AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

UNIVERSITE HENRI POINCARE – NANCY 1
Faculté de médecine

ECOLE DOCTORALE « BIOLOGIE SANTE ENVIRONNEMENT »

Discipline : Ingénierie cellulaire et tissulaire

THESE

présentée et soutenue publiquement

le 07 Octobre 2008

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARE – NANCY 1

par **Marine AMOUROUX**

Caractérisation de la transformation néoplasique de la peau par spectroscopies optiques sur fantôme de mélanome et carcinome épidermoïde murin photo-induit

Membres du jury

Rapporteurs :
Pr. Jean-Claude BEANI, PU-PH, CHU, Grenoble
Dr. Bernard QUERLEUX, HDR, Société L'Oréal, Aulnay-sous-Bois

Jurés :
Dr. Geneviève BOURG-HECKLY, MCU HDR, Paris 6 *Co-directrice de thèse*
Dr. Christine VEVER-BIZET, CR, CNRS – UMR 7033
Dr. Walter C.P.M. BLONDEL, MCU, Nancy - Université
Pr. Jean-Luc SCHMUTZ, PU-PH, CHU, Nancy
Pr. François GUILLEMIN, PU-PH, Centre Alexis Vautrin, Nancy *Directeur de thèse*

Invitée :
Dr. Agnès LEROUX, Centre Alexis Vautrin, Nancy

CENTRE DE RECHERCHE EN AUTOMATIQUE DE NANCY

CNRS – CENTRE ALEXIS VAUTRIN – NANCY-UNIVERSITE

Cette femme vive et malicieuse mais froide
pensait droit et mal
parce que son mari
pensait bien et de travers.

Sartre J.-P., *Les Mots*, Gallimard éd. (Paris, 1964), p. 12

Remerciements

Ces remerciements sont l'occasion d'exprimer ma gratitude notamment aux personnes qui ont composé mon environnement professionnel durant ces trois dernières années. Si ces mots semblent bien futiles, ils ont néanmoins le mérite d'être symboliques et de montrer qu'il n'est possible d'accomplir un travail de thèse, comme il n'est possible de vivre, qu'en équipe.
J'espère également qu'ils montrent que, bien plus qu'un appui scientifico-technique, les personnes communément appelées « collègues » ou « chefs », ont contribué à ma vie intérieure. S'il est vrai qu'*on met du temps à devenir qui l'on est*, soyez assurés que durant ces trois années vous m'avez tous permis de me rapprocher de qui je suis.
J'espère que le futur me donnera l'occasion de vous témoigner à tous ma gratitude autrement que par ces quelques mots.

Je tiens tout d'abord à remercier mes encadrants – Monsieur Guillemin, Madame Bourg-Heckly et Monsieur Blondel – pour tout ce qu'ils m'ont apporté. Même si je suis très mal placée pour « juger » de leur compétence, je sais que j'ai eu une chance immense d'être entourée par ces trois personnes. N'ayant pas toujours été entourée par autant de compétence ni par autant de confiance, de respect et d'humanité, sachez que j'ai essayé d'apprécier à sa juste valeur chaque instant qui m'a été offert de travailler sous votre co-direction à tous les trois. Je sais que j'ai eu beaucoup de chance.

Monsieur Guillemin[i], je vous remercie pour la confiance que vous m'avez accordée en acceptant de diriger mes travaux. Je vous remercie d'avoir mis à ma disposition toute la richesse de votre savoir et de votre expérience, autant sur le plan médical que sur le plan de la recherche. A cet égard notamment, je sais que travailler sous votre direction fut un honneur et une chance. Je vous remercie de vous ériger en modèle : vous montrez en effet chaque jour sur le terrain ce que c'est que d'être passionné et dévoué à son travail. Soyez assuré que je garderai toujours cette image en mémoire et qu'elle me sera souvent utile. Merci d'avoir toujours fait preuve de généreuse intransigeance. Merci également pour votre humanité quand j'en ai eu besoin plus que jamais.

Madame Bourg-Heckly[ii], je vous remercie d'avoir consacré autant de votre énergie à réussir notre numéro commun de funambule : une co-direction de thèse à distance était loin d'être gagnée d'avance mais nous y sommes parvenues. Merci pour votre méticulosité, votre pédagogie et aussi pour toute la force que vous m'avez insufflée. Autant de compétence alliée à autant de modestie et de douceur sont difficiles à croire et pourtant bien réelles et tellement précieuses. C'est cette délicate alliance qui m'a donné le courage d'aller au bout. Vous m'avez redonné confiance en moi, au moment où je n'en avais plus du tout. Merci d'avoir respecté mes choix et de m'avoir soutenue pour terminer selon le calendrier que je souhaitais. Merci pour toutes les démarches que vous avez entreprises et qui m'ont immensément facilité l'existence. Merci d'avoir tout fait dans mon intérêt personnel et professionnel. Chacune de nos discussions et entrevues a été une bouffée d'oxygène. Merci pour la décontraction des

[i] François GUILLEMIN, Professeur d'Université-Praticien Hospitalier (chirurgien). Directeur général du Centre Alexis Vautrin (CAV), Centre de Lutte Contre le Cancer de Lorraine. Attaché au Centre de Recherche en Automatique de Nancy (CRAN) UMR 7039 CNRS-Nancy Université.

[ii] Geneviève BOURG-HECKLY, Maître de Conférences Universitaire Habilitée à Diriger les Recherches (Université Pierre et Marie Curie – Paris 6). Laboratoire BioMoCeTi (Biophysique Moléculaire Cellulaire et Tissulaire) UMR 7033 CNRS - Paris 6.

déjeuners partagés et pour le respect que vous m'avez toujours témoigné. Merci pour votre patience et votre attention lors de nos rédactions communes, que ce soit pour ce rapport de thèse ou pour les articles.

Monsieur Blondel[iii], merci d'avoir pensé à moi quand vous avez entendu parler d'une allocation ministérielle de recherche disponible…en dernière minute, mais juste à temps ! Comme je vous l'ai déjà dit de vive voix, j'ai choisi de faire cette thèse au sein de votre équipe parce que bénéficier de votre présence pleine de compétences, de dynamisme et de respect me semblait primordial au quotidien. Or je vous avais côtoyé durant plusieurs années lors de mes études à l' « IUP », en licence et maîtrise GBM, et j'en avais alors retiré l'image d'une personne envisageant les étudiants sous sa responsabilité comme ses *alter ego* : je ne me suis pas trompée. Je vous remercie d'avoir toujours mis à ma disposition vos grandes compétences et de m'avoir appris à valoriser mes travaux au fur et à mesure. Je vous remercie d'avoir privilégié l'aspect « chercheur » de ma mission d' « étudiant-chercheur », c'est-à-dire de m'avoir fait suffisamment confiance pour me laisser assumer des responsabilités, parfois lourdes, mais tellement formatrices. Une fois que vous m'avez mis le pied à l'étrier, vous avez eu la générosité de me laisser prendre en mains mon projet de doctorat ; je ne me suis jamais sentie obligée de vous « suivre ». Merci de m'avoir soutenue dans mes initiatives et de m'avoir encouragée à rester la même, à ne pas changer, même quand les échecs étaient au rendez-vous. La confiance que vous m'avez accordée est une générosité dont je vous sais infiniment gré. Vous m'avez ainsi donné des racines et des ailes. Merci pour tout.

Je remercie le **Professeur Beani**[iv] et le **Docteur Querleux**[v] pour avoir accepté d'être rapporteurs de mes travaux. Je vous adresse toute ma gratitude pour l'honneur et la confiance que vous me témoignez ainsi.
Monsieur Beani, merci notamment de contribuer au jugement de l'intérêt clinique des outils et méthodes développés durant ma thèse.
Monsieur Querleux, merci d'apporter votre expertise et votre ouverture précieuses notamment en dermo-cosmétique.

Je remercie le **Docteur Vever-Bizet**, le **Docteur Leroux** et le **Professeur Schmutz** pour avoir accepté de faire partie du jury.
Madame Leroux[vi], j'ai eu la chance de pouvoir collaborer avec vous durant ces deux dernières années, notamment au sujet de l'expérimentation sur les carcinomes épidermoïdes murins. Je vous remercie de m'avoir ouvert les portes du service d'anatomo-pathologie que vous dirigez au sein du Centre Alexis Vautrin. J'ai pu ainsi bénéficier de tout le soutien humain et de toutes les ressources techniques dont le service dispose. Je vous remercie pour toutes vos compétences que vous avez bien voulu mettre au service de mes travaux. Je vous remercie pour votre patience lors de mes séances d'initiation aux principes de bases de l'anatomo-pathologie. Merci pour vos idées au service de l'élaboration d'un protocole aussi

[iii] Walter C.P.M. BLONDEL, Maître de Conférences Universitaire (Nancy Université – Université Nancy 1 Henri Poincaré). Responsable de l'action SpID (Spectro-Imagerie de Diagnostic) au sein du CRAN UMR 7039 CNRS-Nancy Université.
[iv] Jean-Claude BEANI, Professeur d'Université-Praticien Hospitalier (dermatologue). Responsable de la clinique universitaire de dermato-vénéréologie, allergologie et photobiologie du pôle pluridisciplinaire de médecine au CHU de Grenoble.
[v] Bernard QUERLEUX, Docteur ès Sciences Habilité à Diriger les Recherches. Responsable du groupe de recherche Imagerie et Optique au sein du service Recherche et Développement de la Société L'Oréal®, Aulnay-sous-Bois.
[vi] Agnès LEROUX, Médecin (anatomopathologiste) - Responsable du service de cytologie et d'anatomo-pathologie du Centre Alexis Vautrin, Nancy.

précis et méticuleux que possible. Merci de m'avoir montré qu'il était important de douter constamment pour assurer un diagnostic aussi fiable que possible.
Madame Vever-Bizet[vii], j'ai eu le plaisir de vous côtoyer un peu durant ces trois dernières années. Je vous remercie pour l'enthousiasme et la joie de vivre avec lesquels vous « contaminez » votre entourage. Merci également pour votre aide et les nombreux conseils scientifiques prodigués au cours de nos discussions. Je rends une dédicace spéciale à notre rendez-vous furtif, au feu rouge, devant la salle Pleyel à Paris !
Monsieur Schmutz[viii], merci de m'avoir ouvert les portes d'une réunion de *staff* du service de dermatologie que vous dirigez au sein du CHU de Nancy. Je vous remercie pour l'intérêt que vous avez immédiatement porté aux travaux que j'ai présentés ce jour-là. Merci de témoigner à nouveau de votre intérêt en faisant partie de ce jury.

Monsieur Didelon[ix], vous avez été un soutien indéfectible tout au long de ces trois années. Chaque fois que j'en ai eu besoin (et ce fut très souvent !), j'ai pu trouver auprès de vous une oreille attentive, une attention constante et une main tendue. Vous avez élaboré toutes les conditions pour me rendre la vie supportable dans les moments où elle ne l'était justement plus. Vous m'avez accueillie dans un véritable cocon à vos côtés à l'IMAC. Merci pour tout ça et pour le collègue compétent, prêt à rendre service que vous avez toujours été. Vous avez apporté beaucoup de rigueur à nombre de mes expérimentations. Que serais-je devenue sans vous ?

Muriel Abbaci, merci d'avoir été ma locomotive. Malgré les épreuves que tu as traversées ces dernières années, la force dont tu as toujours fait preuve m'a beaucoup inspirée. Tu as tenu ce rôle de locomotive non seulement sur le plan professionnel mais également sur le plan de l'amitié. Ta grande compétence, ton énergie quotidienne au travail, tout ce que tu as achevé ainsi que ta générosité et tous les services que tu m'as rendus m'ont tout simplement été vitaux. Nous avons finalement suivi le même parcours ces dernières années et je te félicite d'avoir toujours brillé au firmament depuis l'IUP, en passant par le DEA jusqu'à la thèse. Essayant constamment de t'égaler, je suis honorée d'avoir pu travailler à tes côtés.

Gilberto Díaz-Ayil, Émilie Péry, Sophie Olijnyk, Yahir Hernandez-Mier, votre camaraderie a rendu l'atmosphère générale du laboratoire des plus agréables. Cette atmosphère fut propice à un plaisir indispensable pour venir au travail chaque jour. Grâce à vous, ces quelques années se sont déroulées dans une décontraction des plus précieuses.

Le personnel technique du service d'anatomo-pathologie du CAV. Merci de m'avoir accueillie à vos côtés et de m'avoir aidée tout au long des moments passés en votre compagnie. Vous m'avez toujours facilité la tâche et tous les services que vous m'avez rendus ont permis la réalisation d'un protocole parfois un peu trop lourd pour moi toute seule ! Merci de m'avoir aidée à supporter tout cela. Un remerciement particulier à **Alexandre Simonot** qui, s'il ne fut pas l'unique personne à avoir assuré le traitement de « mes » échantillons de peau de souris, fut celui qui en a assuré la plus grande partie. Je te remercie pour ton assistance permanente, ton aide précieuse, tes idées, ta promptitude à réaliser certains

[vii] Christine VEVER-BIZET, Chargée de Recherches, CNRS - Laboratoire BioMoCeTi (Biophysique Moléculaire Cellulaire et Tissulaire) UMR 7033.
[viii] Jean-Luc SCHMUTZ, Médecin (dermatologue) Responsable du service de Dermatologie et Vénérologie du CHU de Nancy.
[ix] Jacques DIDELON, Docteur ès Sciences, Ingénieur de Recherche INSERM, Responsable du laboratoire IMAC (Instrumentation Médicale Automatisée en Cancérologie) au sein du Centre Alexis Vautrin.

marquages ou certaines coupes quand j'avais besoin que cela aille « vite ». Ta camaraderie et ta gentillesse ont également été des soutiens quotidiens indéfectibles.

Anne-Laure Leblanc, animalière à l'animalerie centrale de la Faculté de médecine de Nancy. Merci pour votre assistance durant mes premiers pas de soins animaliers. Merci pour vos conseils, votre aide et tous les services rendus.

Le Groupe Thématique Ingénierie Pour la Santé (IPS) du CRAN, dirigé par le Professeur **Didier Wolf**. Si nous n'avons pas collaboré directement, car tous absorbés par nos travaux respectifs, nous avons bien souvent cohabité et je vous remercie pour les conseils prodigués et les services rendus à plusieurs reprises, notamment en matière d'expérimentation animale. Merci à **Loraine Tirand**, **Denise Bechet** et **Julie Garrier**, doctorantes ou étudiantes en Master, pour avoir pris sur leur temps pour m'aider dans mes premiers pas d'expérimentation animale. Merci à **Lina Bollotine** pour avoir mis à ma disposition toutes les infrastructures de son équipe.

Alain Richard, directeur du CRAN. Je vous remercie pour le soutien moral apporté à de nombreuses reprises au cours de ce doctorat : merci d'avoir pris ma « défense » durant l'incident du café scientifique, merci d'avoir pris le temps de vous entretenir avec moi pour comprendre le fond des choses et de m'avoir soutenue lors de la mise en place de l'expérimentation animale dans les locaux de l'ENSEM et merci pour m'avoir reçue dans votre bureau lorsqu'il y a quelques mois, vous m'avez sentie égarée face à une fin de thèse difficile et à un avenir totalement flou. Merci de vous rendre autant disponible et accessible à chacune des personnes qui composent « votre » laboratoire. Je vous remercie de m'avoir permis de faire partie du conseil de laboratoire en tant que représentante des doctorants. La tâche fut plus ardue que prévue mais a eu le mérite de m'apprendre beaucoup sur le fonctionnement d'instances telles qu'un conseil de laboratoire ou d'autres au niveau régional ou national.

Jean-François Stoltz, directeur de l'école doctorale BioSE. Merci d'avoir contribué à me rendre cette thèse accessible. Merci également de m'avoir permis de réaliser toutes les étapes qui ont précédé la thèse et notamment un stage de maîtrise au *Georgia Institute of Technology* d'Atlanta aux Etats-Unis d'Amérique ainsi qu'un stage de DEA au sein de votre équipe (LEMTA UMR 7563 CNRS-Nancy Université) .

Je tiens à remercier les personnes qui me sont inconnues et qui pourtant, en tant que responsables d'organismes, ont rendu ces travaux de thèse possibles par le soutien financier qu'ils ont pris la responsabilité d'accorder. Sans ce soutien financier, rien n'aurait été possible et en particulier aucun travail expérimental n'aurait pu être accompli. Je remercie donc les différents responsables pour avoir crû en ces travaux et pour avoir eu donc suffisamment confiance pour allouer des fonds financiers très conséquents.

- La Ligue Contre le Cancer : Comités Départementaux 54 et 55
- Bonus Qualité Recherche (BQR) Université Henri Poincaré
- Nancy Université
- Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS)
- La Région Lorraine
- Le Ministère de l'Education Nationale, de la Recherche et de la Technologie (MENRT) pour l'allocation ministérielle qui m'a été allouée durant ces trois années.

Il est temps maintenant pour moi de paraphraser Boubacar Traoré, « le bluesman malien » et de dire aux personnes suivantes :

Si tu savais combien je t'aime, toi aussi tu dois m'aimer[x].

J'espère que ces quelques lignes vous apprendront combien je vous aime… pour que vous continuiez à m'aimer.

Merci donc **Valérie Marache** pour avoir su me fermer ta porte….lorsque je me trouvais déjà chez toi ! Pour me forcer à rester à tes côtés alors que je me trouvais en trop partout. Tu m'as insufflé de la vie, au jour le jour, quand je ne pouvais pas envisager une autre échelle de temps. Tu m'as portée à bout de bras, tu m'as nourrie au sens propre (à la cueiller), tu m'as fait éclater de rire bref, tu as été d'une présence incroyable. Pardon de ne pas avoir été aussi présente pour toi alors que tu en avais peut-être besoin au cours de ces derniers mois de thèse. Maintenant ça va aller mieux !
Merci **Papa** d'avoir su acheter un billet d'avion pour venir passer 24 heures avec moi…24 heures « seulement », mais les bonnes, celles qui étaient nécessaires, vitales.
Merci **Vanessa Moby** d'avoir su me soutenir quand, incapable d'avaler un morceau du plat qui était devant moi le midi, tu as trouvé la patience d'être à mes côtés alors que je ne pouvais pas articuler un mot pour t'expliquer ce qui se passait.
Merci **Maman** d'avoir été un soutien indéfectible en m'appelant quotidiennement et en trouvant les mots qui m'ont toujours « élevée » et qui continuent de le faire.
Merci **Emilie Castellani** de m'avoir proposé de prendre un billet de train Nice-Nancy pour venir passer un weekend à mes côtés. Un symbole tellement fort.
Merci **Carine Filliol** pour ta présence, pour tes emails plein de recul et de soutien et pour ton colis : lecture et chocolat, le cocktail du réconfort ! Ta présence à toutes les étapes de mon parcours des dernières années m'a été vitale.
Merci **Annabelle Monnier** pour ton soutien, ton amitié et ton aide tellement précieux. Ton intégrité est un exemple dans ma vie.
Merci **Danny Addison** d'avoir su être à mes côtés…depuis la Californie ! Voilà 10 années que je t'ai laissé mon cœur. Merci de l'avoir toujours choyé et d'avoir répondu présent immédiatement dès que tu l'as senti en danger. Tu es resté debout tard pour que nous puissions nous parler malgré les 9 heures de décalage horaire, tu as dépensé des fortunes pour m'appeler des heures durant sur mon téléphone portable : merci infiniment.
Merci **Michel et Claudie Elipot**, mes parents lorrains d'adoption, de m'avoir accueillie et d'avoir été présents, tels de « vrais » parents, dont le soutien ne s'est jamais démenti en 6 ans de vie lorraine.
Merci **Bernard Darley**, d'avoir su calmer mes angoisses archaïques lors de mes premiers pas en expérimentation animale.

Et puis merci également aux tribus qui m'ont apporté la chaleur d'une famille chaque fois que j'avais besoin de ce sentiment tribal d'appartenance et d'identité.
Même si pour certains d'entre vous, nos univers professionnels sont des plus éloignés, vous m'avez toujours témoigné votre présence et votre solidarité, même quand mes efforts pour accomplir ma thèse n'avaient pas beaucoup de sens pour vous, me permettant ainsi d'aller au bout.

[x] Extrait de la chanson Je chanterai pour toi dans l'album *Je chanterai pour toi*, Marabi Productions, 2002.

Le **Fly Club 54**, club d'ultimate-frisbee de Villers-lès-Nancy. En particulier l'équipe à la tête du club : Bab (**Sébastien Beltramo**, président), Virg (**Virginie Lahaye**, trésorière), **François Faivre** (secrétaire) et tous les autres « anonymes » à la gambette musclée et bronzée pour n'avoir jamais perdu patience malgré mes *drops* d'anthologie… Merci pour les organisations pittoresques de nos chaotiques mais non moins célèbres « Tournois découvertes » !!

Le **groupe théâtre de la MJC Pichon** de Nancy. Merci à **Susann et Grégory Jacquier**, **Macky** (Fabrice VanMackelberg de son vrai patronyme…), **Estelle Richard, Elise de Villiers, Julie Solviche, Stanley Davis, Valérie Marache** (toi, t'es déjà citée plus haut) **et Philippe Huriet**. Je vous remercie de m'avoir offert une bouffée d'oxygène hebdomadaire voire bi-hebdomadaire au fur et à mesure que le jour du spectacle approchait : notre « Petit Noël en Famille » inspiré de Minuit Chrétien de Tilly fait partie de mes grandes fiertés. Je conserve le DVD de notre spectacle comme une relique sacrée.

Merci à toute l'équipe de **la Ménagerie de Radio Fajet : Cécile, Hélène, Emilie, Damian, Simon**. Merci Stanley de m'avoir permis de rencontrer toutes ces belles personnes pour des moments légers. Merci pour tous les superbes textes que tu m'as écrits : engagés, drôles, légers, toujours pertinents. Etre caissière l'espace de quelques minutes chaque semaine : mon rêve s'est donc réalisé.

Merci au fabuleux groupe de « voisins » de la cité universitaire Le Placieux qui a rendu mes premiers jours nancéiens tellement heureux ! Je ne pense pas que mes études à Nancy se seraient aussi bien passées si je ne vous avais pas eus à mes côtés en « débarquant de Nice ». Votre sens de la fête fut un soutien immense. Alors je rends hommage à **Laplacieuse**, fameuse discothèque clandestine ! Merci d'abord à son « propriétaire » qui a bien voulu l'accueillir dans sa chambre de 9 m² : **Sébastien Leroux** et puis à tous ses fidèles clients : **Carine Filliol** (déjà citée plus haut)**, Ismail Ijjaali, Julien Fourgueux, Guillaume Lucas, Tomeu Orfilla, Mariana, Ana Hegu, Zoheir Mefti, Thomas Cauchy, Nicolas Desbien, Hadrien Perron, Racha Mounaged, Pascal Kiehl.**

La ***Phillips Academy Class of 1998, Andover, Massachusetts*** (Etats-Unis d'Amérique). La thèse m'a empêché de vous revoir tous pour fêter nos 10 ans. Je serai là pour les 15 ! Merci à **Vincent LeRibeuz** de m'avoir fait vivre ces moments avec vous en pleine nuit, à 6000 km. Merci Vincent d'avoir toujours été un ami tout au long de ces dix années. Tu as été ma Nouvelle Star ! Merci également à **Solange Diallo**, à **Danny Addison** (déjà mentionné plus haut) et à tous les amis rencontrés qui malgré le temps et la distance qui nous ont séparés ces dix dernières années ont su me montrer leur fraternité de promotion et m'encourager. Merci à tous les professeurs de la Phillips Academy et à **Al MacCann** en particulier.

Merci également à la ***Georgia Institute of Technology Wing 2D***, Atlanta, Georgia (Etats-Unis d'Amérique). Vous m'avez tous précédée dans l'obtention de votre doctorat et vous avez ainsi trouvé les mots qui m'ont portée durant les moments de doute. Merci pour votre présence. Curieusement nous nous sommes fréquemment vus de ce côté ou de l'autre de l'Atlantique depuis mon stage au sein de votre laboratoire en 2004 : **Stacy Imler, Bryan Marshall, Chris Wilson, Ashley Palmer, John Connelly, Onyi Irrechukwu et** notre guide à tous, **Marc Levenston** !

Et puis le groupe « DEA » (**Promotion 2005 du DEA Bioingénierie-Biomatériaux**). Pour le coup, nous avons tous vécu les mêmes choses au même moment et la force que cette solidarité m'a insufflée fut un immense secours à chaque instant : **Nadia Ladhari, Vanessa Moby** (déjà

citée plus haut !), **Julien Darmian, Emilie Velot et Annabelle Monnier** (déjà citée plus haut !).

Et puis merci à toutes les autres personnes que je côtoie de manière ordinaire et qui m'ont toujours soutenue en se rendant compte quelle importance avait pour moi mon activité professionnelle.
Merci à ma famille et à mon cousin **François Guermeur** pour m'avoir ouvert la voie de la thèse. Tu as toujours été mon exemple, l'idole de mon enfance, le grand frère que je rêvais d'avoir ! Si tu croisais les bras, je les croisais également. Si tu mangeais des raviolis alors j'en mangeais aussi….bref il n'y a plus qu'à espérer une chose maintenant : que je n'ai pas fait cette thèse uniquement parce que tu en as fait une…
Merci aux amis (de mes parents au départ) qui mont vue naître puis grandir et m'ont apporté un soutien et des encouragements dignes d'une vraie famille : **Martine Bellec, Elizabeth Perrain, Dominique Bagary, Chau N'Guyen, André et Danielle Petitguillaume, Jean-Louis et Françoise Nahon**.
Merci aux amis d'enfance (**Clara Moinard**) qui m'ont toujours soutenue même quand nos chemins et choix de vie divergeaient totalement !

Enfin, je dois également remercier les personnes qui ont contribué à me rendre la vie difficile tout au long de ces trois années. La bienséance m'empêche de vous nommer... dommage car des gens aussi superbes que le **Dalaï-Lama**[xi], **Sœur Emmanuelle**[xii] ou encore **Ingrid Bétancourt**, récemment libérée, et **Philippe Maurice**[xiii] (qui a fait sa thèse en prison !) m'ont fait prendre conscience que j'avais eu de la chance de vous rencontrer. Ils m'ont appris qu'on est seul responsable de la haine qu'on peut ressentir et que vous n'êtes donc pas la cause de celle que vous avez pu m'inspirer parfois. Hier : vous. Demain : qui ?? Jusqu'à quand ? J'ai cette haine en moi et c'est donc à moi de m'en libérer : merci pour la prise de conscience. Merci d'avoir ainsi également contribué à ce que je me rapproche de moi-même en m'obligeant à l'introspection. Vous m'avez permis d'entamer le chemin de la compassion et donc de la libération de toute souffrance. J'espère un jour arriver également au terme de ce cheminement qui a donc commencé grâce à vous et qui semble plus long que celui d'une thèse !

Ma dernière pensée ira vers ceux que le cancer a vaincus et qui nous ont quittés durant le cours de cette thèse. On ne vous oublie pas. Si le cancer est plus fort que la vie, il est impuissant face à l'amour qu'on ressentira toujours pour vous.

- **Martine** (1946-2006), ma chère tante
- **Luc Marchal** (1949-2008), ingénieur d'étude au LEMTA (UMR 7563). Nous avons partagé le même bureau durant mon stage de DEA.
- **Sarah Frédéric** (2005-2008), notre bout de chou.

Si ces remerciements, au même titre que tout travail de recherche, ne sont pas terminés, il faut tout de même y mettre un point final.

Sachez que ma vie n'a de sens que par vous tous.

J'espère pouvoir un jour être à la hauteur de tout ce que vous m'avez apporté.

Sachez que chacune des lignes qui suivent n'a pu être écrite que grâce à vous.

[xi] Dalaï-Lama XIV et Cutler H., *L'art du bonheur*, Robert Laffont, éd., (Paris, 1999).
[xii] Sœur Emmanuelle, *Richesse de la pauvreté*, Flammarion, éd. (Paris, 2001).
[xiii] Maurice P., *De la haine à la vie*, Le cherche midi, éd. (Paris, 2001).

TABLE DES MATIERES

Introduction *12*

1. Cadre de l'étude *14*

1.1. La peau **14**
1.1.1. L'épiderme 16
1.1.2. Le derme 23
1.1.3. L'hypoderme 24

1.2. Cancers de la peau et stades précancéreux **25**
1.2.1. Épidémiologie 25
1.2.2. Etiologie 27
1.2.3. États précancéreux et précoces du cancer 29

1.3. Diagnostic en cancérologie dermatologique **30**
1.3.1. Méthodes actuelles 30
1.3.2. Méthodes optiques de diagnostic 37
1.3.3. Méthodes spectroscopiques 44

2. Etude sur fantômes : évaluation de l'indice de Breslow du mélanome malin par spectroscopie de réflectance diffuse résolue spatialement *49*

2.1. Etat de l'Art **49**
2.1.1. Contexte médical 49
2.1.2. Méthodes actuelles pour le diagnostic du mélanome 54
2.1.3. Méthodes diagnostiques en cours de développement fondées sur la spectroscopie et l'imagerie optique… 59

2.2. Matériels et Méthodes **63**
2.2.1. Choix du modèle 63
2.2.2. Confection du modèle 63
2.2.3. La mélanine 64
2.2.4. Instrumentation pour la spectroscopie 68

2.3. Résultats **70**
2.3.1. Pré-traitement des spectres 70
2.3.2. Présentation des spectres pré-traités 70
2.3.3. Evaluation du potentiel de discrimination des différentes épaisseurs 74
2.3.4. Simulation numérique 77

2.4. Conclusion et perspectives **79**

3. Etude in vivo : classification de différents stades de peau murine irradiée aux ultraviolets par anatomo-pathologie et par spectroscopie bimodale. *80*

3.1. Etat de l'art **80**
3.1.1. Contexte médical : les lésions kératinocytaires 80
3.1.2. Modèles animaux 84
3.1.3. Méthodes de diagnostic clinique des carcinomes cutanés 88
3.1.4. Etat de l'art du diagnostic de carcinome épidermoïde par spectroscopie 89
3.1.5. Classification histologique de stades précancéreux de peau murine 91

3.2. Objectifs de l'étude **91**

3.3. Matériels et méthodes **92**
3.3.1. Modèle animal 92
3.3.2. Mesures spectroscopiques 93
3.3.3. Histologie 101
3.3.4. Tentative de suivi specroscopique en fonction du temps 104

3.4. Résultats ... 106
3.4.1. Photocarcinogenèse ... 106
3.4.2. Classification histologique ... 106
3.4.3. Traitement des données spectrales ... 111
3.4.4. Discussion ... 123
3.5. Conclusion et perspectives ... 125
Conclusion générale ... 126
Liste des Figures ... 128
Liste des Tableaux ... 131
Liste des abréviations ... 133
Références bibliographiques ... 134
Production scientifique ... 141
Résumé - Abstract ... 142

Introduction

Diagnostiquer le cancer durant les premières étapes de son histoire naturelle, c'est-à-dire avant qu'il ne devienne invasif, est le moyen le plus sûr d'effectuer un traitement curatif. Les méthodes optiques de diagnostic semblent pouvoir répondre à cet enjeu clinique car les phénomènes (fluorescence, diffusion élastique) sur lesquels elles reposent, et qui sont mis en jeu lors de l'interaction entre la lumière et les tissus, sont sensibles aux modifications morpho-fonctionnelles des premiers stades de développement des cancers épithéliaux. Parmi ces méthodes, la spectroscopie de fluorescence et, plus récemment, la spectroscopie de diffusion élastique jouent un rôle prépondérant. La spectroscopie est un outil qui utilise la souplesse et la longueur des fibres optiques pour explorer les cavités des organes creux par endoscopie ou la peau qui, de par sa localisation externe, est directement accessible. Nous avons choisi de nous intéresser à ce dernier organe pour deux raisons principales. Tout d'abord, parce que l'incidence des cancers cutanés est en constante augmentation depuis plusieurs décennies. En effet, dû à l'engouement des sociétés occidentales pour le teint hâlé et les loisirs en extérieur, on assiste ces dernières années à une forte augmentation de l'incidence des cancers de la peau car le rayonnement ultraviolet en est le facteur étiologique principal, qu'il soit d'origine naturelle (le soleil) ou d'origine artificielle (lampes à bronzer). Dans ces pays où les populations à peau claire sont majoritaires, le cancer de la peau est celui qui a la plus forte incidence. L'intérêt d'utiliser les différents types de spectroscopie en dermatologie serait d'améliorer la sensibilité et la spécificité du diagnostic en fournissant au clinicien des informations spectrales complémentaires de son appréciation visuelle. Cette complémentarité lors de l'examen clinique pourrait servir à guider les biopsies et limiter le nombre de faux positifs et de faux négatifs. A terme, l'objectif est de porter un diagnostic positif sans devoir faire de biopsie invasive. La deuxième raison pour laquelle nous avons choisi de nous intéresser à la peau est que l'évolution des deux formes de cancers cutanés les plus létales passe par des lésions précancéreuses puis préinvasives : mélanome intraépidermique pour le mélanome ; kératose actinique pour le carcinome épidermoïde *in situ*. Nous aurons ainsi l'opportunité de tester les spectroscopies optiques comme outil de diagnostic précoce.

Le présent travail a donc pour objectif d'évaluer la spectroscopie en tant qu'outil de caractérisation de la transformation néoplasique de la peau. Ce mémoire est divisé en trois parties : la première a pour objet de rappeler le contexte médical de l'étude, les notions de

base sur l'interaction entre la lumière et les tissus biologiques et quelques informations sur les techniques de spectroscopie.

Le deuxième chapitre propose d'étudier la capacité de la spectroscopie de réflectance diffuse résolue spatialement à évaluer de manière non-invasive l'indice de Breslow, c'est-à-dire l'épaisseur du mélanome, simulé par fantôme.

Le troisième chapitre est consacré à l'évaluation *in vivo* par spectroscopie bimodale (combinant deux modalités : autofluorescence en multi-excitation et réflectance diffuse) de peau murine soumise à irradiation ultraviolette. Les mesures spectroscopiques sont réalisées chaque semaine durant les sept mois d'irradiation et suivies de prélèvements cutanés. Des critères histologiques sont ensuite déterminés pour établir une classification des différents états histologiques rencontrés tout au long de la photocarcinogenèse. Notre hypothèse dans ce cas est que la spectroscopie bimodale devrait permettre d'obtenir de meilleurs résultats de classification que ceux obtenus avec chaque modalité utilisée seule.

1. Cadre de l'étude

1.1. La peau

La peau est un organe multi-couches, composé de plusieurs types cellulaires et composants extra-cellulaires, qui produit différentes structures spécialisées appelées « annexes » (cf. Figure 1). La peau se définit comme un organe à part entière qui participe à la protection de l'organisme qu'elle contient. Elle remplit un rôle dans plusieurs fonctions vitales[1] :

- Le maintien de l'homéothermie grâce aux glandes sudorales eccrines qui permettent la sudation et à la couche adipeuse de l'hypoderme qui permet une isolation thermique. Les poils, dont l'être humain ne conserve que quelques vestiges, ne jouent plus qu'un rôle anecdotique dans cette fonction.
- Le maintien de l'équilibre hydrique grâce au *stratum corneum* qui est la « barrière mécanique » de l'organisme. Les lipides hydrophobes, dont il est riche, le rendent notamment globalement imperméable et évitent aussi la déshydratation massive de l'organisme. Les pores des diverses glandes et follicules pileux rendent cette barrière perméable pour un ajustement permanent de l'hydratation.
- Le maintien de l'intégrité de l'organisme dans son environnement grâce au sens du toucher et à un ensemble de nocicepteurs thermiques (corpuscules de Ruffini et de Krause) ou mécaniques (corpuscules de Pacini et de Meissner).
- La reconnaissance du soi et du non-soi par plusieurs types de cellules immunitaires : cellules de Langerhans, mastocytes, lymphocytes, etc.
- L'équilibre neuro-endocrinien grâce aux glandes sudorales apocrines, aux glandes sébacées et aux cellules de Merkell.

Lors de l'étude des structures et des fonctions normales ou anormales de la peau, il est important de garder à l'esprit ses variations régionales qui s'expriment principalement en termes d'épaisseur, de composition, de densité d'annexes, et parfois de différenciations biochimiques.

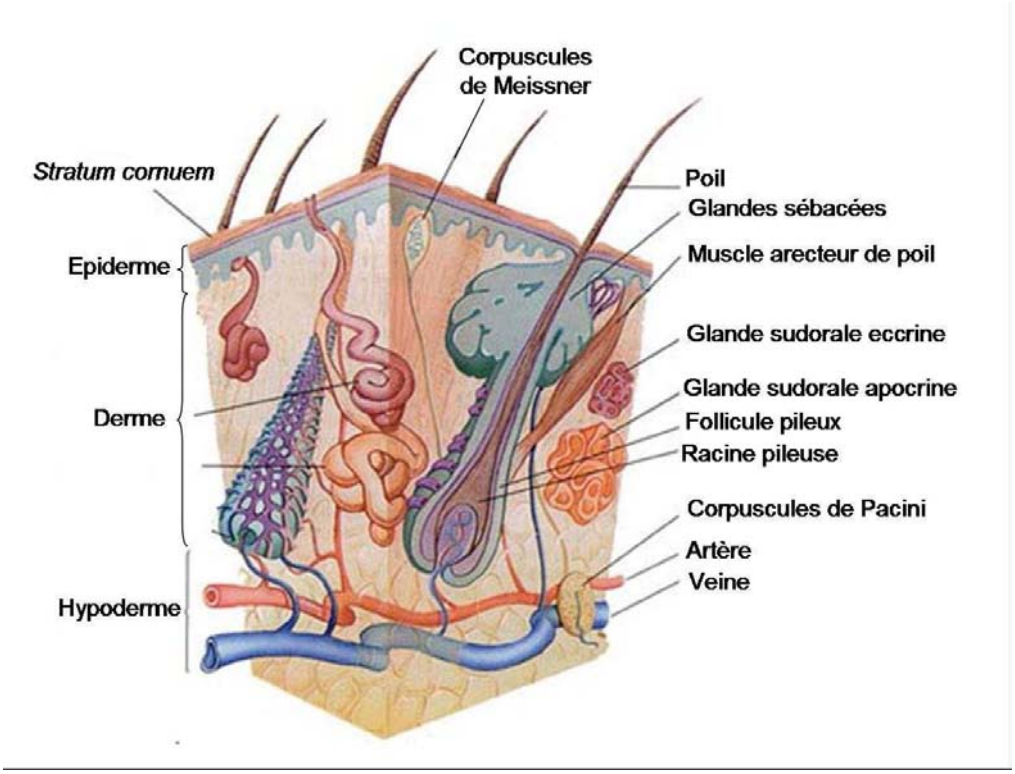


Figure 1 : Schéma tri-dimensionnel d'une coupe transversale de peau humaine. Iconographie disponible sur le site *web* de la *Medical School* de l'Université de Virginie, Etats-Unis d'Amérique

D'un point de vue histologique, trois couches sont identifiées : l'épiderme, le derme et l'hypoderme (cf. Figure 2).

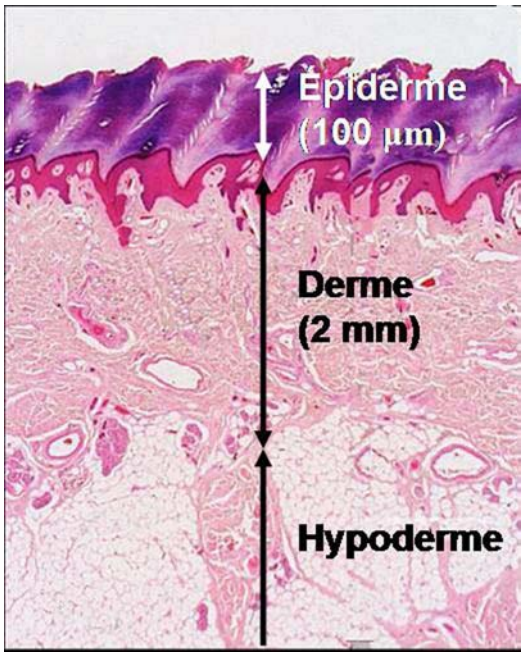


Figure 2 : Schéma d'une coupe histologique de peau humaine avec dimensions typiques des trois couches. Iconographie adaptée du site *web* de la *School of Anatomy and Human Biology, The University of Western Australia*.

L'interaction entre ces 3 couches est importante au cours du développement embryonnaire et dans le maintien de l'homéostasie à l'âge adulte mais elles vont être traitées séparément par la suite.

1.1.1. L'épiderme[2]

L'épiderme est un épithélium stratifié en continuelle régénération qui présente une différenciation progressive (kératinisation) dans la direction transversale et dans le sens des couches basales vers les couches superficielles. L'épiderme comprend plusieurs types cellulaires qui ont des origines embryonnaires diverses :

- kératinocytes
- mélanocytes
- cellules de Langerhans
- cellules de Merkel

Le kératinocyte est le type cellulaire majoritaire au sein de l'épiderme. Environ 90 à 95% des cellules épidermiques sont des kératinocytes qui proviennent de l'ectoderme superficiel au cours des premières semaines du développement de l'implantation embryonnaire. La structure d'un kératinocyte individuel est corrélée avec sa position dans l'épiderme et son état de différenciation. Tous les kératinocytes contiennent des filaments de kératine de 8 à 10 nm de diamètre. Ces kératines s'organisent en réseaux qui croissent au travers du cytoplasme entre l'enveloppe nucléaire et les desmosomes (jonctions cellulaires). Elles remplissent un rôle structural (cytosquelette).

Les couches de l'épiderme

Les kératinocytes sont organisés en plusieurs couches qui correspondent à différentes étapes de différenciation (cf. Figure 3):

- basale
- spineuse
- granuleuse
- cornée

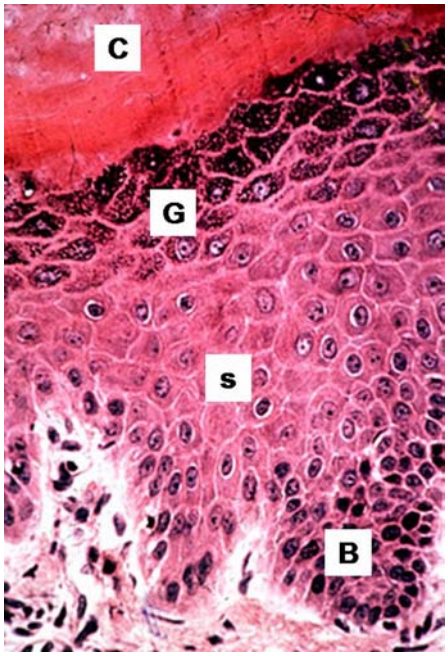


Figure 3 : Photographie d'une coupe histologique marquée à l'Hématoxyline et à l'Eosine (H&E) de peau humaine et montrant les couches cellulaires au sein de l'épiderme correspondant aux différents stades de maturation des kératinocytes. C : couche Cornée, G : couche Granuleuse, S : couche Spineuse, B : couche Basale. Iconographie disponible sur le site *web* du CHU de la Pitié-Salpêtrière (Paris).

Ce processus de différenciation, connu sous le nom de kératinisation ou « cornification » est programmé génétiquement et consiste en une série régulée d'évènements métaboliques et morphologiques.

La kératinisation inclut :

- la perte de la propriété de prolifération
- un accroissement de la taille cellulaire et un aplatissement cellulaire
- la formation de nouveaux organelles en même temps qu'une réorganisation structurale d'organelles déjà présents et une perte éventuelle de certains d'entre eux
- la synthèse de nouvelles protéines ou de nouveaux lipides
- une modification des propriétés plasmatiques et membranaires, des récepteurs et antigènes de la surface cellulaire
- une déshydratation

Le point final du processus de kératinisation est une cellule terminale différenciée et morte : le cornéocyte. Il contient des filaments de kératine, des protéines matricielles et une membrane plasmique renforcée en protéines associés à des lipides de surface. Les cornéocytes, kératinocytes matures ayant perdu leur noyau, constituent le *stratum corneum*, barrière mécanique et clinique de la peau.

L'étude des anomalies de différenciation de l'épiderme a permis la compréhension de la régulation du processus de kératinisation.

