectral markers of the dermo-epidermal junction," *Spectroscopy (New York)*, vol. 27, pp. 421–427, 2012.
- [24] J. Ogien, "Développement de systèmes de microscopie par cohérence optique pour l'imagerie de la peau," 2017.
- [25] A. Dubois, *Handbook of Full-Field Optical Coherence Microscopy : Technology and Applications*. Pan Stanford Pub, 2016.
- [26] J. Ogien, O. Levecq, H. Azimani, and A. Dubois, "Dual-mode line-field confocal optical coherence tomography for ultrahigh-resolution vertical and horizontal section imaging of human skin in vivo," *Biomedical Optics Express*, vol. 11, p. 1327, mar 2020.
- [27] J. Ogien, L. Waszczuk, M. Suppa, V. D. Marmol, J. Malveyh, E. Cinotti, P. Rubegni, J.-L. Perrot, and A. Dubois, "Optical skin biopsy using multimodal line-field confocal optical coherence tomography (lc-oct)," vol. 1194806, p. 29, SPIE, 3 2022.
- [28] B. C. Wilson, "Measurement of tissue optical properties : Methods and theories," 1995.
- [29] S. L. Jacques, C. A. Alter, and S. A. Prah, "Angular dependence of hene-laser light scattering by bovine and human dentine," *Archives of Oral Biology*, vol. 36, pp. 283–289, 1991.
- [30] L. V. Wang and S. L. Jacques, "Use of a laser beam with an oblique angle of incidence to measure the reduced scattering coefficient of a turbid medium," *Applied Optics*, vol. 34, p. 2362, 5 1995.
- [31] R. Lu, R. V. Beers, W. Saeys, C. Li, and H. Cen, "Measurement of optical properties of fruits and vegetables : A review," *Postharvest Biology and Technology*, vol. 159, p. 111003, 1 2020.
- [32] M. A. Boone, M. Suppa, F. Dhaenens, M. Miyamoto, A. Marneffe, G. B. Jemec, V. D. Marmol, and R. Nebosis, "In vivo assessment of optical properties of melanocytic skin lesions and differentiation of melanoma from non-malignant lesions by high-definition optical coherence tomography," *Archives of Dermatological Research*, vol. 308, pp. 7–20, 2016.



- [33] K. A. Vermeer, J. Mo, J. J. A. Weda, H. G. Lemij, and J. F. de Boer, "Depth-resolved model-based reconstruction of attenuation coefficients in optical coherence tomography," *Biomedical Optics Express*, vol. 5, pp. 322–337, 1 2014.
- [34] S. L. Jacques, "Confocal laser scanning microscopy using scattering as the contrast mechanism," 2013.
- [35] L. Thrane, H. T. Yura, and P. E. Andersen, "Analysis of optical coherence tomography systems based on the extended Huygens–Fresnel principle," *Journal of the Optical Society of America A*, vol. 17, p. 484, 3 2000.
- [36] N. J. Overall, "Confocal Raman microscopy : Common errors and artefacts," *Analyst*, vol. 135, pp. 2512–2522, 2010.
- [37] "Spectrometer knowledge." <https://bwtek.com/spectrometer-part-4-the-optical-bench/>.
- [38] A. Flack, "Diffraction grating selection for Raman spectroscopy," 2021.
- [39] L. Waszczuk, J. Ogien, J.-L. Perrot, and A. Dubois, "Co-localized line-field confocal optical coherence tomography and confocal Raman microspectroscopy for three-dimensional high-resolution morphological and molecular characterization of skin tissues ex vivo," *Biomedical Optics Express*, vol. 13, pp. 2467–2487, 4 2022.
- [40] S. Tfaili, C. Gobinet, G. Josse, J. F. Angiboust, M. Manfait, and O. Piot, "Confocal Raman microspectroscopy for skin characterization : A comparative study between human skin and pig skin," *Analyst*, vol. 137, no. 16, pp. 3673–3682, 2012.
- [41] L. Waszczuk, J. Ogien, J.-L. Perrot, and A. Dubois, "Co-localized line-field confocal optical coherence tomography (lc-oct) and confocal Raman microspectroscopy for ex vivo analysis of skin tissues," p. 38, SPIE, 3 2022.
- [42] L. Tognetti, S. Ekinde, C. Habougit, E. Cinotti, P. Rubegni, and J. L. Perrot, "Delayed tattoo reaction from red dye with overlapping clinicopathological features : Examination with high-frequency ultrasound and line-field optical coherence tomography," *Dermatology Practical & Conceptual*, vol. 10, p. e2020053, 6 2020.
- [43] E. Cinotti, F. Bruzziches, C. Habougit, V. Berot, L. Tognetti, P. Rubegni, and J. L. Perrot, "Fulguration-induced tattoo," *Clinical and Experimental Dermatology*, vol. 45, pp. 911–912, 10 2020.
- [44] P. Guitera, L.-X. L. Li, R. A. Scolyer, and S. W. Menzies, "Morphologic features of melanophages under in vivo reflectance confocal microscopy," *Archives of Dermatology*, vol. 146, pp. 492–498, 5 2010.
- [45] L. Tetard, A. Passian, R. H. Farahi, B. H. Voy, and T. Thundat, "Applications of subsurface microscopy," 2012.
- [46] A. Federici, "Développement de systèmes de microscopie par cohérence optique plein champ étendus spatialement et spectralement," 2015.
- [47] H. Yousef, M. Alhadjj, and S. Sharma, "Anatomy, skin (integument), epidermis.," 1 2022.
- [48] S. Tfaili, "Caractérisation par microspectroscopie confocale Raman de la diffusion cutanée d'actif : optimisation des paramètres instrumentaux et méthodologiques en vue d'applications in vivo," 2012.

- [49] A. Tfayli, "Caractérisation structurale et moléculaire de la peau par microspectroscopies optiques vibrationnelles. applications au diagnostic précoce des tumeurs cutanées et à l'étude de la diffusion de principes actifs à visée thérapeutique," 2007.
- [50] <https://www.e-cancer.fr/Dictionnaire/C/cancer>.
- [51] [https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/radiation-ultraviolet-\(uv\)-radiation-and-skin-cancer](https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/radiation-ultraviolet-(uv)-radiation-and-skin-cancer).
- [52] Z. Apalla, A. Lallas, E. Sotiriou, E. Lazaridou, and D. Ioannides, "Epidemiological trends in skin cancer," *Dermatology Practical I& Conceptual*, vol. 7, 4 2017.
- [53] J. Cadet and T. Douki, "Formation of uv-induced dna damage contributing to skin cancer development," *Photochem. Photobiol. Sci.*, vol. 17, pp. 1816–1841, 2018.
- [54] M. Tucker and A. Goldstein, "Melanoma etiology : Where are we?," *Oncogene*, vol. 22, pp. 3042–52, 06 2003.
- [55] H. N. Ananthaswamy and W. E. Pierceall, "Molecular mechanisms of ultraviolet radiation carcinogenesis," *Photochemistry and Photobiology*, vol. 52, pp. 1119–1136, 12 1990.
- [56] Y. Kubo, Y. Urano, K. Yoshimoto, H. Iwahana, K. Fukuhara, S. Arase, and M. Itakura, "p53 gene mutations in human skin cancers and precancerous lesions : Comparison with immunohistochemical analysis," 1994.
- [57] H. Soehnge, A. Ouhtit, and H. N. Ananthaswamy, "Mechanisms of induction of skin cancer by uv radiation," 1997.
- [58] J.-C. Dusingize, "Epidemiologic studies of cancers of the skin," 2018.
- [59] M. Fernandez Figueras, "From actinic keratosis to squamous cell carcinoma : pathophysiology revisited," *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, vol. 31, no. S2, pp. 5–7, 2017.
- [60] H. Sonthalia, S. Yumeen, and F. Kaliyadan, "Dermoscopy overview and extradiagnostic applications," 1 2022.
- [61] D. Tacha, "Immunohistochemistry of the skin," *Laboratory Medicine*, vol. 34, pp. 311–316, 4 2003.
- [62] L. A. Compton, G. F. Murphy, and C. G. Lian, "Diagnostic immunohistochemistry in cutaneous neoplasia : An update," *Dermatopathology*, vol. 2, pp. 15–42, 2015.
- [63] T. Huang, J. Zhuge, and W. W. Zhang, "Sensitive detection of braf v600e mutation by amplification refractory mutation system (arms)-pcr," 2013.
- [64] Z. Yao, R. Moy, T. A. Bs, B. Jansen, B. Rodeoderm, and M. Fincher, "An adhesive patch-based skin biopsy device for molecular diagnostics and skin microbiome studies," 2017.
- [65] E. Brauchle, S. Noor, E. Holtorf, C. Garbe, K. Schenke-Layland, and C. Busch, "Raman spectroscopy as an analytical tool for melanoma research," *Clinical and Experimental Dermatology*, vol. 39, pp. 636–645, 7 2014.
- [66] R. Carminati and J. C. Schotland, *Principles of Scattering and Transport of Light*. Cambridge University Press, 2021.