La couche basale, appelée de manière plus formelle « *stratum germinativum* », est principalement constituée de kératinocytes en activité mitotique et de cellules migrantes. Les kératinocytes basaux contiennent de fins réseaux de filaments de kératine, rendant le cytosquelette suffisamment flexible pour permettre la division et la migration. Les kératinocytes basaux sont structurellement et fonctionnellement associés à la membrane basale sous-jacente via les hémidesmosomes. Cette interaction permet l'intégrité structurale de l'épiderme et produit des signaux régulateurs contrôlant la prolifération, la migration et la différenciation des kératinocytes.

Il y a hétérogénéité dans le potentiel prolifératif des kératinocytes basaux : 3 types cellulaires ont été identifiés principalement sur la base de leur potentiel clonogénique. Environ 10% des kératinocytes basaux sont des cellules souches, c'est-à-dire des cellules à longue vie, avec un cycle lent et une courte phase S (divisions peu fréquentes). Les cellules souches ont un potentiel clonogénique élevé et se divisent pour produire une cellule fille destinée à se différencier et une autre cellule fille qui reste dans la couche basale en tant que cellule souche. **C'est cette population de cellules souches qui est la cible de l'accumulation de mutations génétiques délétères, causées par exemple par une exposition au rayonnement solaire, associées aux néoplasies.** La 2ème population est constituée des cellules filles amenées à se différencier. Il s'agit de cellules en cours d'amplification et de transit qui subiront un nombre limité de divisions supplémentaires dans la couche basale ou supra-basale. La 3ème population de cellules basales qui en représente 5 à 10% sont des cellules en cours de différenciation post-mitotique. Ces cellules expriment les marqueurs de différenciation tels l'involucrine et le K10.

Il a été estimé que, chez l'homme, une fois que le kératinocyte quitte la couche basale, son temps normal de transit vers le *stratum corneum* est d'au moins 14 jours et son transit dans le stratum corneum et sa desquamation requièrent 14 autres jours.

La population des cellules souches peut être identifiée et isolée sur la base d'une forte expression de marqueurs comme les intégrines β1. Cette caractéristique unique de longévité et de clonogénécité est tout à fait remarquable au sein de l'épiderme qui est un tissu en continuelle régénération.

La couche spineuse Le *stratum spinosum* est appelé ainsi à cause de l'apparence histologique des kératinocytes qui y séjournent (cf. Figure 4).

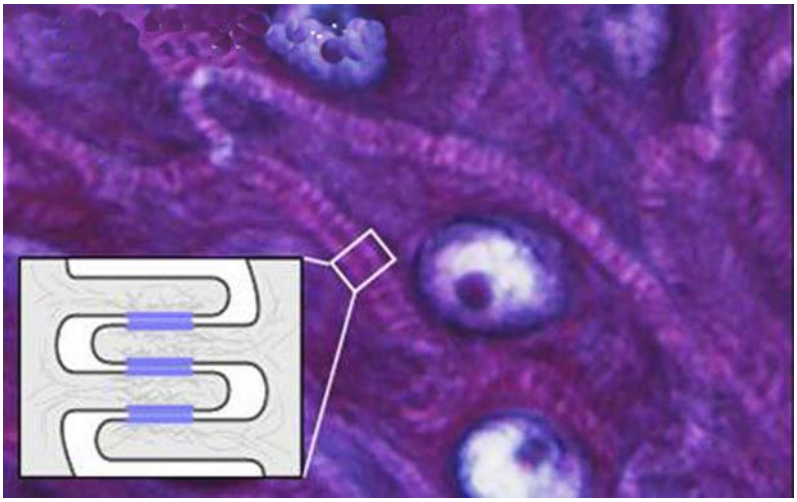


Figure 4 : Photographie montrant la morphologie des kératinocytes au sein de la couche spineuse (*stratum spinosum*) de l'épiderme, appelée ainsi à cause de l'apparence des jonctions intercellulaires (desmosomes) en forme d'épines. Iconographie adaptée du site *web* de la *School of Anatomy and Human Biology, The University of Western Australia*.

La couche granuleuse

Deux à trois couches de cellules granuleuses peuvent être distinguées grâce à leurs grains de kératohyaline basophiles cytoplasmiques caractéristiques.

La couche transitionnelle

Il existe une transition abrupte entre la cellule granuleuse et le kératinocyte totalement différencié. La cellule granuleuse non seulement synthétise, modifie et entre-croise les protéines impliquées dans la kératinisation mais commande aussi son propre programme de destruction (apoptose) grâce à plusieurs enzymes qui provoquent la destruction de certains organelles, notamment le noyau.

Le *stratum corneum*

Le *stratum corneum* joue à la fois un rôle de barrière principale de la peau (contre la perte en eau et la pénétration de substances provenant de l'environnement) et de protection mécanique. Il est composé de plusieurs couches de « cornéocytes », kératinocytes totalement différenciés et non-viables. Comme indiqué sur les Figures 5 a) et b), l'épaisseur du *stratum corneum* varie considérablement entre le dessus du bras (15 couches cellulaires) et les régions palmaires (plusieurs centaines de couches cellulaires).

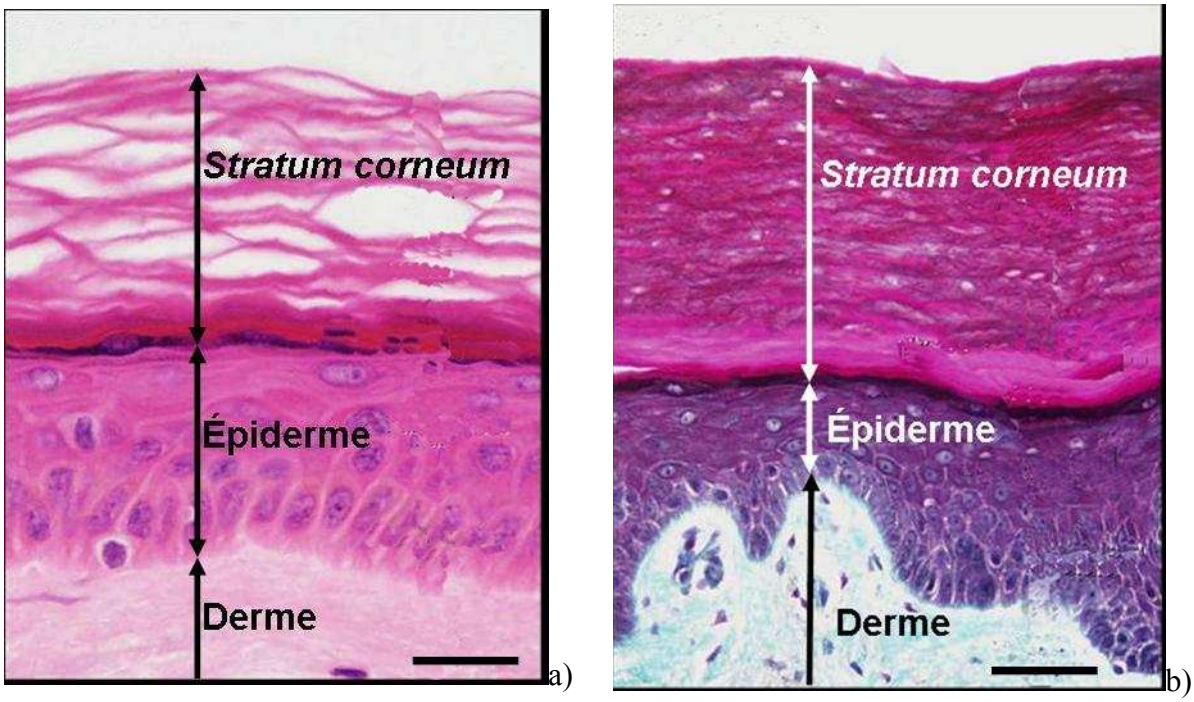
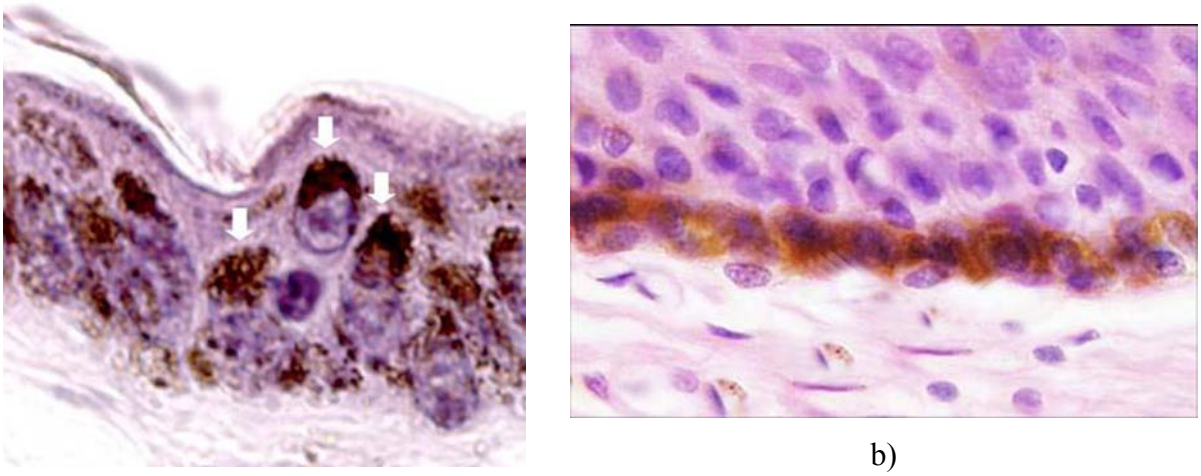


Figure 5 : Photographies de coupes histologiques de peau humaine marquée à l'Hématoxyline et à l'Eosine (H&E) montrant la variabilité régionale de l'épaisseur de la couche cornée : a) Peau fine, barre d'échelle = 50 µm, b) Peau épaisse, barre d'échelle = 100 µm. Iconographie adaptée du site *web* de la *School of Anatomy and Human Biology, The University of Western Australia*.

En plus de cette variabilité régionale, l'épaisseur du *stratum corneum* varie en fonction du sexe, de l'âge et des maladies éventuelles. La fonction de barrière provient du système à deux compartiments, aussi nommé le modèle « de la brique et du ciment » : les briques étant les cornéocytes riches en protéines et pauvres en lipides, entourées de ciment qui est la matrice extra-cellulaire lipidique continue. Le cornéocyte est le plus grand des kératinocytes et est aplati. La forme et les propriétés du cornéocyte sont adaptées au maintien de l'intégrité du *stratum corneum*, permettant cependant la desquamation. La modification de la structure, de la fonction et de la composition des kératinocytes se produit au fur et à mesure qu'ils migrent vers la surface externe de la peau. Les cellules des couches profondes du *stratum corneum* aussi appelé « *stratum compactum* » sont plus épaisses et contiennent des fibres de kératine denses et parallèles, constituant une enveloppe cellulaire cornée plus fragile. Comparées aux couches supérieures du *stratum corneum*, les couches profondes ont une faible capacité à se lier aux molécules d'eau. Les cellules du *stratum corneum* extérieur ont une enveloppe rigide cornée et subissent une dégradation protéolytique des desmosomes. Ces modifications contribuent à une desquamation des couches superficielles faisant en sorte que cette zone de l'épiderme est parfois appelée « *stratum dysjunctum* ».

Le mélanocyte est le deuxième type cellulaire de l'épiderme. Les mélanocytes sont des cellules productrices de mélanine et originaires de la crête neurale du stade embryonnaire. Après la naissance, une fois que les mélanocytes sont établis dans l'épiderme, ils créent des dendrites qui les relient aux kératinocytes. Ces dendrites permettent le transfert du pigment vers les kératinocytes voisins (cf. Figure 6 a et b).



a) b)

Figure 6 : Photographies de coupes histologiques de peau humaine montrant la localisation de la mélanine au sein de l'épiderme.
a) Flèches blanches : mélanine contenue dans les kératinocytes après transfert par les mélanocytes. Cette mélanine qui absorbe le rayonnement ultraviolet se place au dessus du noyau des kératinocytes agissant comme un parasol protegeant l'ADN du rayonnment ultraviolet. Illustration tirée de Weinberg R.A. *The biology of Cancer*, Garland Science, Taylor and Francis Group LLC, éd. (New York, 2007) et empruntée à D.E. Fisher.
b) Pigment visible au sein des mélanocytes dans la couche basale. Iconographie adaptée du site *web* de la *School of Anatomy and Human Biology, The University of Western Australia*.

Le corps cellulaire du mélanocyte s'étend souvent vers le derme sous le niveau de la couche basale mais reste toujours au dessus de la *lamina densa*. Les mélanocytes établissent des contacts avec les kératinocytes de la couche basale et des couches supérieures mais ne forment jamais de jonctions avec eux, à aucun niveau. De récentes études[3] ont montré que les E-cadhérines sont les molécules par lesquelles les mélanocytes et les kératinocytes adhèrent entre eux. La différenciation des mélanocytes est corrélée avec l'acquisition de leurs fonctions premières : la mélanogenèse, l'arborisation et le transfert des pigments vers les kératinocytes. La formation des dendrites est cruciale dans la biologie du mélanocyte car un mélanocyte transfert ses mélanosomes (organelle contenant le pigment) à environ 36 kératinocytes : ils forment ensemble une unité épidermique de mélanisation.

Le mélanosome est l'organelle caractéristique du mélanocyte. Sa taille conditionne le fait qu'il sera ou non dégradé au sein du kératinocyte, conditionnant ainsi la couleur de la peau. Les mélanosomes impliqués dans la synthèse de l'eumélanine noire ou marron sont

elliptiques. Les mélanosomes qui synthétisent la phéomélanine rouge ou jaune ont une forme sphérique. La taille des mélanosomes est déterminée génétiquement ; souvent les peaux noires contiennent des mélanosomes de taille plus importante que les peaux moins pigmentées. La famille de maladies appelées « albinisme oculo-cutané » provient de lésions génétiques dans les gènes codant pour les protéines spécifiques aux mélanosomes et impliquées dans la synthèse de mélanine.

Le transfert des mélanosomes est stimulé par les ultraviolets et par des hormones telles que la MSH (*Melanocyte Stimulating Hormone*) produite par les kératinocytes. Une fois au sein des kératinocytes, les mélanosomes existent soit individuellement soit au sein d'agrégats entourés par une membrane. La distribution des mélanosomes au sein des kératinocytes varie en fonction de la race. Les mélanosomes au sein des kératinocytes sont dégradés par des enzymes lysosomales au fur et à mesures que les cellules se différencient et migrent vers la surface. Quelques rares mélanosomes peuvent parfois être identifiés au niveau du *stratum corneum* mais ils ne sont alors plus contenus dans une membrane.

Les cellules de Langerhans sont les cellules présentatrices des antigènes de l'épiderme. Il s'agit de cellules dendritiques qui résident dans la couche supra-basale de l'épiderme et qui ne sont pas propres à l'épiderme ; on les retrouve dans d'autres épithéliums tels que ceux de la cavité orale, de l'oesophage, du vagin, mais aussi dans le derme. Elles représentent environ 2 à 8% de la population cellulaire de l'épiderme et s'attachent aux kératinocytes via les récepteurs à E-cadhérines. Elles proviennent de la moelle osseuse tôt au cours du développement embryonnaire et résident dans l'épiderme pour un temps durant lequel elles gèrent et présentent les antigènes de l'épiderme. Suite à un processus inflammatoire spécifique, les cellules de Langerhans de l'épiderme migrent vers les ganglions où les cellules T sont stimulées. La capacité des cellules de Langerhans à présenter les antigènes est diminuée par les ultraviolets *in vitro* et *in vivo*.

Les cellules de Merkel sont les cellules neuro-endocrines de l'épiderme et du derme. Elles assurent un rôle de mécano-récepteur et contribuent au développement du plexus nerveux dans le derme supérieur. Elles joignent les kératinocytes par l'intermédiaire de desmosomes.

Jonction dermo-épidermique

La lame basale qui constitue la jonction dermo-épidermique assure l'ancrage de l'épiderme sur le derme. Elle consiste en un feuillet plan continu essentiellement composé de collagène IV assurant l'adhésivité des épithéliums et se polymérisant selon un réseau sur lequel se greffent glycoprotéines (laminines) et protéoglycanes.

1.1.2. Le derme[4]

Le derme, composante conjonctive de la peau, est développé selon un plan sous-épidermique. La solidité, la compliance et la perméabilité cutanée s'expriment dans le derme réticulaire (cf. Figure 7) où siègent les compartiments péri-vasculaire et péri-lymphatique qui régissent échanges trophiques et flux cellulaires et moléculaires de l'inflammation et de l'immunité.

Les cellules conjonctives, résidentes comme les fibroblastes, ou recrutées comme les lymphocytes, baignent sans lame basale dans le fluide matriciel.

La trame collagénique (de types I et III) est majoritairement constituée de longues fibres peu flexibles de section régulière sur toute leur longueur (diamètre de 50 à 100 nm pour les plus fines et les plus épaisses respectivement). Les fonctions de soutien et de compliance sont assurées par la trame collagénique et l'arborescence élastique. Dans le derme papillaire et superficiel, cette trame comble les replis papillaires sous épithéliaux.

Le derme réticulaire est abondamment vascularisé dans sa partie la plus superficielle ; les fibres de collagène y sont assemblées en faisceaux denses regroupant un nombre de fibres croissant avec la profondeur. Faisceaux collagéniques et fibres élastiques étant liés entre eux, leurs quantités respectives au sein du derme sont donc à peu près équivalentes. Les fibres élastiques, les fibroblastes et leurs expansions cytoplasmiques sont attachés, en tension, aux faisceaux collagéniques. La force résistante du derme est classiquement attribuée à l'organisation fasciculée des fibres de collagène où le type I est majoritaire.

Les monocytes, macrophages et dendrocytes dermiques constituent un groupe hétérogène de cellules qui constituent le système phagocytaire de cellules mononucléaires de la peau. Deux sous-groupes peuvent être identifiés : le sous-groupe monocytes-macrophages et celui des cellules dendritiques.

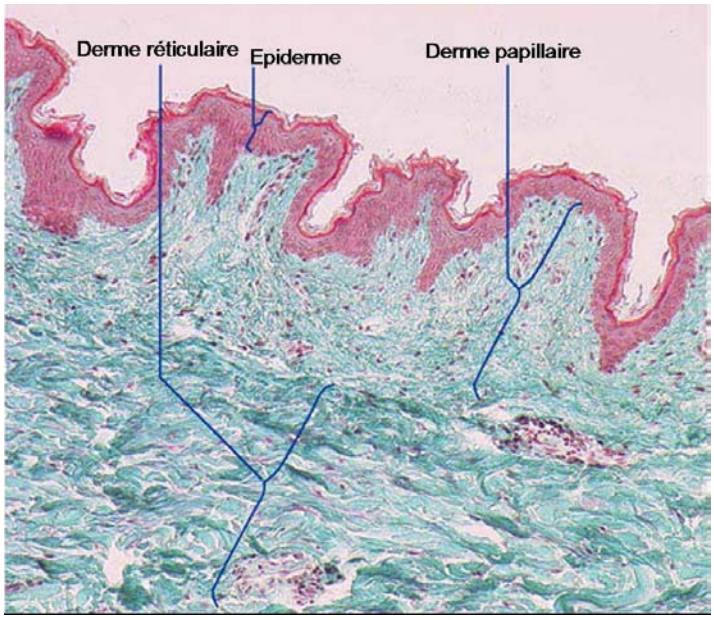


Figure 7 : Photographie de coupe histologique (coloration Goldner) de peau humaine sur laquelle on distingue le derme papillaire avec des fibres collagènes lâches et le derme réticulaire fibreux. Iconographie disponible sur le site *web* de l'unité d'anatomie de l'Université de Fribourg, Suisse.

1.1.3. L'hypoderme

Le tissu hypodermique sert à l'isolation de l'ensemble du corps, est utilisé comme réserve énergétique, protège la peau et permet sa mobilité par rapport aux structures sous-jacentes. La frontière entre derme réticulaire profond et hypoderme est abrupte entre un derme conjonctif principalement fibreux à une région sous-cutanée riche en adipocytes. Les deux structures sont cependant structurellement et fonctionnellement imbriquées grâce aux réseaux vasculaires et nerveux et aux appendices épidermiques. Les follicules pileux en phase active de croissance s'étendent jusque dans la graisse sous-cutanée et les glandes apocrines et écrines de transpiration sont normalement confinées dans ces profondeurs cutanées. Les adipocytes originaires du mésenchyme sont les principales cellules de l'hypoderme et sont regroupées en lobules.

La majorité des lésions cancéreuses de la peau se développent au sein de l'épiderme. Comme décrit précédemment, les deux types cellulaires les plus fréquents au sein de l'épiderme sont les kératinocytes et les mélanocytes. Comme nous allons le voir dans le paragraphe suivant, chaque type cellulaire donne lieu à un type de lésion appelé respectivement kératinocytaire et mélanocytaire.

1.2. Cancers de la peau et stades précancéreux

1.2.1. Épidémiologie

Dans son ouvrage consacré aux tumeurs cutanées[5], l'Organisation Mondiale de la Santé recense 7 types de tumeurs, par ordre de fréquence décroissante :

- les tumeurs kératinocytaires
- les tumeurs mélanocytaires
- les tumeurs d'annexes
- les tumeurs hématolymphoïdes
- les tumeurs des tissus mous
- les tumeurs neurales
- les syndromes tumoraux héréditaires

Nous nous limiterons ici à l'épidémiologie descriptive des deux types de cancers cutanés les plus fréquents.

Les cancers kératinocytaires

Les cancers kératinocytaires incluent principalement les carcinomes baso-cellulaires et les carcinomes épidermoïdes (CE) aussi appelés « spino-cellulaires ». Ces deux formes de cancers sont souvent regroupées sous l'appellation « tumeurs cutanées non mélanocytaires ». Ce sont les lésions malignes les plus fréquemment diagnostiquées dans les populations à peau claire mais elles sont relativement peu dangereuses. La forme basocellulaire ne donne pas de métastase et la forme épidermoïde évolue lentement. En France, deux registres départementaux des cancers ont systématiquement recueilli les cancers cutanés, respectivement depuis 1983 (Doubs) et 1991 (Haut-Rhin)[6]. Ces données montrent une augmentation importante de l'incidence des deux types principaux de carcinomes, une plus grande fréquence à âge égal chez l'homme (plus marquée pour les CE) et une prédominance d'un facteur 3 à 6 (plus marquée chez la femme) des carcinomes basocellulaires sur les CE.

Entre 1980 et 1983, une moyenne de 547 décès par an ont été attribués en France à des cancers cutanés différents du mélanome. Entre 2000 et 2003, ce chiffre était de 492 par an, alors qu'on notait un doublement des décès par mélanome. Parallèlement, la population âgée s'est accrue. Les taux de mortalité standardisés sur la population européenne se sont améliorés, passant de 1,1 à 0,7 pour 100 000 personnes par an chez l'homme et de 0,6 à 0,4 chez la femme. Ces données témoignent probablement de l'amélioration de la prise en charge des carcinomes chez le sujet âgé.

Les cancers mélanocytaires

Le mélanome est le type le plus grave des cancers cutanés. En 2000, on estimait à 7200 le nombre de cas de mélanomes cutanés invasifs en France. Ce chiffre représentait 2,6% de l'ensemble des cancers incidents et 58% des cas étaient féminins[7]. Les taux d'incidence atteints en 2000 (cf. Tableau I) placent le mélanome au 9ème rang des cancers de la femme et au 13ème rang des cancers de l'homme (carcinomes cutanés exclus)[6]. L'augmentation de l'incidence des dernières décennies est due à l'exposition solaire estivale et aux coups de soleil durant la petite enfance. En France, seul le registre départemental du Haut-Rhin fournit des données basées sur la population depuis 1988. Ces données montrent que l'augmentation de l'incidence du mélanome s'accompagne d'une augmentation de la proportion des mélanomes peu épais. La proportion des mélanomes de moins de 1,5 mm d'épaisseur parmi l'ensemble des mélanomes diagnostiqués est passée de 57% durant la période 1988-1990 à 65% durant la période 1997-1999. Cette amélioration de la précocité du diagnostic peut être attribuée au dépistage et à l'information du public. Parallèlement, la proportion de mélanomes épais diminuait, mais leur nombre absolu continuait d'augmenter modérément (cf. Figure 8).

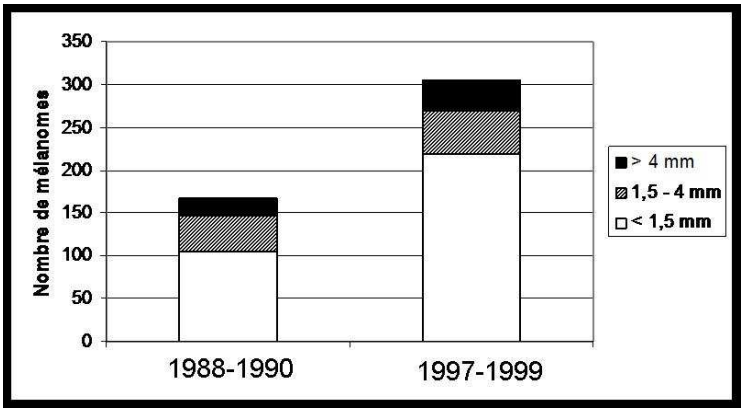


Figure 8 : Évolution de l'indice de Breslow des mélanomes diagnostiqués en France entre 1988 et 1990 et entre 1997 et 1999[6].

Entre 1969 et 1997, le taux de mortalité par mélanome en France a été multiplié par 2,7 chez la femme et par 2,9 chez l'homme. Comme indiqué dans le Tableau I, l'augmentation de la mortalité a été plus lente que celle de l'incidence. La surmortalité masculine observée dès le début de la période s'est accentuée, contrastant avec les taux d'incidence supérieurs chez les femmes. Depuis le début des années 1990 chez la femme et la fin des années 1990 chez l'homme, on assiste à une stabilisation des taux de mortalité standardisés : autour de 1,6/100000 personnes/années chez l'homme et 1,1 chez la femme. Les taux d'incidence et de

mortalité liés au mélanome augmentent régulièrement avec l'âge. Avant 65 ans, l'incidence est supérieure chez la femme, puis elle devient supérieure chez l'homme. L'excès de mortalité masculine devient net vers 50 ans et s'accroît nettement chez l'homme âgé. Ces différences restent principalement expliquées par une épaisseur moyenne au diagnostic plus élevée chez l'homme que chez la femme. D'autres facteurs comme le siège (fréquence des mélanomes du tronc chez l'homme) semblent également intervenir.

Tableau I : Evolution de l'incidence du mélanome cutané et de la mortalité par mélanome en France, dans les deux sexes. Nombre de cas pour 100 000 habitants par an[6].

	1980		1990		2000	
	Incidence	**Mortalité**	**Incidence**	**Mortalité**	**Incidence**	**Mortalité**
Hommes	2,4	0,9	4,3	1,2	7,6	1,6
Femmes	3,9	0,8	6	1	9,5	1,1

1.2.2. Etiologie

Au cours des vingt dernières années, les facteurs de risque pour les cancers cutanés ont été très largement étudiés et en général, ces facteurs de risque se classent en 3 catégories :

- facteurs de susceptibilité de l'individu souvent liés à la couleur de la peau et des cheveux et la sensibilité au rayonnement solaire. Ces facteurs de susceptibilité sont exprimés dans la classification de Fitzpatrick qui définit différents phototypes de peau (cf. Tableau II[8]).
- facteurs environnementaux : le rayonnement ultraviolet (UV) naturel (solaire) ou artificiel (lampes à bronzer notamment)
- les grains de beauté et les naevi : ces facteurs semblant être directement liés aux susceptibilités individuelles et à l'exposition solaire.

Tableau II : Phototypes de peau définis par Fitzpatrick. DEM : Dose Erythémateuse Minimale. Adapté de *Astner et al., 2003*[8]

Phototype	Coups de soleil et historique de bronzage (définit le phototype)	Bronzage immédiat	Bronzage à long terme	Couleur de peau (peau non exposée (fesses)	DEM UVA (mJ/cm²)	DEM UVB (mJ/cm²)
I	Brûle facilement, ne bronze jamais	Aucun -	Aucun -	Blanc ivoire	20-35	15-30
II	Brûle facilement, bronze très peu et avec difficulté	Faible ± ± à +	Minimal à faible ± à +	Blanc	30-45	25-40
III	Brûle modérément, bronze modérément et uniformément	Bien défini +	Faible +	Blanc	40-55	30-50
IV	Brûle peu, bronze modérément et facilement	Modéré + +	Modéré + +	Beige-Olive, légèrement bronzé	50-80	40-60
V	Brûle rarement, bronze beaucoup	Intense (marron) + + +	Intense, marron foncé + + +	Marron clair ou bronzé	70-100	60-90
VI	Ne brûle jamais, bronze beaucoup	Intense (marron foncé) + + +	Intense, marron foncé + + +	Marron foncé ou noir	100	90-150

L'exposition au rayonnement solaire est le facteur étiologique environnemental principal des cancers de la peau. Le rayonnement ultraviolet induit d'une part, des lésions oxydatives des bases de l'ADN par le biais du stress oxydant qu'ils induisent[9, 10]. Il existe des mécanismes de réparation dont la mise en jeu est variable d'un individu à l'autre. Les infrarouges (IR) pourraient avoir un rôle protecteur, qui s'il a été évoqué lors d'études *in vitro*, n'a pas encore été établi *in vivo*[11, 12].

Les données épidémiologiques sur le rapport de cause à effet entre rayonnement UV et mélanome montrent qu'il existe un grand laps de temps entre l'exposition solaire dommageable et l'apparition de la tumeur maligne. De plus, il semble que les expositions solaires les plus dommageables soient celles subies durant l'enfance.

Une étude, portant sur l'âge auquel le CE est diagnostiqué, indique que la fréquence des expositions au soleil est le paramètre le plus corrélé à l'apparition des CE.

Ce délai dans l'apparition de la malignité « avérée » ainsi que la nécessité de recommandations de prévention appropriées ont accru l'intérêt de l'étude des lésions précurseurs des cancers cutanés :

- les kératoses actiniques, comme lésions précurseurs des CE
- les naevi dysplasiques, dont certains peuvent être précurseurs de mélanomes[13].

Le paragraphe suivant va s'attacher à définir ce que sont les stades précancéreux.

1.2.3. États précancéreux et précoces du cancer

Les lésions précancéreuses présentent un grand intérêt car elles précèdent l'apparition des cancers et parce qu'elles se développent sur une longue durée. Elles sont donc la cible potentielle d'un dépistage qui doit permettre une diminution de la mortalité due au cancer.

Tableau III : Rappels de terminologie

Cancer	• Multiplication cellulaire autonome et anormale • Envahissement des structures de voisinage • Métastases
Tumeur[14]	terme non spécifique désignant une grosseur
Néoplasie[14]	processus d'expansion clonale du à des ratés dans le contrôle moléculaire qui régule la prolifération et/ou la mort cellulaire ; pouvant être bénigne ou maligne
Hyperplasie[14]	augmentation de la taille d'un tissu ou d'un organe due à l'augmentation du nombre de cellules. Elle peut être physiologique, compensatoire ou pathologique.
Métaplasie[14]	substitution adaptative d'un type tissulaire adulte par un autre type tissulaire. Sous stresse un type tissulaire plus vulnérable est remplacé par un autre type tissulaire plus capable de résister à ce stress
Dysplasie[14]	prolifération cellulaire anormale dans laquelle on retrouve la perte de l'architecture et de l'orientation normale associée à une irritation et une inflammation chronique. Ce terme est souvent employé dans le contexte des lésions prénéoplasiques/précurseurs du cancer

Cancer : une lésion est qualifiée de « cancéreuse » si elle présente un caractère invasif.

Précancer : le précancer regroupe toutes les lésions allant jusqu'au carcinome *in situ* inclus. Il est défini comme une lésion proliférative dysplasique pour laquelle le risque statistique d'évolution vers un cancer invasif est significativement élevé[15].

Tous les cancers ne sont pas précédés d'un précancer Il est fréquemment avancé que tous les cancers sont précédés d'un état de précancer. A l'encontre de cette notion, et contrairement aux autres formes de cancers cutanés, mélanomes ou carcinomes épidermoïdes, aucune lésion précancéreuse n'a jamais pu être mise en évidence pour le carcinome baso-cellulaire.

Le Tableau III rappelle la définition de plusieurs termes relatifs à des notions histologiques dont certains seront utilisés dans la suite de ce manuscrit.

Ces définitions décrivent mal à la fois la succession des évènements aboutissant au développement cancéreux et les caractéristiques d'un état précancéreux. L'examen anatomo-pathologique fournit une description morphologique qui ne reflète pas complètement les évènements moléculaires.

L'étude des lésions précancéreuses du cancer est importante pour plusieurs raisons :

- les études sur l'étiologie des états précancéreux identifient des facteurs de risque potentiellement modifiables dans l'environnement, qui peuvent ensuite être l'objet de mesures de prévention primaire.
- chez les sujets à risque, les états précancéreux, s'ils sont précisément identifiés, peuvent devenir la cible du dépistage et donc d'une prévention secondaire.
- enfin, l'étude des modifications moléculaires et génétiques rencontrées dans les états précancéreux apporte les connaissances fondamentales de la cancérogenèse.

Notre compréhension du développement et de la progression du cancer a beaucoup évolué lors des dernières décennies : détection plus précoce de la maladie, classification histo-pathologique plus précise et identification des altérations moléculaires. Cependant, de nombreux éléments manquent encore à notre connaissance pour comprendre l'ensemble du précancer. Prouver que le précancer est précurseur du cancer impose de montrer qu'un marqueur stable du précancer persiste dans le cancer, c'est-à-dire que le lignage cancer passe par un stade reconnaissable de précancer.

1.3. Diagnostic en cancérologie dermatologique

1.3.1. Méthodes actuelles

La Figure 9 illustre schématiquement la progression tumorale maligne en terme de nombre de cellules tumorales en fonction du temps. Ce schéma distingue les deux étapes essentielles de l'histoire naturelle de la maladie : le stade non-invasif (appelé « précancer ») et le stade invasif (avec phases infra-clinique puis symptômatique). Les chances de guérison et l'augmentation de l'espérance de vie des patients seront bien plus importantes si la maladie est détectée durant sa phase non-invasive et donc si la prise en charge peut être faite (précocément) à ce stade.

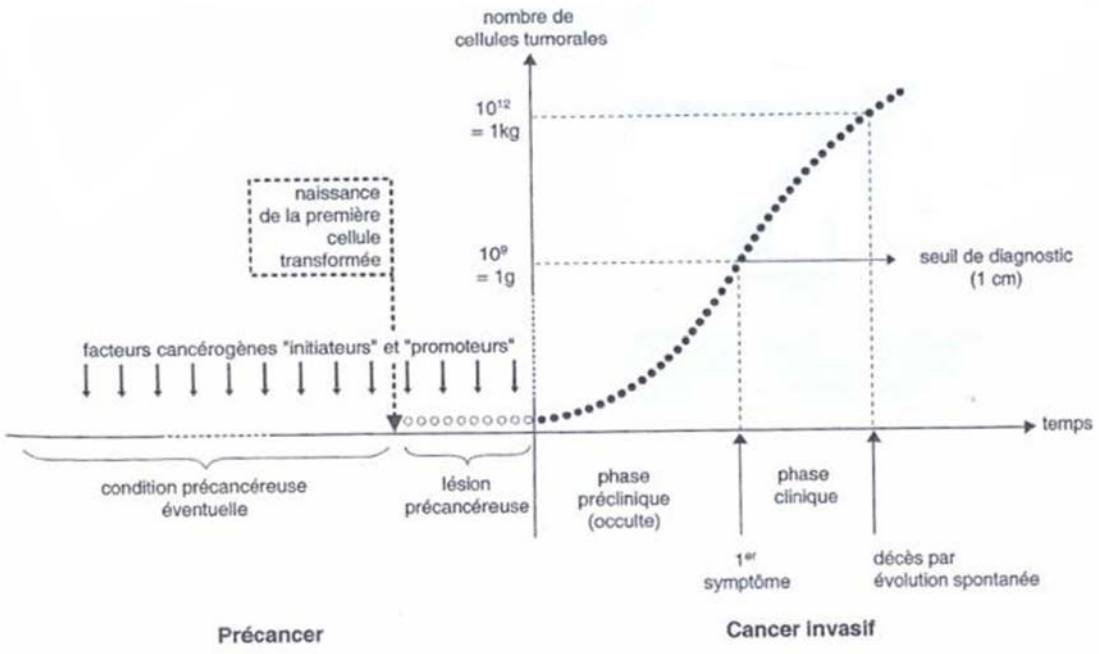


Figure 9 : Cancérogenèse. Figure tirée de Hoerni, 2006[16]

Dans le cas des lésions cutanées, l'examen clinique comportant l'inspection et la palpation est la base du diagnostic. D'autres examens peuvent compléter les données cliniques. Les deux techniques les plus utilisées sont[17] :

- L'examen à la loupe : microscopie de surface (dermatoscopie) en particulier pour le diagnostic des lésions pigmentaires comme le mélanome (cf. chapitre IV).
- L'échographie cutanée : évaluation de la configuration tri-dimensionnelle des lésions (épaisseur de mélanome notamment)

L'objectif de ces différents examens est de rassembler un nombre suffisant de paramètres pour permettre au clinicien de décider si la lésion justifie une biopsie pour caractérisation par anatomo-pathologie.

Biopsie et anatomo-pathologie

L'obtention de tout ou partie de la tumeur aux fins d'examen anatomo-pathologique est obligatoire pour le diagnostic du cancer. L'anatomo-pathologie est une discipline médicale qui étudie les lésions provoquées par les maladies ou associées à celles-ci, sur les organes, tissus ou cellules, en utilisant des techniques principalement basées sur la morphologie macroscopique et microscopique.

Les buts de l'anatomo-cytopathologie dans la pratique médicale sont :

- de contribuer à l'élaboration du diagnostic ou de proposer une hypothèse diagnostique.
- d'apporter des éléments utiles pour préciser le pronostic, en particulier dans le domaine de la pathologie tumorale.

- de contribuer à évaluer l'effet des thérapeutiques le cas échéant.

Comme illustré par la Figure 10, la technique de base menant à la confection des lames histologiques utilisées pour l'étude des tissus en microscopie comporte plusieurs étapes : la fixation, l'inclusion en paraffine, la confection de coupes et leur coloration.

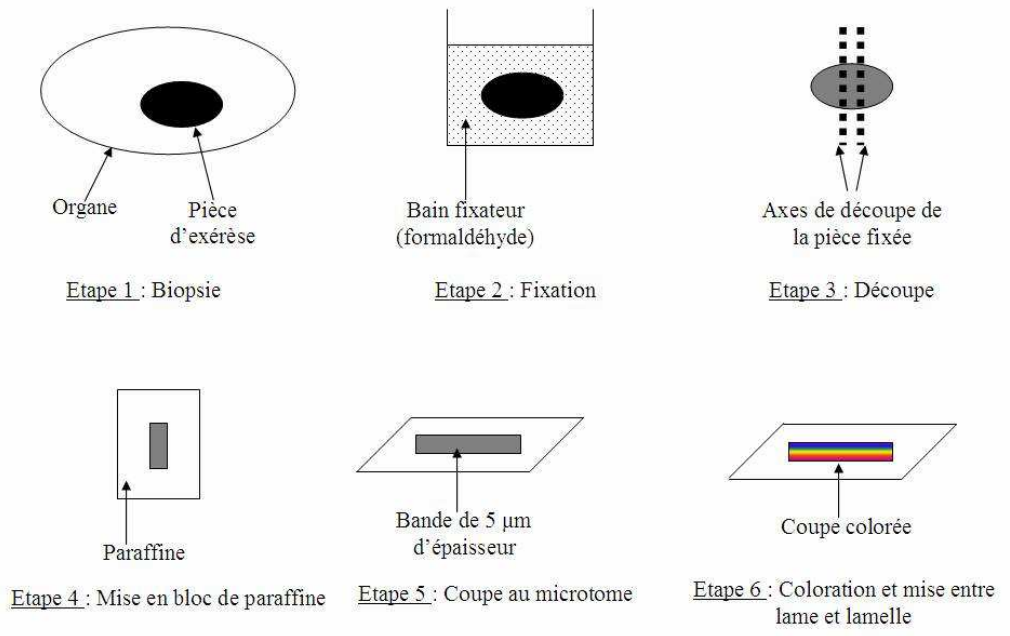


Figure 10 : Schéma illustrant le processus de préparation d'une biopsie (du prélèvement jusqu'à la lame histologique) dans le cas d'une étude histologique standard.

Indispensable pour conserver la morphologie cellulaire, la fixation doit être très rapidement réalisée dès l'obtention du prélèvement. La durée de la fixation dépend de la taille du prélèvement : au minimum 2 à 5 heures pour une biopsie et 48 heures pour une pièce opératoire. Le fixateur habituellement utilisé est le formol à 10% tamponné. Les prélèvements fixés sont déposés dans des cassettes en plastique. Les tissus contenus dans les cassettes sont déshydratés par passage dans des alcools, l'alcool est éliminé par des solvants (xylène) puis la paraffine liquide à 56° imprègne les tissus et est refroidie.

Le bloc solide de paraffine contenant le tissu est coupé grâce à un microtome, les coupes de 3 à 5 micromètres d'épaisseur sont étalées sur des lames.

La coloration usuelle associe un colorant basique nucléaire (hématéine, hématoxyline) et un colorant acide cytoplasmique (éosine, érythrosine, ou phloxine). La coupe colorée est protégée par une lamelle de verre collée ou par un film plastique transparent. Elle est analysée au microscope par un médecin anatomo-pathologiste qui établit un compte-rendu.

Morphologie

Les altérations génétiques et les troubles de la mitose sont responsables d'anomalies nucléaires et cytoplasmiques qui sont visibles microscopiquement et qui constituent les critères cytologiques de malignité.

- Anomalies nucléaires :

Taille : augmentation, inégalité (anisocaryose), pléomorphisme

Contenu : chromatine irrégulièrement répartie (mottes), hyperchromatisme

Forme : contours irréguliers, incisures

Nucléole : augmentation de taille, multiplicité, anomalies de forme

Mitoses : augmentation de nombre, anomalies de forme (mitoses tripolaires, asymétriques)

- Anomalies cytoplasmiques :

Diminution de taille : augmentation du rapport nucléocytoplasmique

Basophilie

Cependant, ces critères n'ont pas une signification unique. En effet :

- Des critères cytologiques de « malignité » peuvent être observés dans des tumeurs bénignes ou des processus non tumoraux (viroses, chimiothérapie, nécrose)
- Certaines tumeurs malignes très différenciées ne présentent que peu de critères de malignité.
- Enfin, l'intensité des anomalies cyto-nucléaires peut varier suivant les conditions techniques, d'une partie à l'autre d'une tumeur, et peut être jugée différemment suivant les observateurs.

Les critères cytologiques de malignité ne sont ni nécessaires, ni spécifiques des tumeurs malignes. Dans certains cas, le diagnostic d'une tumeur maligne repose sur :

- l'identification du type tumoral
- des signes histopathologiques d'envahissement local caractéristiques des tumeurs malignes (emboles tumoraux, envahissements des nerfs)
- la survenue de métastases.

Outre les techniques « standard » de l'anatomo-pathologie pour l'étude de la morphologie, des techniques complémentaires peuvent être utilisées telles que :

- l'immuno-histochimie, par exemple pour détrminer des éléments pronostiques (utilisation de l'anticorps Ki67 pour détecter l'antigène Ki67, marqueur de prolifération).

- l'histo-chimie, par exemple pour marquer les fibres élastiques (marquage de Weigert) ou pour distinguer l'hémosidérine du derme (coloration de Perls) des grains de mélanine.

Le stroma

Au delà d'une certaine taille (quelques millimètres), les foyers tumoraux induisent une adaptation de leur micro-environnement cellulaire et extra-cellulaire. Ces modifications des tissus péritumoraux aboutissent à la formation d'un tissu conjonctif et inflammatoire qui s'appelle le stroma. Le stroma fait partie de la tumeur et participe à sa biologie et à son aspect macroscopique et microscopique.

Le stroma comporte :

- des cellules conjonctives (fibroblastes ou myofibroblastes)
- des capillaires néoformés
- des cellules inflammatoires : lymphocytes, macrophages, etc.
- des fibres extra-cellulaires (fibres collagène et élastiques).

Le stroma a un rôle de soutien (charpente fibreuse) et de nutrition (angiogénèse). L'angiogenèse est particulièrement intéressante à connaître, car elle est indispensable à la croissance tumorale et nécessite une prolifération de cellules endothéliales dont les mécanismes, complexes, sont différents des mécanismes de prolifération des cellules tumorales. De nombreux essais thérapeutiques font appel à des substances inhibant l'angiogenèse pour freiner la croissance des foyers tumoraux ou mieux pour réduire leur volume.

Classification clinique des tumeurs

La nécessité d'une expression universelle des situations cliniques et de leurs conséquences pronostiques explique le développement de classifications cliniques, anatomocliniques et anatomopathologiques. Elles permettent un langage international commun indispensable à la comparaison des résultats thérapeutiques.

La classification clinique internationale la plus répandue est le système TNM de l'Union Internationale Contre le Cancer (UICC) :

- T, pour la tumeur primitive
- N, pour les adénopathies (= atteinte pathologique d'un ou plusieurs ganglions lymphatiques). *Nodes* en anglais.
- M, pour les métastases

Il s'agit d'une classification essentiellement clinique, adaptée aux caractéristiques anatomiques et topographiques de chaque localisation tumorale.

L'utilisation de cette classification permet de regrouper en stades (cf. Tableau IV) les présentations cliniques en fonction de leur curabilité potentielle et des grandes orientations thérapeutiques qui y correspondent.

Pour tenir compte de l'apport des données post-opératoires et anatomopathologiques, la classification TNM clinique peut être complétée par l'expression standardisée des constats chirurgicaux et/ou microscopiques. On parle alors de pTNM. Par ailleurs, une conotation « R » est utilisée après traitement pour exprimer l'existence ou non d'un résidu tumoral (cf. 2ème colonne du Tableau IV).

Au-delà des classifications cliniques, l'analyse antomo-pathologique des tumeurs utilise également des classifications pour exprimer les éléments morphologiques susceptibles d'aider à la caractérisation tumorale et à la prévision pronostique. Il est habituel d'établir le grade tumoral en exprimant la différenciation relative de la tumeur par rapport au tissu normal de référence (cf. 3ème colonne du Tableau IV).

Tableau IV : Nomenclature clinique de classification des lésions cancéreuses

Stades	Résidu tumoral	Grades
Stade I : T1 – N0 – M0	Rx : tumeur résiduelle non évaluable	Grade 1 : tumeur bien différenciée, comparable à l'organe normal de référence et en règle générale, d'évolutivité faible
Stade II : T2 et/ou N1 – M0	R0 : pas de tumeur résiduelle	Grade 2 : tumeur moyennement différenciée
Stade III : T3 et/ou N2 – M0	R1 : tumeur résiduelle microscopique	Grade 3-4 : tumeur peu différenciée, parfois difficile à rattacher à un tissu d'origine et généralement de forte évolutivité locale ou métastatique
Stade IV : T4 et/ou N3 et/ou M+	R2 : tumeur résiduelle macroscopique	

L'objectif de la recherche actuelle en matière de diagnostic de tumeurs cutanées est d'améliorer l'indication des exérèses-biopsies. L'idéal serait que seules les lésions véritablement dysplasiques ou cancéreuses soient biopsiées. En effet, il est estimé qu'actuellement 22% des lésions cutanées cancéreuses ne seraient pas biopsiées alors que des lésions bénignes le seraient dans un tiers des cas[18]. Or les faux négatifs laissent la lésion poursuivre son évolution risquant de devenir trop étendue pour être excisée facilement ultérieurement. Le délai entre la première consultation (signe d'alerte) et un diagnostic tardif peut laisser le temps à des métastases d'apparaître et laisse donc s'installer un risque d'issue fatale. Des indications de prélèvement pour lésions bénignes impliquent des procédures

inutiles coûteuses en temps et en argent, du stress et de la douleur pour les patients ainsi qu'une certaine morbidité.

Les méthodes dites « optiques » semblent prometteuses pour préciser les indications de biopsies. Ces méthodes se basent sur l'interaction entre la lumière et les tissus biologiques, qui sera décrite au paragraphe suivant. Contrairement aux rayons X, les rayons lumineux pénètrent peu profondément au sein des tissus biologiques. Cependant, la profondeur de pénétration des rayons lumineux, qui est de l'ordre de quelques dizaines (vers le « bleu ») et de quelques centaines (vers le « rouge ») de micromètres, est suffisante car cette profondeur correspond à l'ordre de grandeur de l'épaisseur d'un épithélium. Comme indiqué sur la Figure 11, le développement carcinomateux commence dans les couches profondes des épithéliums et de l'épiderme en particulier. La lumière réfléchie ou émise qui sera récupérée en surface de la peau permettra d'obtenir des informations sur l'état des couches profondes de l'épiderme et donc sur d'éventuelles néoplasies débutantes.

En fonction des modalités, les méthodes optiques permettent d'accéder à différents types d'informations (décrites plus loin : intensités spectrales, caractéristiques morphologiques invisibles à l'œil nu, etc.) que nous souhaitons plus objectives que l'appréciation visuelle. De tels paramètres permettront peut-être, à terme, d'améliorer la précision du diagnostic clinique menant ou non à une exérèse-biopsie et pourront être plus facilement exportables que l'expérience personnelle.

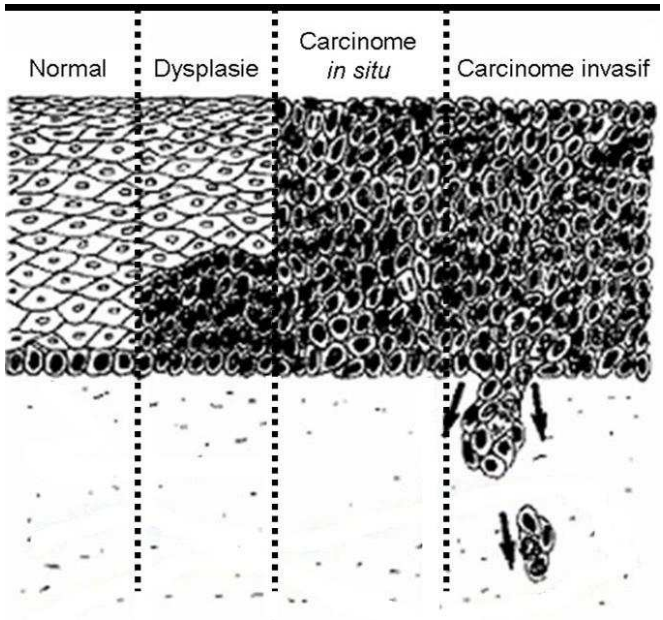


Figure 11 : Schéma de l'évolution cancéreuse typique d'un épithélium

1.3.2. Méthodes optiques de diagnostic

Rappels sur l'interaction lumière-tissus biologiques

Les tissus biologiques sont des milieux complexes, très hétérogènes, composés de structures et d'organites diffusants et absorbants. Leurs propriétés optiques varient notamment avec l'évolution cancéreuse. Comme décrit précédemment (cf. paragraphe précédent, § 1.3.1 consacré à l'anatomo-pathologie), les cellules et tissus cancéreux ont des propriétés morphologiques et fonctionnelles notablement différentes des tissus sains. L'enjeu est de pouvoir détecter ces transformations en profondeur (c'est-à-dire dès le début du développement cancéreux) grâce à la lumière réémise ou rétrodiffusée par les tissus. Comme pour tout milieu matériel, l'interaction lumière – tissu met en jeu trois phénomènes : la réflexion, l'absorption et la diffusion.

- La réflexion

La réflexion optique détermine quelle proportion de la puissance lumineuse va effectivement pénétrer dans le tissu. La fraction du flux d'énergie incident réfléchie à l'interface air-tissu, ou réflectivité, varie de 5 à 25% selon la nature du tissu et la longueur d'onde. Comme indiqué sur la Figure 12, lorsqu'un rayon lumineux arrive à l'interface de deux milieux d'indices de réfraction différents, il est en partie réfléchi et en partie transmis.

L'indice de réfraction est habituellement noté n et défini par :

$$n = c / v$$

c : la vitesse de la lumière dans le vide

v : la vitesse de la lumière dans le milieu en question

Le faisceau réfléchi forme un angle avec la surface du milieu égal à l'angle d'incidence.

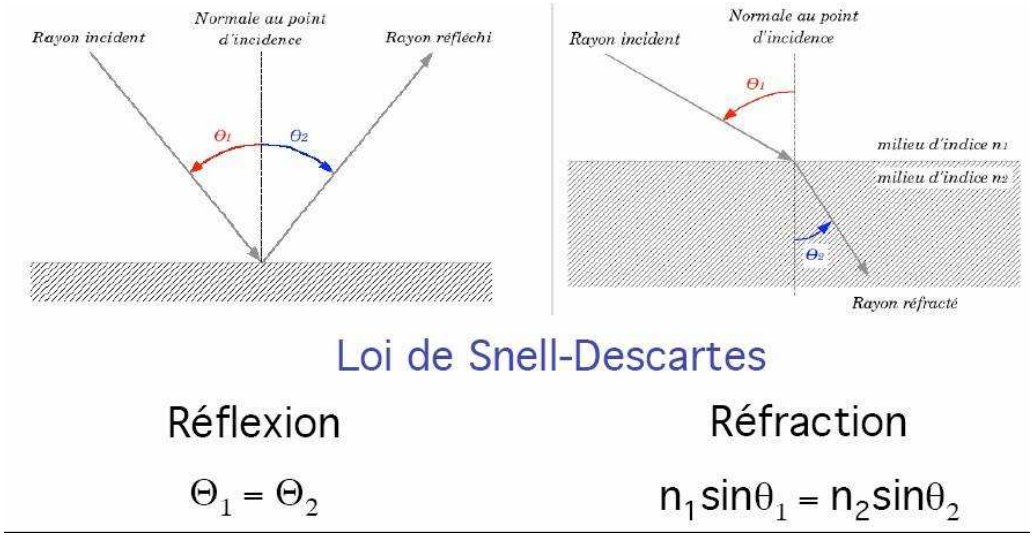


Figure 12 : Schéma de la loi de Snell-Descartes décrivant réflexion et réfraction d'un rayon lumineux à l'interface de milieux matériels d'indices de réfraction différents

Le tissu biologique contenant principalement de l'eau (n_{eau} = 1,33) et des protéines ($n_p \approx 1,6$), son indice de réfraction effectif varie entre 1,35 et 1,5. Il diminue avec l'augmentation de la longueur d'onde. Le Tableau V donne quelques exemples d'indice de réfraction d'éléments biologiques : *n* est donc généralement compris dans la plage [1,3-1,7] et dépend de la longueur d'onde. Par exemple, l'indice de réfraction du muscle de bœuf vaut 1,43 à 390 nm et 1,38 à 710 nm.

Tableau V : Indices de réfraction de matériaux biologiques

Milieu	Indice de réfraction (n)
Eau	1,33
Cytoplasme	1,37
Noyau	1,39
Membrane cellulaire	1,46
Lipides	1,46
Mélanine	1,7

Comme illustré sur la Figure 13, la réflexion est spéculaire ou diffuse en fonction de la rugosité de l'interface.

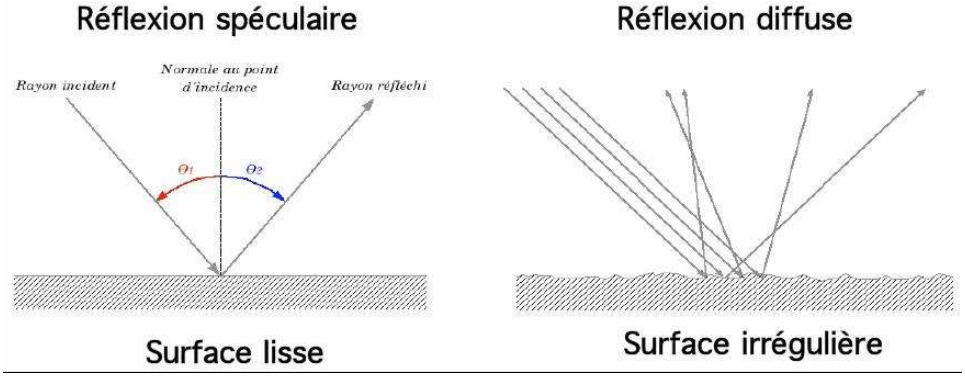


Figure 13 : Schéma de la réflexion spéculaire et diffuse en fonction de la rugosité de lasurface

La surface sera considérée comme optiquement lisse si la hauteur des irrégularités est inférieure à $\lambda/10$, soit 60 nm pour une longueur d'onde de 600 nm, ce qui n'est pas le cas de la peau, puisque les cellules mortes formant le *stratum corneum* ont une épaisseur typique de 600 à 800 nm. Ces cellules qui se détachent peu à peu introduisent plusieurs interfaces air/tissu et tissu/air, accroissant ainsi considérablement la réflectivité, qui peut alors atteindre des valeurs élevées dans la région bleu-vert du spectre (typiquement 20% à 520 nm) mais va diminuer rapidement avec la longueur d'onde. Toutefois, pour la plupart des tissus, un faisceau lumineux collimaté, tombant en incidence normale, subira une réflexion de l'ordre de 4% à 8% de 300 nm à 3000 nm. Pour une source diffuse et isotrope, la réflectivité s'élèvera à 8 - 10%.

Le taux de réflexion ou « réflectance » R dépend de :

- l'angle d'incidence (cf. Figure 14)
- du rapport des indices des deux milieux.

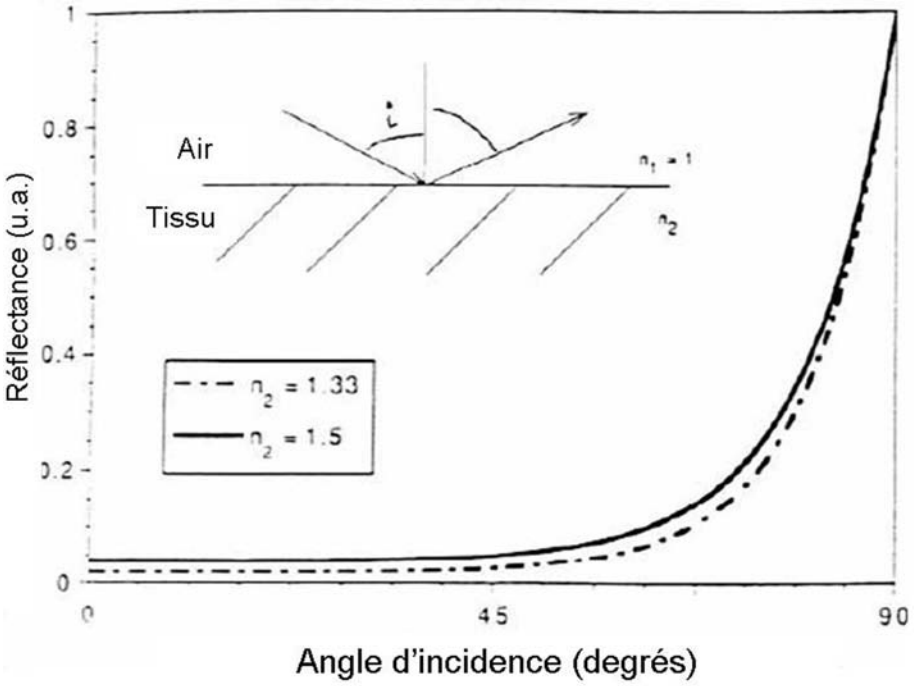


Figure 14 : Taux de réflexion en fonction de l'angle d'incidence du rayon lumineux à l'interface de deux milieux d'indices de réfraction différents

- L'absorption

Les composés biologiques des tissus qui absorbent la lumière sont appelés chromophores. Leur connaissance est essentielle car elle permet de choisir la longueur d'onde appropriée à la pénétration tissulaire recherchée. L'absorption dans les tissus vivants dépend principalement de l'eau, qui entre pour 80% dans leur composition, et de l'hémoglobine contenue dans les vaisseaux sanguins. Il faut y ajouter la mélanine dont le spectre d'absorption s'étend de l'ultraviolet jusqu'au proche infrarouge (cf. Figure 15).

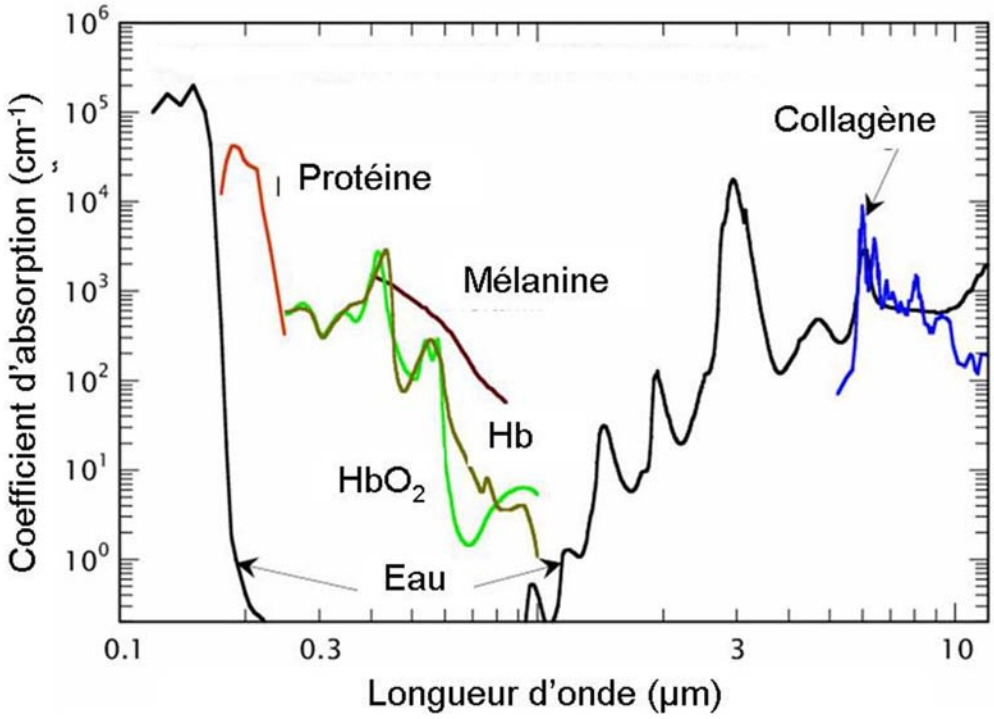


Figure 15 : Spectres d'absorption des principaux chromophores biologiques. Iconographie adaptée de Vogel *et al.*[19]

Dans l'ultraviolet, pour les longueurs d'onde inférieures à 280 nm, l'absorption, très importante, est due aux acides aminés et à l'eau. En conséquence, les profondeurs de pénétration dans l'ultraviolet sont extrêmement faibles, de l'ordre de quelques micromètres.

Dans le visible, l'absorption est principalement due à l'hémoglobine et à la mélanine. L'hémoglobine (oxyhémoglobine HbO_2 et désoxyhémoglobine Hb) présente un pic d'absorption dans le bleu autour de 415 nm et absorbe jusqu'au proche infrarouge. Le coefficient d'absorption de la mélanine décroît de façon exponentielle avec la longueur d'onde de l'ultraviolet (200 nm) jusqu'au proche infrarouge (1300 nm).

D'un point de vue microscopique, une molécule absorbe un photon si celui-ci véhicule une énergie qui permet à la molécule de passer dans un état excité. Ces phénomènes suivent les lois de la mécanique quantique ; il s'agit donc de phénomènes « discrets » (par opposition à « continus »). L'énergie absorbée peut être, après réorganisation interne, réémise sous forme de luminescence (fluorescence ou phosphorescence) ou dissipée pour augmenter la température interne du corps, qui devient alors source secondaire d'émission infrarouge (cf. Figure 16).

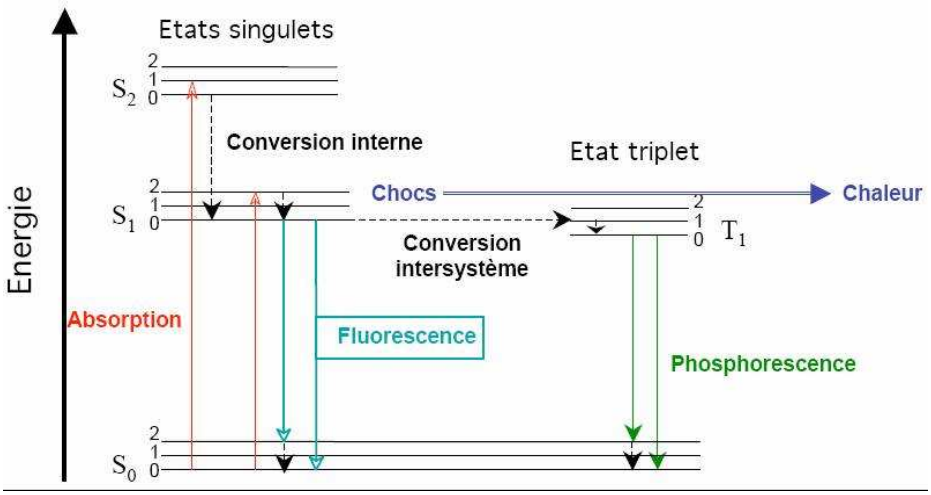


Figure 16 : Diagramme de Jablonski illustrant le phénomène d'absorption portant la molécule à un niveau d'énergie excité ainsi que les différentes voies de retour à l'état fondamental : soit par émission lumineuse (fluorescence ou phosphorescence) soit pas dissipation de chaleur.

D'un point de vue macroscopique, l'absorption est décrite par la loi de Beer-Lambert (cf Figure 17) qui considère un milieu homogène (non diffusant). La fraction d'intensité (dI) absorbée par une tranche d'épaisseur dz de ce milieu homogène est :

$$dI = I(z) - I(z+dz)$$

$$dI = - \mu_a I(z)\, dz$$

$$\text{d'où } I(z) = I(z=0) \exp(- \mu_a z)$$

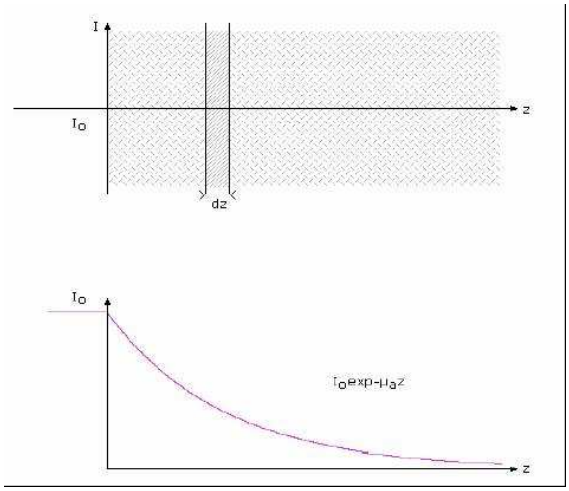


Figure 17 : Illustration de la loi de Beer-Lambert décrivant l'absorption de l'intensité lumineuse par un milieu homogène absorbant d'épaisseur dz et de coefficient d'absorption μ_a

μ_a (λ) : coefficient d'absorption (cm^{-1}) qui caractérise une molécule donnée à une longueur d'onde donnée. A la profondeur de pénétration $\delta = 1/\mu_a$, il reste 37% de l'intensité initiale.

- La diffusion élastique

La diffusion dans les tissus est causée par la présence de nombreuses hétérogénéités de tailles et d'indices de réfraction variés : les cellules et les tissus contiennent des centres diffusants de taille diverse allant de quelques nanomètres à plusieurs dizaines de micromètres (7-10 μm pour un noyau typique, 20-50 μm pour les cellules). Un grand nombre d'organites intra-cellulaires sont de dimension typique inférieure aux longueurs d'onde utilisées en optique (300-900 nm environ). La diffusion de la lumière par de telles particules est décrite par la théorie de Rayleigh et est caractérisée par une distribution angulaire isotrope. Quand les particules diffusantes sont de taille inférieure mais de même ordre que la longueur d'onde utilisée, on utilise l'approximation de Rayleigh-Gans. Cette approximation est particulièrement utile dans le cas de la diffusion par les organites intra-cellulaires tels que lysosomes ou mitochondries. Dans ce cas, la diffusion se fait essentiellement « vers l'avant » c'est-à-dire dans le sens d'incidence du rayonnement sur l'organite. La diffusion par une particule de taille plus grande que la longueur d'onde (noyaux par exemple) est décrite par l'approximation de Hulst et l'intensité est majoritairement comprise dans un cône de largeur λ/a (a étant la dimension typique de la particule diffusante)[20]. Il existe également une partie de l'intensité qui est rétro-diffusée mais elle est négligeable comparée à l'intensité qui est diffusée vers l'avant. Cette approximation donne des résultats similaires à ceux issus de la théorie de Mie qui concerne uniquement les particules sphériques.

Ainsi diffusions de Rayleigh et Mie coexistent, mais la taille moyenne des centres diffuseurs étant généralement de dimension égale ou supérieure à la longueur d'onde, la diffusion Mie l'emporte. Le coefficient de diffusion μ_s varie en λ^{-n} ($n< 4$) et décroît de façon monotone avec la longueur d'onde entre 350 et 950 nm. Pour les tissus mous, dans le domaine spectral du visible et de l'infrarouge, μ_s est compris entre 10 et 100 mm^{-1} ce qui signifie que le libre parcours moyen entre deux diffusions, $l_s = 1/ \mu_s$, varie entre 10 et 100 micromètres. La répartition spatiale de la lumière diffusée présente une forte anisotropie que l'on peut décrire par le paramètre g appelé anisotropie : $g = \langle \cos \theta \rangle$, valeur moyenne de l'angle de diffusion θ entre les rayons incident et diffusé, est compris entre 0,70 et 0,99 le plus souvent proche de 0,97 ce qui signifie que la diffusion "pointera" vers l'avant et que le volume irradié aura une forme oblongue (cf. Figure 18).

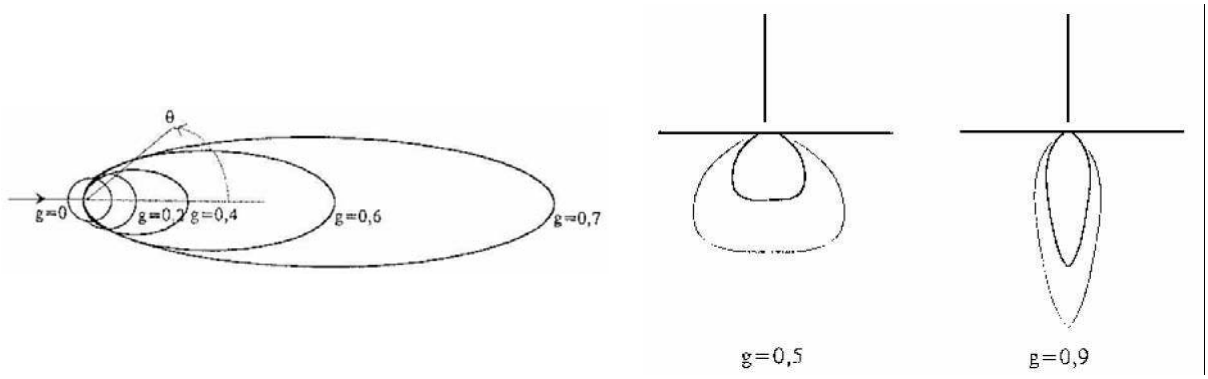


Figure 18 : Distribution angulaire de la diffusion en fonction de la valeur du paramètre d'anisotropie g.

L'action simultanée de l'absorption et de la diffusion détermine une région spectrale située entre 600 et 1200 nm où la transmission dans les tissus est maximum: la pénétration d'un faisceau lumineux peut atteindre plusieurs millimètres. Pour les longueurs d'onde inférieures à 600 nm, la profondeur de pénétration est inférieure au millimètre. Pour les longueurs d'onde inférieures à 1200 nm la pénétration est fortement limitée par l'absorption de l'eau. Les photons qui atteignent une profondeur supérieure à quelques dixièmes de millimètres ont tous été l'objet de diffusions multiples.

Les principaux centres diffuseurs de la peau sont :

- Les cellules plates du *stratum corneum* (kératinocytes matures appelés « cornéocytes » d'environ 1 µm d'épaisseur).
- Les granules de mélanine (0,3 à 0,8 µm) contenus dans l'épiderme
- Les fibres de collagène (20 à 100 nm)
- Les globules rouges
- Les noyaux des cellules : kératinocytes, mélanocytes, leukocytes, etc.

<u>Les méthodes optiques de diagnostic</u>

La lumière blanche utilisée pour la visualisation des lésions cutanées en dermatologie classique ou des épithéliums des organes creux en endoscopie conventionnelle ne permet que la détection du cancer à des états avancés de son histoire naturelle. Depuis une vingtaine d'années, un certain nombre de méthodes optiques, chacune basée sur un type d'interaction entre lumière et tissu biologique, ont été développées pour mettre en évidence des modifications morpho-fonctionnelles invisibles en lumière blanche :

- tomographie optique cohérente
- microscopie confocale fibrée
- spectroscopie

- ✓ de fluorescence
- ✓ de réflectance diffuse
- ✓ Raman

Parce qu'elle présente notamment l'avantage d'être facile à mettre en œuvre et peu coûteuse, nous avons choisi de nous consacrer à l'étude de la spectroscopie.

1.3.3. Méthodes spectroscopiques

La spectroscopie est aussi appelée « biopsie optique » en double-référence à l'utilisation qu'on souhaite en faire (établir un diagnostic à la manière de l'anatomo-pathologie) et à son caractère non-invasif (la lumière remplace le bistouri).

On parle souvent de spectroscopie « fibrée point par point » car, comme indiqué sur la Figure 19, cette technique se base sur l'utilisation de fibres optiques : une excitatrice et une ou plusieurs autres réceptrices. Cette sonde est posée au contact du tissu à examiner. Le volume tissulaire sondé est déterminé par les propriétés optiques du tissu (s'il est plus ou moins diffusant ou absorbant notamment), par la longueur d'onde (qui pénètre plus ou moins les tissus) et par les propriétés géométriques des sondes à fibres optiques utilisées : diamètre de cœur des fibres optiques, distances inter-fibres notamment. Pour donner une idée du volume typique sondé : surface (disque d'1 mm de diamètre) x profondeur (100 µm) = 0 ,078 mm^3.

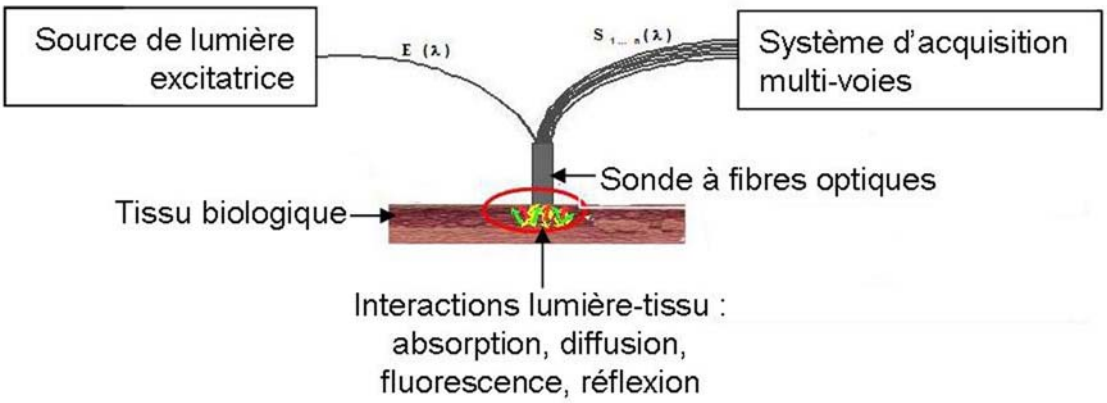


Figure 19 : Schéma de principe de la spectroscopie optique fibrée point par point

Dans les vingt dernières années, les deux modalités de spectroscopie qui ont été les plus étudiées tant en laboratoire qu'en clinique ont été la spectroscopie de réflectance diffuse et la spectroscopie d'autofluorescence.

- Spectroscopie de réflectance diffuse

Le potentiel de détection des stades précoces de cancers des épithéliums par spectroscopie de réflectance diffuse a été démontré dans plusieurs études concernant en particulier l'œsophage, le côlon, le col de l'utérus, la vessie, les poumons ou les voies aériennes supérieures. Cette technique est notamment sensible aux caractéristiques communes à tous les états précancéreux et cancéreux précoces : accroissement de la taille des noyaux et leur hyperchromatisme[21].

Les études qui ont été menées sur la distinction entre tissus dysplasiques et tissus sains montrent que les spectres de réflectance diffuse analysés permettent de déterminer la distribution de taille des noyaux. Dans les organes étudiés (œsophage, cavité buccale et vessie), les noyaux des épithéliums dysplasiques ont une densité et une taille supérieure à ceux des épithéliums sains[22].

- Spectroscopie de fluorescence

La spectroscopie de fluorescence des tissus biologiques peut se faire de deux manières : soit à l'aide de fluorophores exogènes soit sur la base des fluorophores endogènes. Le Tableau VI résume les principaux avantages et inconvénients de chaque méthode.

Tableau VI : Principaux avantages et inconvénients de l'utilisation clinique de la fluorescence exogène et endogène

	Avantages	Inconvénients
Fluorescence exogène	▪ Un seul fluorophore prédomine ▪ Forte intensité du signal	▪ Administration du fluorophore ▪ Allergie ▪ Toxicité
Fluorescence endogène	▪ Aucun produit à administrer au patient	▪ Information difficile à extraire car provenant de plusieurs fluorophores ▪ Faible intensité du signal

Nous avons choisi de privilégier une approche totalement non-invasive et donc de nous consacrer à la fluorescence endogène. Comme indiqué sur la Figure 20 a), la plupart des fluorophores endogènes sont excités dans l'ultraviolet et le bleu.

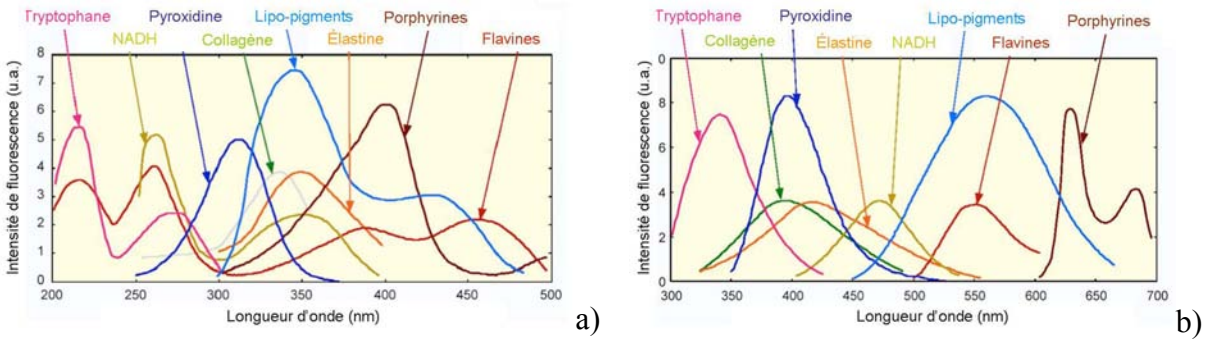


Figure 20 : Spectres typiques a) d'absorption et b) d'émission des principaux fluorophores endogènes

Ces fluorophores peuvent être :

- structurels : il s'agit principalement des protéines constitutives de la matrice extra-cellulaire. Citons notamment :
    - les collagènes, de types I et III majoritaires au sein du derme et de type IV majoritaire au sein de la lame basale.
    - la kératine,
    - l'élastine.
- ou intra-cellulaires : dans ce cas, ils sont notamment impliqués dans le métabolisme énergétique de la cellule. On compte deux nucléotides chargés du transport d'électrons (le NAD) ou de protons (le FAD) ainsi que les porphyrines impliquées notamment dans le cycle de l'hème ou constitutives des cytochromes :
    - le NAD, nicotinamide adénine dinucléotide, se trouve également sous forme réduite (NADH) ou phosphatée (NADPH) mais Mayevsky *et al.*[23], dans leur revue concernant le monitorage de l'activité mitochondriale via la détection de fluorescence du NADH, précisent que la fluorescence mesurée *in vivo* provient principalement du NADH et non du NADPH ou du NAD.
    - Le FAD, flavine adénine dinucléotide, peut se trouver lui aussi sous forme réduite : $FADH_2$. Kosterin *et al.*[24] précisent que dans ce cas c'est la forme oxydée qui est relativement plus fluorescente que la forme réduite.
    - Les noyaux porphyrines sont des molécules fluorescentes qui se retrouvent souvent complexées à un ion métallique (Fe^{2+} dans le cas de l'hème)

L'intensité d'émission recueillie aux longueurs d'onde caractéristiques de ces différents fluorophores peut donc donner des indications sur leur concentration, leur conformation moléculaire ou leur environnement (le pH peut induire des modifications d'émission par exemple). Ces informations peuvent être ensuite analysées pour déterminer par exemple un hypermétabolisme cellulaire propre aux cellules cancéreuses. Attention toutefois à ne pas

établir de corrélation abusive. En effet, ce n'est pas parce que les cellules cancéreuses sont censées être hypermétaboliques que l'intensité à la longueur d'onde d'émission du NADH sera plus importante. En effet, si une hyperplasie accompagne, comme c'est souvent le cas, l'évolution dysplasique, l'intensité de fluorescence pourra être moins importante à cause de l'atténuation de l'intensité due au chemin optique plus important à parcourir pour les photons d'émission du fait de l'épaississement de l'épithélium[25].

Évaluation d'une méthode diagnostique

Quelle que soit la méthode diagnostique étudiée, il est essentiel d'apprécier sa capacité à prédire la présence ou l'absence de maladie et de pouvoir comparer ses performances au test de référence (« *gold-standard* ») pour savoir si la méthode étudiée devrait être appliquée en routine sur le plan clinique. Pour cela, on mesure deux paramètres :

- lorsque le test est positif, la probabilité d'être malade.
- lorsque le test est négatif, la probabilité de ne pas être malade.

Les caractéristiques intrinsèques du test, sa capacité à classer correctement les personnes qui ont la maladie dans le groupe ayant un test positif et les personnes qui n'ont pas la maladie dans le groupe ayant un test négatif, sont décrites par la sensibilité et la spécificité.

La sensibilité est la probabilité d'obtenir un test positif lorsque la maladie est réellement présente. Lorsque la sensibilité d'un test augmente, le nombre de faux négatifs diminue.

La spécificité est la probabilité d'obtenir un test négatif lorsque la maladie est réellement absente. Un test très spécifique génèrera peu de faux positifs.

Deux autres mesures donnent une estimation de la probabilité de la maladie en fonction des résultats du test. Elles définissent la fiabilité du test :

- la valeur prédictive positive (VPP) est la valeur prédictive d'un test positif c'est-à-dire la capacité de prédire la présence de la maladie ;
- la valeur prédictive négative (VPN) est la capacité de prédire l'absence de maladie.

La valeur prédictive d'un test varie en fonction de sa sensibilité, de sa spécificité et de la prévalence de la maladie. La fiabilité d'un test mesure la proportion de résultats corrects (vrais positifs et vrais négatifs). Le Tableau VII résume les relations entre les résultats du test et la présence ou non de la maladie, déterminée par un diagnostic approprié.

Tableau VII : Définition des caractéristiques d'un test de dépistage

		Cancer	
		Présent	**Absent**
Test de dépistage	+	VP	FP
	-	FN	VN

Sensibilité = VP / (VP + FN) x 100
Spécificité = VN / (FP + VN) x 100
Valeur prédictive positive = VP / (VP + FP)
Valeur prédictive négative = VN / (VN + FN) x 100
Fiabilité du test = (VP + VN) / (VP + VN + FP + FN)

2. Etude sur fantômes : évaluation de l'indice de Breslow du mélanome malin par spectroscopie de réflectance diffuse résolue spatialement

2.1. Etat de l'Art

2.1.1. Contexte médical

Epidémiologie du mélanome

Les tumeurs de peau mélanocytaires regroupent un grand nombre de néoplasies bénignes et malignes ayant des profils génétiques, morphologiques et cliniques variés. D'un point de vue clinique et de l'impact sur la santé, les mélanomes malins sont le groupe le plus important de cancers de la peau. Bien qu'ils soient moins courants que les carcinomes baso-cellulaires ou épidermoïdes, ils sont beaucoup plus souvent létaux à cause de leur tendance à métastaser. De fortes doses de rayonnement ultraviolet reçues par intermittence semblent être le facteur de risque environnemental principal, souvent en combinaison avec des facteurs de risque endogènes, comme une susceptibilité génétique. Bien qu'ils puissent se retrouver dans des groupes ethniques à pigmentation plus importante, les mélanomes malins touchent principalement les populations à peau claire. La forte progression du taux d'incidence reflète les modifications récentes du mode de vie occidental qui incite à une forte exposition au soleil : mode du teint bronzé, sports et activités de détente en extérieur, etc. La prévention primaire et le dépistage semblent être les approches les plus prometteuses pour réduire le taux de mortalité associé au mélanome.

Incidence et mortalité[26]

Dans le monde, en 2002, le mélanome a été diagnostiqué chez environ 79 000 hommes et 81 000 femmes. Les taux sont élevés dans les régions où les populations d'origine caucasienne prédominent alors qu'ils sont faibles dans les pays où les populations d'origine asiatique et africaine prédominent : 80% de ces mélanomes se retrouvent dans des populations à peau claire d'Amérique du Nord, d'Australie, de Nouvelle Zélande et d'Europe. Le mélanome malin est le 16ème et le 15ème cancer le plus souvent diagnostiqué respectivement chez les hommes et chez les femmes et apparaît le plus fréquemment en Australie et en Nouvelle Zélande (4ème et 3ème cancer le plus fréquent chez les hommes et les femmes

respectivement), en Amérique du Nord (6ème pour les hommes et 5ème pour les femmes) et en Europe (16ème pour les hommes et 8ème pour les femmes). En 2002, environ 22 000 hommes et 19 000 femmes sont morts des suites du mélanome dans le monde. Le mélanome est un des cancers les plus importants si on le considère en termes de perte de vies, d'autant plus qu'il est souvent diagnostiqué chez des personnes relativement jeunes et qu'il peut être fatal s'il n'est pas traité. En France, et dans la plupart des pays d'Europe, on estime l'incidence à 5 à 10 nouveaux cas/100 000 habitants et par an (40/100 000 chez les Blancs d'Australie, descendants d'immigrés d'Europe septentrionale : Royaume-Uni, Irlande, Pays scandinaves, etc.). L'incidence du mélanome double environ tous les 10 ans dans les pays à population blanche. La mortalité (1,2 à 1,5/100 000 en France, autour de 5 en Australie) tend à augmenter.

Le mélanome était de très mauvais pronostic dans les années 1950 et 1960 mais à partir du milieu des années 1970, les taux de mortalité se sont stabilisés dans de nombreuses populations à risque, bien que les taux d'incidence augmentent encore. La survie a augmenté de manière substantielle, principalement dans les pays avec fort taux d'incidence. C'est le résultat d'une détection précoce permise grâce à une forte sensibilisation due aux campagnes de prévention primaire et secondaire.

A ce jour, le soleil est le seul facteur d'environnement connu impliqué dans l'épidémiologie du mélanome. De nombreuses études épidémiologiques attribuent un rôle majeur aux expositions intermittentes et intenses et aux brûlures solaires reçues dans l'enfance. Cependant, ces modalités d'exposition à risque concernent principalement le mélanome superficiel extensif. Les mélanomes de Dubreuilh, survenant sur les zones exposées en permanence chez les sujets âgés, sont plutôt liés aux expositions chroniques cumulatives. Les mélanomes des paumes et des pieds ne sont pas directement liés aux expositions solaires.