- [67] C. F. Bohren and D. R. Huffman, *Absorption and scattering of light by small particles*. Wiley, 1983.
- [68] V. V. Tuchin, "Light scattering study of tissues," *Physics-Uspekhi*, vol. 40, pp. 495–515, 1997.
- [69] S. Chandrasekhar, *Radiative Transfer*. 1960.
- [70] W. F. Cheong, S. A. Prahl, and A. J. Welch, "A review of the optical properties of biological tissues," *IEEE Journal of Quantum Electronics*, vol. 26, pp. 2166–2185, 1990.
- [71] S. L. Jacques, "Optical properties of biological tissues : a review," *Physics in Medicine and Biology*, vol. 58, pp. R37–R61, 6 2013.
- [72] T. Lister, P. A. Wright, and P. H. Chappell, "Optical properties of human skin," *Journal of Biomedical Optics*, vol. 17, p. 0909011, 2012.
- [73] Z. Gajinov, M. Matić, S. Prčić, and V. Đuran, "Optical properties of the human skin," *Serbian Journal of Dermatology and Venerology*, vol. 2, pp. 131–136, 2010.
- [74] D. Gareau, "Automated identification of epidermal keratinocytes in reflectance confocal microscopy," *Journal of Biomedical Optics*, vol. 16, p. 030502, 2011.
- [75] A. Bhandari, B. Hamre, O. Frette, K. Stamnes, and J. J. Stamnes, "Modeling optical properties of human skin using mie theory for particles with different size distributions and refractive indices," *Optics Express*, vol. 19, p. 14549, 2011.
- [76] A. N. Bashkatov, E. A. Genina, and V. V. Tuchin, "Optical properties of skin, subcutaneous, and muscle tissues : A review," *Journal of Innovative Optical Health Sciences*, vol. 4, pp. 9–38, 2011.
- [77] C. Mignon, D. J. Tobin, M. Zeitouny, and N. E. Uzunbajakava, "Shedding light on the variability of optical skin properties : finding a path towards more accurate prediction of light propagation in human cutaneous compartments," *Biomedical Optics Express*, vol. 9, p. 852, 2018.
- [78] R. Cooper, "Bioimaging : Watching the brain at work," *Nature Photonics*, vol. 8, 05 2014.
- [79] S. G. Resink, W. Steenbergen, and A. C. Boccara, "State-of-the art of acoust-optic sensing and imaging of turbid media," *Journal of Biomedical Optics*, vol. 17, no. 4, pp. 1 – 11, 2012.
- [80] K. Kihm, "Confocal laser scanning microscopy (clsm)," 01 2011.
- [81] D. Huang, E. A. Swanson, C. P. Lin, J. S. Schuman, W. G. Stinson, W. Chang, M. R. Hee, T. Flotte, K. Gregory, C. A. Puliafito, and J. G. Fujimoto, "Optical coherence tomography," *Science*, vol. 254, no. 5035, pp. 1178–1181, 1991.
- [82] A. M. Zysk, F. T. Nguyen, A. L. Oldenburg, D. L. Marks, and S. A. Boppart, "Optical coherence tomography : a review of clinical development from bench to bedside," *Journal of Biomedical Optics*, vol. 12, p. 051403, 2007.
- [83] J. Olsen, J. Holmes, and G. B. E. Jemec, "Advances in optical coherence tomography in dermatology—a review," *Journal of Biomedical Optics*, vol. 23, pp. 1–10, 2018.
- [84] A. Dubois, O. Levecq, H. Azimani, D. Siret, A. Barut, M. Suppa, V. del Marmol, J. Malveyh, E. Cinotti, P. Rubegni, and J.-L. Perrot, "Line-field confocal optical coherence tomography for high-resolution noninvasive imaging of skin tumors," *Journal of Biomedical Optics*, vol. 23, p. 1, 10 2018.

- [85] J. Ogien, A. Daures, M. Cazalas, J.-L. Perrot, and A. Dubois, "Line-field confocal optical coherence tomography for three-dimensional skin imaging," *Frontiers of Optoelectronics*, vol. 13, pp. 381–392, 12 2020.
- [86] M. A. Calin, S. V. Parasca, R. Savastru, M. R. Calin, and S. Dontu, "Optical techniques for the noninvasive diagnosis of skin cancer," *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, vol. 139, pp. 1083–1104, 2013.
- [87] E. G. Borisova, E. Pavlova, T. Kundurjiev, P. Troyanova, T. Genova, and L. Avramov, "Light-induced autofluorescence and diffuse reflectance spectroscopy in clinical diagnosis of skin cancer," *Biophotonics : Photonic Solutions for Better Health Care IV*, vol. 9129, p. 91291O, 2014.
- [88] E. G. Borisova, P. Troyanova, P. Pavlova, and L. Avramov, "Diagnostics of pigmented skin tumors based on laser-induced autofluorescence and diffuse reflectance spectroscopy," *Quantum Electronics*, vol. 38, pp. 597–605, 2008.
- [89] A. C. Croce and G. Bottiroli, "Autofluorescence spectroscopy and imaging : A tool for biomedical research and diagnosis," *European Journal of Histochemistry*, vol. 58, pp. 320–337, 2014.
- [90] P. Rakotomanga, C. Soussen, G. Khairallah, M. Amouroux, S. Zaytsev, E. Genina, H. Chen, A. Delconte, C. Daul, V. Tuchin, and W. Blondel, "Source separation approach for the analysis of spatially resolved multiply excited autofluorescence spectra during optical clearing of ex vivo skin," *Biomedical Optics Express*, vol. 10, p. 3410, 7 2019.
- [91] N. Rajaram, J. S. Reichenberg, M. R. Migden, T. H. Nguyen, and J. W. Tunnell, "Pilot clinical study for quantitative spectral diagnosis of non-melanoma skin cancer," *Lasers in Surgery and Medicine*, vol. 42, pp. 716–727, 2010. Pas de distinction épiderme/derme.
- [92] L. Lim, B. Nichols, M. R. Migden, N. Rajaram, J. S. Reichenberg, M. K. Markey, M. I. Ross, and J. W. Tunnell, "Clinical study of noninvasive in vivo melanoma and nonmelanoma skin cancers using multimodal spectral diagnosis," *Journal of Biomedical Optics*, vol. 19, p. 117003, 2014.
- [93] W. Blondel, A. Delconte, G. Khairallah, F. Marchal, A. Gavaille, and M. Amouroux, "Spatially-resolved multiply-excited autofluorescence and diffuse reflectance spectroscopy : Spectroscopic medical device for skin in vivo optical biopsy," *Electronics*, vol. 10, p. 243, 1 2021.
- [94] D. Débarre, A.-M. Pena, W. Supatto, T. Boulesteix, M. Strupler, M.-P. Sauviat, J.-L. Martin, M.-C. Schanne-Klein, and E. Beaurepaire, "[second- and third-harmonic generation microscopies for the structural imaging of intact tissues].," *Médecine sciences : M/S*, vol. 22, pp. 845–50, 11 2006.
- [95] V. Colas, C. Daul, G. Khairallah, M. Amouroux, and W. Blondel, "Spatially resolved diffuse reflectance and autofluorescence photon depth distribution in human skin spectroscopy : a modeling study," p. 49, SPIE-Intl Soc Optical Eng, 10 2020.
- [96] V. Colas, W. Blondel, G. Khairallah, C. Daul, and M. Amouroux, "Proposal for a skin layer-wise decomposition model of spatially-resolved diffuse reflectance spectra based on maximum depth photon distributions : A numerical study," *Photonics*, vol. 8, 10 2021.
- [97] D. W. Shipp, F. Sinjab, and I. Notinger, "Raman spectroscopy : techniques and applications in the life sciences," *Advances in Optics and Photonics*, vol. 9, pp. 315–428, 6 2017.