Prédisposition familiale, facteurs génétiques[27]

Ils sont au moins aussi importants que le soleil. Environ 10% des mélanomes surviennent dans un contexte de « mélanome familial », défini par deux personnes au moins atteintes de mélanome dans une famille (surtout si elles sont apparentées au premier degré). Ces personnes ont souvent, au cours de leur vie, plusieurs mélanomes primitifs différents. Plusieurs gènes semblent impliqués dans la transmission familiale du mélanome le principal étant *CDKN2A*, gène suppresseur de tumeur.

D'autres facteurs sont également génétiquement transmis :

– la sensibilité de la peau au soleil qui est définie par le phototype. Les sujets à peau claire, à cheveux blonds et surtout roux, et les sujets qui ont des éphélides sont les plus sensibles au soleil (phototype I-II) ;

– la capacité à générer des naevi qui se traduit par le phénotype nævique, c'est-à-dire le nombre, la taille et l'aspect des nævi. Une forme particulière est le « syndrome du nævus atypique » défini par la présence en grand nombre de nævi (N > 50), souvent de grande taille (> 6 mm de diamètre), ayant des aspects atypiques (bords irréguliers, polychromie), et siégeant en peau non exposée au soleil (cuir chevelu, fesses et seins chez la femme).

Marqueurs de risque du mélanome

Ils découlent des études épidémiologiques. Ce sont :

– les antécédents familiaux de mélanome ;

– les antécédents personnels de mélanome ; le risque pour un individu qui a déjà présenté un mélanome de développer un second mélanome primitif au cours de sa vie est de l'ordre de 5 à 8% de l'ensemble des malades atteints de mélanome,

– la couleur claire de la peau et des cheveux et en particulier le marqueur roux avec des éphélides, cheveux roux, blond vénitien ou auburn ;

– un nombre élevé de nævi : le risque augmente avec le nombre des nævi ;

– le « syndrome du nævus atypique » ;

- des antécédents d'expositions solaires intenses, avec coups de soleil.

Fonctions protectrices de la mélanine[28]

La mélanine est le pigment qui colore les lésions « pigmentées » dont les mélanomes font partie. Il s'agit du produit de la mélanogenèse qui est la fonction principale des mélanocytes dont les mélanomes sont dérivés. Pour la constitution des fantômes, nous avions besoin de connaître la densité de mélanine contenue typiquement dans un mélanome, le type de mélanine et leurs propriétés optiques.

La mélanine est un pigment très répandu dans la nature autant chez les plantes que chez les animaux. Chez les humains (et les vertébrés en général), la biosynthèse de la mélanine inclut une cascade métabolique commençant par l'oxydation de la tyrosine et menant à la synthèse de l'eumélanine ou de la phéomélanine, dont les molécules sont représentées respectivement sur les Figures 21 a) et b).

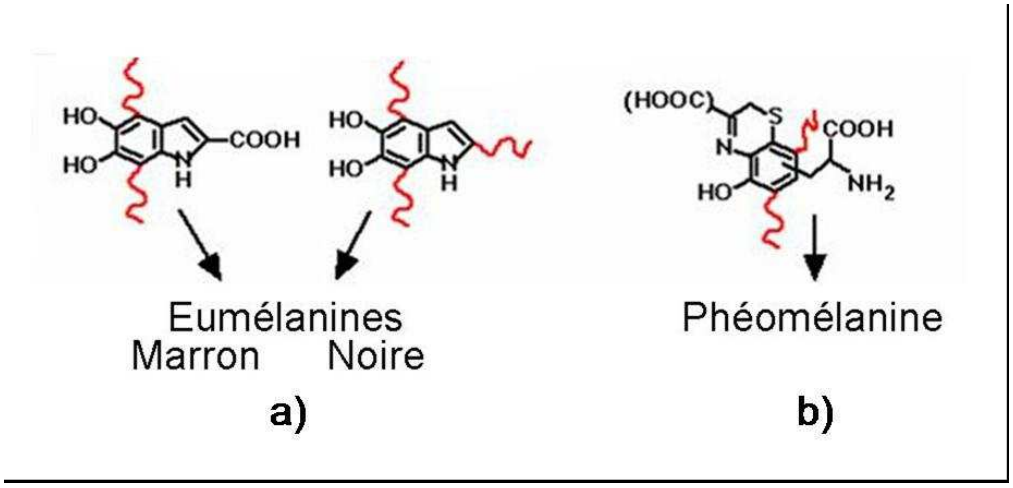


Figure 21 : Représentation moléculaire des deux types de mélanine : a) eumélanine noire et brune et b) phéomélanine.

Les connaissances actuelles indiquent que la pigmentation de la plupart des humains est l'expression d'une combinaison des deux types de métabolismes donnant lieu à un mélange des différents pigments. L'expression phénotypique de ce mélange donne lieu à la classification de Fitzpatrick en phototypes (1 à 6) et met l'accent sur la relation inversement proportionnelle entre degré de pigmentation et susceptibilité aux dommages causés par le rayonnement solaire, comme la photocarcinogenèse. La combinaison des fonctions carbonyle et un haut degré de conjugaison chimique font de la mélanine un matériau hautement absorbeur de radiation avec une absorption spectrale qui s'étend de l'ultraviolet à l'infrarouge. De plus, la propriété protectrice de la mélanine provient d'une action intra-cellulaire car le haut degré de conjugaison à l'intérieur du polymère permet le mouvement d'électrons entre la quinone et les résidus catécholiques. Cette propriété fait en sorte que le pigment agit comme un échangeur d'électron simple et donc comme un collecteur de radicaux libres. Les charges résiduelles sur les groupes hydroxyles et carboxyles permettent à la mélanine d'agir comme un moyen de localiser et d'excréter les cations toxiques, dont les métaux lourds. Tous ces bénéfices sont généralement le lot des cellules auxquelles le pigment a été transféré. La photoprotection sert surtout de « génoprotection ». Il existe deux aspects de cette protection du génome :

- la photoprotection qui est la dissipation de l'énergie photonique et la collecte des radicaux libres produits par la photo-oxidation
- la photosensibilisation : les cellules exposées à des doses de radiations génotoxiques sont éliminées.

L'eumélanine est plus photoprotectrice que la phéomélanine. **Cependant, comme illustré sur la Figure 22 les propriétés optiques des deux pigments dans l'UV sont similaires**[29].

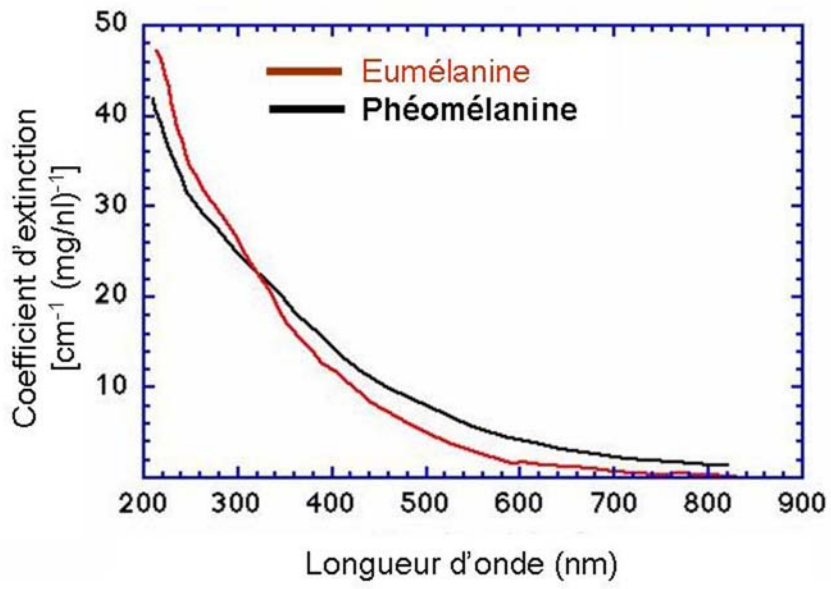


Figure 22 : Spectre d'extinction de l'eumélanine et de la phéomélanine. Iconographie disponible sur le site web de l'OMLC (*Oregon Medical Laser Center*).

La raison de cette différence entre les propriétés photoprotectrices des deux types de mélanine n'est pas entièrement comprise mais proviendrait du fait que les produits de la photolyse de la phéomélanine sont plus toxiques que ceux de l'eumélanine. De plus, les mélanocytes produisant de la phéomélanine semblent dépourvus de thiols, les rendant plus sensibles à un stress oxydant photo-induit.

Précurseurs

Malgré l'absence de méthode satisfaisante pour apprécier la fréquence des mélanomes développés à partir d'un nævus, on admet que la majorité des mélanomes naissent *de novo*, en peau apparemment saine (hors de tout précurseur identifiable). Le risque de transformation maligne des petits nævi « communs » est très faible. Les nævi congénitaux de grande taille (par définition de diamètre supérieur à 20 cm) ont un risque de transformation plus élevé. Cependant, ils sont exceptionnels et, par conséquent, n'occasionnent la survenue que de très peu de mélanomes. Dans un but de prévention il n'y a donc aucun intérêt à faire l'exérèse systématique préventive des nævus communs. L'exérèse préventive précoce des grands nævus congénitaux serait souhaitable, mais elle n'est pas toujours réalisable en pratique.

Histologie du mélanome

L'histogenèse des mélanomes se déroule sur un mode biphasique. Dans une première phase, l'extension est « horizontale » intraépidermique, au-dessus de la membrane basale. Dans une seconde phase, l'extension est « verticale » avec envahissement du derme superficiel (phase

micro-invasive), puis du derme profond et de l'hypoderme (phase invasive). Le mélanome a donc en règle générale:

– une composante intraépidermique faite de mélanocytes qui constituent une nappe (mélanomes lentigineux) ou des thèques (amas plus ou moins globulaires de mélanocytes) disposées irrégulièrement le long de la basale, associée à un envahissement des couches superficielles de l'épiderme par des cellules tumorales migrant de façon isolée et anarchique ;

– une composante dermique invasive parfois associée à une réaction inflammatoire

2.1.2. Méthodes actuelles pour le diagnostic du mélanome

a) Diagnostic histologique

Le diagnostic du mélanome n'est affirmé que par anatomo-pathologie suite à une exérèse-biopsie de la lésion suspecte. On dit que l'anatomo-pathologie est la technique de référence ou « *gold-standard »* pour employer l'expression anglophone consacrée.

L'examen histologique permet de déterminer les critères suivants indispensables pour établir un diagnostic complet de mélanome :

- affirmation de la malignité de la tumeur (hétérogénéité de la distribution cellulaire, asymétrie de la lésion, etc.). Le critère de malignité est cependant parfois difficile à affirmer dans le cas de mélanome débutant intraépidermique ou dans certaines formes de nævi ;
- affirmation de la nature mélanocytaire de la tumeur facilitée, en l'absence de mélanine, par la recherche de marqueurs phénotypiques en immuno-histochimie : protéine S100 (peu spécifique), anticorps monoclonal HMB45 (spécifique mais peu sensible) ou melan A.

Types histopathologiques

- sur mélanome de Dubreuilh (LMM : *Lentigo Maligna Melanoma*)
- mélanome superficiel extensif (SSM : *Superficial Spreading Melanoma*)
- mélanome malin nodulaire (NM : *Nodular Melanoma*)
- mélanome acro-lentigineux (ALM : *Acral Lentiginous Melanoma*)

Facteurs pronostiques

- Evaluation du niveau d'invasion de la tumeur en profondeur dans le derme. Il existe cinq niveaux d'invasion dans la classification de Clark et Mihm[30] : I (mélanome intra-épidermique), II (atteinte superficielle du derme papillaire), III (invasion de toute

l'épaisseur du derme papillaire jusqu'à l'interface entre dermes papillaire et réticulaire), IV (invasion du derme réticulaire) et V (invasion de l'hypoderme). En pratique, cette classification est peu utilisée dans la conduite thérapeutique à tenir.

- Mesure de son épaisseur appelée « indice de Breslow ». Cet indice est défini comme étant la distance entre la couche granuleuse et la limite inférieure de la lésion[31].

  N.B. : À invasion tumorale identique (c'est-à-dire même indice de Breslow), toutes les types histopathologiques ont le même pronostic. Le taux moyen de croissance verticale d'un mélanome est de 0,12 mm/mois pour les mélanomes extensifs superficiels, 0,13 mm/mois pour les mélanomes acraux lentigineux et de 0,49 mm/mois pour les mélanomes nodulaires[32].
- Emboles néoplasiques
- Ulcération
- Index mitotique.

b) Orientation diagnostique clinique

En termes diagnostiques, une fois avérée la nature mélanocytaire et maligne de la lésion suspecte, l'Indice de Breslow est l'élément clef à déterminer. Sur le plan clinique, la stratégie la plus pratiquée est de réaliser une excision-biopsie de la lésion étant suspectée d'être un mélanome, qui sera suivie d'une réexcision si le rapport histologique confirme cette hypothèse diagnostique. Les marges de la réexcision et la décision de recherche d'une atteinte ganglionnaire dépendent de l'épaisseur tumorale. Cette épaisseur tumorale (ou « indice de Breslow ») est, non seulement, le facteur qui détermine les marges d'exérèse autour de la lésion (cf. Tableau VIII) mais est également le principal facteur pronostique (cf. Tableau IX pour la survie globale à 10 ans en fonction de l'indice de Breslow).

Tableau VIII : Marges de résection recommandées autour du mélanome en fonction de l'indice de Breslow[33]

Indice de Breslow	Marges de réexcision
Mélanome *in situ*	0,5 cm
0 – 1 mm	1 cm
1,01 – 2 mm	1 – 2 cm
2,01 – 4 mm	2 cm
> 4 mm	2 – 3 cm

Tableau IX : Survie globale à dix ans en fonction de l'indice de Breslow. Données sur la période 1977-1995 publiées en 1996 par le *South Cancer Registry* (Adelaide, Australie)[34]

Indice de Breslow	Survie globale à 10 ans
< 0,75 mm	97,9%
0,75 – 1,5 mm	90,7%
1,5 – 3 mm	75,4%
3 – 4 mm	55%
> 4 mm	40%

Le diagnostic préopératoire du mélanome et l'évaluation de son épaisseur par une méthode non-invasive peuvent remettre en question la nécessité d'effectuer une biopsie au préalable. La prise en charge chirurgicale d'une tumeur primaire pourrait être simplifiée car la procédure ne comporterait qu'une seule étape, diminuant ainsi la morbidité et le coût de la prise en charge[35].

Orientation diagnostique clinique de malignité

- Règle ABCDE

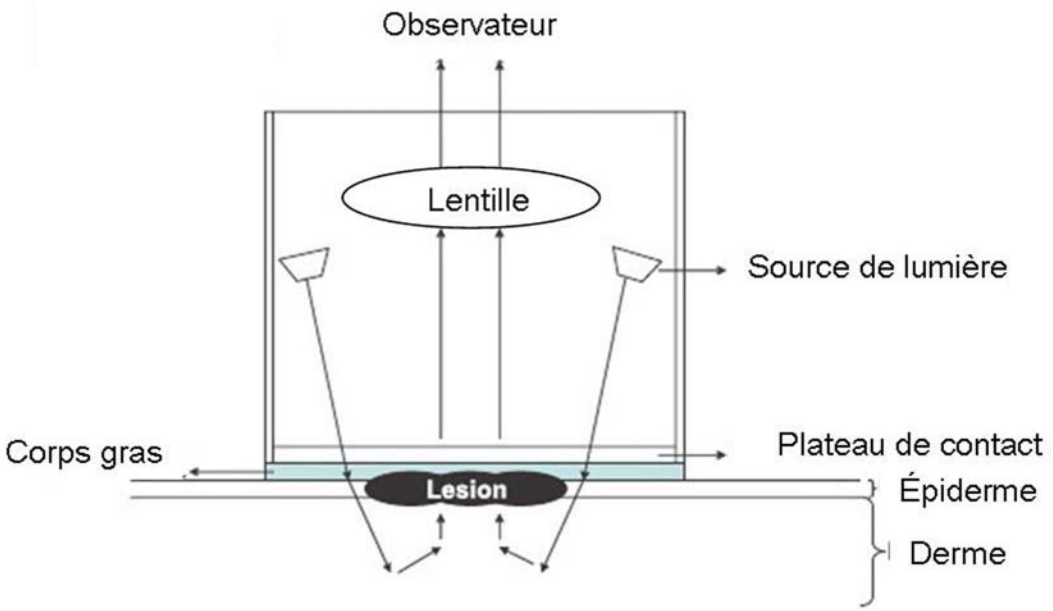
Dans la pratique clinique de routine, le dermatologue ou le médecin généraliste utilise la règle ABCDE pour évaluer le risque de malignité d'une lésion :

- A : asymétrie
- B : bords (irréguliers)
- C : couleur (non uniforme)
- D : diamètre (supérieur à 6 mm)
- E : évolution (dans le temps)

Il est à noter que cette règle présente des faiblesses notamment dans l'évaluation des mélanomes achromiques et des mélanomes de diamètre inférieur à 6 mm[36]. Cependant, Girardi *et al.*[37] ont montré la faiblesse de cette méthode par rapport à l'analyse globale de la lésion pour identifier des lésions pigmentées ayant un aspect clinique différent des autres présentées par le patient.

- Dermoscopie

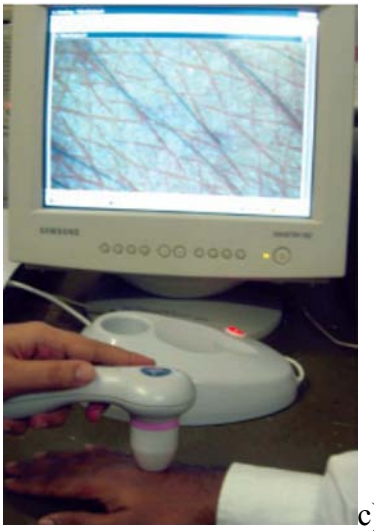
L'inspection visuelle classique peut être complétée par une observation faite avec un dermatoscope (appelé aussi dermoscope ou microscope de surface). Comme indiqué sur la Figure 23, un dermoscope est une loupe associée à une source lumineuse. Cette loupe est posée au contact de la lésion à observer. Différents grossissements (de x10 à x100) sont disponibles dans le commerce et généralement un produit gras (vaseline, huile) sert d'interface entre dermoscope et lésion pour permettre une meilleure pénétration de la lumière dans la peau car ce corps gras rend la couche cornée translucide.



a)



b)



c)

Figure 23 : Instrumentation pour la dermoscopie : a) Principe d'un dermoscope, b) Différentes pièces d'un dermoscope permettant une prise d'image, c) Dermoscope équipé d'une visualisation vidéo

Dans ce cas, plusieurs algorithmes ont été développés conduisant à une amélioration de 10 à 27% du diagnostic du mélanome comparé aux résultats obtenus par l'examen clinique seul[38]. La règle ABCD de dermoscopie est le premier algorithme décrit en dermoscopie par Stolz *et al.*[39] en 1994. D'autres méthodes ont ensuite été établies : l'analyse des patrons, la liste italienne en sept points ainsi que la méthode de Menzies. Il s'agit d'une approche quantitative pour savoir si une lésion est bénigne, suspecte ou maligne. Comme indiqué dans le Tableau X, il s'agit d'établir un score pour chaque critère afin de déterminer un score total pour la lésion considérée. Avec un seuil de 5,45, la sensibilité et la spécificité sont respectivement de 97,9% et 90,3%.

Tableau X : Score attribué à chaque critère utilisé en dermoscopie pour l'élaboration d'algorithme de diagnostic

Critère		Score
Asymétrie	Dans 0, 1 ou 2 axes : couleur, structure et forme	0-2
Bordure	Arrêt abrupt du pigment dans 0 à 8 segments	0-8
Couleur	Présence jusqu'à 6 couleurs (blanc, rouge, brun clair, brun foncé, bleu-gris, noir)	1-6
Structures dermoscopiques	Présence d'un réseau pigmenté, de zones sans structures, de points, de globules et de stries	1-5

Le Tableau XI ci-dessous donne les performances (sensibilité et spécificité) et les caractéristiques implémentées dans les algorithmes pour discriminer de manière automatique les naevi bénins, les naevi dysplasiques et les mélanomes pour quelques études en dermoscopie.

Tableau XI : Performances diagnostiques (SE : sensibilité et SP : spécificité) obtenues par la dermoscopie pour différents algorithmes visant à discriminer lésions cutanées pigmentées bénignes et mélanomes malins cutanés

Equipe	SE	SP	Caractéristiques extraites du signal recueilli et implémentées dans les algorithmes
Binder *et al.*[40]	84	93	Nombre de couleurs et bords
Binder *et al.*[41]	90	87	
Elbaum *et al.*[42]	85	100	Analyse de l'infrarouge et des ondelettes
Andreassi *et al.*[43]	88	81	Contraste, colorimétrie, dimension de la lésion
Seidenari *et al.*[44]	86	100	Contraste et composante rouge

Evaluation non-invasive de l'indice de Breslow

- Dermoscopie

Une corrélation entre les critères dermoscopiques et les critères anatomocliniques de la tumeur ont été établis dans plusieurs études traitant de la détermination de l'épaisseur de la tumeur:

- Le réseau pigmenté est corrélé avec les crêtes épidermiques pigmentées que l'on retrouve dans le cadre d'une lésion mélanocytaire. Différentes études ont confirmé la perte des réseaux pigmentés avec la progression tumorale et la destruction progressive de l'architecture dermoépidermique.
- Dans les tumeurs mélanocytaires, les zones bleu-gris (voile bleu-gris) correspondent à une pigmentation diffuse, confluente, irrégulière, ne remplissant pas toute la lésion. Ces zones bleu-gris sont en général associées à des tumeurs plus épaisses.

- Le réseau vasculaire atypique est retrouvé de façon prédominante dans les phases de croissance verticale de la tumeur. Cela peut être un critère important si la tumeur est faiblement pigmentée.

Argenziano *et al.* [45] ont élaboré un algorithme qui combine deux critères cliniques : le diamètre et le fait que la tumeur soit palpable. Cette méthode permet une prévision correcte de l'épaisseur du mélanome dans 68% des tumeurs si on les sépare en trois groupes : épaisseur inférieure à 0,75 mm, épaisseur comprise entre 0,76 et 1,6 mm et épaisseur supérieure à 1,5 mm. Selon Carli *et al.*[46], un score total de dermoscopie de plus de 6,8 est associé à des mélanomes d'une épaisseur supérieure à 0,55 mm, avec une sensibilité de 74% et une spécificité de 86%, une VPP de 79% et une VPN de 82% ainsi qu'une performance diagnostique de 62%.

- Echographie

L'échographie a été évaluée pour l'estimation de l'épaisseur des mélanomes en combinaison avec l'examen clinique et l'examen dermoscopique. Pour l'identification correcte de l'épaisseur tumorale d'un mélanome, un algorithme en deux étapes est proposé par Pellacani et Seidenari [47], combinant critères dermoscopiques et ultrasonographiques. La technique permet de différencier les lésions « fines » (<1 mm) des lésions « épaisses » (>1 mm) avec une sensibilité de 86,7% et une spécificité de 100%.

2.1.3. Méthodes diagnostiques en cours de développement fondées sur la spectroscopie et l'imagerie optique

Diagnostic de malignité

Marchesini *et al.*[48] ont établi une revue des différentes techniques optiques et algorithmes étudiés depuis le début des années 1990 pour automatiser le diagnostic de malignité du mélanome. Précisons qu'il n'est pas question d'évaluation de l'indice de Breslow dans ces études.

- Imagerie

Les premières tentatives d'automatisation de la discrimination entre naevi et mélanomes utilisaient une caméra vidéo couleur, un système d'illumination, un cadreur et un ordinateur personnel. Une analyse colorimétrique et morphologique des lésions était réalisée pour extraire quelques caractéristiques implémentées ensuite dans des algorithmes d'analyse statistique automatisés. Les performances sont résumées dans le Tableau XII.

Tableau XII : Performances diagnostiques obtenues par l'imagerie couleur (SE : sensibilité et SP : spécificité)

Equipe	SE	SP	Caractéristiques extraites du signal recueilli et implémentées dans les algorithmes
Green *et al.*[49]	91	80	Infrarouge, rouge et fragmentation
Cascinelli *et al.*[50, 51]	55	91	Taille, forme, couleur
Green *et al.*[51]	90	89	Surface, périmètre et gradient de couleur RGB

Chwirot et al.[52] ont obtenu une sensibilité de 77% et une spécificité de 82% par des calculs de ratio de fluorescence grâce à l'imagerie d'autofluorescence.

- Spectroscopie et tomographie optique cohérente (*Optical Coherent Tomography*, OCT pour l'acronyme anglophone)

Comme indiqué dans le Tableau XIII, la capacité de plusieurs techniques de spectroscopie seules (réflectance diffuse et OCT) ou en association avec l'imagerie (imagerie multi-spectrale) a été évaluée pour établir un diagnostic automatisé de la malignité des lésions pigmentées.

Tableau XIII : Performances diagnostiques des lésions pigmentées par les méthodes optiques référencées par Marchesini *et al.*[53] (SE : sensibilité et SP : spécificité)

Méthode optique	Equipe	SE	SP	Caractéristiques extraites du signal recueilli et implémentées dans les algorithmes
Réflectance diffuse	Marchesini *et al.*[48]	77	90	Réflectance entre 700 et 780 nm et aire sous la courbe pour la discrimination entre naevi et mélanomes
	Wallace *et al.*[54]	91	84	Aires et pentes de la courbe de réflectance
OCT	Pas d'étude recensée			Technique qui semble avoir beaucoup de potentiel grâce à sa résolution latérale et axiale de 1 à 3 µm (anatomo-pathologie *in vivo*) et à sa bonne profondeur de pénétration
Imagerie multispectrale	Tomatis *et al.*[55]	88	89	Surface de la lésion et courbe spectrale
	Farina *et al.*[56]	46	80	Reflectance à 461 nm et à 940 nm

Il est à noter que pour l'OCT, si aucun algorithme n'a été étudié pour automatiser le diagnostic de mélanome, Gambichler *et al*[57]. ont montré qu'en particulier la jonction dermo-épidermique ainsi que la réflectivité du derme papillaire et du derme réticulaire superficiel avaient des caractéristiques visibles par OCT et propres respectivement aux naevi bénins et aux mélanomes malins permettant ainsi de les discriminer.

La spectroscopie de réflectance diffuse apparaît donc dans ce tableau comme capable d'établir un diagnostic de malignité avec une sensibilité et une spécificité de 77 et 90% pour l'une des études et de 91 et 84% pour l'autre étude.

Reste à voir si elle serait potentiellement capable d'évaluer le second paramètre indispensable à savoir l'indice de Breslow et de « concurrencer » dermoscopie et/ou échographie.
A notre connaissance, aucune étude sur ce sujet n'a été menée jusqu'à présent.

Résolution spatiale pour une évaluation de l'indice de Breslow

Comme indiqué sur le schéma de principe de la spectroscopie (cf. Figure 19, cf. § 1.3.3.), la spectroscopie repose sur l'utilisation de fibres optiques :

- « excitatrices » utilisées pour acheminer la lumière excitatrice entre source lumineuse et tissu biologique
- « réceptrices » utilisées pour acheminer la lumière émise ou réfléchie par le tissu biologique à explorer.

Certaines instrumentations utilisent une seule et même fibre pour l'excitation et la réception. Cependant, disposer de deux canaux distincts permet de diminuer le bruit de fond[58].

Une caractéristique alors essentielle à déterminer est la distance qui sépare la fibre excitatrice de la fibre réceptrice. Dans la suite de ce document, nous appellerons cette distance : « distance inter-fibres ». Drezek *et al.*[59] ont montré qu'en spectroscopie de réflectance diffuse, les modifications cellulaires dues à une néoplasie débutante sont le mieux détectées à des distances inter-fibres inférieures à 500 µm pour des ouvertures numériques inférieures à 0,4.

L'utilisation de plusieurs fibres de réception permet, entre autres, l'exploration du tissu à plusieurs profondeurs[60]. En effet, comme schématisé sur la Figure 24 adaptée de Liu *et al.*[61], la profondeur de pénétration est fonction non seulement de la distance inter-fibres mais aussi de l'ouverture numérique des fibres. Cette ouverture numérique détermine un cône d'illumination (pour la fibre excitatrice) et un cône de réception (pour la fibre réceptrice) qui s'entrecoupent à une profondeur donnée fonction de la distance les séparant. On estime alors que l'information recueillie est contenue dans la surface commune à ces cônes et que la profondeur d'exploration est donc déterminée par le lieu d'intersection des cônes. Aux longueurs d'onde du visible, la réflectance diffuse sonde les tissus jusqu'à une profondeur de 100 µm pour une distance entre excitation et réception de 250 µm[61].

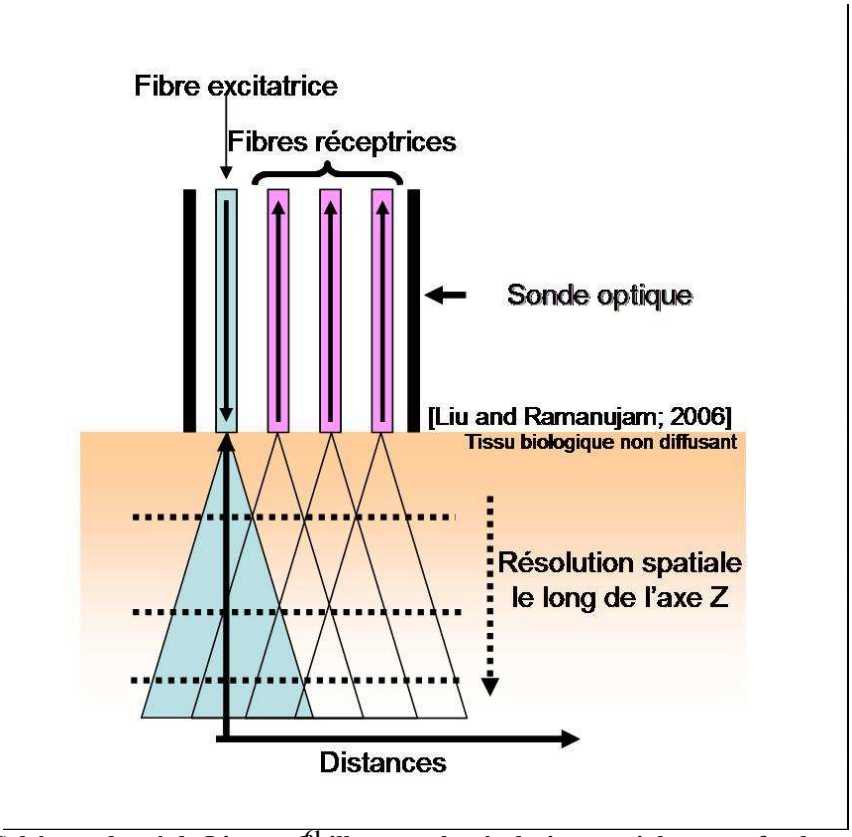


Figure 24 : Schéma adapté de Liu *et a.l*[61] illustrant la résolution spatiale en profondeur permise par l'utilisation de plusieurs distances entre fibre optique excitatrice et fibres optiques réceptrices. Schéma simplifié d'un milieu non diffusant.

Il est à noter que sur le plan instrumental, utiliser plusieurs fibres réceptrices impose de disposer d'un détecteur multi-canaux («*multi-track* » ou « *multi-channel* » en anglais). Il est en particulier important de s'assurer que ces canaux de détection ne se chevauchent pas.

Objectif

Forts de ces notions sur la capacité de résolution spatiale en profondeur de la spectroscopie, nous avons émis l'hypothèse qu'un tel outil pouvait être capable de discriminer différentes épaisseurs. Nous avons donc choisi plusieurs distances inter-fibres pour atteindre notre objectif c'est-à-dire définir une méthode spectroscopique d'évaluation d'épaisseur de mélanomes (indice de Breslow).

2.2. Matériels et Méthodes

2.2.1. Choix du modèle

Pour évaluer le potentiel de la spectroscopie de réflectance diffuse comme outil non invasif de l'indice de Breslow, nous devons disposer de modèles simulant des mélanomes dont l'épaisseur est précisément contrôlée et connue. Ces modèles de mélanome peuvent être de trois sortes :

- fantômes i.e. à base de matériaux inertes
- modèles de peau reconstituée *in vitro* (comme ceux proposés par l'entreprise SkinEthic® à Nice)
- modèles animaux : irradiation de nouveaux-nés de souris transgéniques HGF/SF[62], une race de mini-cochons qui développent spontanément des mélanomes[63], des poissons et des opposums[64].

L'inconvénient majeur des modèles animaux et des modèles de peau reconstituée pour notre type d'étude est qu'ils ne permettent pas de disposer de plusieurs épaisseurs de lésions en nombre suffisant. De plus, l'évaluation d'une nouvelle méthode impose de disposer d'un modèle simple dont nous maîtrisons les différentes caractéristiques : géométrie, taille, coefficients optiques étant, dans notre cas, les principaux paramètres. La simplicité de confection d'objets-tests tels que les fantômes nous permet d'assurer une reproductibilité de tous les paramètres sauf de celui à faire varier. Il est alors plus facile d'établir un lien de cause à effet entre le paramètre qui varie et les résultats. Pour toutes ces raisons (statistiques et expérimentales), nous avons donc choisi de travailler avec des fantômes. Nous avons alors dû faire un choix de matériaux qui permettent de reconstituer les coefficients optiques de la peau *in vivo*.

2.2.2. Confection du modèle

Les matériaux inertes utilisés pour confectionner les fantômes ont été choisis d'après la littérature. Nous avons choisi de développer un modèle à deux couches : l'une (celle du dessous) mimant le derme et l'autre (celle du dessus) mimant le mélanome d'épaisseur variable. Comme indiqué dans le Tableau XIV, nous avons considéré un derme principalement diffusant sans tenir compte de l'absorption due à l'hémoglobine (le coefficient de diffusion est 100 fois plus important que le coefficient d'absorption) et un épiderme diffusant et absorbant.

Tableau XIV : Coefficients optiques des différentes couches de la peau humaine à 520 nm d'après Zeng *et al* [65]

Couche	Epaisseur (µm)	n	μ_a (cm^{-1})	μ_s (cm^{-1})	g
Stratum corneum	10	1,45	40	570	0,77
Epiderme	80	1,4	40	570	0,77
Derme	1600	1,4	5	500	0,77
Hypoderme		1,46			

- Coefficient de diffusion

Coefficient de diffusion : plusieurs matériaux diffusants ont été utilisés et décrits dans la littérature

- Intralipides[66-71]
- Billes de TiO_2[72, 73]
- Sphères de polystyrène (aussi décrites comme des billes de latex) [36, 45, 74]

D'après Shimada *et al.*[75], les **coefficients de diffusion** du derme et de l'épiderme rencontrés *in vivo* peuvent être obtenus grâce à une « matrice » de gélatine enrichie en Intralipides 20% (Baxter) dont la concentration est ajustée pour chaque couche :

- 5% (vol./vol.) pour l'épiderme
- 13,3% (vol./vol.) pour le derme.

Pour information, les Intralipides correspondent à un mélange d'huile de soja et d'huile d'olive.

- Coefficient d'absorption

L'absorption de l'épiderme et des lésions pigmentaires comme le mélanome est principalement due au pigment synthétisé par les mélanocytes : la mélanine.

2.2.3. La mélanine

Les données sur le contenu quantitatif et qualitatif en mélanine des mélanomes et des différents phototypes de peau ont été regroupées par Ito et Wakamatsu[76]. Celles qui nous intéressent plus particulièrement sont mentionnées dans le Tableau XV.

Tableau XV : Taux d'eumélanine et de phéomélanine contenues dans la peau de différents phototypes et dans des mélanomes

Référence bibliographique	Echantillon	Source	n	Eumélanine (ng/mg de tissu sec)	Phéomélanine (ng/mg de tissu sec)
Tadokoro *et al.*[77]	Peau du dos	Noire	5	30 ± 9	26 ± 6
Tadokoro *et al.*[77]	Peau du dos	Asiatique	3	11,6 ± 2,5	14,3 ± 3
Tadokoro *et al.*[77]	Peau du dos	Blanc	7	4,5 ± 1,5	10,2 ± 3
Morishima and Fukada[78]	Mélanome	Primaire et métastasé	10	63 ± 58	719 ± 464

Il est intéressant de noter que :

- les différents échantillons contiennent autant ou plus (jusqu'à 10 fois plus pour le mélanome) de phéomélanine que d'eumélanine.
- le mélanome contient en moyenne presque deux fois plus d'eumélanine que la peau noire. Il est à noter que les peaux noires comme les mélanomes diffèrent entre eux par l'intensité de leur couleur.

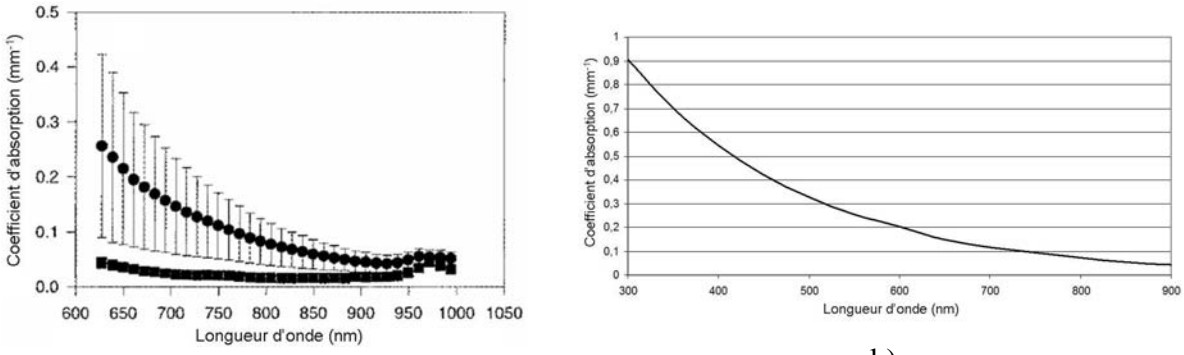
Nous avons donc décidé de nous baser sur les coefficients optiques de peau publiés par Simpson *et al.*[72] obtenus à partir de tissus cutanés *post-mortem* de type « négroïdes » (communément appelée « peau noire »). Nous avions donc besoin d'un matériau qui mime la mélanine. De la mélanine synthétique ainsi que de l'encre de sèche (contenant presque exclusivement de l'eumélanine) sont disponibles dans le commerce. Cependant, insolubles dans l'eau, leur utilisation n'est pas adaptée à une dilution dans la gélatine qui, comme indiqué au paragraphe précédent, est notre matrice de base. Nous avons donc essayé le café qui s'est révélé avoir un coefficient d'absorption spectral proche de celui de la mélanine, en tout cas proche de celui de la peau négroïde mesurée par Simpson *et al. ex vivo*.

Le café a donc été choisi comme absorbeur mimant la mélanine. Pour mettre au point la concentration de café dans l'eau utilisée pour dissoudre la gélatine, nous avons réalisé une série de tests « essai-erreur » de mesures d'absorbance grâce au spectrophotomètre généreusement prêté par le laboratoire LEMTA (UMR 7563 de la Faculté de Médecine de Nancy). Pour connaître la concentration optimale, nous nous sommes basés sur :

- les mesures *ex vivo* du coefficient d'absorption entre 600 et 1000 nm données par Simpson *et al.*[72] (cf. Figure 25 a).
- le fait que la mélanine a un coefficient d'absorption à décroissance exponentiellement monotone de l'UV au proche-IR.

Les courbes des Figure 25 a) et b) indiquent que la concentration optimale est atteinte en dissolvant 2 g de café en poudre dans 70 ml d'eau. Il faut noter que les échelles sont

différentes autant pour l'axe des abscisses (longueurs d'onde) que pour l'axe des ordonnées (coefficient d'absorption).



a) b)

Figure 25 : a) Données tirées de Simpson *et al*[72] : coefficient d'absorption de peau caucasienne (carrés) et de peau négroïde (ronds) mesurés *ex vivo* (barre d'ereur : écart-type), b) Spectre d'absorption de la gélatine faite avec 2 g de café diluée dans 70 ml d'eau du robinet.

La Figure 26 montre la divergence entre les deux spectres d'absorption. Cette divergence est principalement due au fait que les deux exponentielles ont des arguments différents :

- exp (-0,006) pour le café
- exp (-0,005) pour la mélanine.

A 700 nm, longueur d'onde d'intérêt pour nous, cette divergence est d'environ 26%. Cependant, le Tableau XV rappelle que la concentration en eumélanine de la peau humaine de type négroïde ou d'un mélanome peut fortement varier d'un individu à l'autre :

- 30 ± 9 ng / mg de tissu sec (n = 5) soit un écart-type d'environ 30% pour la peau négroïde.
- 63 ± 58 ng / mg (n = 10) soit un écart-type d'environ 97% pour les différents mélanomes considérés.

En conséquence, même si nous sommes bien conscients de l'approximation de notre modèle, nous pensons que cette approximation reste acceptable.

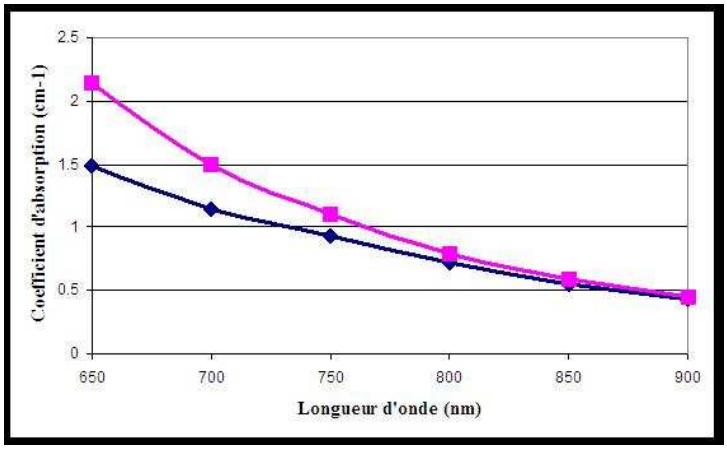


Figure 26 : Comparaison des spectres d'absorption de la peau négroïde mesuré *ex vivo* fourni par Simpson *et al.* (bleu) et de la couche de gélatine enrichie en café (2 g pour 70 ml d'eau) mise au point pour mimer l'absorption d'un mélanome (rose).

Comme schématisé sur la Figure 27, la gélatine encore fondue (chaude) est coulée dans des plaques de culture multi-puits (plaque 12 puits) dont les puits font 3,5 cm de diamètre, soit environ 2,5 fois la plus longue distance entre fibres excitatrice et réceptrice utilisée, nous permettant de négliger l'effet de réflexion de la lumière sur les bords du puits. La couche du dessous (le derme) est d'abord coulée dans le fond du puits puis laissée au réfrigérateur plusieurs heures pour totale solidification avant de couler par-dessus la couche supérieure (épiderme) suivant le même principe que la première.

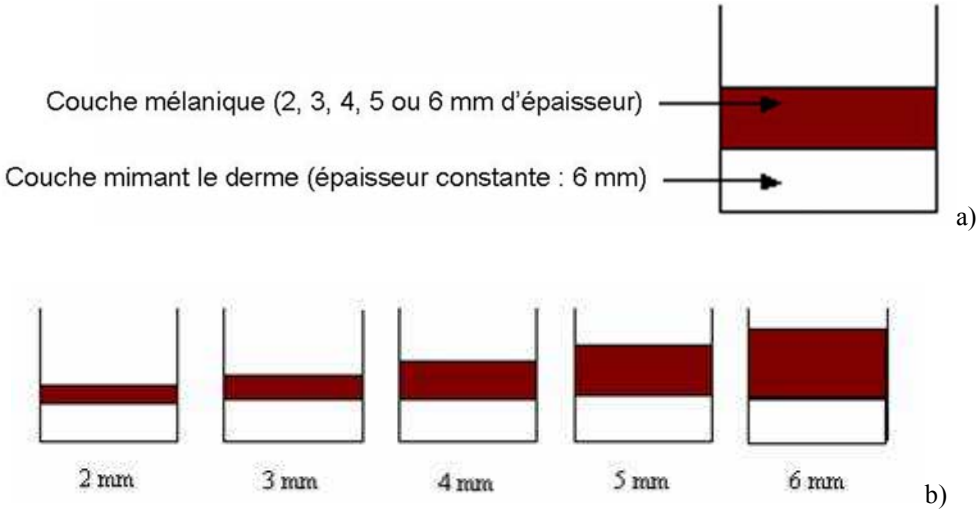


Figure 27 : Schéma des fantômes utilisés pour mimer a) derme et mélanome ainsi que b) les différentes épaisseurs de mélanomes (indices de Breslow) testées

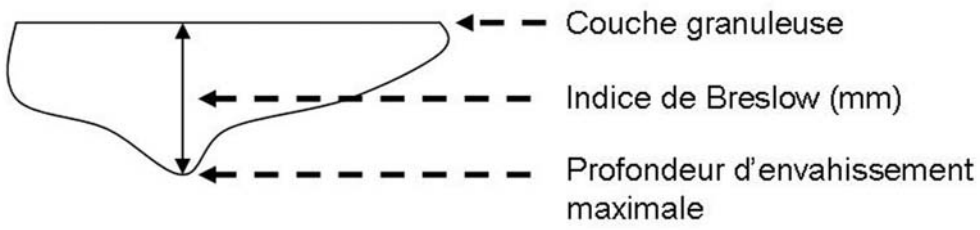
Limite de notre modèle

Notre modélisation prend le parti de représenter les mélanomes comme une couche au coefficient d'absorption homogène et à faces parallèles. Or, comme illustré sur la Figure 28 a), la pigmentation d'un mélanome est très souvent inhomogène (c'est d'ailleurs le critère

« C » de la règle ABCDE) et sa croissance se fait rarement de manière homogène sur toute sa surface : la mesure de l'indice de Breslow est réalisée par l'anatomo-pathologiste selon le plus grand axe de la lésion (cf. Figure 28 b).



a)



b)

Figure 28 : a) Photo d'un mélanome illustrant la pigmentation généralement inhomogène. Iconographie disponible sur le site *web* du *National Cancer Institute* ; b) Schéma d'une coupe transversale d'un mélanome telle qu'elle peut se retrouver sur coupe histologique pour illustrer la mesure de l'indice de Breslow.

2.2.4. Instrumentation pour la spectroscopie

Comme indiqué sur la Figure 29, l'instrumentation utilisée pour l'acquisition des spectres de réflectance diffuse se compose :

- d'une lampe Halogène-Deutérium (DH-2000, Ocean Optics, Allemagne) fibrée (connecteur SMA). Cette source a été utilisée car elle couvre le spectre UV-visible-IR : le Deutérium émet principalement dans l'UV et dans le visible et l'Halogène principalement dans le proche Infrarouge (IR) et le visible.
- d'une sonde contenant 37 fibres optiques, chacune de 200 µm de diamètre de cœur, organisées en trois cercles concentriques. Comme indiqué sur la Figure 29, une fibre optique a été choisie comme fibre optique excitatrice et six autres ont été choisies comme fibres réceptrices pour collecter la lumière réfléchie à cinq distances de la fibre excitatrice : 271 µm, 536 µm (2x271 environ), 834 µm (3x271 environ), 1076 µm (4x271 environ) et 1341 µm (5x271 environ).

Le choix des fibres dans la sonde à fibres optiques a été fait prioritairement selon les distances les séparant. En effet, l'objectif de cette étude préliminaire était de déterminer les distances inter-fibres adéquates et utilisables dans le cadre d'une future étude clinique. Nous avons donc choisi une fibre excitatrice sur le « bord » de la sonde multi-fibres (cf. Figure 30) de manière à disposer du plus large choix possible de distances inter-fibres : de la plus petite possible (271 µm) à la plus grande, qui soit également un multiple de 271 µm, soit 1341 µm (1341 = 5 x 271). C'est la première des raisons pour lesquelles nous n'avons pas choisi une répartition géométrique par exemple classiquement rencontrée dans la littérature : les fibres réceptrices disposées de manière concentrique autour de la fibre excitatrice. La seconde raison est que nous ne disposions pas du matériel adéquat pour injecter le signal reçu par toutes les fibres réceptrices concentriques et donc situées à la même distance de la fibre excitatrice dans une seule fibre raccordée au détecteur.

- d'un spectrographe imageant (iHR 320, JobinYvon Horiba, France) qui a été utilisé en mode multi-fibres pour collecter les cinq spectres simultanément aux cinq différentes distances.

Puisque l'angle et la pression des fibres optiques sur les fantômes influence la profondeur de pénétration de la lumière, nous avons choisi de fixer la sonde contenant toutes les fibres optiques sur une plateforme motorisée. De cette manière, la fibre formait un angle de 90° avec la surface plane et plate du fantôme. La répétabilité de la pression était assurée grâce à une vis micrométrique qui contrôlait la plateforme motorisée.

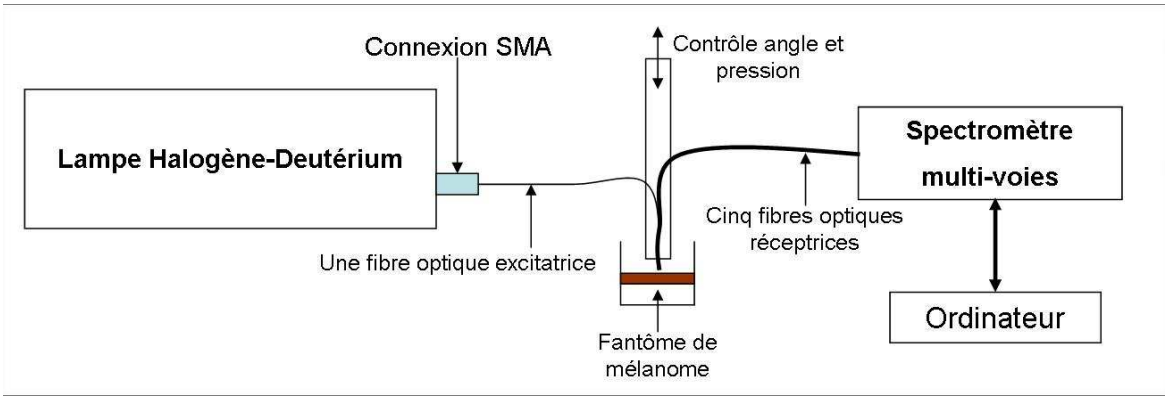


Figure 29 : Schéma bloc de l'instrumentation utilisée pour la spectroscopie de réflectance diffuse résolue spatialement pour la détermination non invasive de l'indice de Breslow du mélanome simulé par fantôme

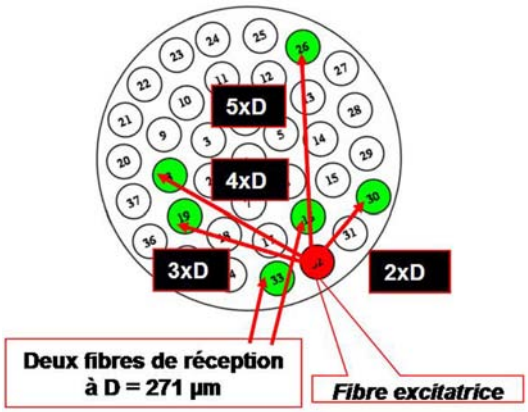


Figure 30 : Schéma en coupe de la sonde à fibres optiques utilisée pour les expérimentations montrant les différentes distances entre fibre excitatrice et fibres réceptrices choisies.

2.3. Résultats

2.3.1. Pré-traitement des spectres

Suite à un filtrage gaussien, les spectres de Réflectance Diffuse ont été calculés en divisant les spectres bruts par le spectre acquis à la plus petite distance entre fibres excitatrice et réceptrice (271 µm) sur une surface lambertienne, c'est-à-dire qui rétro-diffuse toutes les longueurs d'onde de manière isotrope. Cette surface « étalon » est un standard en PTFE (WS-1, Ocean Optics, Allemagne).

2.3.2. Présentation des spectres pré-traités

La Figure 31 montre les spectres de réflectance obtenus à toutes les distances inter-fibres pour chaque épaisseur de couche mimant un mélanome : a) 2 mm , b) 3 mm , c) 4 mm , d) 5 mm et e) 6 mm. Comme attendu, l'intensité est faible jusqu'à 500 nm (étendue spectrale sur laquelle la mélanine absorbe le plus) et nous observons que pour chaque épaisseur de mélanome, plus la distance entre excitation et réception augmente plus l'intensité du signal est faible.

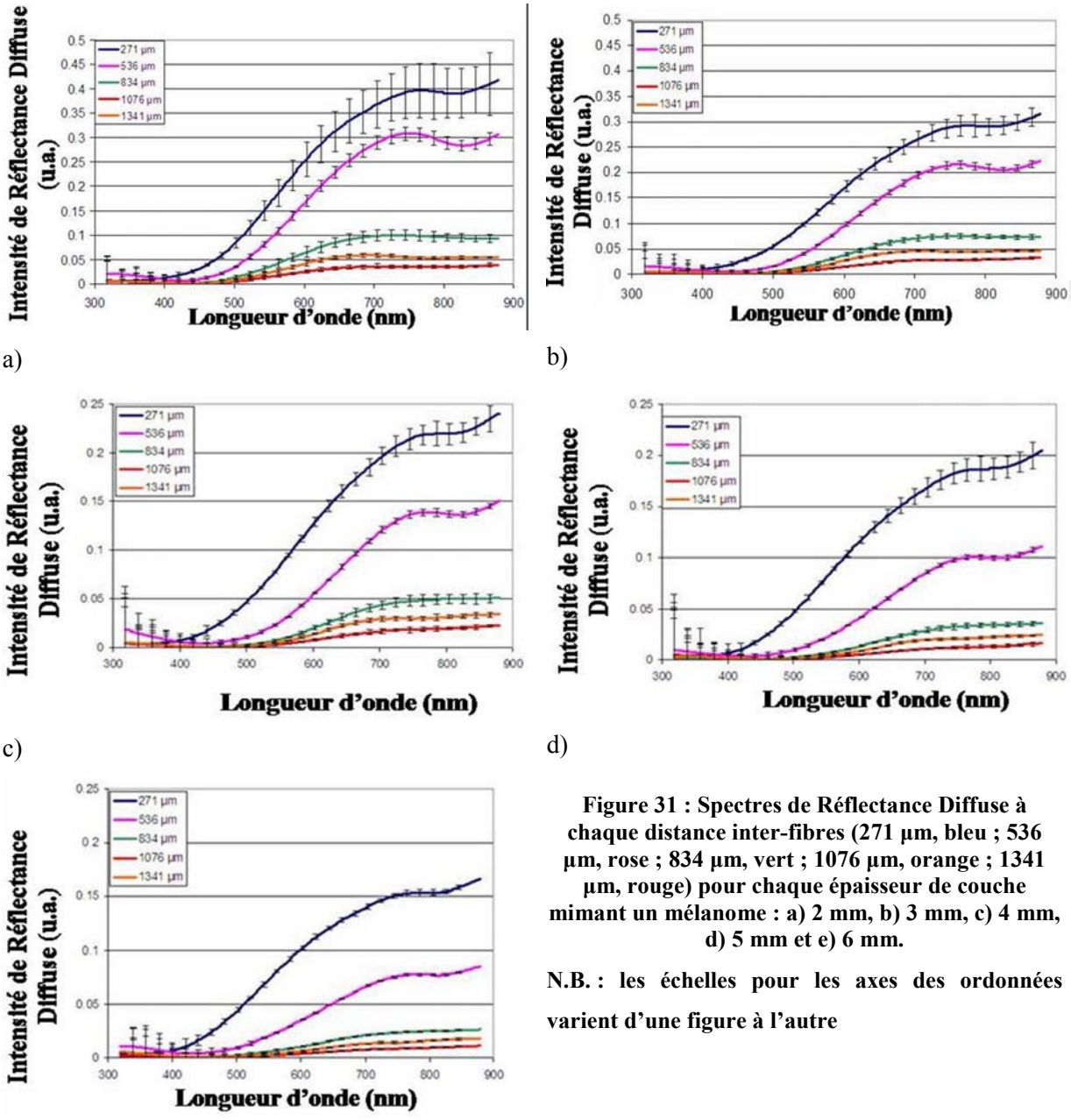
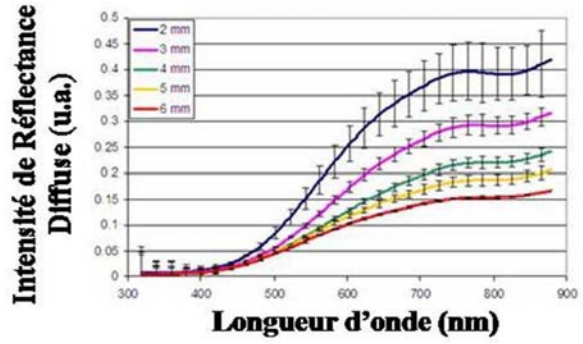


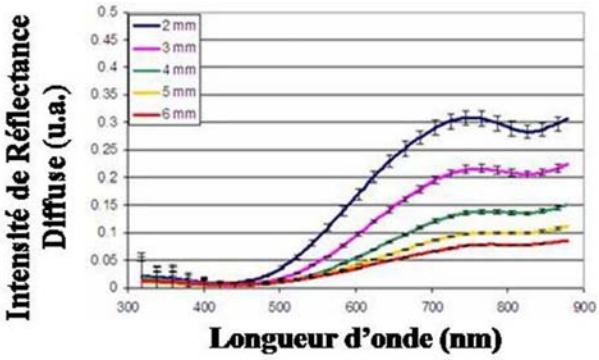
Figure 31 : Spectres de Réflectance Diffuse à chaque distance inter-fibres (271 µm, bleu ; 536 µm, rose ; 834 µm, vert ; 1076 µm, orange ; 1341 µm, rouge) pour chaque épaisseur de couche mimant un mélanome : a) 2 mm, b) 3 mm, c) 4 mm, d) 5 mm et e) 6 mm.

N.B. : les échelles pour les axes des ordonnées varient d'une figure à l'autre

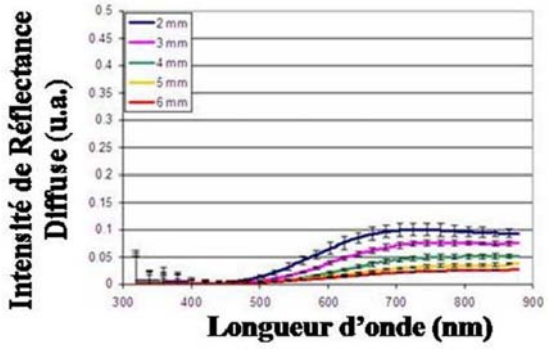
La Figure 32 montre les spectres de réflectance obtenus pour toutes les épaisseurs de mélanome à chaque distance entre excitation et réception : a) 271 µm, b) 536 µm, c) 834 µm, d) 1076 µm et e) 1341 µm. Nous observons qu'à chaque distance entre excitation et réception, plus l'épaisseur de la couche absorbante est grande, plus l'intensité du signal est faible.



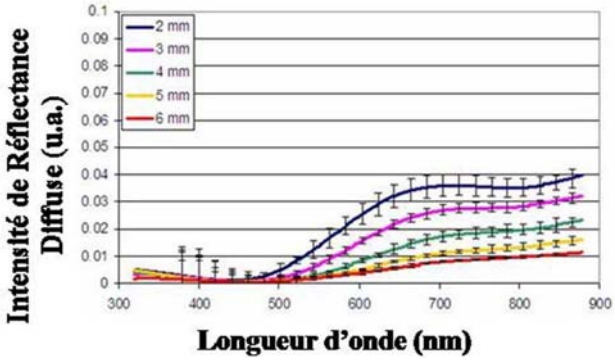
a)



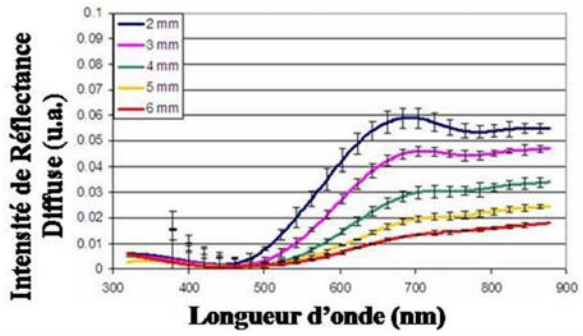
b)



c)



d)



e)

Figure 32 : Spectres de Réflectance Diffuse pour chaque épaisseur de couche mimant un mélanome (2 mm, bleu ; 3 mm, rose ; 4 mm, vert ; 5 mm, jaune et 6 mm, rouge) à chaque distance inter-fibres : a) 271 µm, b) 536 µm, c) 834 µm, d) 1076 µm, e) 1341 µm.

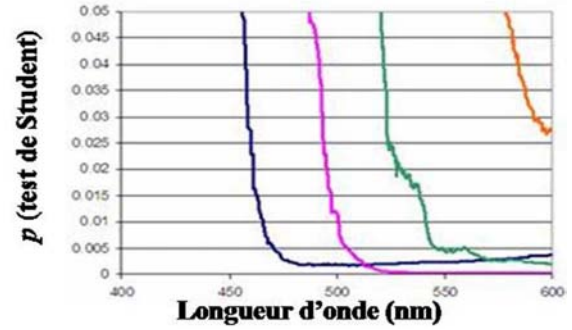
N.B. : les échelles des axes des ordonnées varient d'une figure à l'autre

Des tests statistiques (Student) ont été réalisés pour savoir à quelles longueurs d'onde l'intensité des spectres était significativement différente d'une épaisseur de couche à une autre. La différence a été considérée statistiquement significative si la valeur *p* était inférieure à 0,05. Ce seuil de valeur indique que le risque statistique que le résultat trouvé soit dû au hasard (ou à une erreur d'échantillonnage) est inférieur à 5%.

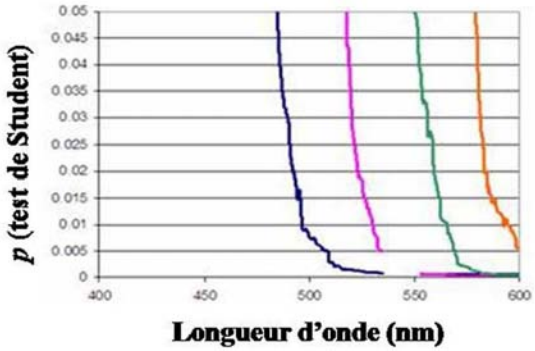
La Figure 33 montre les résultats statistiques obtenus pour la discrimination entre épaisseurs les plus proches (différentes d'1 mm) à chaque distance entre excitation et réception : a) 271 µm, b) 536 µm, c) 834 µm, d) 1076 µm et e) 1341 µm. Nous observons que *p* devient inférieur à 0,05 pour des longueurs d'onde d'autant plus petites que les couches à discriminer sont

fines. Cependant, on peut observer que pour les couches les plus épaisses, *p* devient inférieur à 0,05 pour les longueurs d'onde supérieures à 600 nm.

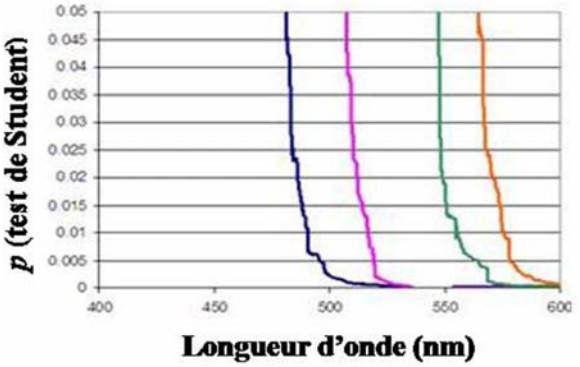
Nous en concluons que la configuration que nous utilisons pour la spectroscopie de réflectance diffuse permet la discrimination des couches d'épaisseur différant d'1 mm pour une épaisseur maximale de 6 mm à toutes les longueurs d'onde supérieures à 600 nm pour les distances inter-fibres comprises entre 271 et 1341 µm.



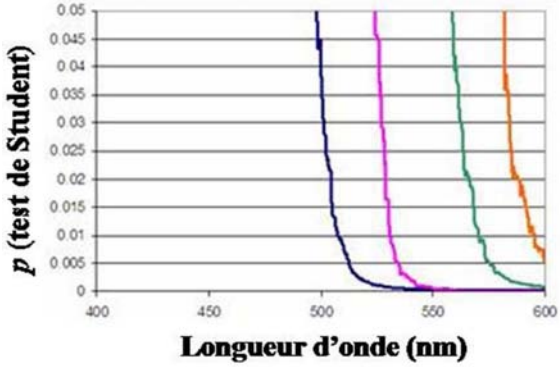
a)



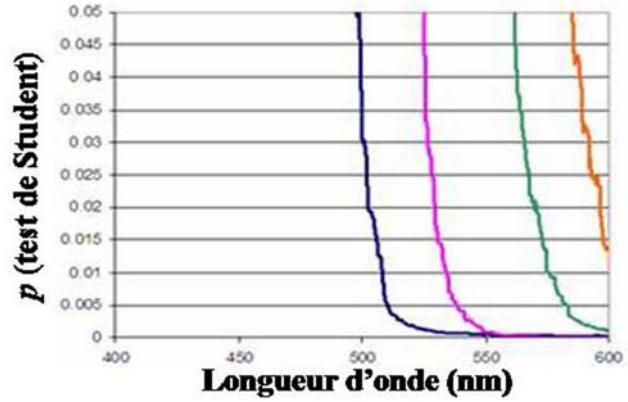
b)



c)



d)



e)

Figure 33 : Valeur *p* du test de Student pour la discrimination de deux couches mélaniques dont les épaisseurs varient entre elles d'1 mm (2 mm *vs.* 3 mm, bleu ; 3 mm *vs.* 4 mm, rose ; 4 mm *vs.* 5 mm, vert ; 5 *vs.* 6 mm, orange) à chaque distance inter-fibres : a) 271 µm, b) 536 µm, c) 834 µm, d) 1076 µm, e) 1341 µm.

Nous avons choisi de poursuivre l'analyse des résultats pour la réflectance à 700 nm. Les résultats présentés dans la suite de l'étude concernent donc uniquement les signaux obtenus à cette longueur d'onde. Nous avons fait ce choix pour deux raisons :

- nos tests statistiques (cf. Figure 32) indiquent que la significativité (p<0,05) est obtenue à partir de 600 nm
- Marchesini *et al.*[48] (cf. Tableau XIII, cf. § 2.1.3.) ont trouvé que la réflectance diffuse permettait le diagnostic de malignité avec une sensibilité et une spécificité de 77% et 90% aux longueurs d'onde supérieures à 700 nm.

Nous avions alors plusieurs manières d'analyser nos résultats :

- une méthode « absolue »
- une méthode « relative »

2.3.3. Evaluation du potentiel de discrimination des différentes épaisseurs

- Méthode absolue

Elle est fondée sur les différences de valeurs absolues d'intensité. Il s'agit de voir si la discrimination est meilleure à une distance plutôt qu'une autre. Ainsi, on se base sur la valeur d'intensité absolue du signal de réflectance à chaque distance. La Figure 33 et le Tableau XVI montrent qu'à toutes les distances testées, p est inférieur à 0,05. Il apparaît que les distances les plus grandes sont celles qui permettent la meilleure discrimination.

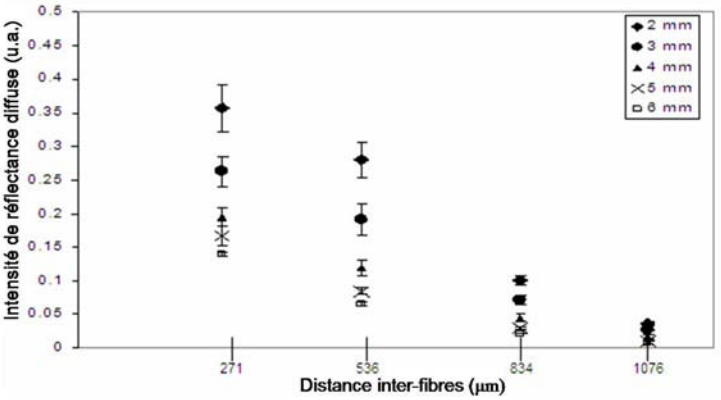


Figure 34 : Intensité du signal de réflectance diffuse à 700 nm en fonction de la distance inter-fibres pour chaque épaisseur de couche mélanique

Tableau XVI : Valeur maximale (parmi les cinq valeurs obtenues) du p du test de Student pour chaque distance inter-fibres

Distances inter-fibres (µm)	p max
271	0,01
536	0,0005
834	0,0002
1076	0,0002

Cependant cette méthode d'analyse de résultats présente deux inconvénients :

- aux plus grandes distances, l'intensité du signal est faible et donc plus bruitée qu'aux autres distances
- se baser sur les valeurs absolues impliquerait en essai clinique d'avoir déterminé des abaques de valeurs absolues d'intensité du signal pour chaque épaisseur de mélanome (« indice de Breslow »). Or ce type de méthode est inenvisageable dans la perspective d'un essai clinique pour des raisons de manque de robustesse aux variations :
    - intra- et inter- individuelles : l'intensité de coloration varie d'une personne à l'autre et pour une lésion, d'un endroit à un autre d'un même mélanome
    - instrumentales : les variations d'intensité de la source excitatrice notamment influenceront directement la valeur absolue du signal d'où la nécessité de mettre en œuvre une procédure d'étalonnage qui allonge le temps de manipulation et de traitement des données.

Pour éviter ces différents biais, nous avons pensé à développer une méthode d'analyse des résultats qui soit « relative » c'est-à-dire qui ne se base pas uniquement sur la valeur du signal de réflectance à une distance donnée mais sur la décroissance de l'intensité du signal en fonction de la distance inter-fibres.

- Méthode relative

Nous avons décidé d'étudier la fonction donnant l'intensité du signal de réflectance diffuse en fonction de la distance inter-fibres pour différentes épaisseurs de mélanome simulé par fantôme. Comme indiqué sur la Figure 35 :

- cette fonction semble décroître de façon linéaire
- plus l'épaisseur du mélanome simulé est importante plus la valeur absolue de la pente est petite.

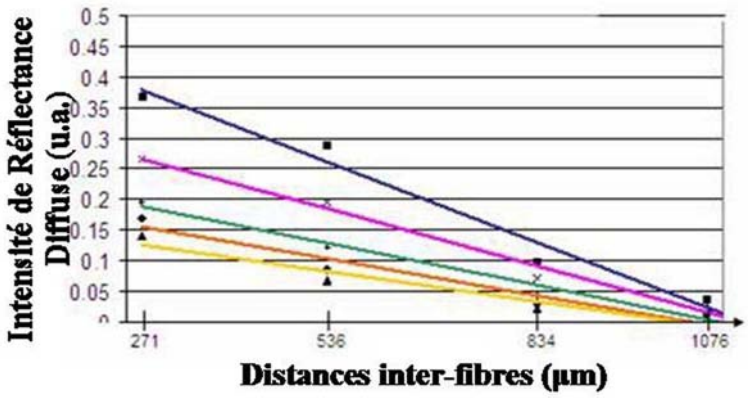


Figure 35 : Régression linéaire de la décroissance de l'intensité du signal de reflectance diffuse à 700 nm en fonction de la distance inter-fibres : bleu, 2 mm ; rose, 3 mm ; vert, 4 mm ; orange, 5 mm et jaune, 6mm.

Pour confirmer l'impression de linéarité, nous avons testé la valeur du facteur de régression linéaire R^2 pour chaque épaisseur. Comme indiqué dans le Tableau XVII, tous les R^2 sont supérieurs à 0,92, confirmant donc la linéarité de la décroissance du signal.

Tableau XVII : Coefficient de régression linéaire de la décroissance du signal de réflectance diffuse à 700 nm en fonction de la distance entre fibre inter-fibres pour chaque épaisseur de mélanome (Indice de Breslow) testée

Epaisseur de la couche supérieure ("mélanome")	Pente (valeur absolue)	R^2
2 mm	0,004	0,97
3 mm	0,003	0,98
4 mm	0,002	0,97
5 mm	0,002	0,94
6 mm	0,002	0,92

Restait à savoir si les valeurs de pente étaient significativement différentes d'une épaisseur de mélanome simulé à une autre. La Figure 36 indique les valeurs de pente accompagnées de leur écart-type (n=5) pour chaque épaisseur de mélanome. Le Tableau XVIII donne les résultats du test de Student réalisé entre les plages de valeurs de pentes obtenues pour des épaisseurs variant d'1 mm. Toutes les valeurs de *p* sont inférieures à 0,05.

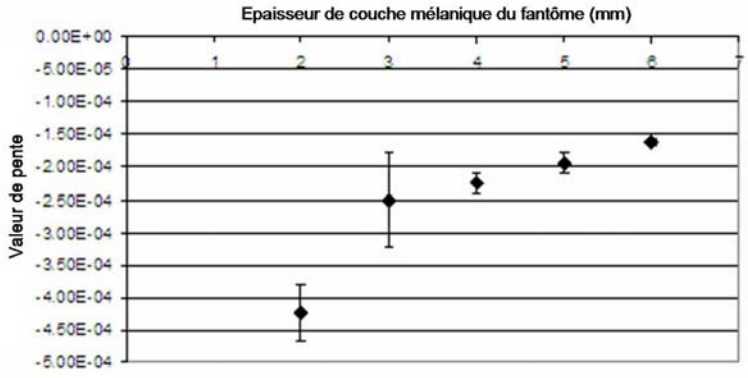


Figure 36 : Valeur de pente de la décroissance de l'intensité du signal de reflectance diffuse à 700 nm en fonction de la distance inter-fibres pour chaque épaisseur de couche mélanique

Tableau XVIII : Valeurs de p du test de Student fait pour discriminer des épaisseurs de couches mélaniques variant d'1 mm

Épaisseur de couches mélaniques supérieures	p (n=5)
2 *vs.* 3mm	0.0046
3 *vs.* 4 mm	0.0039
4 *vs.* 5 mm	0.0139
5 *vs.* 6 mm	0.0026

2.3.4. Simulation numérique

Pour confirmer nos résultats et tester d'autres indices de Breslow, nous avons choisi d'utiliser le programme de simulation numérique mis au point par Emilie Péry[79], doctorante dans notre équipe. Ce programme de simulation est basé sur la méthode de Monte Carlo et est inspiré, pour la partie diffusion du programme qui nous concerne, des codes publiés par Prahl *et al*.[80] Wang *et al*.[81] et Jacques *et al*.[82] Il approxime les milieux biologiques sous la forme de milieux microscopiquement homogènes (un coefficient de diffusion pour toute une couche simulée comme le derme par exemple sans tenir compte des variations locales) ce qui est une configuration parfaitement adaptée à notre cas puisque nous souhaitons comparer les données numériques à nos données expérimentales obtenues sur fantômes. Or les fanômes sont eux-mêmes des approximations de la réalité constitués de couches (mélanome et derme) aux coefficients optiques homogènes. La méthode de Monte Carlo consiste à transformer un problème déterministe en un problème probabiliste : une série de nombres est utilisée pour simuler des processus aléatoires tels que la propagation des photons dans les milieux diffusants que sont les tissus biologiques. Nous avons utilisé cet outil car il était primordial d'évaluer notre méthode sur des épaisseurs plus petites. En effet, comme indiqué par la Figure 37, la majorité des mélanomes diagnostiqués le sont à de petits indices de Breslow. Or nous n'avions pas réussi à confectionner des couches d'épaisseur inférieure à 2 mm qui soient homogènes. Nous avons donc utilisé la simulation numérique pour réaliser des tests sur des couches d'épaisseurs comprises entre 1 et 6 mm, par pas de 0,5 mm.

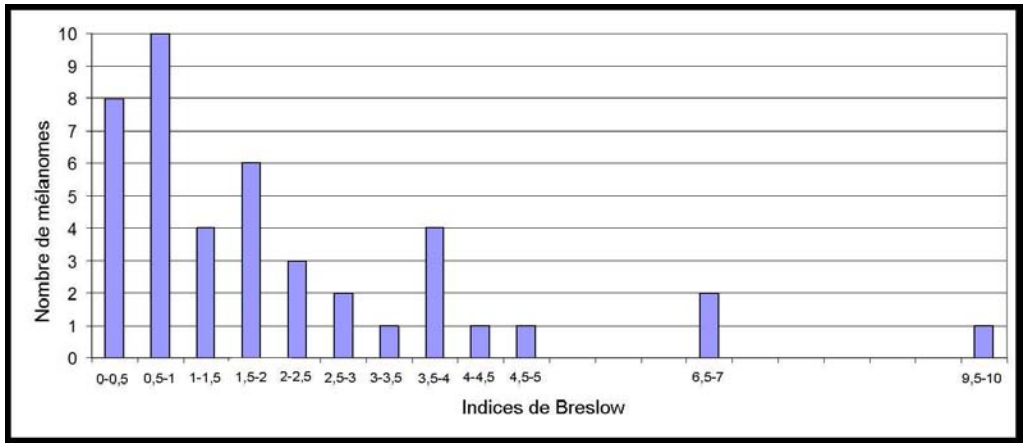


Figure 37 : Indices de Breslow des mélanomes pris en charge au Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Nancy en 2004. Données généreusement fournies par Dr. Florence Granel-Brocard (Dermatologue) et Mme Charlotte Carnin (Attachée de recherche clinique).

Comme le montrent la Figure 37 et le Tableau XIX, la linéarité de la décroissance est confirmée avec des R^2 supérieurs à 0,94 pour toutes les épaisseurs considérées. Nous constatons à nouveau que l'épaisseur est inversement proportionnelle à la valeur absolue de la pente de décroissance du signal en fonction de la distance. Puisqu'il s'agit de simulation numérique, nous ne pouvons pas réaliser de test statistique qui permettrait de déterminer si les valeurs d'intensité du signal de réflectance sont significativement différentes. Cependant nous nous rendons compte que les intensités de réflectance diffuse pour les couches d'1 mm et de 1,5 mm d'épaisseurs semblent très différentes entre elles au moins autant sinon davantage que les intensités pour les couches de 2 et 3 mm d'épaisseurs. Donc si le test de Student est significatif pour la discrimination des couches de 2 et 3 mm, il devrait donc l'être également pour les couches de 1 et 1,5 mm d'épaisseur.

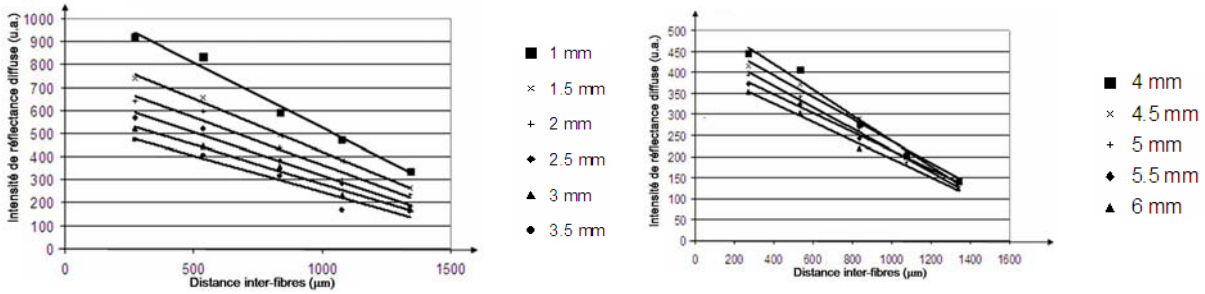


Figure 38 : Intensité de réflectance diffuse à 700 nm en fonction de la distance entre fibre excitatrice et fibres récéptrices a) pour les fines couches testées (1-3,5 mm) et b) pour les couches les plus épaisses (4-6 mm)

Tableau XIX : Valeurs de pente et de coefficient de régression linéaire obtenues en simulation numérique pour chaque indice de Breslow testé

Epaisseur de couche mélanique supérieure	Pente (valeur absolue)	Coefficient de regression linéaire (R^2)
1 mm	0,55	0,98
1,5 mm	0,46	0,99
2 mm	0,41	0,97
2,5 mm	0,37	0,98
3 mm	0,34	0,98
3,5 mm	0,31	0,94
4 mm	0,30	0,98
4,5 mm	0,26	0,98
5 mm	0,25	0,99
5,5 mm	0,22	0,99
6 mm	0,21	0,99

2.4. Conclusion et perspectives

Ces travaux nous ont permis de voir que la spectroscopie de réflectance diffuse résolue spatialement est un outil potentiellement capable de réaliser une détermination non-invasive de l'indice de Breslow à 700 nm. La méthode, dite « relative », d'exploitation des spectres mesurés semble la plus prometteuse dans la perspective d'un transfert clinique. Il s'agirait alors de réaliser des mesures sur les lésions suspectes, d'exciser la lésion, d'obtenir la valeur de l'indice de Breslow après examen anatomo-pathologique et de déterminer si des valeurs de pentes pourraient être corrélées à des indices de Breslow. L'essai clinique permettrait également de nous assurer que la méthode est robuste aux variations inter-individuelles de caractéristiques des mélanomes : géométrie, pigmentation, etc. Nous avons réalisé l'analyse de nos résultats pour la longueur d'onde 700 nm car il s'agit d'une longueur d'onde à laquelle la réflectance diffuse a déjà permis d'obtenir une sensibilité et une spécificité de 77% et 90% respectivement (cf. Marchesini *et al.*[48]) pour le diagnostic de malignité. La combinaison de nos résultats avec ceux obtenus par Marchesini *et al.* [48] indiquent que la spectroscopie de réflectance diffuse est un outil qui a le potentiel d'établir un diagnostic complet de la lésion. Si ces résultats étaient confirmés en clinique alors la prise en charge du mélanome pourrait être envisagée en une seule étape au lieu de deux actuellement pratiquées.

3. Etude *in vivo* : classification de différents stades de peau murine irradiée aux ultraviolets par anatomo-pathologie et par spectroscopie bimodale.

3.1. Etat de l'art

3.1.1. Contexte médical : les lésions kératinocytaires

Elles dérivent des kératinocytes contenus dans l'épiderme et dans les annexes cutanées. Elles comprennent un grand nombre de lésions allant des proliférations bénignes aux carcinomes épidermoïdes (CE), lésions malignes qui peuvent parfois devenir invasives. C'est ce dernier type de lésion auquel nous allons nous intéresser dans la présente étude. Les tumeurs kératinocytaires sont très fréquentes et, malgré leur faible taux de mortalité, elles représentent un important problème de santé publique. Le principal facteur étiologique est le rayonnement solaire qui induit des altérations de l'ADN, dont des dimères de pyrimidine qui, durant la réplication de l'ADN, conduisent à des mutations CC:TT au niveau du codon du gène suppresseur de tumeur p53. D'autres gènes comme le PTCH et l'oncogène RAS sont impliqués dans la formation des cancers de la peau qui comporte plusieurs étapes.
On pourra se reporter au § 1.2.1 du présent mémoire pour des notions d'épidémiologie sur les carcinomes épidermoïdes (CE). De nombreuses anomalies de prolifération intra-épidermique (dysplasies) peuvent être précurseurs des CE, en particulier les kératoses actiniques et la maladie de Bowen (qui est un carcinome intra-épidermique aussi appelé carcinome *in situ*).

Les kératoses actiniques (Synonyme : kératoses solaires)
Les kératoses actiniques sont des lésions érythémateuses qui ont tendance à desquamer et qui apparaissent sur les zones exposées au soleil des personnes à peau claire. Il est difficile de déterminer l'incidence des kératoses actiniques car elles ont tendance à apparaître et disparaître spontanément. Bien que le taux d'évolution maligne soit faible, certaines études ont montré que ces kératoses actiniques pouvaient être précurseurs de CE.

Histopathologie

D'un point de vue histologique, elles présentent d'abord des lésions dermiques dues à l'exposition au soleil puis sont suivies par l'apparition de lésions épidermiques. Les modifications au niveau du derme incluent notamment une élastose solaire, une infiltration de lymphocytes et une vascularisation accrue. Au niveau de l'épiderme, les anomalies se répartissent souvent de manière hétérogène (on dit aussi de manière « focale »). On distingue les anomalies de maturation (hypogranulose, hyperkératose, parakératose, dyskératose) des anomalies (atypies) cellulaires (grossissement du noyau, hyperchromatisme, pléomorphisme, activité mitotique, pâleur cytoplasmique). On retrouve également une désorganisation cellulaire due à une prolifération désordonnée avec des atypies d'intensité variable.

Il a été proposé d'attribuer des grades au Néoplasie Intraépidermiques Kératinocytaires (ou *Keratinocytic Intraepidermal Neoplasia*, KIN pour l'acronyme anglophone) : KIN I, II et III.

D'après la classification proposée par Cockerell[83]

- La classe KIN I est caractérisée par une atypie focale des kératinocytes basaux limitée au tiers inférieur de l'épiderme.
- La classe KIN II est caractérisée par une atypie focale des kératinocytes qui s'étend jusqu'aux 2 tiers inférieurs de l'épiderme, concernant parfois également les kératinocytes de l'acrosyringium (partie intra-épidermique du canal sudoral) et s'accompagnant parfois d'une hyperkératose.
- La classe KIN III par une prolifération de kératinocytes atypique diffuse dans toute l'épaisseur de l'épiderme.

KIN I et II sont souvent regroupés sous le terme KIN « de bas grade » alors que KIN III est considérée comme une néoplasie intraépidermique de haut grade également appelée « maladie de Bowen » ou carcinome épidermoïde *in situ*.

Les lésions pour lesquelles une dysmaturation et une atypie apparaissent sur toute l'épaisseur de l'épiderme ont été labellisée "kératoses actiniques bowenoïdes » (KAB).

Pronostic et facteurs de prédiction

Les kératoses actiniques non-traitées évoluent en CE invasif dans 8 à 20% des cas[84]. Elles sont également considérées comme facteurs de risque pour les carcinomes baso-cellulaires (CBC) et les mélanomes. Les kératoses actiniques peuvent cependant rester stables pendant de nombreuses années et peuvent régresser grâce à une photo-protection. Des patients âgés porteurs de plusieurs lésions, suivis pendant plus de 10 ans, ont montré un risque de progression compris entre 6 et 10% alors que 14% des patients portant plus de 10 kératoses actiniques développent des CE invasifs dans les 5 ans[84]. Parmi tous les CE, 60% ont été estimés comme évoluant à partir de kératoses actiniques et plus récemment des kératoses

actiniques jouxtant les CE ont été identifiées dans 82 à 97% des cas[84]. Certains classifient les kératoses actiniques comme un type de CE plutôt que comme une forme précurseur. Il ne peut cependant pas être démontré que les kératoses actiniques évoluent inexorablement vers des CE. L'hypothèse que d'autres mutations génétiques soient nécessaires avant une expression clinique de malignité est plausible.

Maladie de Bowen

Dans le cas de la maladie de Bowen, l'atypie des kératinocytes se retrouve sur toute l'épaisseur de l'épiderme, parfois même dans les follicules pileux et dans les conduits excréteurs de sueur. Bien que la maladie de Bowen soit décrite comme un CE *in situ*, aucune étude n'a porté sur le taux de transformation maligne (sur le risque d'invasivité et de métastases) de ce type de lésions. Dans le cas où un CE invasif se développe à partir d'une telle lésion, la phase *in situ* est souvent très longue (plusieurs années).

Carcinomes épidermoïdes

Etiologie

De nombreuses études ont montré que les radiations ultraviolettes (UV), les UVB en particulier, contribuaient à la formation de CE. Les CE se développent selon un processus comprenant plusieurs étapes dont l'activation de proto-oncogènes et/ou l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur au sein des kératinocytes. Les kératoses actiniques évoluant en CE présentent des mutations du gène K-ras. Il en ressort que ces anomalies génétiques semblent avoir un impact crucial dans la carcinogenèse d'au moins une partie des CE.

De fortes doses d'ultraviolet peuvent aussi causer le développement de lésions cancéreuses en induisant des radicaux libres comme l'oxygène singulet qui joue un rôle important dans les dommages intra-cellulaires. L'augmentation de la production de radicaux libres et/ou la décroissance de l'efficacité du système de défense anti-oxydant contribuent aux nombreux processus de dégénérescence incluant la formation de dimères de pyrimidine et la perte d'hétérozigotie (LOH). Les deux gènes suppresseurs de tumeur TP53 et PTCH qui sont victimes de perte d'hétérozigotie induisent des Carcinomes Baso-Cellulaires (CBC). Les CE ont des mutations des gènes H-Ras et du locus INK4a. Les patients atteints de Xéroderma Pigmentosum (XP) présentent également d'autres mutations du gène TP53.