- [98] J. Zhao and H. Lui, "Real-time raman spectroscopy for noninvasive in vivo skin analysis and diagnosis," 2010.
- [99] P. J. Caspers, H. A. Bruining, G. J. Puppels, G. W. Lucassen, and E. A. Carter, "In vivo confocal raman microspectroscopy of the skin : Noninvasive determination of molecular concentration profiles," *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 116, pp. 434–442, 3 2001.
- [100] M. G. Tosato, R. S. Alves, E. A. dos Santos, L. Raniero, P. F. Menezes, K. M. Belletti, C. E. O. Praes, and A. A. Martin, "Raman spectroscopic investigation of the effects of cosmetic formulations on the constituents and properties of human skin," *Photomedicine and Laser Surgery*, vol. 30, pp. 85–91, 2 2012.
- [101] J. A. Izatt, M. R. Hee, G. M. Owen, E. A. Swanson, and J. G. Fujimoto, "Optical coherence microscopy in scattering media," *Opt. Lett.*, vol. 19, pp. 590–592, Apr 1994.
- [102] T. Wilson and C. Sheppard, "Theory and practice of scanning optical microscopy," *London : Academic Press*, vol. -1, 10 1984.
- [103] E. Beaufort, M. Lebec, L. Blanchot, and H. Saint-Jalmes, "Full-field optical coherence microscopy," *Optics letters*, vol. 23, pp. 244–6, 03 1998.
- [104] A. Dubois, K. Grieve, G. Moneron, R. Lecaque, L. Vabre, and C. Boccara, "Ultrahigh-resolution full-field optical coherence tomography," *Applied Optics*, vol. 43, 2004.
- [105] W. Xue, "Tomographie par cohérence optique confocale linéaire (lc-oct) basée sur un interféromètre de mirau pour le diagnostic des cancers de la peau," 2022.
- [106] J. Ogien, J.-L. Perrot, A. Daures, A. Sourp, O. Levecq, and A. Dubois, "Line-field confocal optical coherence tomography (LC-OCT) for ex-vivo skin imaging with extended field-of-view," in *Photonics in Dermatology and Plastic Surgery 2022* (B. Choi, M. Rajadhyaksha, and H. Zeng, eds.), vol. 11934, p. 119340I, International Society for Optics and Photonics, SPIE, 2022.
- [107] K. G. Larkin, "Efficient nonlinear algorithm for envelope detection in white light interferometry," *J. Opt. Soc. Am. A*, vol. 13, pp. 832–843, Apr 1996.
- [108] M. Pedrazzani, J. Breugnot, P. Rouaud-Tinguely, M. Cazalas, A. Davis, S. Bordes, A. Dubois, and B. Closs, "Comparison of line-field confocal optical coherence tomography images with histological sections : Validation of a new method for in vivo and non-invasive quantification of superficial dermis thickness," *Skin Research and Technology*, vol. 26, pp. 398–404, 5 2020.
- [109] C. Ruini, S. Schuh, E. Sattler, and J. Welzel, "Line-field confocal optical coherence tomography—practical applications in dermatology and comparison with established imaging methods," *Skin Research and Technology*, vol. 27, pp. 340–352, 5 2021.
- [110] J. Chauvel-Picard, V. Bérot, L. Tognetti, C. Orte Cano, M. Fontaine, C. Lenoir, J. Pérez-Anker, S. Puig, A. Dubois, S. Forestier, J. Monnier, R. Jdid, G. Cazorla, M. Pedrazzani, A. Sanchez, S. Fischman, P. Rubegni, V. del Marmol, J. Malvey, E. Cinotti, J. L. Perrot, and M. Suppa, "Line-field confocal optical coherence tomography as a tool for three-dimensional in vivo quantification of healthy epidermis : A pilot study," *Journal of Biophotonics*, vol. 15, no. 2, p. e202100236, 2022.
- [111] M. Suppa, M. Fontaine, G. Dejonckheere, E. Cinotti, O. Yélamos, G. Diet, L. Tognetti, M. Miyamoto, C. O. Cano, J. Perez-Anker, V. Panagiotou, A. Trepan, J. Monnier, V. Berot, S. Puig,

- P. Rubegni, J. Malvehy, J. Perrot, and V. Marmol, "Line-field confocal optical coherence tomography of basal cell carcinoma : a descriptive study," *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, vol. 35, pp. 1099–1110, 5 2021.
- [112] C. Ruini, S. Schuh, C. Gust, B. Kendziora, L. Frommherz, L. E. French, D. Hartmann, J. Welzel, and E. Sattler, "Line-field optical coherence tomography : in vivo diagnosis of basal cell carcinoma subtypes compared with histopathology," *Clinical and Experimental Dermatology*, vol. 46, pp. 1471–1481, 12 2021.
- [113] E. Cinotti, L. Tognetti, A. Cartocci, A. Lamberti, S. Gherbassi, C. O. Cano, C. Lenoir, G. Dejonckheere, G. Diet, M. Fontaine, M. Miyamoto, J. Perez-Anker, V. Solmi, J. Malvehy, V. Marmol, J. L. Perrot, P. Rubegni, and M. Suppa, "Line-field confocal optical coherence tomography for actinic keratosis and squamous cell carcinoma : a descriptive study," *Clinical and Experimental Dermatology*, vol. 46, pp. 1530–1541, 12 2021.
- [114] C. Lenoir, E. Cinotti, L. Tognetti, C. O. Cano, G. Diet, M. Miyamoto, L. Rocq, A. Trépant, J. Perez-Anker, S. Puig, J. Malvehy, P. Rubegni, J. Perrot, V. Marmol, and M. Suppa, "Line-field confocal optical coherence tomography of actinic keratosis : a case series," *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, vol. 35, pp. 1–3, 12 2021.
- [115] S. Schuh, C. Ruini, M. K. E. Perwein, F. Daxenberger, C. Gust, E. C. Sattler, and J. Welzel, "Line-field confocal optical coherence tomography : A new tool for the differentiation between nevi and melanomas?," *Cancers*, vol. 14, no. 5, 2022.
- [116] K. Gupta and M. R. Shenoy, "Method to determine the anisotropy parameter  $g$  of a turbid medium," *Applied Optics*, vol. 57, p. 7559, 9 2018.
- [117] T. M. Cannon, B. E. Bouma, and N. Uribe-Patarroyo, "Layer-based, depth-resolved computation of attenuation coefficients and backscattering fractions in tissue using optical coherence tomography," *Biomedical Optics Express*, vol. 12, pp. 5037–5056, 8 2021.
- [118] J. F. Beek, P. Blokland, P. Posthumus, M. Aalders, J. W. Pickering, H. J. C. M. Sterenborg, and M. J. C. van Gemert, "In vitro double-integrating-sphere optical properties of tissues between 630 and 1064 nm," *Physics in Medicine and Biology*, vol. 42, pp. 2255–2261, 11 1997.
- [119] A. N. Bashkatov, E. A. Genina, V. I. Kochubey, and V. V. Tuchin, "Optical properties of human skin, subcutaneous and mucous tissues in the wavelength range from 400 to 2000 nm," *Journal of Physics D : Applied Physics*, vol. 38, pp. 2543–2555, 8 2005.
- [120] A. M. Ionescu, J. C. Cardona, I. Garzon, A. C. Oliveira, R. Ghinea, M. Alaminos, and M. M. Perez, "Integrating-sphere measurements for determining optical properties of tissue-engineered oral mucosa," *Journal of the European Optical Society : Rapid Publications*, vol. 10, p. 15012, 3 2015.
- [121] A. ul Rehman, I. Ahmad, and S. A. Qureshi, "Biomedical applications of integrating sphere : A review," *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, vol. 31, p. 101712, 9 2020.
- [122] J. W. Pickering, S. A. Prahl, N. van Wieringen, J. F. Beek, H. J. C. M. Sterenborg, and M. J. C. van Gemert, "Double-integrating-sphere system for measuring the optical properties of tissue," *Applied Optics*, vol. 32, pp. 399–410, 2 1993.