Des agents carcinogènes exogènes également connus incluent 1) le tabac, 2) le virus à papillome humain, 3) l'arsenic etc. On ne s'intéressera dans cette étude qu'aux CE causés par les UV.

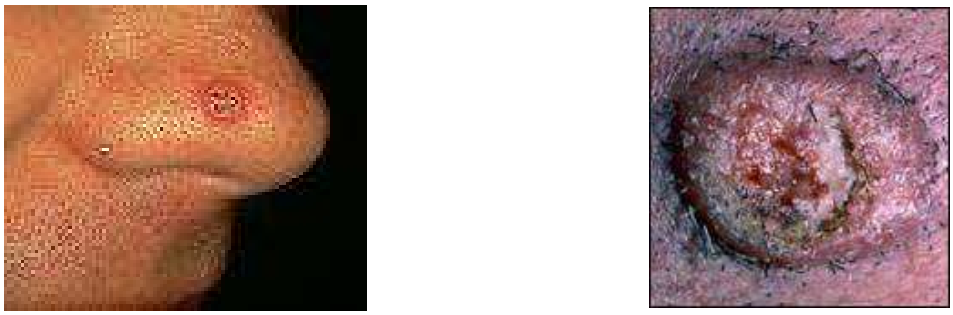
Les patients ayant subi une transplantation d'organe sont particuliers sujets à développer des CE. La plupart des morts causées par les CE sont recensées en Australie suggérant que le soleil joue un rôle important non seulement mutagène mais également immunosuppresseur.

Localisation

La plupart des CE se développent dans des zones exposées au soleil comme le front, le visage, les oreilles, le cuir chevelu, le cou et le dessus des mains. La partie vermillon de la lèvre inférieure est également un site à risque.

Aspect clinique

Les carcinomes épidermoïdes se présentent souvent comme des ulcérations avec une croûte de kératine surélevée ou comme des plaques ou des nodules (cf. Figures 39 a) et b). La peau autour de la lésion présente souvent des modifications causées par le rayonnement solaire.



a) b)

Figure 39 : Photographies de carcinomes épidermoïdes. a) Iconographie disponible sur le site *web* du *South Coast medical Center*. b) Iconographie disponible sur le site *web* du *National Institute of Cancer.*

Histo-pathologie

Les CE sont généralement constitués de cellules épithéliales spineuses regroupées en nids qui se développent à partir de l'épiderme jusque dans le derme sur une distance variable. Les cellules présentent souvent un cytoplasme éosinophile ainsi qu'un grand noyau vésiculaire. Des ponts intercellulaires proéminents, une kératinisation centrale de taille variable et la formation de perles, en fonction du degré de différenciation de la tumeur, sont également visibles.

Le degré d'anaplasie des cellules à l'intérieur des nids tumoraux sert à donner le grade de la tumeur. La lésion considérée est ensuite classée dans l'une des catégories suivantes, en fonction de la capacité de la tumeur à reproduire le tissu normal épidermique : bien, modérément ou peu différenciée. La plupart des CE se développant à partir de kératoses actiniques, des éléments caractéristiques des kératoses actiniques sont souvent présents à la périphérie de la tumeur invasive et dans le derme sous-jacent.

Pronostic et facteurs de prédiction

La majorité des CE sont agressifs uniquement à l'échelle locale et peuvent être traités de diverses manières. Les CE se développant chez les patients immunodéprimés (atteints par le HIV par exemple) sont en général plus agressifs. Les tumeurs présentant une invasion profonde, une faible différenciation, une invasion périnerveuse et des caractéristiques acantholytiques présentent plus de risques de réapparaître ou de métastaser. De faibles marges de résection sont un autre facteur de risque de rechute.

L'épaisseur de la tumeur est, comme dans le cas du mélanome, un facteur pronostique. Les tumeurs de 2 mm ou moins d'épaisseur ne métastasent que rarement, les tumeurs d'épaisseur comprise entre 2 et 5 mm ont un risque modéré alors que les tumeurs de plus de 5 mm d'épaisseur métastasent dans environ 20% des cas[84].

La diamètre est également un facteur pronostique : les tumeurs de plus de 2 cm de diamètre présentent plus de risques de métastaser et de réapparaître que les lésions de plus faible diamètre.

La plupart des patients présentant des cancers non-mélanocytaires ont un excellent pronostic. La mortalité des cancers non mélanocytaires est très faible mais significativement plus élevée pour les CE que pour les CBC. Les CE ont le potentiel de réapparaître et de métastaser avec un taux de réapparition sur 5 ans de 8%. Les CE se développant à partir de kératoses actiniques métastasent dans 0,5 à 5% des cas. Les patients pour lesquels les métastases sont déjà apparues ont un mauvais pronostic. Le taux de survie à 10 ans est inférieur à 20% pour les patients dont les ganglions sont atteints et inférieur à 10% pour les patients qui présentent des métastases à distance. Plus de 70% des rechutes de CE et des métastases ses développent dans les 2 ans de traitement de la tumeur primaire et 95% dans les 5 ans. Le risque cumulatif à 3 ans de développer un cancer de la peau pour une personne ayant eu un CE est de 35 à 60% et le risque de mélanome est également augmenté[84].

3.1.2. Modèles animaux

Deux principaux modèles de CE sur souris ont été décrits dans la littérature : ils diffèrent par la race de souris utilisée et surtout par l'agent carcinogène employé qui est, soit le DMBA-TPA (produit chimique à badigeonner sur la peau), soit l'UV. Le DMBA (DiMéthylBenza Anthracène) est un hydrocarbure polycyclique aromatique. Il a été proposé comme initiateur de la carcinogenèse pour des raisons historiques. En effet, le premier cancer professionnel identifié a été le cancer du scrotum chez les ramoneurs. Or la suie est un vecteur de molécules de type hydrocarbure dont le potentiel carcinogène a été depuis largement prouvé. Concernant

le rayonnement ultra-violet, on a vu en introduction qu'il s'agissait du principal facteur étiologique environnemental associé aux cancers cutanés.

Cependant Lacave[85] note que dans le modèle de souris glabres (« hairless ») irradiées aux UV, l'observation des mutations de p53 sont proches de ce qui est observé chez l'homme, à savoir la présence de mutations précoces dans la peau murine irradiée normale et dans les carcinomes UV-induits. En revanche dans les modèles d'oncogenèse chimique, les mutations de p53 semblent intervenir plus tardivement au cours du développement tumoral montrant que les anomalies moléculaires observées dans les carcinomes cutanés varient selon le facteur carcinogène déclenchant.

De même, Pentland *et al.*[86] notent que les caractéristiques génétiques sont différentes entre les lésions cutanées chimio-induites et les lésions UV-induites. Dans le cadre de leurs études sur les chimio-thérapies, ils recommandent donc de développer des modèles tumoraux se conformant davantage à l'étiologie humaine c'est-à-dire causés par l'irradiation UV.

Le rayonnement ultraviolet est appelé carcinogène « complet » car il est la cause des 3 étapes classiquement définies dans la carcinogenèse que sont[14] :

- initiation : elle se définit comme l'interaction irréversible entre un carcinogène et l'ADN d'un tissu. Le dommage causé à l'ADN est nécessaire mais pas suffisant à la tumorogenèse. N'induisant pas de modification morphologique, elle ne peut pas être détectée par l'examen anatomo-pathologique mais elle induit des cellules précurseurs de la future tumeur
- promotion : la promotion tumorale est un processus réversible qui facilite l'expression des cellules initiées et qui mène à l'émergence de lésions précurseurs et de tumeurs bénignes. Les promoteurs peuvent induire des tumeurs à partir des cellules initiées mais ne sont pas cancérogènes en eux-mêmes. De plus, les tumeurs ne se développent pas lorsque l'agent promoteur est appliqué avant et non après l'agent initiateur. Cela démontre que, à la différence des effets des agents initiateurs, les modifications cellulaires secondaires à l'application des promoteurs n'altèrent pas directement l'ADN et sont réversibles.
- progression : la progression est le processus durant lequel à partir du clone initial, l'accumulation d'altérations génétiques mène à la transformation progressive des cellules normales en cellules fortement malignes

N.B. : L'avancée des connaissances permet de se rendre compte que ce schéma, bien que pertinent, soit par lui-même bien trop grossier. En réalité, la cancérogenèse est un phénomène certes « pluri-étapes » mais certaines des mutations génétiques classiquement associées à

chacune des trois étapes mentionnées précédemment sont décisives alors que d'autres ne le sont pas. On ignore en particulier si l'ordre des évènements doit être respecté ou si seule le cumul final importe. A ce jour, on doit donc émettre des réserves sur la réalité de ce schéma.

Nous avons donc choisi de développer un modèle tumoral UV-induit sur souris SKH1 qui est la race de souris la plus utilisée dans ce modèle de carcinomes épidermoïdes (CE). Il nous a ensuite fallu déterminer toutes les variables physiques rappelées par de Gruijl et van der Leun[87] dans leur revue sur le thème de la photo-carcinogenèse expérimentale :

- le domaine spectral d'irradiation : en effet, un spectre d'action qui donne la section efficace de réaction en fonction de la longueur d'onde permet de déterminer une longueur d'onde optimale qui induit l'effet biologique escompté i.e. dans notre cas, le développement tumoral. Plusieurs études ont permis de déterminer un spectre d'action nommé le SCUP-m (*Skin Cancer Utrecht-Philadelphia-murine*) dont le maximum est à 293 nm pour la génération de dimères de thymine de gène p53. Nous privilégierons donc la partie UVB du spectre qui s'étend entre 280 et 315 nm. Pour information, la bande spectrale UVA s'étend de 315 à 380 nm[88].
- l'exposition (dose en J/cm²) : la dose est égale à l'irradiance incidente sur la peau (W/cm²) multipliée par le temps d'exposition (s). Plus cette dose est élevée plus les effets biologiques sont importants. Cependant il est crucial de préserver les tissus de la nécrose. Pour éviter cela, nous nous sommes référés à la « Dose Erythémateuse Minimale» (acronyme anglophone : MED) pour ne pas la dépasser et donc ne pas brûler la peau des souris. En fonction des références bibliographiques, cette MED est estimée à environ 100 mJ/cm².
- le temps de latence tumoral : pour une dose égale à une demi-MED administrée quotidiennement, de Gruijl et van der Leun estiment que chaque souris développe en moyenne 1 tumeur au bout de 100 jours (15 semaines environ).

Le Tableau XX fait un état des lieux non exhaustif des doses administrées, de la durée d'irradiation et du nombre de tumeurs développées par les souris de race SKH1.

Tableau XX : Etudes ayant utilisé la photocarcinogenèse de peau de souris SKH1 et précisant les doses administrées, leur fréquence et leur durée, les effets biologiques observés et le matériel utilisé

Équipe	Dose quotidienne administrée (mJ/cm²)	Fréquence et durée d'irradiation	Effets biologiques	Matériel utilisé, fournisseur
Reeve *et al.*, 2005[89]	UVA : 2333 UVB : 128	5 jours par semaine pendant 10 ou 30 semaines	**10, 20 ou 30 semaines après la fin des 10 semaines d'irradiation :** présence de tumeurs mais pas de photovieillissement i.e. pas d'augmentation significative du nombre de mastocytes.	UVA : F40T10/BL backlight tubes, Hitachi UVB: TL 40W/12RS, Philips
Liu *et al.*, 2004[90]	UVA : 52 UVB : 91	5 jours par semaine pendant 10 semaines	**11ème semaine :** 40% des souris ont des tumeurs **12ème semaine** : 30% des souris ont des tumeurs de diamètre supérieur à 4 mm **14ème semaine :** 100% des souris ont des tumeurs **22ème semaine :** 75% des souris ont des tumeurs de diamètre supérieur à 4 mm.	FS20 tubes, Westinghouse
Liu *et al.*, 2004[90]	UVA : 13,2 UVB : 840	4 jours par semaine pendant 10 semaines	**11ème semaine :** 40% des souris ont des tumeurs **14ème semaine :** 100% des souris ont des tumeurs **18ème semaine :** 30% des souris ont des tumeurs de diamètre supérieur à 4 mm **22ème semaine :** 65% des souris ont des tumeurs de diamètre supérieur à 4 mm.	Bellariums : Wolff system TLK10 : Philips
Liu *et al.*, 2004[90]	UVA : 10 000 UVB : 645	5 jours par semaine pendant 10 semaines	**14ème semaine :** 40% des souris ont des tumeurs **17ème semaine :** 100% des souris ont des tumeurs **23ème semaine :** 30% des souris ont des tumeurs de diamètre supérieur à 4 mm **22ème semaine :** 30% des souris ont des tumeurs de diamètre supérieur à 4 mm (70% à 26 sem.)	Bellariums : Wolff system TLK10 : Philips
Pentland *et al.*, 2004[86]	UVB : 180	3 jours par semaine pendant 15 semaines	**4 semaines après la fin de l'irradiation (= 19ème semaine)** : 1 tumeur / souris **30ème semaine :** 6 tumeurs/souris (n=12)	Sunlamps, Q-Panel lab products

Zhang *et al.*, 2005[91]	70 puis + 25% par semaine jusqu'à un maximum de 210	3 jours par semaine pendant 20 semaines	**A 16 semaines :** 50% des souris ont des tumeurs **A 20 semaines :** 95% des souris ont des tumeurs 8,71 tumeurs / animal en moyenne (3% sont des CE et 92% de papillomes)	FS20 UVB tubes, National Biological Corp.
Juzenas *et al.*, 2002[92]	80	5 jours par semaine pendant 30 semaines	Aucune description fournie	FS20 tubes, Westinghouse
Davidson *et al.*, 2004[93]	110 puis 120	3 jours par semaine pendant 3 mois puis arrêt d'1 semaine et 2 jours par semaine pendant 3 mois	**26ème semaine :** 0,8 ± 0,23 tumeur / souris	FS20 tubes, Westinghouse
Burns *et al.*, 2004[94]	Deux protocoles : 100 ou 170	3 jours par semaine pendant 26 semaines	**26ème semaine :** 1er protocole : 2,4 ± 0,5 tumeurs / souris 2ème protocole : 3,5 ± 0,48 tumeurs / souris **Apparition de la 1ère tumeur :** 1er protocole : 103ème jour (15ème semaine) 2ème protocole : 92ème jour (13ème semaine)	FS20 tubes, Westinghouse
Ahsan *et al.*, 2005[95]	Très courte et ponctuelle		L'induction tumorale n'est pas le but de l'étude. L'étude porte sur la synthèse d'une protéine suite à une irradiation très courte.	Research Irradiator, Daavlin

3.1.3. Méthodes de diagnostic clinique des carcinomes cutanés

Le Tableau XXI[96] ci-dessous recense les caractéristiques et les performances des différentes techniques étudiées pour le diagnostic des lésions non mélanocytaires. Ce tableau regroupe tous les types de techniques :

- invasives (biopsies pour examen anatomopathologique) ou non (dermoscopie, spectroscopie, etc.)
- celles actuellement utilisées en clinique (échographie, dermoscopie) et celles qui n'ont fait l'objet que d'études pilotes (impédance électrique, imagerie térahertz)
- celles basées sur une évaluation visuelle (OCT, anatomopathologie) et celles basées sur une analyse de signal (spectroscopie Raman)

Tableau XXI : Caractéristiques et performances des différentes méthodes diagnostiques recensées par Mogensen *et al.* [96] utilisées pour le diagnostic des carcinomes épidermoïdes

Méthode	Performances	Remarques
Examen clinique visuel (par dermatologue ou médecin généraliste)	Se= 56-90% Sp=75-90%	Diagnostic de CBC et CE confondus
Ccytologie exfoliative Anatomie pathologique	Se=97% Sp=86%	Pas d'informations sur les délimitations de la lésion
Anatomopathologie	*Gold-standard*	Variabilité inter-opérateur : 1,2-7%
Echographie		Surestimation de l'épaisseur de la lésion
Dermoscopie	Diagnostic des CBC d'après les caractéristiques vasculaires	Est parfois associée à la spectroscopie : « *mole scanner* »
OCT		Anatomo-pathologie in vivo et en temps réel
Microscopie confocale		Caractéristiques utilisées pour le diagnostic des CE : masses épithéliales irrégulières. Utilisé *in vivo* et *ex vivo*.
Spectroscopie Raman	Se=97% Sp=98%	CBC (*ex vivo*). Etudes également prometteuses *in vivo* et sur la discrimination entre tissu sain et kératoses actiniques.
Imagerie de fluorescence		Permet une délimitation de la lésion. Intensité de fluorescence du tryptophane accrue pour CBC et CE par rapport à la peau saine
Imagerie térahertz	Etude pilote sur CBC *ex vivo* et *in vivo*	Fréquences comprises entre 0,1 et 10 THz absorbées par l'eau
Impédance électrique	Etude pilote	Méthode invasive : micro-électrodes
PET		Détection de CBC de diamètre supérieur à 1 cm grâce au ^{18}FDG qui marque préférentiellement les tumeurs

3.1.4. Etat de l'art du diagnostic de carcinome épidermoïde par spectroscopie

A notre connaissance, seule la spectroscopie d'autofluorescence a été étudiée pour le diagnostic de cancers non mélanocytaires (CE et/ou CBC) chez l'homme et chez la souris. Cependant, Georgakoudi *et al.*[97], Chang *et al.*[98] et Breslin *et al.*[99] ont montré que la combinaison des deux modalités de spectroscopie, réflectance diffuse et autofluorescence, permet d'augmenter la précision diagnostique des cancers de l'œsophage, de l'utérus et du sein respectivement. Aucune étude en bimodalité n'a été menée sur la peau.

Spectroscopie d'autofluorescence comme outil diagnostique chez l'homme

A notre conaissances, deux études ont été menées *in vivo* chez l'homme pour tester la capacité de la spectroscopie d'autofluorescence à discriminer tissus sains et lésions précancéreuses ou cancéreuses non mélanocytaires (CE et/ou CBC).

Brancaleon *et al.*[100] ont réalisé des mesures d'autofluorescence chez 18 patients. Ces patients présentaient des CBC (n=20) ou des CE (n=5). Des mesures ont été réalisées sur les lésions (diagnostiquées par histo-pathologie *a posteriori*) ainsi que sur la peau considérée comme saine à environ 1 cm du bord de la lésion. Les mesures de fluorescence étaient réalisées à 2 longueurs d'onde d'excitation : 295 et 350 nm. Les résultats montrent que pour l'excitation à 295 nm les CBC présentent une intensité d'émission de fluorescence 2,9 (± 1,4) fois plus importante que la peau saine alors que pour les CE le ratio est : 2 (± 1,4). L'intensité de fluorescence obtenue sur les lésions pour l'excitation à 350 nm était en revanche plus faible et le ratio des intensités entre lésion et peau saine était de 0,72 (± 0,14) et 0,85(± 0,11) pour les CBC et CE respectivement. Ils attribuent l'émission de fluorescence au tryptophane et aux ponts (*cross links*) du collagène pour les excitations à 295 et 350 nm respectivement. Sur les lésions, l'accroissement d'intensité du tryptophane est attribué à une hyperprolifération cellulaire tandis que la décroissance d'intensité d'émission due au collagène proviendrait de la dégradation de la matrice extra-cellulaire par les enzymes (collagénases en particulier).

Ils concluent de cette étude que puisque les lésions (CBC ou CE) ont des caractéristiques spectrales significativement différentes de la peau saine, la spectroscopie de fluorescence est un outil qui pourrait à terme être utilisé pour le diagnostic et la détection de marges de lésions non mélanocytaires dans un cadre clinique.

Panjehpour *et al.*[101] ont quant à eux réalisé des mesures d'autofluorescence pour une excitation à 410 nm chez 49 patients de phototype I (n = 20), II (n = 22) ou III (n = 7) et présentant des CBC (n = 88), des CE (n = 13), des lésions précancéreuses (kératoses actiniques ou neavi dysplasiques, n = 12) ou des lésions bénignes (kératoses séborhéiques, neurofibromes, etc., n = 47). Leurs résultats indiquent une décroissance de l'intensité d'émission de fluorescence à 510 nm ainsi qu'un léger décalage vers les courtes longueurs d'onde des maxima d'émission pour les carcinomes ($I_{CBC} > I_{CE}$) comparé aux lésions bénignes ou à la peau saine ($I_{saine} > I_{bénignes}$). Les performances de classification n'ont pas été exprimées en termes de sensibilité et de spécificité car dans leur cas, le groupe de données d'entraînement était le même que celui des données de validation. Ils ont donc calculé une plage de valeurs (aire sous la courbe entre 430 et 716 nm) correspondant à chaque groupe d'échantillons : sain, bénin, précancéreux, BC et CE puis ont calculé les pourcentages

d'échantillons pour lequels les valeurs d'aire sous la courbe étaient comprises dans les plages de valeurs correspondantes. Leurs résultats de classification sont meilleurs pour le phototype I que pour les phototypes II et III, soulignant donc que la mélanine, absorbant fortement dans l'UV et le bleu, peut diminuer les performances diagnostiques de méthodes optiques.

Spectroscopie de diagnostic en spectroscopie d'autofluorescence chez la souris

Diagardjane *et al.*[102] ont étudié les performances diagnostiques de la spectroscopie d'autofluorescence à 19 longueurs d'onde d'excitation différentes (280-460 nm). Ils ont extrait les 5 longueurs d'onde les plus discriminantes entre les différentes étapes pré-cancéreuses et le tissu sain. Ils concluent à une augmentation moyenne de 11,6% de la précision de classification entre l'utilisation d'une seule longueur d'onde d'excitation et la combinaison des 5 longueurs d'onde d'excitation.

3.1.5. Classification histologique de stades précancéreux de peau murine

Diagaradjane *et al.*[102] sont à notre connaissance, les seuls à proposer une classification histologique des différents stades précancéreux de peau murine : I (normal), II (inflammation-hyperplasie), III (hyperplasie-dysplasie), IV (CE modérément différencié) et V (CE peu différencié). Cependant,

- ils ne décrivent que très succinctement les critères utilisés pour classer un échantillon dans telle ou telle classe,
- la carcinogenèse est chimio-induite (application topique de DMBA et de TPA)
- ils utilisent des souris de race *Swiss-Webster* qui contrairement aux souris que nous proposons d'utiliser (de race SKH1) sont poilues.

3.2. Objectifs de l'étude

L'ensemble des éléments décrits dans cet état de l'art nous a encouragé à évaluer la capacité de la spectroscopie bimodale, combinant réflectance diffuse et autofluorescence, à discriminer différents stades précancéreux de peau murine. Plus précisément, nos objectifs sont les suivants :

- Spectroscopie :

- comparer les performances obtenues en spectroscopie d'autofluorescence avec les différentes longueurs d'onde d'excitation couvrant un large domaine spectral (UV-visible)
- comparer les performances obtenues avec l'autofluorescence en utilisant une ou plusieurs longueurs d'onde d'excitation (mono- ou multi-excitation respectivement).
- comparer les performances obtenues en autofluorescence de multi-excitation, en réflectance diffuse et en bimodalité

- Histologie

Puisque la peau murine est un modèle très largement utilisé en recherche, il nous a paru intéressant de proposer une classification à partir des caractéristiques histologiques déterminées par anatomo-pathologie. Ce travail a été réalisé avec l'aide et sous la direction du Dr. Agnès Leroux, chef du service d'anatomo-pathologie du Centre Alexis Vautrin.

3.3. Matériels et méthodes

3.3.1. Modèle animal

Un dossier décrivant le déroulement de l'expérimentation a été transmis au Comité Régional d'Ethique pour l'Expérimentation Animale Nancy-Lorraine – Nord-Est qui, après examen du dossier, a rendu un avis favorable à la mise en œuvre du protocole.

Animaux

72 souris femelles de race SKH-1 (Charles River Laboratories, L'Arbresle, France) âgées de 4 semaines à la livraison sont utilisées. Il s'agit d'une race de souris albinos et glabres. Une semaine après livraison, elles pèsent en moyenne 20g (16,1 g et 24,1 g pour les poids minimum et maximum respectivement). N.B. : les souris étaient poilues jusqu'à l'âge de 3 mois.

Les souris sont hébergées au sein de l'animalerie centrale de la Faculté de médecine de l'Université Henri Poincaré (Nancy Université) agréée par la Direction Départementale des Services Vétérinaires de Meurthe et Moselle. Le responsable de l'animalerie est le professeur François Marchal et l'animalière est Madame Anne-Laure Leblanc.

Les souris sont hébergées conformément à la directive du Conseil 86/609/CEE, à savoir 4 individus par cage de 37x22 cm² de surface au sol, nourriture et eau du robinet *ad libitum*. Les

rythmes circadiens de luminosité (éclairage aux néons) sont de 12 heures « jour » (7h00-19h00) et 12 heures « nuit ».

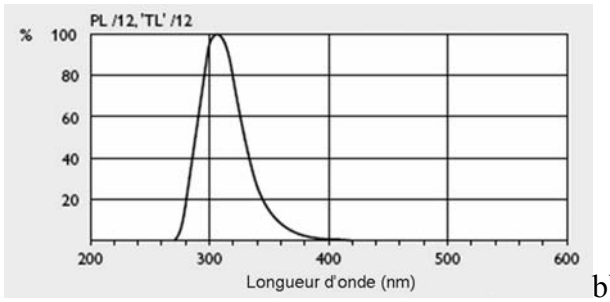
Etant titulaire du Diplôme Universitaire d'Expérimentation Animale de niveau 1, j'ai pu assurer moi-même l'ensemble de l'expérimentation animale.

Irradiation

L'induction des tumeurs cutanées est réalisée grâce à l'irradiation des souris par rayonnement ultraviolet émis par le *Research Irradiation Unit* (Daavlin, Belgique) (cf. Figures 39 a) et b).



a)



b)

Figure 40 : a) Photographie de l'appareil d'irradiation ultraviolette (*Research Irradiation Unit*, Daavlin, Belgique), b) Spectre d'émission des tubes du *Research Irradiation Unit* utilisé pour l'irradiation des souris.

Comme nous avons choisi de classer les échantillons de peau prélevée uniquement d'après des critères anatomo-pathologiques, nous avons pu adapter la dose délivrée à chaque souris en fonction des réactions cutanées macroscopiques, tels les érythèmes que certaines souris présentaient plus que d'autres en fonction de leur susceptibilité individuelle.

En moyenne, les souris ont reçu une dose de 50 mJ/cm² :

- une fois par semaine pendant les 15 premières semaines de protocole
- deux fois par semaine pendant les 15 dernières semaines du protocole.

Les souris du groupe témoin sont traitées dans des conditions similaires à celles des souris irradiées : pour cela, lors des séances d'irradiation des autres souris, elles sont placées également dans des cages déposées sous l'appareil d'irradiation pendant la même durée que leurs congénères sans bien sûr que l'appareil ne soit mis en marche.

3.3.2. Mesures spectroscopiques

Instrumentation

Le schéma de principe du système de spectroscopie multi-excitation-réception développé est représenté en Figure 40. Le système comporte :

- une lumière d'excitation (Fexc) injectée dans la sonde fibrée issue d'une lampe Xénon 300 W continue à arc court (1,2 mm), montée sur un miroir parabolique (Eurosep).

Cette lampe possède un spectre d'émission étendu dans l'UV couvrant la bande 300-700 nm.

- un filtre anticalorique (F1) qui protège les composants optiques suivants de la dégradation due à l'échauffement provoqué par le rayonnement IR. La lumière de la lampe est ensuite focalisée sur la fibre d'excitation grâce à la lentille convergente L1 de focale 42 mm.
- un filtre passe-bande F2 qui est utilisé pour l'excitation d'autofluorescence afin de réduire au maximum la transmission de lumière parasite dans la bande d'émission spectrale des fluorophores (450-600 nm).
- un système de positionnement motorisé qui permet de déplacer automatiquement un couple de filtres passe-haut FL1 et passe-bas FL2 offrant un réglage dynamique du pic central de la longueur d'onde d'excitation de fluorescence ($350 < \lambda < 460$ nm) et de la largeur de bande (entre 15 et 25 nm de largeur à mi-hauteur). Pour la diffusion élastique, les bandes spectrales s'étendent de 350 à 800 nm.
- une sonde à fibres optiques décrite au chapitre précédent. Nous avons utilisé la même fibre excitatrice et les cinq mêmes distances inter-fibres.
- un spectrographe imageant multi-voies (iHR320, HORIBA Jobin Yvon) pour l'acquisition simultanée de 1 à 13 spectres d'émission. Ce spectrographe est muni d'un capteur CCD *back-illuminated* UV (Symphony 2048 x 512) et d'une roue à filtres permettant d'éliminer la rétrodiffusion aux longueurs d'onde des différentes excitations lors des mesures en autofluorescence.
- une interface dédiée à notre application développée en Visual C++ permet un paramétrage complet des spectres d'excitation ainsi que le contrôle et la synchronisation du système avec les acquisitions du spectromètre iHR320. Le système de contrôle positionne les filtres FL1 et FL2 pour fixer un pic d'excitation programmé, ensuite un signal TTL active le déclenchement des mesures par voie externe sur le spectromètre iHR320. Une fois la dernière acquisition programmée terminée pour cette excitation, le système place les filtres dans une nouvelle position pour le pic d'excitation suivant, etc. Cette procédure peut être répétée autant de fois que de longueurs d'onde d'excitation programmées.

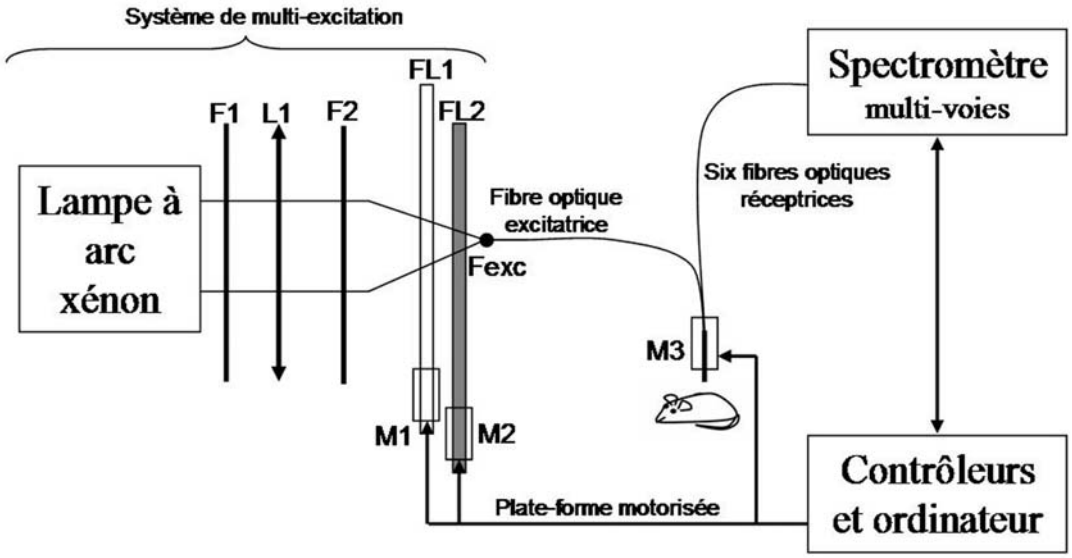


Figure 41 : Schéma de l'instrumentation utilisée pour les mesures en spectroscopie bimodale.

Notre système multi-excitation permet d'ajuster les largeurs de bandes d'excitation au dixième de nanomètre près (15 nm de largeur pour l'autofluorescence et plusieurs centaines pour la réflectance diffuse) et la longueur d'onde centrale du pic avec la même résolution.
Les caractéristiques :

- des sept longueurs d'onde d'excitation : 360, 368, 390, 400, 410, 420 et 430 nm (cf. Figure 41 a)
- et des trois bandes d'illumination (cf. Figure 41 b)

utilisées respectivement en autofluorescence et en réflectance diffuse sont données dans les Tableaux XXII et XXIII.

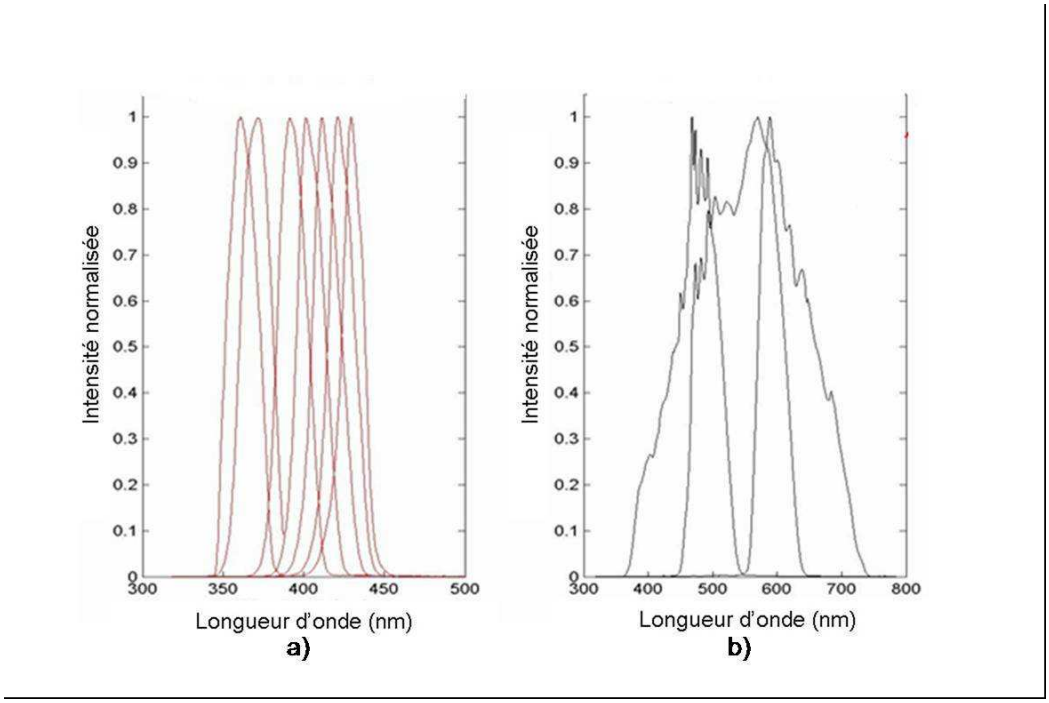


Figure 42 : Longueurs d'onde d'excitation et bandes d'illumination respectivement utilisées pour la spectroscopie d'autofluorescence et de réflectance diffuse

a) 7 longeurs d'onde d'excitation pour l'autofluorescence : 360, 368, 380, 390, 400, 410, 420 et 430 nm

b) 3 bandes d'illumination pour la Réflectance Diffuse : 365-545, 450-640 et 550-740 nm

Tableau XXII : Caractéristiques des sept longueurs d'onde d'excitation utilisées pour la spectroscopie d'autofluorescence.

Longueur d'onde centrale (nm)	Largeur à mi-hauteur (nm)	Puissance (µW) mesurée en sortie de fibre optique après environ 24 heures de fonctionnement de la lampe Xénon	Puissance (µW) mesurée en sortie de fibre optique après environ 250 heures de fonctionnement de la lampe Xénon
360	17,1	36	18,7
368	17,3	51	25
390	17,1	62	32
400	15	64	30
410	15,2	66	30
420	15,2	58	26
430	15,2	43	19,4

Tableau XXIII : Caractéristiques des trois bandes d'illumination utilisées pour la spectroscopie de réflectance diffuse

Longueurs d'onde extremum pour chaque bande d'illumination	Puissance (µW) mesurée en sortie de fibre optique après environ 24 heures de fonctionnement	Puissance (µW) mesurée en sortie de fibre optique excitatrice après environ 250 heures de fonctionnement
370-540	505	430
450-640	373	305
560-740	228	242

Pour chaque site anatomique (qui représente à la surface de la peau un disque de 2,5 mm de diamètre), le système permet de recueillir 180 (10 x 6 x3) spectres co-localisés : 7 spectres d'intensité d'autofluorescence et 3 spectres de diffusion (10 au total) pour 5 distances inter-fibres : 271 µm (deux fibres utilisées), 536 µm, 834 µm, 1076 µm et 1341 µm. Chaque spectre est la moyenne de 3 acquisitions successives.

Dus aux temps d'intégration (500 ms en autofluorescence et 50 ms en réflectance diffuse), aux changements de configurations logicielles et instrumentales (changements manuels de filtres), chaque mesure (pour les 180 spectres) prend environ 3 minutes.

Protocole d'acquisition des spectres

Préparation des animaux

Le transport des animaux entre animalerie et salle d'expérimentation est assuré dans des cages à couvercle filtrant (cages de livraison, Charles River Laboratories, Lyon, France) insérées dans des cartons, transportés en voiture (trajet d'environ 1,5 km). Chaque souris est pesée (Balance KB 100-3, Kern, Balingen, Allemagne) pour calculer la dose d'anesthésique à lui administrer.

Le mélange anesthésique est constitué de

- Xylazine (Rompun 2%, Bayer Healthcare) : 10,5 mg/kg
- Kétamine (Panpharma) : 105 mg/kg

L'injection d'anesthésique est réalisée à l'aide d' :

- une seringue (Luer Lok Tip 1 ml, Beckton Dickinson, Bioblock, réf. 309628, Illkirch, France) et
- une aiguille (Luer 25G, Terumo, Beckton Dickinson, Bioblock)

Durant l'anesthésie, les souris sont allongées sur une couverture chauffante (*Temperature Control Unit HB 101/2*, Vitrolles, Bioseb)

Pour repérer de manière fiable les sites anatomiques de mesures spectroscopiques, un cache translucide a été confectionné. Il s'agit d'un rectangle de plastique de 2x3 cm². Quatre rangées de 6 trous de 3 mm de diamètre sont réalisées à l'aide d'un emporte-pièce métallique et d'un marteau. Les centres de ces trous sont espacés de 5 mm laissant ainsi entre les trous un espace de 2 mm (cf. Figure 42).

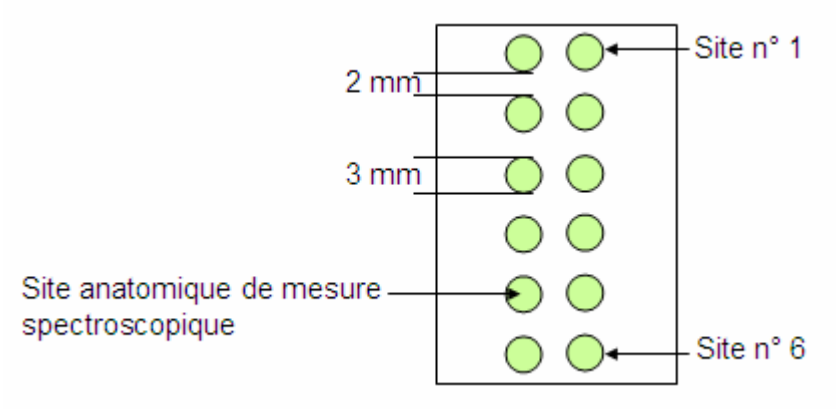


Figure 43 : Schéma du cache troué réalisé en plastique translucide et utilisé pour repérer les sites antomiques de mesures spectroscopiques.

Le cache troué est fixé sur le dos des souris à l'aide de sparadrap micro-poreux (Urgopore, Pharmacie Sanzoni, Vandoeuvre-lès-Nancy, France) afin de ne pas les blesser (cf. Figure 43).

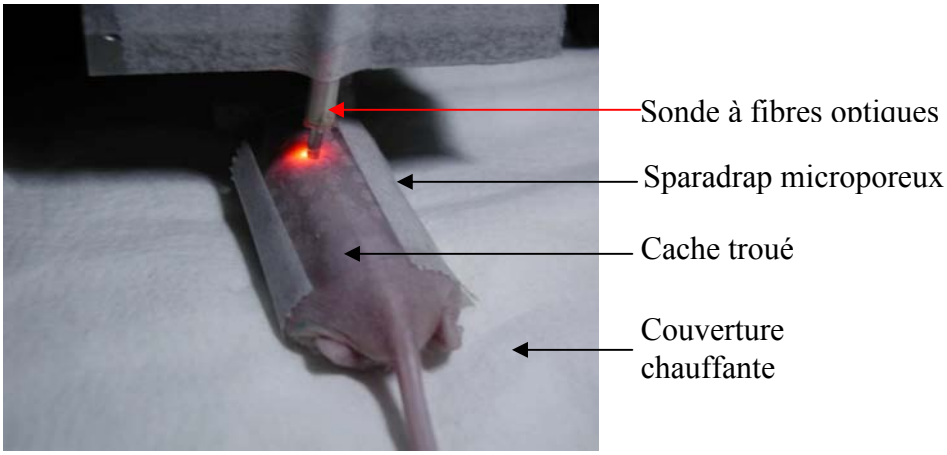


Figure 44 : Photographie d'une souris anesthésiée installée sur la couverture chauffante et portant sur le dos le cache troué fixé à l'aide de sparadrap.

Dans la salle d'expérimentation, les souris sont placées dans des cages d'hébergement classiques avec nourriture et eau *ad libitum*. Un délai d'environ une heure trente sépare l'installation des souris dans la salle d'expérimentation de la 1ère anesthésie.

Durant les mesures spectroscopiques, la salle d'expérimentation était plongée dans l'obscurité. La lumière est allumée au moment du changement d'animal : essentiellement pour réaliser l'anesthésie de la souris suivante. La température ambiante est maintenue à 22-24°C grâce à une climatisation. La température de la couverture chauffante est fixée à 35°C pour toute la durée de l'anesthésie. La pâte de tatouage est placée au bout d'une aiguille. En cours d'anesthésie, l'aiguille est ensuite utilisée pour transpercer les oreilles en un ou plusieurs

points afin de constituer un code propre à chaque individu (2 points oreille gauche et 1 point oreille droite par exemple).

Environ 5 minutes après l'injection, la souris s'immobilise. Cependant, il est préférable pour diminuer le stress de l'animal de le laisser s'endormir sans le déplacer (de la cage à la couverture chauffante). Ainsi, quelques secondes après l'injection, l'animal encore vigil est déplacé jusque sur la couverture chauffante. Puis il est maintenu sur la couverture chauffante le temps qu'il s'immobilise et laissé tranquille sur la couverture le temps de l'endormissement (perte de conscience) complet soit environ une dizaine de minutes.

Une fois l'animal anesthésié, le cache troué est fixé sur son dos à l'aide du sparadrap.

Le nombre de sites anatomiques mesurés a été fixé d'après 2 critères :

- couvrir une partie significative du corps de l'animal
- un temps d'anesthésie qui ne soit pas trop délétère pour l'animal soit une heure trente maximum.

18 sites anatomiques sont mesurables en environ 75 minutes : ce temps inclut le temps nécessaire aux 18 mesures elles-mêmes, aux levers et baissers de fibres lors des changements de sites anatomiques, au redémarrage logiciel (Logiciel SynerJY, Jobin Yvon, Longjumeau, France) nécessaire tous les 50 spectres acquis, à l'installation de la souris sur le flan gauche, puis sur le flan droit et enfin sur le ventre, etc.

La dose de rayonnement UV reçue par la surface dorsale décroît selon un gradient allant de la colonne vertébrale vers le ventre du fait de la courbe des flancs de l'animal. Il est donc plus probable que les tumeurs se développent là où la dose reçue est maximale c'est-à-dire vers la colonne vertébrale. C'est pourquoi nous avons choisi 6 sites anatomiques de mesures spectroscopiques répartis le long de la colonne vertébrale : à droite et à gauche.

Six points correspondent à peu près à toute la longueur disponible le long de la souris soit environ 30 mm (6 x 5 mm). Nous disposons donc de 12 sites dorsaux (cf. Figure 44).

Des mesures sur le ventre nous permettent de disposer d'un contrôle intra-individuel pour chaque souris. Il nous « reste » 6 points disponibles (18 – 12) que nous répartissons également à droite et à gauche (3+3) et selon des repères anatomiques de la queue vers la tête : points naturellement présents vers les pattes arrière, cage thoracique et à mi-chemin entre ces deux repères.

Les 18 sites anatomiques de mesure spectroscopique sont donc répartis comme suit :

- 12 sur le dos
    - 6 le long de la colonne vertébrale à droite
    - 6 le long de la colonne vertébrale à gauche

- 6 sur le ventre.

En fin de mesure spectroscopique, les individus qui doivent être sacrifiés le jour-même sont tatoués au niveau du 6ème point de mesure (celui le plus proche de la queue) à droite et à gauche afin de repérer la localisation exacte des sites de mesure (cf. Figure 44).

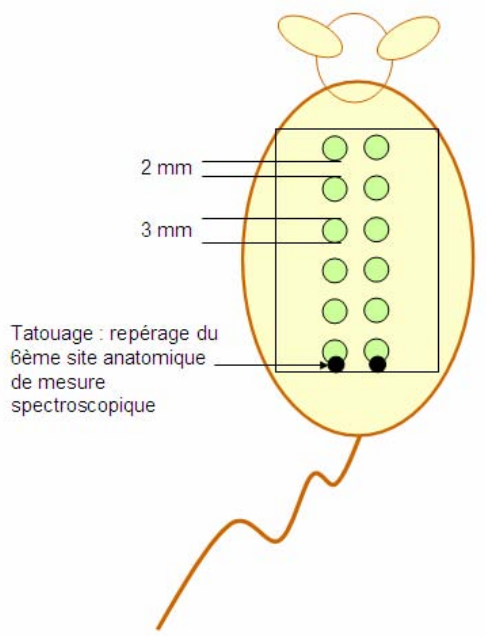


Figure 45 : Schéma indiquant les tatouages (points noirs) utiliser pour repérer les lignes de mesures spectroscopiques sur les souris devant être sacrifiées.

La sonde à fibres optiques est fixée sur une platine motorisée (cf. Figure 45) pour permettre un contrôle de l'angle et de la pression de la sonde sur la peau des souris.

L'angle fixe et égal à 90°. Cette valeur a été choisie car, comme mentionné au § 1.3.2, la réflexion spéculaire est d'autant plus faible que l'angle d'incidence avec la peau est proche de la normale. De cette manière, nous optimisons la pénétration de la lumière d'excitation dans la peau.

La pression de la sonde est estimée visuellement. La sonde est placée au contact de la peau des souris, induisant une dépression du tissu de quelques millimètres (2 à 3 mm environ). La valeur de la pression a été estimée grâce à une tige de soudure de 2,4 mm de diamètre (la sonde à fibres optiques mesurant 2,5 mm de diamètre extérieur). Cette tige pèse au départ 7,9 g. Elle est posée sur la peau de l'animal pour apprécier visuellement quelle dépression du tissu elle impose. La pression imposée étant alors trop importante, elle est successivement coupée en 2, pesée et posée sur la peau de l'animal afin d'obtenir au bout de plusieurs tests essai/erreur une baguette dont le poids induit une dépression du tissu équivalente à celle

induite par la sonde lors des mesures spectroscopiques. C'est le cas pour une baguette pesant 2,45 g. La pression alors appliquée est 5,3 kPa.

Pour permettre d'avoir une pression constante d'un site de mesure à un autre :

- la souris est posée sur le flanc (gauche puis droit) de manière à ce que l'autre flanc sur lequel les mesures sont réalisées soit le plus plan possible
- la sonde est placée au contact du tissu pour le 1er point de mesure de l'animal par appréciation qualitative visuelle.
- pour passer d'un site de mesure à un autre, la sonde est ensuite levée de 5 mm à l'aide de la platine motorisée, l'animal est déplacé de manière à ce que la fibre se trouve au dessus du site de mesure suivant puis la platine motorisée est abaissée de 5 mm également.
- si nécessaire, l'ajustement est réalisé avec un pas d'1 mm car le flanc de la souris n'est pas totalement plan.

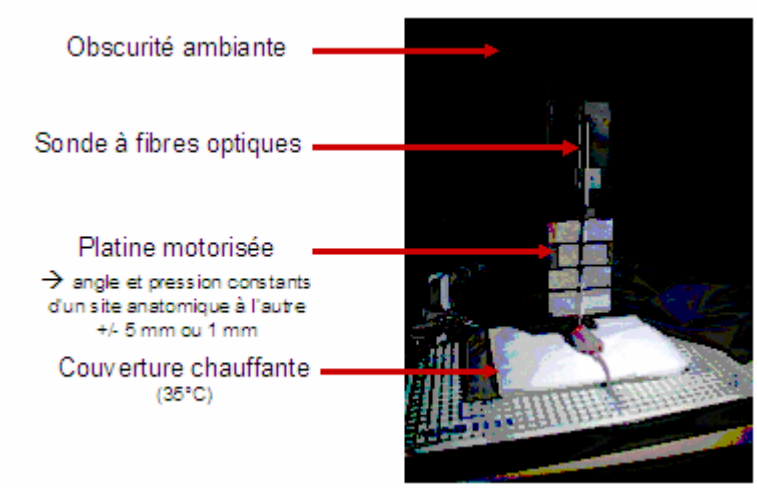


Figure 46 : Photo du site de mesure spectroscopique présentant la sonde optique fixée sur la platine motorisée pour contrôle d'angle et de pression de la sonde sur la peau des souris.

3.3.3. Histologie

Suite aux mesures spectroscopiques, deux souris sont sacrifiées chaque semaine tout au long des sept mois de la photocarcinogenèse. Le sacrifice a lieu dans les six heures suivant la fin des mesures spectroscopiques.

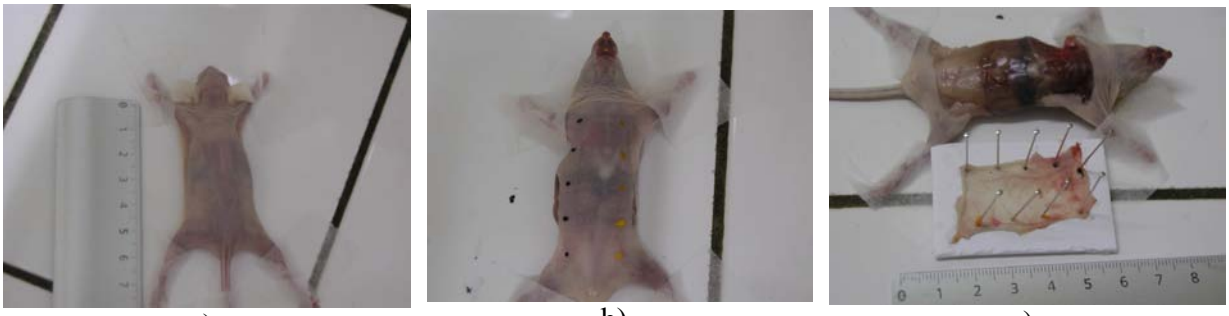
Prélèvement cutané

Une fois anesthésiées par injection intra-péritonéale, les souris sont sacrifiées par dislocation cervicale : pince placée entre 2 vertèbres cervicales et étirement brutal de la queue jusqu'à obtention du bruit caractéristique de brisement osseux.

Puis, sur l'animal mort, sont marquées à l'aide d'encre de Chine :

- le cou des animaux pour savoir comment orienter l'échantillon une fois prélevé et savoir où se trouvaient la tête et la queue (couleur verte)
- repères centimétriques sur les flancs de l'animal (cf. Figure 46 b).

Le lambeau de peau prélevé est étalé sur une plaque en polystyrène. Pour qu'il ne soit ni recroquevillé ni écartelé, les repères centimétriques marqués sur la peau à l'encre de Chine sont posés face à des repères centimétriques indiqués sur le support en polystyrène. Puis la peau est maintenue au support en la piquant à l'aide d'aiguilles de couturière à boules de couleurs (cf. Figure 46 c). Pour une journée donnée, une couleur est attribuée à chaque souris. L'ensemble support en polystyrène + peau + aiguilles est plongé dans l'Alcool Formolé Acétique (AFA), qui est liquide fixateur. N.B. : Le polystyrène fait flotter l'ensemble donc il faut ajouter un objet qui permette de garder l'ensemble complètement immergé.



a) b) c)

Figure 47 : a) Mise en place de l'animal après sacrifice, pour prélèvement cutané. Les pattes sont maintenues collées à la paillasse grâce à du sparadrap ; b) Repères centimétriques marqués sur la peau de la souris (peau du ventre en l'occurrence) ; c) Lambeau de peau prélevé posé sur un support en polystyrène et maintenu dessus grâce à des aiguilles de couturière.

Préparation des lames

Les matériels utilisés pour la préparation des lames sont ceux du service de cytologie et d'anatomie pathologique du Centre Alexis Vautrin.

Après avoir trempé 48 à 72 heures dans le liquide fixateur (AFA), le lambeau de peau est considéré comme « fixé ». Il est sorti de l'AFA et désolidarisé du support en polystyrène (les aiguilles sont ôtées). Le lambeau fixé rectangulaire est découpé de manière à ne conserver que les bandes de peau (3x40 mm²) qui correspondent aux sites anatomiques de mesures

spectroscopiques. A partir de l'échantillon fixé, les différentes étapes menant à la confection des lames sont illustrées sur la Figure 47.

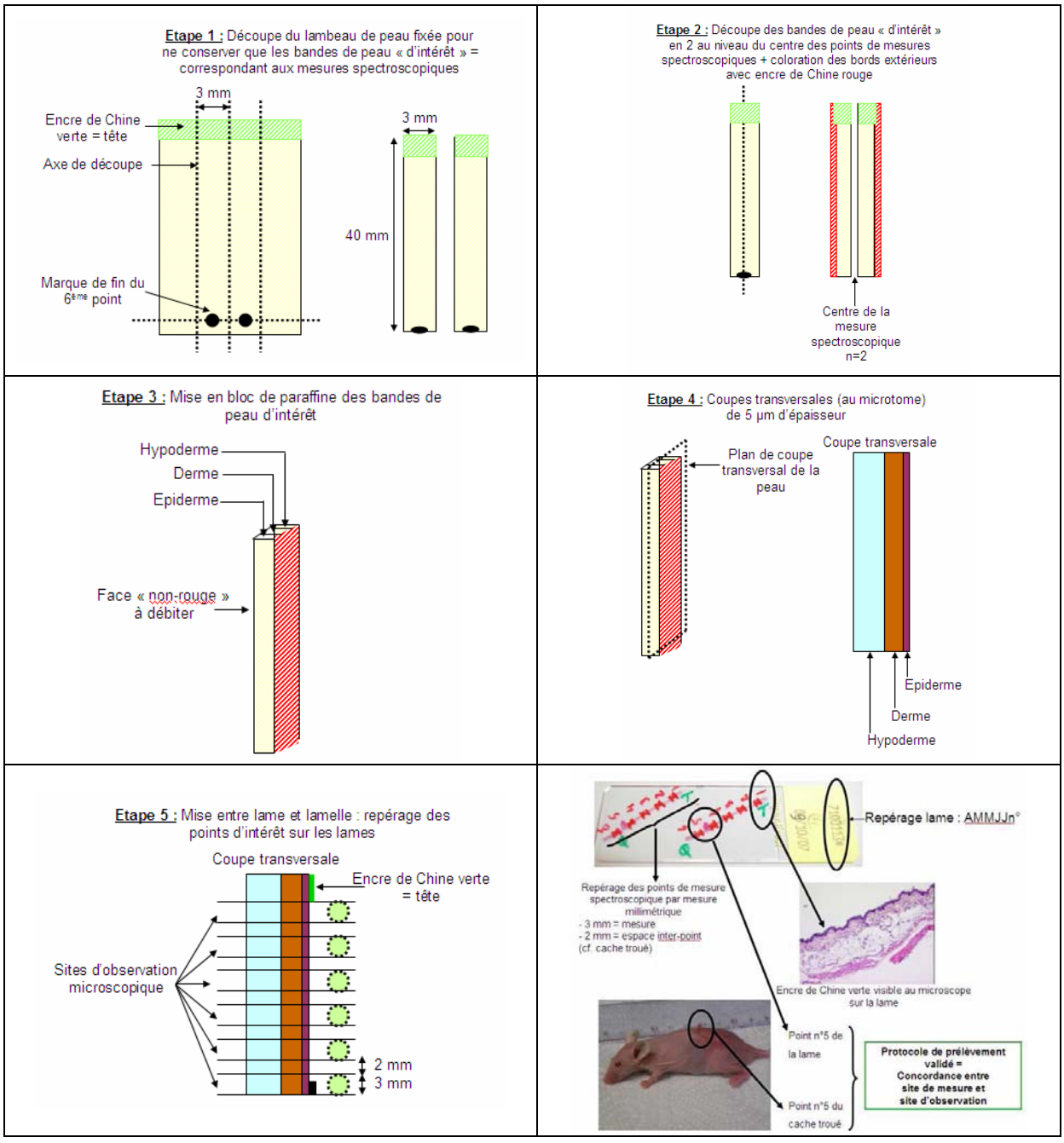


Figure 48 : Processus de traitement de la peau murine prélévée jusqu'à la confection des lames histologiques.

Les sites d'observation correspondant aux sites de mesures spectroscopiques sont repérés sur les lames.

Traitement des données histologiques

Tous les sites à observer sont pris en photo à 5 grossissements différents : x5, x10, x20, x40 et x100. L'épaisseur de l'épiderme est mesuré grâce au logiciel Osiris (disponible gratuitement en ligne) pour identifier les échantillons hyperplasiques

3.3.4. Tentative de suivi specroscopique en fonction du temps

Nous avons mis au point un protocole pour réaliser les mesures de spectroscopie bimodale sur des sites anatomiques « suivis » tout au long des sept mois de la photocarcinogenèse. Pour cela nous localisons ces sites sur 20 souris identifiées : 12 irradiées et 8 témoins. Comme indiqué sur la Figure 48, lors de la première série de mesures réalisée sur une souris, le cache est mis en place sur son dos et les coins du cache sont repérés par tatouage (cf. ronds rouges sur la Figure 48). De cette manière, le cache peut être replacé au même endroit tous les quinze jours. A priori, il est ainsi possible de comparer au même instant *t* les signatures spectrales provenant des sites anatomiques sur lesquels des carcinomes épidermoïdes se sont développés et les signatures spectrales des sites sur lesquels aucun carcinome ne s'est développé. L'objectif est de déterminer s'il existe une signature spectrale propre aux états tissulaires précédant le développement carcinomateux, qui soit différente des états dysplasiques ayant peu de risque d'évoluer vers le carcinome. Cette tentative fut un échec sur le plan statistique car seuls trois carcinomes se sont développés sur les douze souris irradiées « suivies ». Ce faible échantillon (n = 3) ne nous a pas permis de déterminer des caractéristiques spectrales significativement différentes entre sites dysplasiques « précarcinomateux » et sites dysplasiques « non évolutifs ».

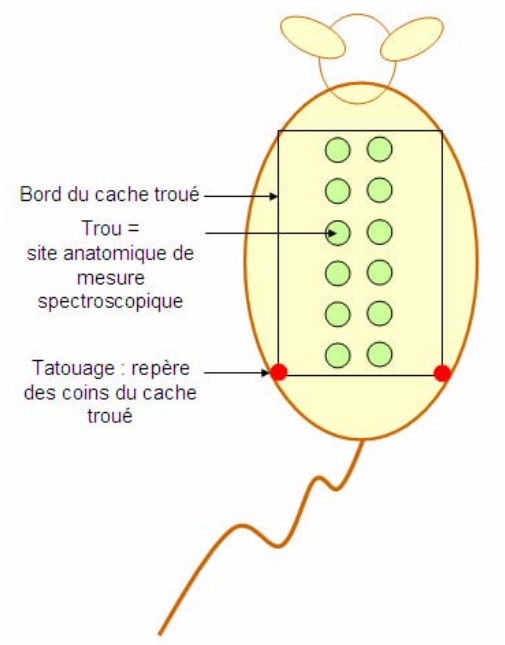


Figure 49 : Repérage du cache troué par tatouage (points rouges) et sites anatomiques de mesures spectroscopiques (ronds verts) sur le dos des souris

Nous avons réfléchi aux raisons pouvant expliquer l'obtention d'un si faible nombre de carcinomes épidermoïdes de manière à trouver une solution pour en obtenir davantage. D'après nos observations, tous les CE se sont développés lors des cinq dernières semaines. Ainsi, la poursuite de la photocarcinogenèse au-delà de sept mois pourrait permettre à l'avenir le développement de CE supplémentaires. Une autre raison pourrait être les faibles doses d'UV administrées aux souris. Comme indiqué dans le Tableau XXIV, elles étaient en effet bien inférieures à celles préconisées par la littérature dans le Tableau XX (cf § 3.1.2). Nous avons procédé de cette manière car les souris du lot dont nous avons disposé présentaient des érythèmes à de plus fortes doses d'UV. Cette hypersensibilité était peut-être due au Virus Hépatique Murin (VHM) dont nos souris étaient porteuses. Il faudrait donc réitérer l'expérience avec des souris non porteuses du virus. Il est cependant important de noter que ce protocole de suivi a été un succès sur le plan de la survie des animaux. En effet, au début du protocole, nous n'avions aucune information bibliographique sur la longévité des souris soumises durant 7 mois à une anesthésie hebdomadaire par injection intra-péritonéale d'un mélange anesthésique à base de Xylazine et de Kétamine. Le Professeur Christine Capdeville-Atkinson (Faculté de Pharmacie, Nancy-Université) nous avait conseillé l'anesthésie par inhalation d'isoflurane pour des raisons de moindre toxicité et d'accoutumance moins marquée que pour les autres produits. Cependant, ce mode d'anesthésie est incompatible :

- avec l'état sanitaire de nos souris porteuses du Virus Hépatique Murin
- avec nos infrastructures, notamment sur le plan de la ventilation et de la dangerosité pour le manipulateur.

Pour cette raison, nous avons choisi de constituer deux groupes de souris suivies afin de prendre moins de risque de « perdre » des animaux en cours de protocole. Le principe était donc de n'anesthésier les souris « suivies » qu'une semaine sur deux en constituant deux groupes :

- un groupe de 10 individus mesurés les semaines paires
- un groupe de 10 individus mesurés les semaines impaires.

Sur les 20 souris suivies et anesthésiées tous les quinze jours pendant sept mois (soit environ 14 fois), aucune n'est morte pour cause d'anesthésies répétées. En terme de poids, âgées de 15 semaines, elles pesaient en moyenne 25,6 g et âgées de 40 semaines, elles en pesaient 28,9 g en moyenne (n=13). Cet évolution de poids (+13%) est à prendre en compte dans le suivi des sites anatomiques et dans le manque de précision du replacement du cache troué sur le dos des souris qui grossissent au fur et à mesure du protocole.

3.4. Résultats

3.4.1. Photocarcinogenèse

Seuls 4 carcinomes (intra-épithéliaux ou invasifs) dont 2 sur le même individu se sont développés. Le Tableau XXIV ci-dessous récapitule nos résultats.

Tableau XXIV : Protocole d'irradiation et résultats obtenus avec notre expérimentation.

Equipe	Dose quotidienne administrée (mJ/cm²)	Fréquence et durée d'irradiation	Effets biologiques	Matériel utilisé, fournisseur
SpID (Amouroux *et al.*)	50 mJ/cm²	1 fois par semaine pendant les 15 premières semaines puis deux fois par semaine pendant les 15 dernières semaines	Carcinomes observés uniquement à partir de la 25ème semaine d'irradiation (n=12) • 1 souris avec 2 carcinomes (un infiltrant et un intra-épithélial) • 1 souris avec un carcinome épidermoïde • 1 souris avec un carcinome intra-épithélial	Research Irradiation Unit, Daavlin, Belgique

3.4.2. Classification histologique

La classification histologique s'est faite en 2 étapes: la 1ère consistait à déterminer la valeur moyenne de l'épaisseur de l'épiderme sain pour chaque site de mesure. Connaissant cette valeur, il est alors possible de déterminer un seuil au-delà duquel l'épiderme sera considéré comme hyperplasique. La 2ème étape consistait à proposer une classification des différents types d'hyperplasie rencontrés tout au long des 7 mois de la photo-carcinogenèse. Nous avons défini 3 classes d'hyperplasie.

a) Définition de l'hyperplasie

La peau humaine présente des disparités d'épaisseur d'un site anatomique à l'autre. Nous avons fait l'hypothèse qu'il en était de même pour les souris. Nous avons donc choisi de déterminer une valeur seuil par site anatomique de mesures spectroscopiques, ces sites s'étalant le long de la colonne vertébrale entre cou (point n°1) et queue (point n°6). Les mesures d'épaisseur de l'épiderme des 12 sites dorsaux des 8 souris du groupe contrôle ont permis de définir des plages de valeurs d'épaisseurs saines tenant compte des variations inter-individuelles. Pour cela, chaque échantillon de peau a été photographié au microscope. Puis l'épiderme de chaque échantillon a été mesuré en 10 points différents à l'aide du logiciel de mesure sur images Osiris (développé et mis à disposition gratuitement sur le site web du CHU

de Genève) de manière à tenir compte des variations intra-individuelles (cf. Figure 9). Les mesures étaient données par le logiciel Osiris en pixels puis converties en distances après un étalonnage réalisé à l'aide dune règle micrométrique fournie par le service d' anatomopathologie du Centre Alexis Vautrin.

La Figure 49 indique la moyenne d'épaisseur obtenue pour chaque site anatomique entre cou et queue.

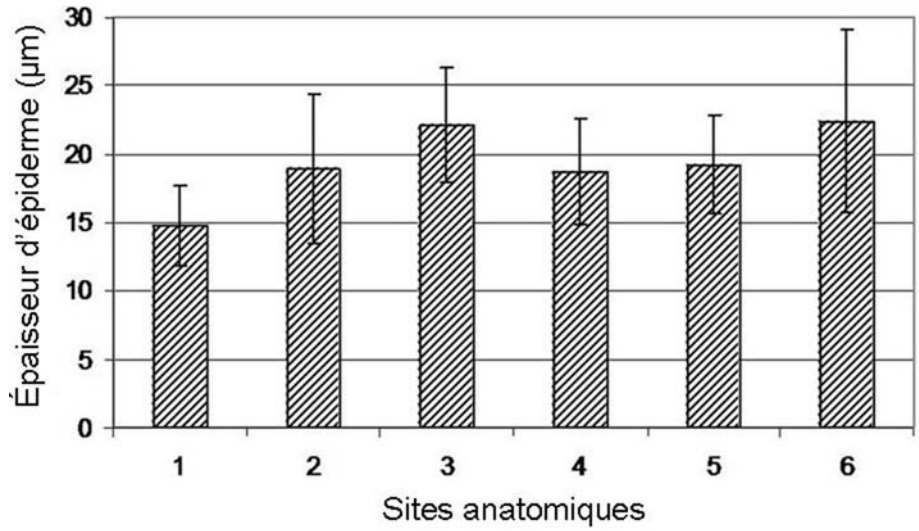


Figure 50 : Moyenne (n=160) des épaisseurs d'épiderme mesurées pour chaque site anatomique de mesure spectroscopique. Les barres d'erreur indiquent l'écart-type.

Il fallait ensuite définir une valeur « seuil » maximale qui permette de déterminer à partir de quelle épaisseur un épiderme serait classé dans la classe « hyperplasie ». Pour définir ce seuil maximal, nous avons dû déterminer une étendue de valeurs « normales » (= non-hyperplasiques = « saines »). Nous avons ensuite vérifié que nos valeurs d'épaisseur suivaient une distribution normale et nous avons utilisé l'écart-type (ET) pour définir le seuil :

$$\text{moyenne} + 2 \times ET^{[103]}.$$

Les valeurs seuils correspondant à chacun de ces sites anatomiques de mesures spectroscopiques sont indiquées dans le Tableau XXV.

On observe que la valeur seuil du site de mesures spectroscopiques n°6 (40 µm) correspond quasiment au double de la valeur seuil du point n°1 (21 µm). Les Figures 50 a) et b) présentent des photos représentatives de cet épaississement physiologique entre haut et bas du dos.

Tableau XXV : Seuil d'épaisseur de l'épiderme des souris SKH1 du groupe contrôle (non irradiées) pour distinguer épiderme "normal" d'un épiderme hyperplasique. Ces valeurs seuil sont définies par : moyenne + 2 x écart-type (ET) Les moyennes ont été calculées sur 8 souris saines, pour 2 échantillons par souris et pour 10 mesures par échantillons soit n= 160.

Site anatomique de mesures spectroscopiques	1	2	3	4	5	6
Épaisseur d'épiderme moyenne + 2ET (µm)	21	29	30	27	27	40

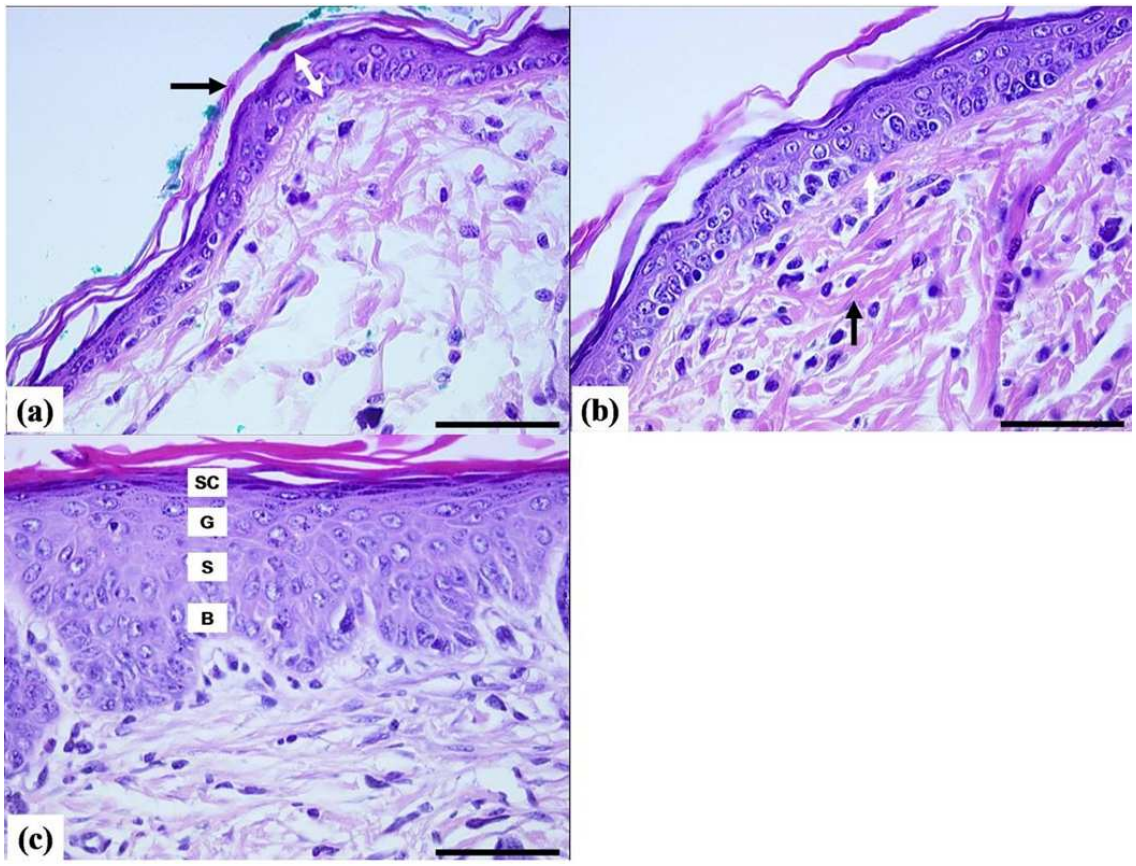


Figure 51 : Photos représentatives de coupe transversale de 5 µm d'épaisseur de peau de souris marquée à l'Hématoxyline et à l'Éosine (H&E) illustrant les différentes épaisseurs d'épiderme rencontrées pour un même individu sain en fonction du site anatomique considéré et en fonction de la classe histologique pour un même site anatomique.
a) peau saine, haut du dos = site n°1. La flèche blanche délimite l'épiderme ; la flèche noire indique les filaments de kératine qui recouvrent l'épiderme.
b) peau saine, bas du dos = site n°6. La flèche blanche inique la lame basale qui sert d'ancrage à l'épiderme sur le derme.
c) peau irradiée pendant 1 mois, point n°6 Illustration des différentes couches traditionnellement décrites dans l'épiderme : SC, *stratum corneum*, G, couche Granuleuse, S, couche Spineuse et B : couche Basale. La barre d'échelle indique : 50 µm.

b) Définition qualitative des différents types d'hyperplasie

Pour établir les critères morphologiques qui permettraient de définir différentes classes histologiques correspondant aux principales étapes de la photocarcinogenèse, il fut décider d'attendre la fin du protocole c'est-à-dire le développement des CE pour lister les modifications histologiques et cytologiques en fonction de la photo-carcinogenèse. Nous nous attendions en effet à des modifications similaires à celles observées dans le cas de la peau

humaine et à celles décrites dans les articles de Diagaradjane *et al.*[102] et de Reeve *et al.*[89]. Trois classes histologiques ont alors pu être définies grâce aux différents critères histologiques décrits dans le Tableau XXVI:

- hyperplasie compensatoire (cf. Figure 51 a). L'adjectif qualificatif « compensatoire » a été choisi comme synonyme de « aiguë ». Il s'agit en effet d'un type d'hyperplasie en réponse à une irradiation ultraviolette de courte durée qui induit une réaction érythémateuse voire inflammatoire. Les kératinocytes prolifèrent d'où la possibilité de trouver des mitoses dans les couches supérieures alors que « normalement » celles-ci sont confinées dans la couche basale. L'hyperprolifération s'accompagne d'une hyperactivité métabolique des kératinocytes d'où une synthèse accrue de kératine résultant en une couche épaissie de kératine recouvrant l'épiderme ; c'est l'hyperkératose.
- Hyperplasie atypique. Cette classe correspond à un état tissulaire « intermédiaire » c'est à dire à un stade où l'œil de l'anatomo-pathologiste commence à distinguer des éléments morphologiques anormaux mais de manière isolée (on dit aussi de manière « focale ») uniquement. Nous avons distingué principalement une hétérogénéité de la chromatine à l'intérieur des noyaux, des couches supérieures contenant toujours des noyaux (on les appelle « nucléées » car normalement ces couches ne contiennent plus que des kératinocytes totalement différenciés c'est-à-dire dépourvus de noyau et remplis de kératine éosinophile). Ces couches nucléées indiquent donc une dysmaturation cytologique et une désorganisation des couches cellulaires : les strates habituelles ne sont plus visibles focalement, indiquant des anomalies de communication cellulaire notamment. Cependant on ne distingue pas d'anomalie fonctionnelle majeure de par la persistence d'une couche granuleuse, i.e. la kératine mature normalement.
- Hyperplasie dysplasique ou « dysplasie ». Dans ce cas, aux atypies cellulaires mentionnées ci-dessus, viennent s'ajouter des éléments caractéristiques de la dysfonction des kératinocytes (parakératose et dyskératoses) et des fibroblastes du derme (élastose). La parakératose (cf. Figure 51 b) correspond à une couche de kératine contenant toujours des kératinocytes ou des noyaux cellulaires alors que normalement le *stratum corneum* n'est constitué que de filaments de kératine totalement mature. Les dyskératoses (cf. Figure 51 c) correspondent à des kératinocytes totalement matures (différenciés) dans les couches inférieures alors que normalement les kératinocytes n'arrivent à maturation totale qu'en surface, au niveau du *stratum corneum*. De la même manière, les fibroblastes du derme endommagés par l'irradiation UV synthétisent des fibres élastiques anormales : courtes et épaisses (cf. Figure 51 d).

Tableau XXVI : Critères morphologiques utilisés pour classer les échantillons de peau dans les trois types d'hyperplasie définis: compensatoire (CH), atypique (AH) et dysplasique (D). ⊕: caractéristique qui doit être présente pour classer l'échantillon dans la classe correspondante, ⊗: caractéristique qui peut se retrouver également dans un échantillon de cette classe histologique. Les souris non irradiées étaient considérées comme saines (H) et les caractéristiques histologiques de leur peau étaient utilisées comme contrôles négatifs. Les caractéristiques histologiques et cytologiques retrouvées dans les CE ou les carcinomes intra-épithéliaux (maladie de Bowen) étaient utilisées comme contrôles positifs.

	Sain (H)	Hyperplasie Compensatoire (CH)	Hyperplasie Atypique (AH)	Dysplasie (D)	Carcinome intra-épithélial (maladie de Bowen) ou invasif (CE)
Epiderme hyperplasique		⊕	⊕	⊕	⊕
Mitoses en dehors de la couche basale		⊗	⊗	⊗	⊗
Hyperkératose orthokératosique		⊗			
Chromatine hétérogène			⊕	⊕	⊕
Désorganisation des couches cellulaires			⊕	⊕	⊕
Parakératose				⊗	⊕
Dyskératose				⊗	⊕
Elastose				⊗	⊕
Nombre d'échantillons	84	47	37	56	4

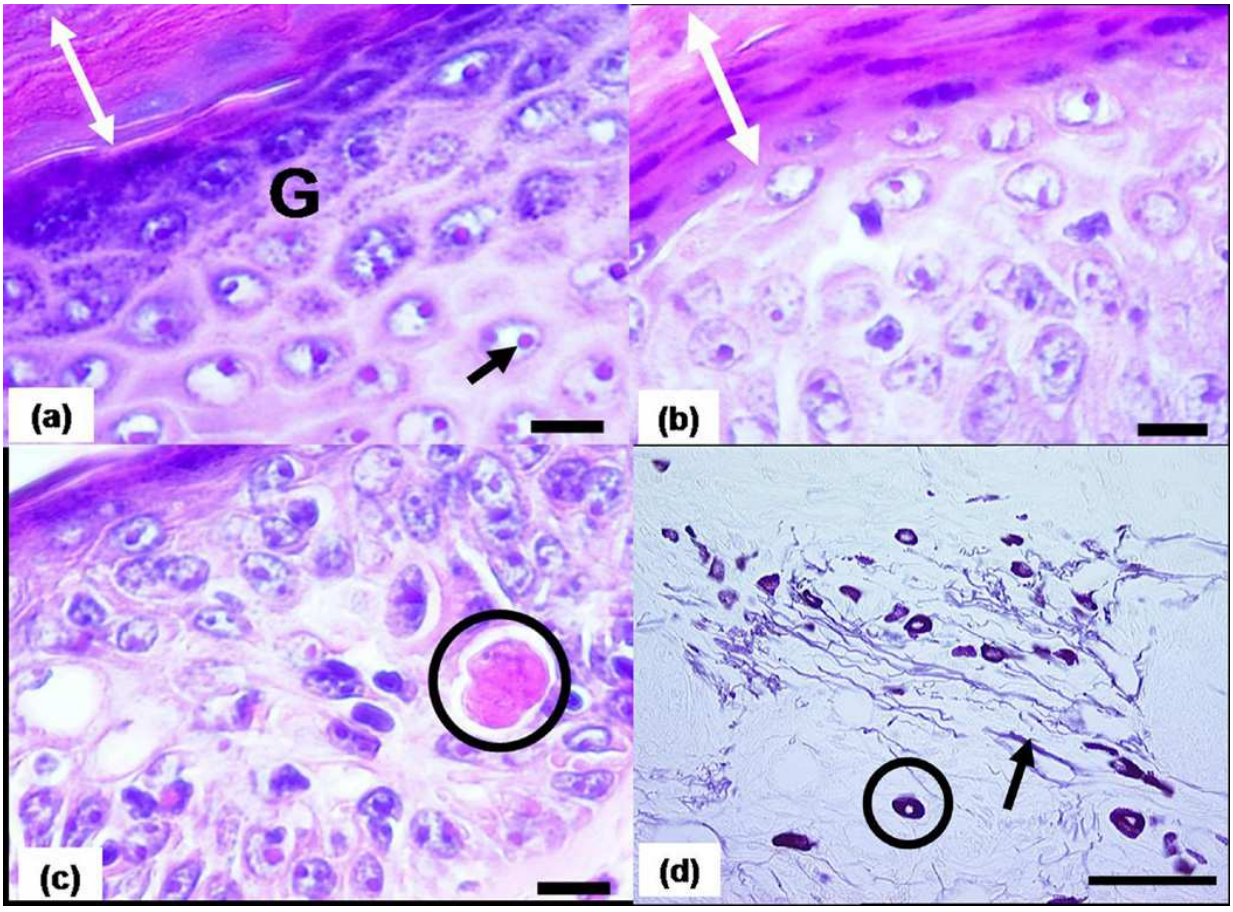


Figure 52 : Photos représentatives de peau de souris irradiée aux ultraviolets pendant 1 mois (a) et 6 mois (b,c,d). Les coupes a, b, c) sont marquées avec Hématoxyline et Eosine ; la coupe d) est marqué avec un marquage Weigert spécifique des fibres élastiques. a) hyperplasie compensatoire : épiderme épaissi (i.e. dont l'épaisseur est supérieure au seuil sain correspondant) présentant une hyperkératose (flèche blanche). Cependant, les cellules sont encore organisées en couches, la kératine mature normalement (présence de la couche granuleuse : G et orthokératose) et la chromatine présente un aspect normal : confiné dans le noyau. b) Epiderme dysplasique : parakératose (flèche blanche), couches cellulaires non apparentes, chromatine hétérogène à l'intérieur des noyaux. c) épiderme dysplasique présentant une dyskératose (cercle noir). d) élastose : la flèche noire indique les fibres élastiques cassées et épaissies ; le cercle noir entoure un mastocyte, signe d'une inflammation. Les barres d'échelle correspondent à 10 µm pour les photos a,b,c) et à 50 µm pour d).

Comme indiqué dans le Tableau XXVI, les analyses histologiques ont permis de classer 47 échantillons dans la classe hyperplasie compensatoire, 37 en hyperplasie atypique et 56 en dysplasie.

Nous avons supposé que la peau des 8 souris non irradiées était saine. Nous avons donc disposé des spectres acquis sur 84 échantillons de peau saine.

3.4.3. Traitement des données spectrales

Pré-traitement des spectres

Pour la spectroscopie de Réflectance Diffuse, la normalisation des spectres sur la bande 390-720 nm a été réalisée en divisant les spectres bruts par un spectre acquis sur une surface

standard dite lambertienne c'est à dire qui rétro-diffusant toutes les longueurs d'onde de manière isotrope (Spectralon, Ocean Optics). Ce spectre était acquis à la plus petite distance inter-fibres, chaque jour d'expérimentation, durant les 7 mois de la photocarcinogenèse. Cette normalisation permet de prendre en compte :

- la réponse spectrale non-uniforme du système d'acquisition : CCD et fibres optiques notamment.
- la variation d'intensité de la source d'excitation tout au long des 7 mois d'expérimentation.

Pour la spectroscopie d'autofluorescence,

- la réponse spectrale non uniforme du système d'acquisition a été corrigée à l'aide d'une lampe d'étalonnage (HL-2000, Ocean Optics) dont le spectre d'émission est connu. L'acquisition du spectre d'émission de la lampe par le système et la comparaison du résultat obtenu avec le spectre « vrai » de celle-ci permet de déterminer un facteur correctif pour chacune des longueurs d'onde qui est appliqué à chaque spectre expérimental.
- la variation d'intensité de la source d'excitation est prise en compte en mesurant le puissance d'excitation en sortie de fibre optique excitatrice grâce à un puissance-mètre (818-UV, Newport Research Corp.) chaque jour d'expérimentation tout au long des sept mois du protocole.

Les données de fluorescence d'un site de mesures spectroscopiques sont représentées sous la forme d'une matrice 2D excitation-émission (EEM pour l'acronyme anglais) : comme schématisé sur la Figure 52, les colonnes de ce type de matrice correspondent à l'émission à chaque longueur d'onde d'excitation. L'intensité I_{ij} correspond à l'intensité d'émission de fluorescence à la longueur d'onde λ_j pour la longueur d'onde d'excitation λ_i. Puisque l'émission de fluorescence se fait aux longueurs d'onde supérieures à la longueur d'onde d'excitation, les valeurs d'intensité de la matrice ont été fixées à zéro pour les longueurs d'onde d'émission inférieures aux longueurs d'onde d'excitation.

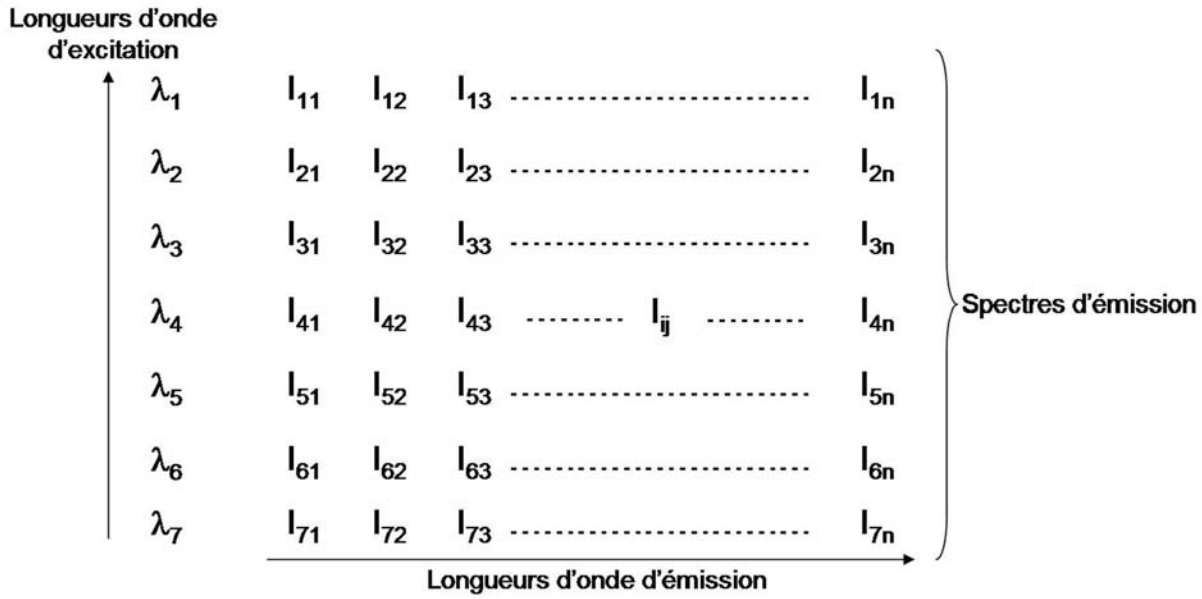


Figure 53 : Schéma d'une matrice « excitation-émission » utilisée pour représenter les données collectées en spectroscopie d'autofluorescence multi-excitation.

L'analyse des spectres obtenus nous a conduits à extraire quatre types de caractéristiques spectrales illustrés sur la Figure 53 :

- surface sous la courbe ou « énergie totale » entre λ_i et λ_j : $A_{\lambda i\text{-}\lambda j}$
- rapport de surfaces : $A_{\lambda i\text{-}\lambda j}/A_{\lambda k\text{-}\lambda l}$
- rapport d'intensités à λ_m et λ_n : $R_{\lambda m/\lambda n}$
- pente entre λ_p et λ_q : $S_{\lambda p\text{-}\lambda q}$.