- [123] Z. Sun, D. Hu, Z. Wang, L. Xie, and Y. Ying, "Spatial-frequency domain imaging : An emerging depth-varying and wide-field technique for optical property measurement of biological tissues," *Photonics*, vol. 8, p. 162, 5 2021.
- [124] M. Boone, M. Suppa, M. Miyamoto, A. Marneffe, G. Jemec, and V. D. Marmol, "In vivo assessment of optical properties of basal cell carcinoma and differentiation of bcc subtypes by high-definition optical coherence tomography," *Biomedical Optics Express*, vol. 7, p. 2269, 6 2016.
- [125] G. van Soest, T. Goderie, E. Regar, S. Koljenović, G. L. J. H. van Leenders, N. Gonzalo, S. van Noorden, T. Okamura, B. E. Bouma, G. J. Tearney, J. W. Oosterhuis, P. W. Serruys, and A. F. W. van der Steen, "Atherosclerotic tissue characterization in vivo by optical coherence tomography attenuation imaging," *Journal of Biomedical Optics*, vol. 15, p. 011105, 2010.
- [126] C. Kut, K. L. Chaichana, J. Xi, S. M. Raza, X. Ye, E. R. McVeigh, F. J. Rodriguez, A. Quiñones-Hinojosa, and X. Li, "Detection of human brain cancer infiltration ex vivo and in vivo using quantitative optical coherence tomography," *Science Translational Medicine*, vol. 7, p. 292ra100, 6 2015.
- [127] M. Bus, D. de Bruin, D. Faber, G. Kamphuis, P. Zondervan, M. Laguna-Pes, T. van Leeuwen, T. M. de Reijke, and J. de la Rosette, "Optical coherence tomography as a tool for in vivo staging and grading of upper urinary tract urothelial carcinoma : A study of diagnostic accuracy," *Journal of Urology*, vol. 196, pp. 1749–1755, 12 2016.
- [128] T. G. V. Leeuwen, D. J. Faber, and M. C. Aalders, "Measurement of the axial point spread function in scattering media using single-mode fiber-based optical coherence tomography," *IEEE Journal on Selected Topics in Quantum Electronics*, vol. 9, pp. 227–233, 2003.
- [129] D. J. Faber, F. J. van der Meer, M. C. G. Aalders, and T. G. van Leeuwen, "Quantitative measurement of attenuation coefficients of weakly scattering media using optical coherence tomography," *Optics Express*, vol. 12, p. 4353, 2004.
- [130] S. Stefan, K.-S. Jeong, C. Polucha, N. Tapinos, S. A. Toms, and J. Lee, "Determination of confocal profile and curved focal plane for oct mapping of the attenuation coefficient," *Biomedical Optics Express*, vol. 9, p. 5084, 2018.
- [131] H. Wang, C. Magnain, S. Sakadžić, B. Fischl, and D. A. Boas, "Characterizing the optical properties of human brain tissue with high numerical aperture optical coherence tomography," *Biomedical Optics Express*, vol. 8, p. 5617, 2017.
- [132] J. Kübler, V. S. Zoutenbier, A. Amelink, J. Fischer, and J. F. de Boer, "Investigation of methods to extract confocal function parameters for the depth resolved determination of attenuation coefficients using oct in intralipid samples, titanium oxide phantoms, and in vivo human retinas," *Biomedical Optics Express*, vol. 12, p. 6814, 11 2021.
- [133] F. Feroldi, J. Willemsse, V. Davidoiu, M. G. O. Gräfe, D. J. van Iperen, A. W. M. Goorsenberg, J. T. Annema, J. M. A. Daniels, P. I. Bonta, and J. F. de Boer, "In vivo multifunctional optical coherence tomography at the periphery of the lungs," *Biomedical Optics Express*, vol. 10, p. 3070, 2019.



- [134] S. Zheng, Y. Fei, and S. Jian, "Method for parametric imaging of attenuation by intravascular optical coherence tomography," *Biomed. Opt. Express*, vol. 12, pp. 1882–1904, Apr 2021.
- [135] E. R. Pena, G. P. Paredes, J. M. L. Higuera, and O. M. Conde, "Depth-resolved attenuation coefficient estimation for skin cancer assessment with optical coherence tomography," *Proceedings of SPIE*, vol. 1107812, p. 37, 2019.
- [136] S. Azuma, S. Makita, A. Miyazawa, Y. Ikuno, M. Miura, and Y. Yasuno, "Pixel-wise segmentation of severely pathologic retinal pigment epithelium and choroidal stroma using multi-contrast Jones matrix optical coherence tomography," *Biomedical Optics Express*, vol. 9, p. 2955, 2018.
- [137] Y. Zhou, T. Liu, Z. Ding, K. Tao, K. Liu, J. Jiang, Z. Liu, Y. Jiang, and H. Kuang, "An optimized attenuation compensation and contrast enhancement algorithm without pseudocharacteristics in intravascular OCT imaging," *IEEE Photonics Journal*, vol. 8, 2016.
- [138] G. T. Smith, "Automated, depth-resolved estimation of the attenuation coefficient from optical coherence tomography data," *IEEE Trans Med Imaging*, vol. 176, pp. 139–148, 2015.
- [139] N. Dwork, G. T. Smith, T. Leng, J. M. Pauly, and A. K. Bowden, "Automatically determining the confocal parameters from OCT B-scans for quantification of the attenuation coefficients," *IEEE Transactions on Medical Imaging*, vol. 38, pp. 261–268, 2019.
- [140] M. M. Amaral, D. M. Zezell, A. F. Monte, A. C. de Cara, J. C. Araújo, A. Antunes, and A. Z. Freitas, "General model for depth-resolved estimation of the optical attenuation coefficients in optical coherence tomography," *Journal of Biophotonics*, pp. 1–13, 2019.
- [141] J. Liu, N. Ding, Y. Yu, X. Yuan, S. Luo, J. Luan, Y. Zhao, Y. Wang, and Z. Ma, "Optimized depth-resolved estimation to measure optical attenuation coefficients from optical coherence tomography and its application in cerebral damage determination," *Journal of Biomedical Optics*, vol. 24, p. 1, 2019.
- [142] K. Li, W. Liang, Z. Yang, Y. Liang, and S. Wan, "Robust, accurate depth-resolved attenuation characterization in optical coherence tomography," *Biomedical Optics Express*, vol. 11, pp. 672–687, 2020.
- [143] R. Samatham, "Determination of optical scattering properties of tissues using reflectance-mode confocal microscopy," 2012.
- [144] S. L. Jacques, R. Samatham, N. Choudhury, Y. Fu, and D. Levitz, "Measuring tissue optical properties in vivo using reflectance-mode confocal microscopy and OCT," vol. 6864, p. 68640B, 2008.
- [145] N. Choudhury and S. L. Jacques, "Extracting scattering coefficient and anisotropy factor of tissue using optical coherence tomography," vol. 8221, p. 822111, 2 2012.
- [146] D. Abi-Haidar and T. Olivier, "Confocal reflectance and two-photon microscopy studies of a songbird skull for preparation of transcranial imaging," *Journal of Biomedical Optics*, vol. 14, p. 034038, 2009.
- [147] M. Almasian, N. Bosschaart, T. G. van Leeuwen, and D. J. Faber, "Validation of quantitative attenuation and backscattering coefficient measurements by optical coherence tomography in the concentration-dependent and multiple scattering regime," *Journal of Biomedical Optics*, vol. 20, p. 121314, 2015.

- [148] R. F. Lutomirski and H. T. Yura, "Propagation of a finite optical beam in an inhomogeneous medium."
- [149] Z. Turani, E. Fatemizadeh, T. Blumetti, S. Daveluy, A. F. Moraes, W. Chen, D. Mehregan, P. E. Andersen, and M. Nasiriavanaki, "Optical radiomic signatures derived from optical coherence tomography images improve identification of melanoma," *Cancer Research*, vol. 79, pp. 2021–2030, 2019.
- [150] L. Thrane, M. H. Frosz, T. M. Jørgensen, A. Tycho, H. T. Yura, and P. E. Andersen, "Extraction of optical scattering parameters and attenuation compensation in optical coherence tomography images of multilayered tissue structures," *Optics Letters*, vol. 29, pp. 1641–1643, jul 2004.
- [151] A. K. Dabrowska, G. M. Rotaru, S. Derler, F. Spano, M. Camenzind, S. Annaheim, R. Stämpfli, M. Schmid, and R. M. Rossi, "Materials used to simulate physical properties of human skin," *Skin Research and Technology*, vol. 22, pp. 3–14, 2016.
- [152] M. Lualdi, A. Colombo, B. Farina, S. Tomatis, and R. Marchesini, "A phantom with tissue-like optical properties in the visible and near infrared for use in photomedicine," *Lasers in Surgery and Medicine*, vol. 28, pp. 237–243, 2001.
- [153] S.-H. Tseng, A. Grant, and A. J. Durkin, "In vivo determination of skin near-infrared optical properties using diffuse optical spectroscopy," *Journal of Biomedical Optics*, vol. 13, p. 014016, 2008.
- [154] R. B. Saager, C. Kondru, K. Au, K. Sry, F. Ayers, and A. J. Durkin, "Multilayer silicone phantoms for the evaluation of quantitative optical techniques in skin imaging," *Design and Performance Validation of Phantoms Used in Conjunction with Optical Measurement of Tissue II*, vol. 7567, p. 756706, 2010.
- [155] J. Zhang, Y. Liu, J. Robic, A. Nkengne, H. Yan, X. Zhang, and X. Y. Soo, "Optical phantom development for skin measurement," vol. 19001, p. 19001, EDP Sciences, 9 2019.
- [156] A. I. Chen, M. L. Balter, M. I. Chen, D. Gross, S. K. Alam, T. J. Maguire, and M. L. Yarmush, "Multilayered tissue mimicking skin and vessel phantoms with tunable mechanical, optical, and acoustic properties," *Medical Physics*, vol. 43, pp. 3117–3131, 2016.
- [157] V. V. Tuchin, A. N. Bashkatov, E. A. Genina, V. I. Kochubey, V. V. Lychagov, S. A. Portnov, N. A. Trunina, D. R. Miller, S. Cho, H. Oh, B. Shim, M. Kim, J. Oh, H. Eum, Y. Ku, D. Kim, and Y. Yang, "Finger tissue model and blood perfused skin tissue phantom," *Dynamics and Fluctuations in Biomedical Photonics VIII*, vol. 7898, p. 78980Z, 2011.
- [158] I. Bodurov, I. Vlaeva, A. Viraneva, T. Yovcheva, and S. Sainov, "Modified design of a laser refractometer,"
- [159] G. Ghosh, "Dispersion-equation coefficients for the refractive index and birefringence of calcite and quartz crystals," *Optics Communications*, vol. 163, no. 1, pp. 95–102, 1999.
- [160] S. Sarkar, V. Gupta, M. Kumar, J. Schubert, P. T. Probst, J. Joseph, and T. A. König, "Hybridized guided-mode resonances via colloidal plasmonic self-assembled grating," *ACS Applied Materials & Interfaces*, vol. 11, no. 14, pp. 13752–13760, 2019. PMID : 30874424.
- [161] T. Siefke, S. Kroker, K. Pfeiffer, O. Puffky, K. Dietrich, D. Franta, I. Ohlídal, A. Szeghalmi, E.-B. Kley, and A. Tünnermann, "Materials pushing the application limits of wire grid polarizers

- further into the deep ultraviolet spectral range," *Advanced Optical Materials*, vol. 4, no. 11, pp. 1780–1786, 2016.
- [162] S. Prael, "Optical property measurements using the inverse adding doubling program," 10 2011.
- [163] S. A. Prael, M. J. C. van Gemert, and A. J. Welch, "Determining the optical properties of turbid media by using the adding–doubling method," *Appl. Opt.*, vol. 32, pp. 559–568, Feb 1993.
- [164] L. V. Wang and H. i Wu, *Biomedical Optics : Principles and Imaging*. 2007.
- [165] S. S. Ou and J. D. Seader, "Contribution of multiple scattering to light transmittance by a collimated beam," 1987.
- [166] I. V. Turchin, E. A. Sergeeva, L. S. Dolin, V. A. Kamensky, N. M. Shakhova, and R. Richards-Kortum, "Novel algorithm of processing optical coherence tomography images for differentiation of biological tissue pathologies," *Journal of Biomedical Optics*, vol. 10, p. 064024, 2005.
- [167] B. Ghafaryasl, K. Vermeer, J. Kalkman, T. Callewaert, J. de Boer, and L. V. Vliet, "Attenuation coefficient estimation in fourier-domain oct of multi-layered phantoms," *Biomedical Optics Express*, vol. 12, pp. 2744–2758, 2021.
- [168] T. Kono and J. Yamada, "In vivo measurement of optical properties of human skin for 450-800 nm and 950-1600 nm wavelengths," *International Journal of Thermophysics*, vol. 40, p. 51, 2019.
- [169] S. Wu, H. Li, X. Zhang, and Z. Li, "Optical features for chronological aging and photoaging skin by optical coherence tomography," *Lasers in Medical Science*, vol. 28, pp. 445–450, 2013.
- [170] Q. Zhao, C. Dai, S. Fan, J. Lv, and L. Nie, "Synergistic efficacy of salicylic acid with a penetration enhancer on human skin monitored by oct and diffuse reflectance spectroscopy," *Scientific Reports*, vol. 6, pp. 1–11, 2016.
- [171] B. W. Barry, H. G. M. Edwards, and A. C. Williams, "Fourier transform raman and infrared vibrational study of human skin : Assignment of spectral bands," *Journal of Raman Spectroscopy*, vol. 23, no. 11, pp. 641–645, 1992.
- [172] J. Zhao, H. Zeng, S. Kalia, and H. Lui, "Using raman spectroscopy to detect and diagnose skin cancer in vivo," *Dermatologic Clinics*, vol. 35, pp. 495–504, 2017.
- [173] P. A. Philipsen, L. Knudsen, M. Gniadecka, M. H. Ravnbak, and H. C. Wulf, "Diagnosis of malignant melanoma and basal cell carcinoma by in vivo nir-ft raman spectroscopy is independent of skin pigmentation," *Photochemical and Photobiological Sciences*, vol. 12, pp. 770–776, 2013.
- [174] X. Feng, A. J. Moy, H. T. M. Nguyen, Y. Zhang, J. Zhang, M. C. Fox, K. R. Sebastian, J. S. Reichenberg, M. K. Markey, and J. W. Tunnell, "Raman biophysical markers in skin cancer diagnosis," *Journal of Biomedical Optics*, vol. 23, p. 1, 2018.
- [175] J. Schleusener, P. Gluszczynska, C. Reble, I. Gersonde, J. Helfmann, J. W. Fluhr, J. Lademann, J. Röwert-Huber, A. Patzelt, and M. C. Meinke, "In vivo study for the discrimination of cancerous and normal skin using fibre probe-based raman spectroscopy," *Experimental Dermatology*, vol. 24, pp. 767–772, 2015.
- [176] A. Tfayli, C. Gobinet, V. Vrabie, R. Huez, M. Manfait, and O. Piot, "Digital dewaxing of raman signals : Discrimination between nevi and melanoma spectra obtained from paraffin-embedded skin biopsies," *Applied Spectroscopy*, vol. 63, pp. 564–570, 2009.

- [177] C. A. Lieber, S. K. Majumder, D. L. Ellis, D. D. Billheimer, and A. Mahadevan-Jansen, "In vivo nonmelanoma skin cancer diagnosis using raman microspectroscopy," *Lasers in Surgery and Medicine*, vol. 40, pp. 461–467, 2008.
- [178] N. S. Eikje, K. Aizawa, and Y. Ozaki, "Vibrational spectroscopy for molecular characterisation and diagnosis of benign, premalignant and malignant skin tumours," *Biotechnology Annual Review*, vol. 11, pp. 191–225, 2005.
- [179] J. Zhao, H. Lui, S. Kalia, and H. Zeng, "Real-time raman spectroscopy for automatic in vivo skin cancer detection : an independent validation," *Analytical and bioanalytical chemistry*, vol. 407, pp. 8373–8379, 2015.
- [180] X. Feng, A. J. Moy, H. T. M. Nguyen, J. Zhang, M. C. Fox, K. R. Sebastian, J. S. Reichenberg, M. K. Markey, and J. W. Tunnell, "Raman active components of skin cancer," *Biomedical Optics Express*, vol. 8, p. 2835, 6 2017.
- [181] M. A. Short, H. Lui, D. McLean, H. Zeng, A. Alajlan, and X. K. Chen, "Changes in nuclei and peritumoral collagen within nodular basal cell carcinomas via confocal micro-raman spectroscopy," *Journal of Biomedical Optics*, vol. 11, p. 034004, 2006.
- [182] E. L. Wilkinson, L. Ashton, J. G. Kerns, S. L. Allinson, and R. L. Mort, "Fingerprinting of skin cells by live cell raman spectroscopy reveals melanoma cell heterogeneity and cell-type specific responses to uvr," *Experimental Dermatology*, 6 2022.
- [183] J. Du, Y. Su, C. Qian, D. Yuan, K. Miao, D. Lee, A. H. Ng, R. S. Wijker, A. Ribas, R. D. Levine, J. R. Heath, and L. Wei, "Raman-guided subcellular pharmaco-metabolomics for metastatic melanoma cells," *Nature Communications*, vol. 11, 2020.
- [184] E. Baria, R. Cicchi, F. Malentacchi, I. Mancini, P. Pinzani, M. Pazzagli, and F. S. Pavone, "Supervised learning methods for the recognition of melanoma cell lines through the analysis of their raman spectra," *Journal of Biophotonics*, vol. 14, p. 202000365, 3 2021.
- [185] X. Feng, M. C. Fox, J. S. Reichenberg, F. C. P. S. Lopes, K. R. Sebastian, M. K. Markey, and J. W. Tunnell, "Biophysical basis of skin cancer margin assessment using raman spectroscopy," *Biomedical Optics Express*, vol. 10, pp. 104–118, 1 2019.
- [186] R. Boitor, C. de Wolf, F. Weesie, D. W. Shipp, S. Varma, D. Veitch, A. Wernham, A. Koloydenko, G. Puppels, T. Nijsten, H. C. Williams, P. Caspers, and I. Notingher, "Clinical integration of fast raman spectroscopy for mohs micrographic surgery of basal cell carcinoma," *Biomedical Optics Express*, vol. 12, pp. 2015–2026, 4 2021.
- [187] C. A. Patil, H. Kirshnamoorthi, D. L. Ellis, T. G. van Leeuwen, and A. Mahadevan-Jansen, "A clinical instrument for combined raman spectroscopy-optical coherence tomography of skin cancers," *Lasers in Surgery and Medicine*, vol. 43, pp. 143–151, 2 2011.
- [188] A. Varkentin, M. Mazurenka, E. Blumenröther, L. Behrendt, S. Emmert, U. Morgner, M. Meinhardt-Wollweber, M. Rahlves, and B. Roth, "Trimodal system for in vivo skin cancer screening with combined optical coherence tomography-raman and colocalized optoacoustic measurements," *Journal of Biophotonics*, vol. 11, p. e201700288, 6 2018.
- [189] V. P. Zakharov, I. A. Bratchenko, S. V. Kozlov, A. A. Moryatov, D. V. Kornilin, O. O. Myakinin, and D. N. Artemyev, "Advances in tumor diagnosis using oct and raman spectroscopy," *Proc. SPIE*, vol. 9129, pp. 58–64, 5 2014.

- [190] V. P. Zakharov, I. A. Bratchenko, D. N. Artemyev, O. O. Myakinin, D. V. Kornilin, S. V. Kozlov, and A. A. Moryatov, "Comparative analysis of combined spectral and optical tomography methods for detection of skin and lung cancers," *Journal of Biomedical Optics*, vol. 20, p. 025003, 2 2015.
- [191] K. Egodage, S. Dochow, T. Bocklitz, O. Chernavskaia, C. Matthaeus, M. Schmitt, and J. Popp, "The combination of optical coherence tomography and raman spectroscopy for tissue characterization," *Journal of Biomedical Photonics & Engineering*, vol. 72, pp. 169–177, 6 2015.
- [192] M. Mazurenka, L. Behrendt, M. Meinhardt-Wollweber, U. Morgner, and B. Roth, "Development of a combined oct-raman probe for the prospective in vivo clinical melanoma skin cancer screening," *Review of Scientific Instruments*, vol. 88, 10 2017.
- [193] P. J. Caspers, G. W. Lucassen, H. A. Bruining, and G. J. Puppels, "Automated depth-scanning confocal raman microspectrometer for rapid in vivo determination of water concentration profiles in human skin," *Journal of Raman Spectroscopy*, vol. 31, pp. 813–818, 8 2000.
- [194] H. Wang, A. M. D. Lee, H. Lui, D. I. McLean, and H. Zeng, "A method for accurate in vivo micro-raman spectroscopic measurements under guidance of advanced microscopy imaging," *Scientific Reports*, vol. 3, p. 1890, 12 2013.
- [195] X. Feng, M. C. Fox, J. S. Reichenberg, F. C. P. S. Lopes, K. R. Sebastian, A. K. Dunn, M. K. Markey, and J. W. Tunnell, "Rapid assessment of skin surgical margins using superpixel raman spectroscopic imaging," vol. 11222, p. 1122205, SPIE, 2 2020.
- [196] F. Placzek, E. C. Bautista, S. Kretschmer, L. M. Wurster, F. Knorr, G. González-Cerdas, M. T. Erkkilä, P. Stein, Çağlar Ataman, G. G. Hermann, K. Mogensen, T. Hasselager, P. E. Andersen, H. Zappe, J. Popp, W. Drexler, R. A. Leitgeb, and I. W. Schie, "Morpho-molecular ex vivo detection and grading of non-muscle-invasive bladder cancer using forward imaging probe based multimodal optical coherence tomography and raman spectroscopy," *Analyst*, vol. 145, pp. 1445–1456, 2020.
- [197] I. W. Schie, F. Placzek, F. Knorr, E. Cordero, L. M. Wurster, G. G. Hermann, K. Mogensen, T. Hasselager, W. Drexler, J. Popp, and R. A. Leitgeb, "Morpho-molecular signal correlation between optical coherence tomography and raman spectroscopy for superior image interpretation and clinical diagnosis," *Scientific Reports*, vol. 11, p. 9951, 2021.
- [198] W. Wang, J. Zhao, M. Short, and H. Zeng, "Real-time in vivo cancer diagnosis using raman spectroscopy," *Journal of Biophotonics*, vol. 8, pp. 527–545, 2015.
- [199] C. Lieber and A. Mahadevan-Jansen, "Development of a handheld raman microspectrometer for clinical dermatologic applications," *Optics Express*, vol. 15, p. 11874, 2007.
- [200] R. R. Jones, D. C. Hooper, L. Zhang, D. Wolverson, and V. K. Valev, "Raman techniques : Fundamentals and frontiers," *Nanoscale Research Letters*, vol. 14, 2019.
- [201] C. Krafft, S. Dochow, I. Latka, B. Dietzek, and J. Popp, "Diagnosis and screening of cancer tissues by fiber-optic probe raman spectroscopy," *Biomedical Spectroscopy and Imaging*, vol. 1, pp. 39–55, 01 2012.
- [202] J. Schleusener, C. Reble, M. C. Meinke, and J. Helfmann, "Raman spectroscopy for the discrimination of cancerous and normal skin," *Photonics & Lasers in Medicine*, vol. 4, pp. 151–167, 1 2015.

- [203] "Microscope objectives for nir-raman spectroscopy." <https://www.riverd.com/skin-analysis-with-the-gen2-sca/products/microscope-objectives/>.
- [204] T. Wilson, "Resolution and optical sectioning in the confocal microscope," *Journal of Microscopy*, vol. 244, pp. 113–121, 2011.
- [205] H. Wang, N. Huang, J. Zhao, H. Lui, M. Korbely, and H. Zeng, "Depth-resolved in vivo micro-raman spectroscopy of a murine skin tumor model reveals cancer-specific spectral biomarkers," *Journal of Raman Spectroscopy*, vol. 42, pp. 160–166, 2 2011.
- [206] H. Lui, J. Zhao, D. McLean, and H. Zeng, "Real-time raman spectroscopy for in vivo skin cancer diagnosis," *Cancer Research*, vol. 72, pp. 2491–2500, 2012.
- [207] Y. A. Khristoforova, I. A. Bratchenko, O. O. Myakinin, D. N. Artemyev, A. A. Moryatov, A. E. Orlov, S. V. Kozlov, and V. P. Zakharov, "Portable spectroscopic system for in vivo skin neoplasms diagnostics by raman and autofluorescence analysis," *Journal of Biophotonics*, vol. 12, 2019.
- [208] P. J. Caspers, G. W. Lucassen, R. Wolthuis, H. A. Bruining, and G. J. Puppels, "In vitro and in vivo raman spectroscopy of human skin," *Biospectroscopy*, vol. 4, 1998.
- [209] W. Werncke, I. Latka, S. Sassning, B. Dietzek, M. E. Darvin, M. C. Meinke, J. Popp, K. König, J. W. Fluhr, and J. Lademann, "Two-color Raman spectroscopy for the simultaneous detection of chemotherapeutics and antioxidative status of human skin," *Laser Physics Letters*, vol. 8, no. 12, pp. 895–900, 2011.
- [210] J. Zhao, H. Lui, D. I. Mclean, and H. Zeng, "Automated autofluorescence background subtraction algorithm for biomedical raman spectroscopy," *Applied Spectroscopy*, vol. 61, pp. 1225–1232, 2007.
- [211] V. Mazet, C. Carteret, D. Brie, J. Idier, and B. Humbert, "Background removal from spectra by designing and minimising a non-quadratic cost function," *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, vol. 76, pp. 121–133, 4 2005.
- [212] N. Tarcea and J. Popp, "Raman data analysis," 2012.
- [213] S. J. Barton, T. E. Ward, and B. M. Hennelly, "Algorithm for optimal denoising of raman spectra," *Analytical Methods*, vol. 10, pp. 3759–3769, 8 2018.
- [214] M. E. Darvin, J. Schleusener, F. Parenz, O. Seidel, C. Krafft, J. Popp, and J. Lademann, "Confocal raman microscopy combined with optical clearing for identification of inks in multicolored tattooed skin in vivo," *The Analyst*, vol. 143, pp. 4990–4999, 2018.
- [215] K. W. C. Poon, I. R. Dadour, and A. J. McKinley, "In situ chemical analysis of modern organic tattooing inks and pigments by micro-Raman spectroscopy," *Journal of Raman Spectroscopy*, vol. 38, no. April, pp. 1538–1553, 2008.
- [216] K. H. Carlsen, M. Kjøcks, M. Sepehri, and J. Serup, "Allergic reactions in red tattoos : Raman spectroscopy for 'fingerprint' detection of chemical risk spectra in tattooed skin and culprit tattoo inks," *Skin Research and Technology*, vol. 22, pp. 460–469, 2016.
- [217] J. Serup, K. H. Carlsen, N. Dommershausen, M. Sepehri, B. Hesse, C. Seim, A. Luch, and I. Schreiber, "Identification of pigments related to allergic tattoo reactions in 104 human skin biopsies," *Contact Dermatitis*, vol. 82, pp. 73–82, 2 2020.

- [218] K. Hanada, S. Chiyoya, and Y. Katabira, "Systemic sarcoidal reaction in tattoo," *Clinical and Experimental Dermatology*, vol. 10, pp. 479–484, 9 1985.
- [219] H. Kushima, Y. Kinoshita, H. Ishii, and M. Fujita, "Tattoo-induced systemic sarcoidosis," *BMJ Case Reports*, vol. 13, p. e237723, 8 2020.
- [220] M. Sepehri, K. H. Carlsen, and J. Serup, "Papulo-nodular reactions in black tattoos as markers of sarcoidosis : Study of 92 tattoo reactions from a hospital material," *Dermatology*, vol. 232, pp. 679–686, 2016.
- [221] M. Manso, S. Pessanha, M. Guerra, U. Reinholz, C. Afonso, M. Radtke, H. Lourenço, M. L. Carvalho, and A. G. Buzanich, "Assessment of toxic metals and hazardous substances in tattoo inks using sy-xrf, aas, and raman spectroscopy," *Biological Trace Element Research*, vol. 187, pp. 596–601, 2019.
- [222] B. J. Yakes, T. J. Michael, M. Perez-Gonzalez, and B. P. Harp, "Investigation of tattoo pigments by raman spectroscopy," *Journal of Raman Spectroscopy*, vol. 48, pp. 736–743, 5 2017.
- [223] I. Waldmann and F. Vakilzadeh, "Allergische spättypreaktion auf roten azofarbstoff in tätowierungen," *Der Hautarzt*, vol. 48, pp. 666–670, 9 1997.
- [224] S. Gaudron, M.-C. F.-L. Bouëdec, F. Franck, and M. D'Incan, "Azo pigments and quinacridones induce delayed hypersensitivity in red tattoos," *Contact Dermatitis*, vol. 72, pp. 97–105, 2 2015.
- [225] I. Steinbrecher, W. Hemmer, and R. Jarisch, "Adverse reaction to the azo dye pigment red 170 in a tattoo," *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, vol. 2, pp. 1007–1012, 12 2004.
- [226] A. Guichard, M. Agozzino, P. Humbert, F. Fanian, A. Elkyat, and M. Ardigò, "Skin rejecting tattoo ink followed, in vivo, by reflectance confocal microscopy editor," *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, vol. 28, pp. 391–393, 3 2014.
- [227] C. Reilly, N. Chuchvara, J. Cucalon, R. Srivastava, and B. K. Rao, "Reflectance confocal microscopy evaluation of pigmented lesions on tattooed skin," *Lasers in Medical Science*, vol. 36, pp. 1077–1084, 7 2021.
- [228] I. R. Lewis and H. Edwards, *Handbook of Raman Spectroscopy*. CRC Press, 1st ed., 2001.
- [229] B. Brozek-Pluska, M. Kopec, and J. Surmacki, "Surface-enhanced raman spectroscopy analysis of human breast cancer via silver nanoparticles : An examination of fabrication methods," *Journal of Spectroscopy*, vol. 2018, pp. 1–8, 7 2018.
- [230] I. Martina, R. Wiesinger, and M. Schreiner, "Micro-raman characterisation of silver corrosion products : Instrumental set up and reference," *e-Preservation Science*, vol. 9, pp. 1–8, 2012.
- [231] I. Martina, R. Wiesinger, and M. Schreiner, "Micro-raman investigations of early stage silver corrosion products occurring in sulfur containing atmospheres," *Journal of Raman Spectroscopy*, vol. 44, pp. 770–775, 5 2013.
- [232] G. I. N. Waterhouse, G. A. Bowmaker, and J. B. Metson, "The thermal decomposition of silver (i, iii) oxide : A combined xrd, ft-ir and raman spectroscopic study," *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 3, pp. 3838–3845, 2001.

- [233] T. de Caro, D. Caschera, G. M. Ingo, and P. Calandra, "Micro-raman innovative methodology to identify ag-cu mixed sulphides as tarnishing corrosion products," *Journal of Raman Spectroscopy*, vol. 47, pp. 852–859, 7 2016.
- [234] T. Mazza, E. Barborini, P. Piseri, P. Milanik, D. Cattaneo, A. L. Bassi, C. E. Bottani, and C. Ducati, "Raman spectroscopy characterization of tio<sub>2</sub> rutile nanocrystals," *Physical Review B*, vol. 75, p. 045416, 2007.
- [235] V. V. der Chemischen Industrie e.V., "Harmonized classification of titanium dioxide," 2017.
- [236] P. Mekiarun, B. B. Andriana, H. Matsuyoshi, and H. Sato, "Non-invasive quantitative analysis of specific fat accumulation in subcutaneous adipose tissues using raman spectroscopy," *Nature Publishing Group*, 2016.
- [237] R. Ram, A. Natalini, I. J. G. Kljusurić, T. Dhanani, T. Dou, K. Biradar, J. Jifon, D. Kurouski, and B. S. Patil, "Raman spectroscopy detects changes in carotenoids on the surface of watermelon fruits during maturation," *Frontiers in Plant Science | www.frontiersin.org*, vol. 1, p. 832522, 2022.
- [238] M. E. Darvin, W. Sterry, J. Lademann, and T. Vergou, "molecules the role of carotenoids in human skin," *Molecules*, vol. 16, pp. 10491–10506, 2011.
- [239] N. I. Krinsky, "The biological properties of carotenoids," *Pure and Applied Chemistry*, vol. 66, pp. 1003–1010, 1 1994.
- [240] M. Suppa, M. Fontaine, G. Dejonckheere, E. Cinotti, O. Yélamos, G. Diet, L. Tognetti, M. Miyamoto, C. O. Cano, J. Perez-Anker, V. Panagiotou, A. Trepant, J. Monnier, V. Berot, S. Puig, P. Rubegni, J. Malvey, J. Perrot, and V. Marmol, "Line-field confocal optical coherence tomography of basal cell carcinoma : a descriptive study," *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, vol. 35, pp. 1099–1110, 5 2021.
- [241] A. Nijssen, T. C. B. Schut, P. J. Caspers, G. J. Puppels, F. Heule, M. H. Neumann, and D. P. Hayes, "Discriminating basal cell carcinoma from its surrounding tissue by raman spectroscopy," *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 119, pp. 64–69, 7 2002.
- [242] B. Bodanese, F. L. Silveira, R. A. Zêngaro, M. T. T. Pacheco, C. A. Pasqualucci, and L. Silveira, "Discrimination of basal cell carcinoma and melanoma from normal skin biopsies in vitro through raman spectroscopy and principal component analysis," *Photomedicine and Laser Surgery*, vol. 30, pp. 381–387, 2012.
- [243] M. Larraona-Puy, A. Ghita, A. Zoladek, W. Perkins, S. Varma, I. H. Leach, A. A. Koloydenko, H. Williams, and I. Notingher, "Development of raman microspectroscopy for automated detection and imaging of basal cell carcinoma," *Journal of Biomedical Optics*, vol. 14, p. 054031, 2009. pas confocal.
- [244] M. Gniadecka, H. C. Wulf, O. F. Nieisew, D. H. Christensen, and J. Hercogova3, "Distinctive molecular abnormalities in benign and malignant skin lesions : Studies by raman spectroscopy," 1997.
- [245] I. A. Bratchenko, L. A. Bratchenko, Y. A. Khristoforova, A. A. Moryatov, S. V. Kozlov, and V. P. Zakharov, "Classification of skin cancer using convolutional neural networks analysis of raman spectra," *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, vol. 219, p. 106755, 2022.



- [246] <https://www.isc.fraunhofer.de/>.
- [247] F. K. Groeber-Becker, A. Leikeim, F. F. Schmidt, N. G. B. Neto, K. Tiltmann, C. Junger, M. G. Monaghan, and B. Schilling, "A preclinical model of cutaneous melanoma based on reconstructed human epidermis," 2022.
- [248] S. Rossi, M. Cordella, C. Tabolacci, G. Nassa, D. D'Arcangelo, C. Senatore, P. Pagnotto, R. Magliozzi, A. Salvati, A. Weisz, A. Facchiano, and F. Facchiano, "Tnf-alpha and metalloproteases as key players in melanoma cells aggressiveness," *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, vol. 37, 12 2018.
- [249] J. Bakar, R. Michael-Jubeli, S. Tfaili, A. Assi, A. Baillet-Guffroy, and A. Tfayli, "Biomolecular modifications during keratinocyte differentiation : Raman spectroscopy and chromatographic techniques," *Analyst*, vol. 146, pp. 2965–2973, 5 2021.
- [250] P. J. Caspers, G. W. Lucassen, and G. J. Puppels, "Combined in vivo confocal raman spectroscopy and confocal microscopy of human skin," *Biophysical Journal*, vol. 85, pp. 572–580, 2003.
- [251] J. Schleusener, C. Reble, J. Helfmann, I. Gersonde, H. J. Cappius, M. Glanert, J. W. Fluhr, and M. C. Meinke, "Design and technical evaluation of fibre-coupled raman probes for the image-guided discrimination of cancerous skin," *Measurement Science and Technology*, vol. 25, 2014.
- [252] M. Essendoubi, C. Gobinet, R. Reynaud, J. F. Angiboust, M. Manfait, and O. Piot, "Human skin penetration of hyaluronic acid of different molecular weights as probed by raman spectroscopy," *Skin Research and Technology*, vol. 22, pp. 55–62, 2 2016.
- [253] G. Kourbaj, S. Bielfeldt, M. Seise, and K. Wilhelm, "Measurement of dermal water content by confocal raman spectroscopy to investigate intrinsic aging and photoaging of human skin in vivo," *Skin Research and Technology*, vol. 27, pp. 404–413, 5 2021.