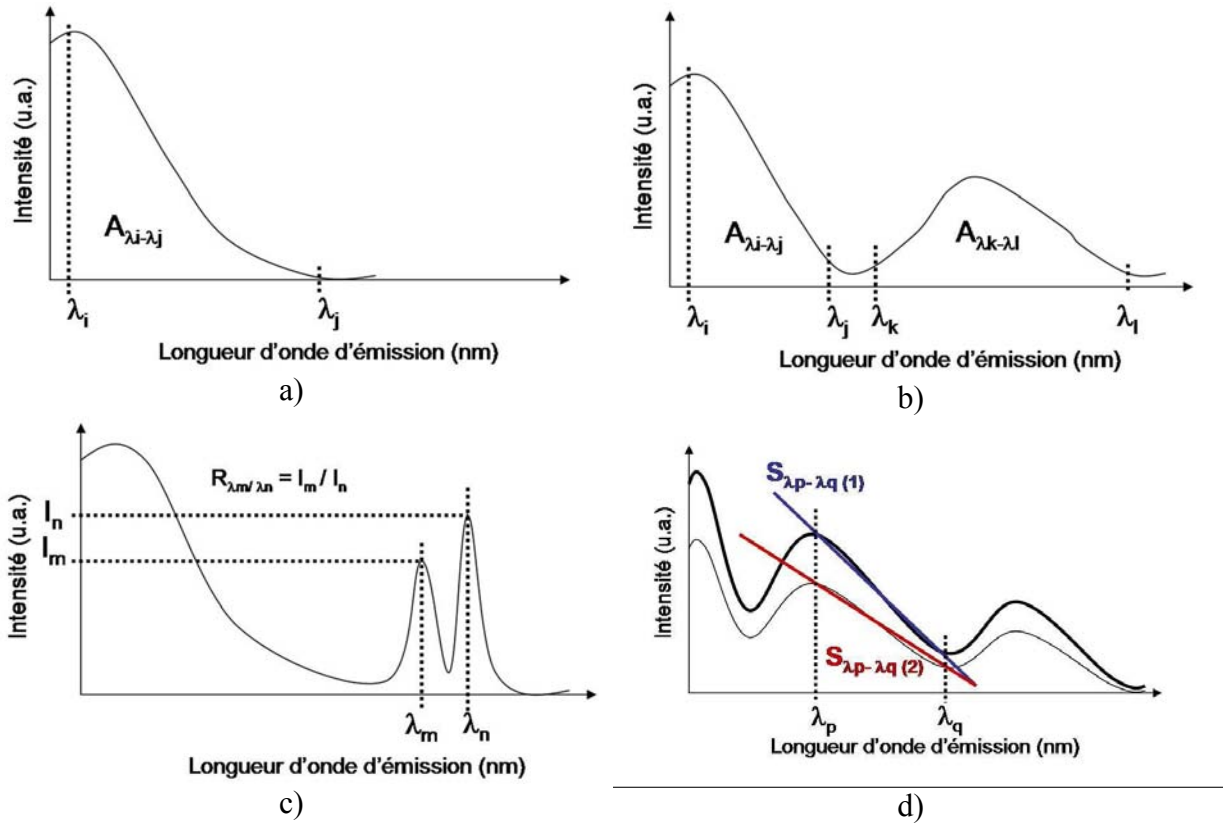


Figure 54 : Les quatre types de caractéristiques spectrales extraites pour l'analyse statistiques : a) Surface sous la courbe, b) Rapport de surfaces, c) Rapport d'intensités et d) Pente.

Comme indiqué dans le Tableau XXVII, 19 et 4 paramètres ont été extraits respectivement pour l'AF et la RD. Nous disposerons donc de 23 paramètres pour la spectroscopie bimodale.

Tableau XXVII : caractéristiques spectrales (19 pour l'autofluorescence et 4 pour la réflectance diffuse) utilisées pour la classification des spectres. L'énergie totale correspond à l'intégration de toutes les intensités spectrales sur la bande spectrale [λ_i - λ_j]. Le rapport de surfaces est le rapport entre la somme des intensités sur la bande spectrale [λ_i - λ_j] et la somme des intensités sur la bande spectrale [λ_k - λ_l]. Le rapport d'intensité correspond au rapport entre les pics d'intensité observés à λ_m et à λ_n. La pente correspond à la pente entre les pics d'intensité à λ_p et λ_q.

Autofluorescence			
λexc (nm)	Energie totale (u.a.)	Rapport de surfaces	Rapport d'intensités
360	$A_{410\text{-}700}$	$A_{410\text{-}459} / A_{459\text{-}700}$	
368	$A_{410\text{-}700}$	$A_{410\text{-}470} / A_{470\text{-}700}$	
390	$A_{460\text{-}700}$	$A_{460\text{-}545} / A_{545\text{-}700}$	$R_{470/634}$
400	$A_{461\text{-}700}$	$A_{461\text{-}550} / A_{550\text{-}700}$	$R_{485/633.5}$
410	$A_{460\text{-}700}$	$A_{460\text{-}542.5} / A_{542.5\text{-}700}$	$R_{492/633}$
420	$A_{462.5\text{-}700}$	$A_{462.5\text{-}550} / A_{550\text{-}700}$	$R_{505/633}$
430	$A_{476\text{-}700}$	$A_{476\text{-}585} / A_{585\text{-}700}$	$R_{507/633}$
Réflectance Diffuse	Energie totale (u.a.)	Pente	Rapport d'intensités
	$A_{390\text{-}720}$	$S_{580\text{-}600}$ $S_{615\text{-}720}$	$R_{423/577}$

Traitement des données

Le traitement des données doit permettre de déterminer les paramètres les plus pertinents pour discriminer les différentes classes histologiques entre elles. Ce traitement se fait en deux étapes :

a) Réduction des données

Le grand nombre de caractéristiques spectrales est réduit grâce à l'Analyse par Composantes Principales (ACP ou PCA pour l'acronyme anglophone). Cette méthode de transformation linaire permet de diminuer la dimension de l'espace de données de départ en représentant la partie significative de l'information (sans le bruit) en un ensemble de composantes principales (CPs) décorrélées. L'ACP est utilisée sur un sous-ensemble des spectres acquis sur les échantillons de peau classés par analyse anatomo-pathologique dans l'une des quatre classes définies : sain, hyperplasie compensatoire, hyperplasie atypique ou dysplasie. Dans ce cas, nous avons choisi au hasard 66% de la totalité des spectres correspondant à chaque classe histologique. Ce sous-ensemble de spectres est appelé ensemble d'entraînement et sert à « entraîner » l'algorithme pour qu'il apprenne à classifier les spectres et par conséquent les échantillons de peau sur lesquels ils ont été acquis dans la classe histologique adéquate.

b) Classification

Chaque nouveau spectre appartenant au sous-ensemble (appelé ensemble de « validation ») qui correspond aux 34% restant dans chaque classe histologique est classé dans l'une des 4 classes histologiques définies : sain, hyperplasie compensatoire, hyperplasie atypique ou dysplasie. Cette classification se fait sur la base d'une comparaison avec le modèle standard déterminé pour chaque classe histologique.

Différents algorithmes de classification sont utilisables dont celui dit « des voisins les plus proches » (*k-Nearest Neighbors* avec k qui détermine le nombre de voisins) que nous avons choisi d'implémenter pour classer un échantillon donné dans la classe qui présente le plus grand nombre d'échantillons proches (« voisins ») dans le sous-ensemble de données d'entraînement. La distance euclidienne a été utilisée pour mesurer la distance entre les différents points.

Comme indiqué dans la première partie de ce rapport (cf. § 1.3.3), la sensibilité (Se) et la spécificité (Sp) ont été calculées pour évaluer les performances diagnostiques. Pour cela, les vrais négatifs et les vrais positifs ont été comptabilisés. Afin d'optimiser le couple de valeurs (Se, Sp), nous avons étudié l'influence du nombre de voisins (pour k entier, appartenant à [1-15]) et du nombre de composantes principales sur les valeurs de la sensibilité et de la

spécificité et ce, pour chaque modalité dans la discrimination de chacune des 6 paires de classes histologiques : H *vs.* CH, H *vs.* AH, H *vs.* D, CH *vs.* AH, CH *vs.* D et AH *vs.* D (cf. Tableau XXVIII).

Tableau XXVIII : Nombre de composantes principales (CPs) et de voisins les plus proches (k) testés pour chaque modalité de spectroscopie: autofluorescence (AF) en mono-excitation, autofluorescence (AF) en multi-excitation, Réflectance Diffuse (RD) et bimodalité (RD + AF en multi-escitation)

AF mono-excitation		**AF multi-excitation**	**RD**	**Bimodalité : AF multi-excitation et RD**
360, 368 nm	**390, 400, 410, 420, 430 nm**			
CPs = 1, 2. K = 1, 2, ...,15.	CPs = 1, 2, 3. k = 1, 2, ...,15.	CPs = 1, 2..., 19. k = 1, 2, ...,15.	CPs = 1, 2, 3, 4. k = 1, 2, ...,15.	CPs = 1, 2..., 23. k = 1, 2, ...,15.

Classification spectrale

La Figure 54 montre les matrices Excitation-Emission moyennes obtenues pour chaque classe histologique : a) sain, b) hyperplasie compensatoire, c) hyperplasie atypique et d) dysplasie. Nous y observons les modifications caractéristiques de l'émission des flavines et de la kératine ainsi que des porphyrines, respectivement mentionnées par les aires 1 et 2 sur la matrice correspondant à la classe histologique saine.

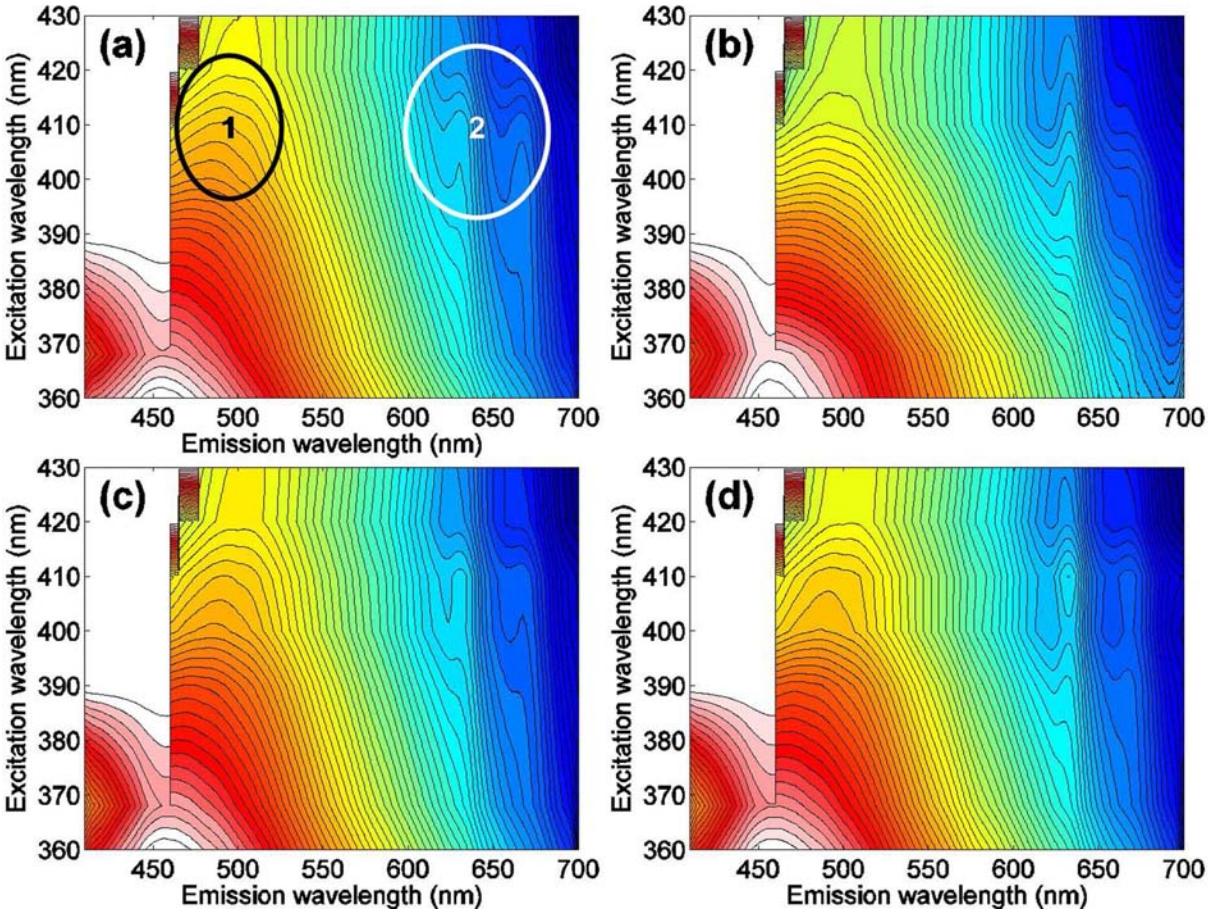


Figure 55 : Matrices Excitation-Emission (EEMs) moyennes obtenues par spectroscopie d'autofluorescence multi-excitation (AF multi-excitation) pour chaque classe histologique : a) sain, b) hyperplasie compensatoire, c) hyperplasie atypique et d) dysplasie. Les modifications notables des spectres sont indiquées en a) : 1 et 2 correspondant respectivement aux excitation/émission des flavines et kératine ainsi que des porphyrines.

Les spectres d'autofluorescence obtenus pour une excitation à 410 nm (Figure 55 a) présentent des maxima d'émission autour de 510 nm, 633 nm et 672 nm. La fluorescence à 510 nm résulte très certainement de la superposition des émissions des flavines intracellulaires et de la kératine. En effet, pour une excitation dans la partie bleue du spectre, la kératine présente une forte fluorescence dont la distribution spectrale est très proche de celle des flavines[104] mais un peu décalée vers les courtes longueurs d'onde (maximum vers 503 nm pour des mesures sur lame histologique de peau humaine biopsiée, fixée[105]) par rapport aux flavines (530-550 nm[106]). Le double-pic d'émission d'émission à 633 nm et 672 nm est caractéristique des porphyrines.

Dans le cas de la réflectance diffuse (Figure 55 b), les « creux » observés sont caractéristiques du maximum principal (415 nm) et des maxima secondaires (542 nm et 777 nm) de l'absorption de l'hémoglobine.

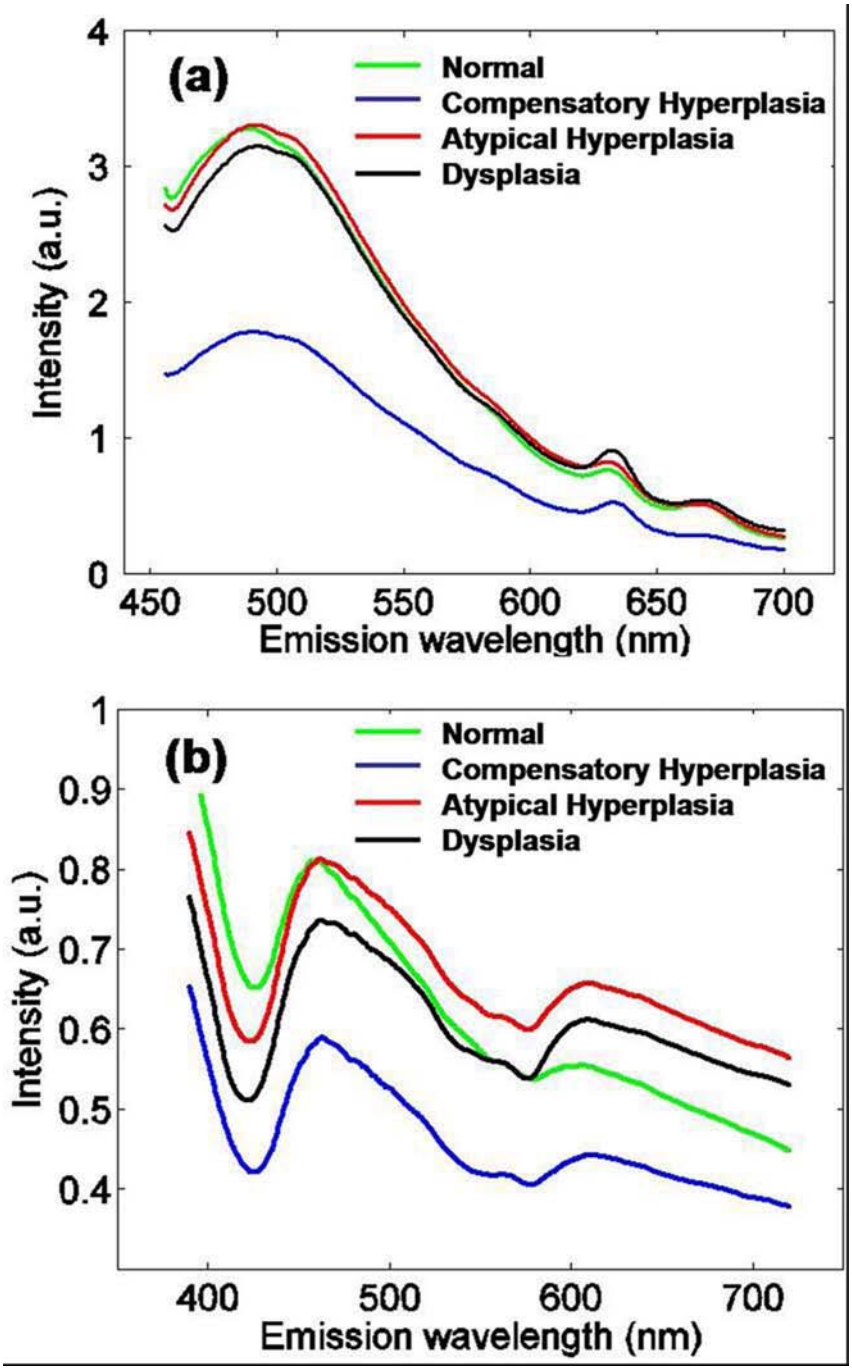


Figure 56 : Spectres moyens obtenus pour chaque classe histologique (sain, hyperplasie compensatoire, hyperplasie atypique et dysplasie) en a) autofluorescence pour une excitation à 410 nm et b) en réflectance diffuse. a) 410 nm correspond au pic d'excitation des flavines et de la kératine dont l'émission apparaît à 510 nm et des porphyrines dont le double pic d'émission apparaît vers 633 et 672 nm. b) les chutes d'intensité observées sur les spectres de réflectance diffuse sont caractéristiques des pics d'absorption de l'hémoglobine (420, 542 et 577 nm)

Le but de la classification spectrale est de déterminer le couple de valeurs (sensibilité et spécificité) qui caractérise la précision avec laquelle l'algorithme (Voisins les plus proches) discrimine les classes histologiques par paires. Pour cela, nous avons utilisé un test ROC, acronyme anglophone de *Receiver Operating Characteristic* qui représente Se en fonction de

(1 – Sp) : cf. Figure 56. Un nuage de points correspondant à la classification des différents échantillons est déterminé sur le diagramme ROC. Le point le plus éloigné de la ligne médiane est conservé comme le résultat de la classification et comme indiquant le couple (Se, Sp) optimal dont les valeurs sont ensuite utilisées pour comparer les résultats obtenus par les différentes modalités étudiées.

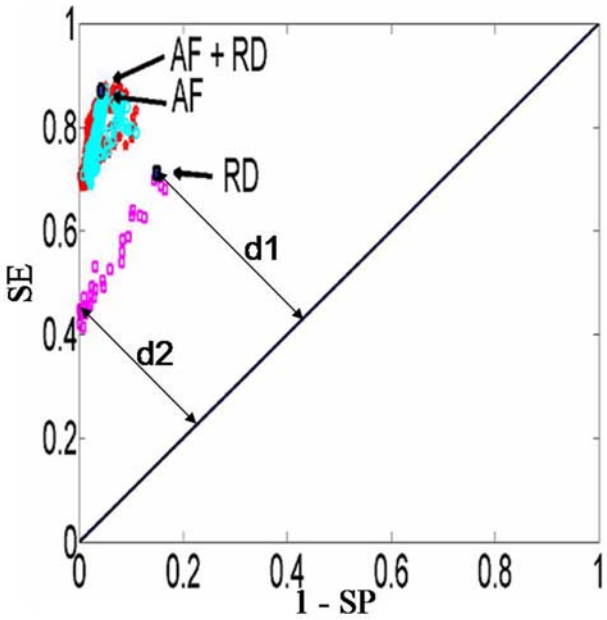


Figure 57 : Diagramme ROC (*Receiver Operating Characteristic*) permettant de déterminer le couple (Se, Sp) optimal obtenu pour la classification des spectres de la modalité étudiée (ici Autofluorescence seule : AF ou réflectance diffuse seule : RD ou bimodalité : AF+RD) dans l'une des classes histologiques

Nous avons analysé nos résultats de manière à :

- comparer la précision obtenue par chaque longueur d'onde d'excitation : 360, 368, 390, 400, 410, 420 et 430 nm pour la spectroscopie d'autofluorescence
- comparer la précision obtenue par la spectroscopie d'autofluorescence avec une seule longueur d'onde d'excitation (AF mono-excitation) ou avec la combinaison des 7 longueurs d'onde d'excitation (AF multi-excitation)
- comparer la précision obtenue par l'AF multi-excitation avec celle obtenue par la spectroscopie de réflectance diffuse (RD)
- comparer la précision obtenue par AF multi-excitation, RD ou la bimodalité (AF multi-excitation+RD)

Autofluorescence en mono-excitation : comparaison de la précision de classification obtenue avec chaque longueur d'onde d'excitation

Les Figures 57 a) et b) indiquent respectivement la sensibilité et la spécificité obtenues en spectroscopie d'autofluorescence. On remarque que lors de la discrimination de la classe

hyperplasie compensatoire des trois autres classes (sain, hyperplasie atypique et dysplasie), les longueurs d'onde visibles (390, 400, 410, 420 et 430 nm) permettent d'obtenir de meilleurs résultats de sensibilité que les longueurs d'onde de l'ultraviolet (360 et 368 nm). Ces résultats sont intéressants car l'hyperplasie compensatoire est considérée comme un stade bénin. Or en situation clinique, nous souhaiterions distinguer les stades bénins des stades précancéreux pour réduire le nombre de biopsies non nécessaires. Dans ce cas, les longueurs d'onde visibles devraient donc être préférées à celles de l'ultraviolet.

On peut également remarquer que ces longueurs d'onde visibles atteignent les scores les plus faibles lors de la discrimination entre les classes saine et hyperplasie atypique. Comme nous pouvons le remarquer dans le Tableau XXVI (cf. § 3.4.2), les classes « saine » et « hyperplasie atypique » sont les deux classes pour lesquelles il n'y a pas d'anomalie du *stratum corneum*. En effet, l'hyperplasie compensatoire présente en général une hyperkératose et la dysplasie présente une parakératose. Notre hypothèse est donc que la kératine jour un rôle important dans la discrimination par autofluorescence entre les différents types de peau. Or les deux classes « saine » et « hyperplasie compensatoire » présentant toutes les deux une couche superficielle de kératine « normale », la différenciation est difficile à faire pour la spectroscopie d'autofluorescence.

Une diminution très importante de la spécificité est observée lors de la discrimination entre hyperplasie atypique et dysplasie autant dans pour les longueurs d'onde de l'ultraviolet que pour les visibles (Figure 57 b). Notre hypothèse est que cette faible spécificité est due à la grande similarité morphologique entre ces deux classes. En effet, les seuls éléments morphologiques qui les distinguent sont une plus grande désorganisation cellulaire ou la présence de dyskératose, de parakératose ou d'élastose. En moyenne, ces classes sont donc relativement proches sur le plan morphologique.

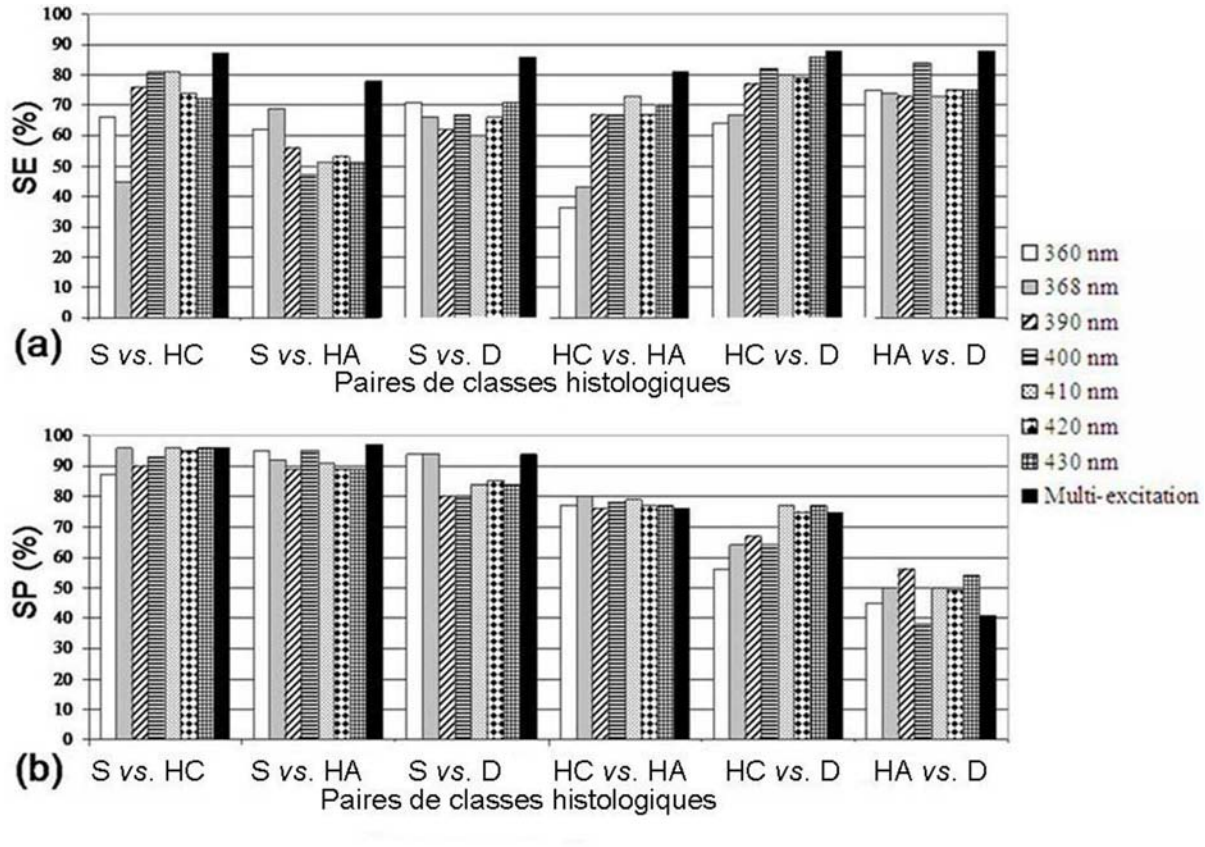


Figure 58 : Sensibilité (a) et spécificité (b) obtenues dans le cas de l'autofluorescence en mono- et multi-excitation

Comparaison de l'autofluorescence en mono-excitation et en multi-excitation

Sur la Figure 57, l'histogramme de couleur noire correspond à la spectroscopie d'autofluorescence en multi-excitation c'est-à-dire combinant les 7 longueurs d'onde d'excitation. On observe que la sensibilité obtenue dans le cas de la multi-excitation est meilleure que pour n'importe quelle longueur d'onde d'excitation utilisée seule. L'amélioration moyenne est de 7,3% sur toutes les paires de classes histologiques à discriminer. C'est l'inverse pour la spécificité qui n'est pas augmentée par la multi-excitation : cette spécificité atteint des scores très élevés (autour de 95%) quand il s'agit de discriminer la classe saine des trois autres classes histologiques (HC, AH et D) mais on observe une baisse importante dans le cas de la discrimination entre les trois types d'hyperplasie (76, 75 et 41% respectivement) avec des scores inférieurs à ceux obtenus par l'AF en mono-excitation.

Réflectance Diffuse (RD)

La Figure 58 montre les scores de sensibilité et de spécificité obtenus par la spectroscopie de réflectance diffuse pour la discrimination de chacune des 6 paires de classes histologiques. On observe que la sensibilité est légèrement meilleure (+5,6%) lors de la discrimination des différentes types d'hyperplasie les uns des autres (sensibilité moyenne de 75,3% sur les 3

paires de classes histologiques concernées : HC *vs.* HA, HC *vs.* D et HA *vs.* D) que lors de la discrimination entre tissu sain et n'importe quel type d'hyperplasie (sensibilité moyenne de 69,7% sur les trois paires de classes histologiques concernées : sain *vs.* HC, sain *vs.* HA et sain *vs.* D). C'est le contraire dans le cas de la spécificité qui est beaucoup plus faible (-24%) dans le cas de la discrimination entre les différents types d'hyperplasie (66% de spécificité en moyenne sur les 3 paires de classes histologiques) que pour discriminer la peau saine de chacun des types d'hyperplasie (90% de spécificité en moyenne sur les 3 paires de classes histologiques).

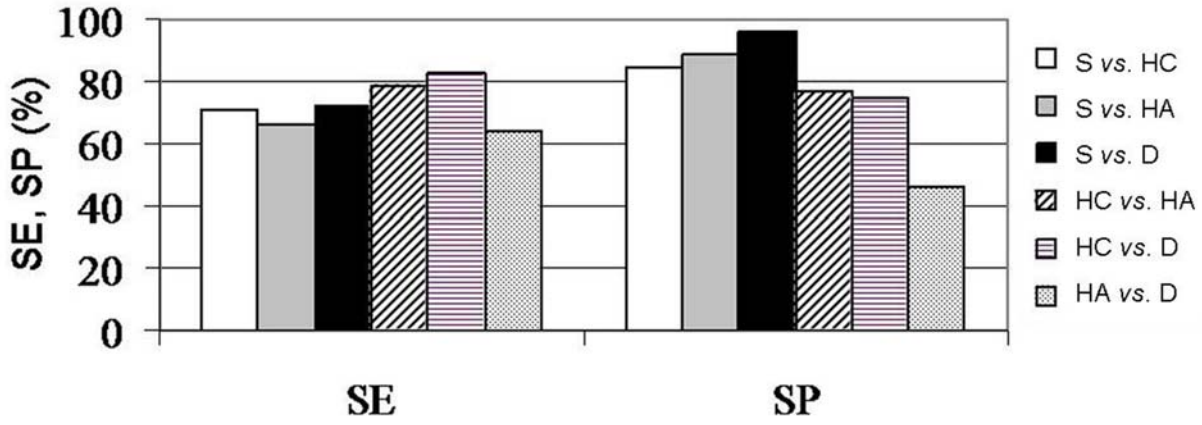


Figure 59 : Sensibilité (SE) et spécificité (SP) obtenues par la spectroscopie de réflectance diffuse lors de la discrimination de chacune des 6 paires de classes histologiques

Comparaison entre autofluorescence en multi-excitation et réflectance diffuse

La Figure 59 montre les scores de sensibilité (a) et de spécificité (b) de l'autofluorescence en multi-excitation (AF multi-excitation), de la réflectance diffuse (RD) et de la bimodalité (AF multi-excitation + RD) dans la discrimination des 6 paires de classes histologiques. L'AF multi-excitation obtient toujours de meilleurs scores de sensibilité (+12,2% en moyenne sur les 6 paires de classes histologiques) que la RD. Dans le cas de la spécificité, l'autofluorescence en multi-excitation et la réflectance diffuse obtiennent des résultats comparables : les deux modalités fournissent de meilleurs résultats pour discriminer la peau saine des différents types d'hyperplasies que pour discriminer les différents types d'hyperplasie entre elles. La chute de spécificité est même spectaculaire dans le cas de la discrimination entre hyperplasie atypique et dysplasie avec 41% et 46% de spécificité pour l'AF multi-excitation et la RD respectivement (comparé à un minimum de 75% de spécificité pour les cinq autres paires de classes histologiques).

Comparaison entre mono-modalité (AF en multi-excitation ou RD) et bimodalité

Dans le cas de la sensibilité, l'AF multi-excitation atteint des scores supérieurs à ceux de la bimodalité pour toutes les paires de classes histologiques. Par contre, la bimodalité permet d'améliorer la spécificité pour la discrimination entre les 3 types d'hyperplasie comparé à l'AF multi-excitation ou à la RD utilisée seule : +9% de spécificité sur les 3 paires de classes histologiques concernées (HC *vs.* HA, HC *vs.* D et HA *vs.* D).

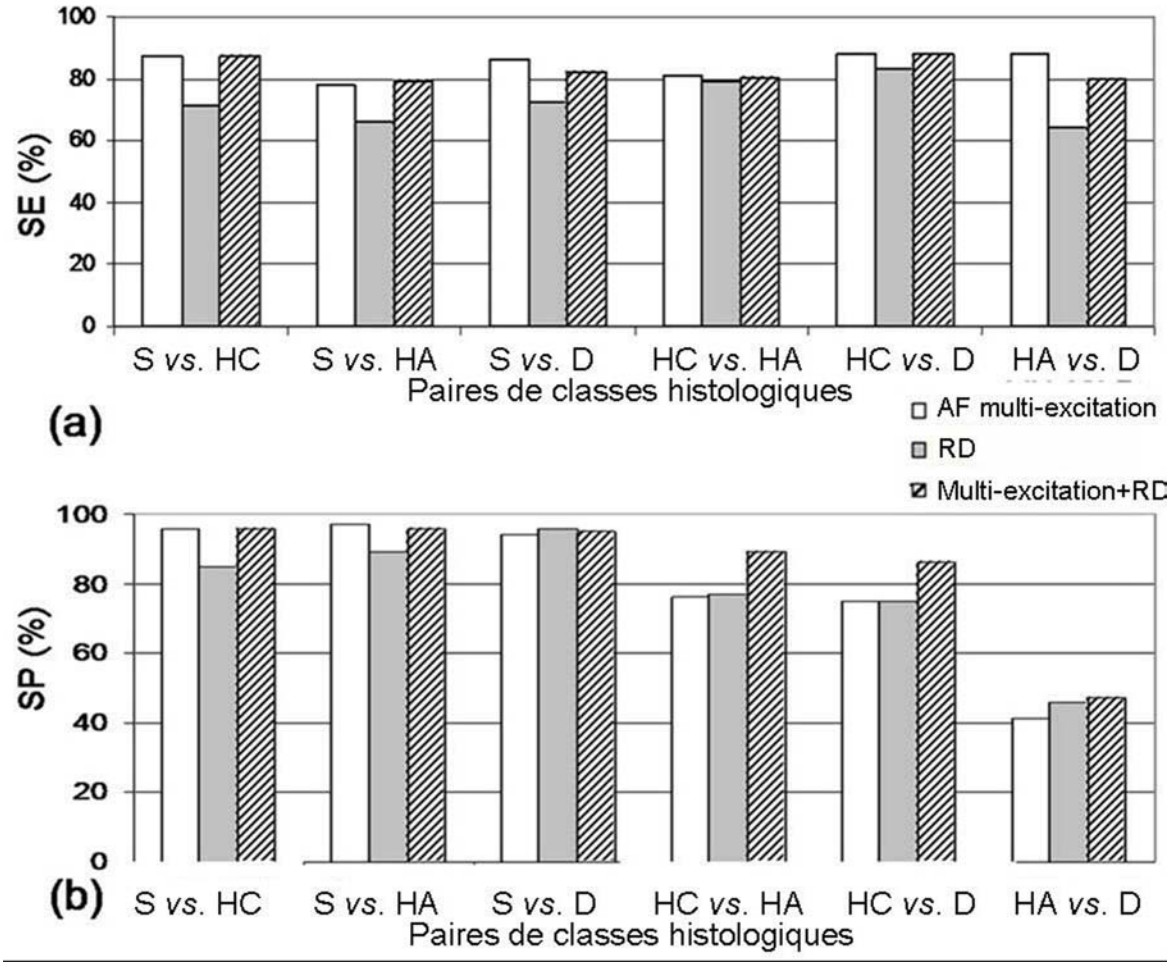


Figure 60 : Sensibilité (a) et spécificité (b) moyennes obtenues dans le cas de l'autofluorescence en mutli-excitation (AF multi-excitation, histogramme blanc), de la réflectance diffuse (gris) et de la bimodalité (AF multi-excitation +RD rayé)

3.4.4. Discussion

Nos résultats sont cohérents avec ceux publiés par Diagaradjane *et al.*[102] qui portaient sur la discrimination des premiers stades de la modification néoplasique de la peau murine induite par DMBA/TPA. Ils ont également comparé la précision diagnostique atteinte par la spectroscopie d'autofluorescence en mono- et en multi- excitation associées à une méthode d'analyse statistique multivariée. Parmi les 19 longueurs d'onde d'excitation qu'ils ont testées (entre 280 et 460 nm), les auteurs ont atteint les meilleurs scores grâce aux longueurs d'onde

280 et 410 nm : 74,3 et 73,1% de précision diagnostique respectivement. Nous avons choisi de ne pas utiliser des longueurs d'onde aussi courtes que 280 nm (domaine spectrale de l'UVB) car elles risquent de ne pas pouvoir être utilisées lors d'un transfert clinique puisqu'elles sont mutagènes (interactions avec l'ADN). Mais si l'on compare les résultats obtenus dans l'étendue spectrale commune à nos deux équipes (360-430 nm), nous obtenons les mêmes types de résultats : les longueurs d'onde visibles fournissent des scores supérieurs à ceux obtenus avec les plus courtes longueurs d'onde (73,1% de précision diagnostique pour 410 nm et 63,9% pour 360 nm). De même, ils obtiennent de meilleurs résultats en multi-excitation qu'en mono-excitation. En comparant les résultats obtenus par la combinaison des 5 longueurs d'onde d'excitation les plus discriminantes, ils concluent à une augmentation de précision diagnostique de 11,6% comparé à la précision diagnostique obtenue par la longueur d'onde la plus discriminante. Nos résultats montrent une augmentation de sensibilité diagnostique de 7,3%.

Au sujet de l'intérêt de la bimodalité, nos résultats peuvent être mis en parallèle avec ceux de Chang *et al.*[98] Ces derniers ont comparé le potentiel diagnostique de l'autofluorescence seule, de la réflectance diffuse seule et de la combinaison des deux modalités (bimodalité) à discriminer la muqueuse saine du col de l'utérus (de types squameux et glandulaire) de différents stades précancéreux de ces deux mêmes types de muqueuse. Ils ont donc également montré que l'autofluorescence en multi-excitation utilisée seule permettait d'obtenir de meilleurs résultats que la réflectance diffuse seule et que la bimodalité permettait une petite amélioration de la performance diagnostique. Nous avons observé les mêmes tendances sur la peau de souris : l'AF multi-excitation est plus discriminante que la RD. Cependant, alors que Chang *et al.* s'intéressent uniquement à discriminer le tissu sain des états précancéreux, nous avons choisi de nous intéresser également à la discrimination des états précancéreux entre eux. Or dans ce cas, nous observons que la bimodalité permet une nette amélioration de la spécificité du diagnostic. C'est la raison pour laquelle la bimodalité semble particulièrement précieuse car elle pourrait permettre de mieux distinguer les états bénins (hyperplasie compensatoire) des états précancéreux (hyperplasie atypique et dysplasie) ce qui est d'une grande importance sur le plan clinique.

3.5. Conclusion et perspectives

A notre connaissance, notre étude est la première à évaluer l'intérêt de la spectroscopie bimodale pour discriminer différents stades histologiques de la photocarcinogenèse de peau murine.

Il était pour cela important de pouvoir définir précisément les différentes classes histologiques et nous avons donc proposé des critères morphologiques pour classer les différents échantillons de peau prélevés tout au long des 7 mois de la photocarcinogenèse dans trois classes d'hyperplasie : compensatoire, atypique et dysplasique. Cette proposition de classification nous semblait d'autant plus importante que la peau murine est un modèle largement utilisé en recherche.

Il serait maintenant souhaitable de mettre en place un essai clinique qui nous permette de tester la robustesse de la spectroscopie bimodale à la variabilité inter-individuelle caractéristique des êtres humains, plus importante que pour les souris. La robustesse devra également être testée face à la présence de mélanine dans la peau humaine. Les souris SKH1 que nous avons utilisées sont albinos et leur peau est donc dépourvue de mélanine. Or la mélanine absorbe fortement la lumière dans le proche-UV et le visible, ce qui risque de diminuer l'intensité des signaux d'excitation d'autofluorescence et de réflectance diffuse mais également de modifier la forme de spectres.

La spectroscopie bimodale pourrait également utilisée pour réaliser sur des kératoses actiniques et des carcinomes pour déterminer une signature spectrale propre aux lésions bénignes qui permettrait aux cliniciens de limiter le nombre d'exérèses inutiles.

Conclusion générale

Les travaux présentés ici montrent que les spectroscopies de réflectance diffuse et d'autofluorescence sont des outils potentiellement intéressants pour améliorer le diagnostic des deux lésions cutanées les plus létales : mélanome et carcinome épidermoïde.

Sur un modèle simple de fantôme simulant des mélanomes d'indices de Breslow différents, nous avons montré que la spectroscopie de réflectance diffuse permettait de discriminer deux épaisseurs différant d'1 mm et ce, pour une gamme d'épaisseurs variant de 2 à 6 mm. De plus, une simulation numérique a montré qu'une discrimination plus fine était envisageable, par pas de 0,5 mm, sur des épaisseurs de l'ordre du millimètre.

Ces résultats préliminaires encourageants nous ont incités à réfléchir à l'élaboration d'un protocole clinique qui viserait à évaluer par spectroscopie bimodale toute lésion pigmentaire suspecte prête à être excisée. L'objectif serait alors de corréler les mesures spectroscopiques à la classification anatomo-pathologique d'abord en termes de malignité puis en termes d'indice de Breslow, dans le cas des mélanomes. Il faudra en particulier tester la robustesse de la méthode aux variations inter-individuelles d'intensité de pigmentation et de géométrie des lésions.

Les méthodes optiques sont actuellement utilisées en dermo-cosmétique comme outils de biométrologie cutanée non invasive, notamment pour évaluer la couleur de la peau et ainsi étudier le pouvoir pigmentogène ou dépigmentogène de préparations ou pour déterminer des phototypes. Plusieurs méthodes spectroscopiques sont actuellement utilisées telles la chromamétrie (basée sur le système L*a*b de Munsell) et la mexamétrie (analyse de la lumière rétrodiffusée à 568 et 660 nm pour déterminer la quantité d'hémoglobine et à 660 et 880 nm pour déterminer la quantité de mélanine)[107]. Ces techniques sont utilisées surtout pour apporter une évaluation objective des effets des préparations topiques. A notre connaissance, aucune étude n'a encore porté sur l'utilisation de méthodes optiques pour discriminer les lentigos des lésions pigmentées précancéreuses ou cancéreuses précoces. Les lentigos sont des « taches » observées en particulier chez le sujet âgé en peau exposée au rayonnement solaire (on parle de lentigo actinique). Un lentigo est une petite macule hyperpigmentée de 1 à 3 mm de diamètre dont la teinte foncée n'est pas accentuée par l'exposition solaire contrairement aux éphélides (taches de rousseur). L'examen histologique peut s'imposer lorsque l'aspect clinique est inquiétant[108]. La distinction entre lentigo et mélanose de Dubreilh ou nævus

dysplasique peut s'avérer importante en particulier chez les sujets atteints de Xeroderma Pigmentosum.
Outre la notion de pigmentation, celle d'épaisseur, qui nous a concernés pour l'indice de Breslow, intéresse particulièrement l'industrie cosmétique. En effet, le vieillissement cutané implique chez la peau âgée l'altération de tous les constituants de la peau (liée à la sénescence) sauf de la couche cornée, faite de cellules mortes qui est plutôt épaissie[109].
La méthode que nous avons mise au point pourrait ainsi être utilisée pour évaluer de manière objective et non invasive l'épaisseur de certaines couches cutanées et donc le pouvoir régénérant et anti-âge de préparations cosmétiques.

L'étude de la photocarcinogenèse de peau murine a permis de proposer une classification histologique et de tester la capacité de la spectroscopie bimodale à discriminer les différentes classes déterminées. Nos résultats montrent que, comparé aux performances atteintes par chacune des deux modalités (autofluorescence et réflectance diffuse), la bimodalité permet surtout d'améliorer la spécificité (+9%) de la discrimination des différents types d'hyperplasie rencontrés durant la photocarcinogenèse. Ces résultats préliminaires doivent maintenant être confirmés par des études cliniques en réalisant des mesures en spectroscopie bimodale sur des kératoses actiniques et des carcinomes pour déterminer si une signature spectrale qui serait propre aux lésions bénignes permettrait d'aider les cliniciens à ne pas réaliser d'exérèse inutile. Il serait également intéressant de tester l'intérêt de la spectroscopie à aider au contourage des lésions[110]. Enfin, notre étude a permis de poser les bases d'une instrumentation simplifiée facilement utilisable en clinique. Il est en effet possible de limiter le nombre de longueurs d'ondes d'excitation au domaine du visible (410 nm) et le nombre de distances inter-fibres pour ne conserver que celles inférieures à 1 mm chez la souris.

Liste des Figures

Figure 1 : Schéma tri-dimensionnel d'une coupe transversale de peau humaine. Iconographie disponible sur le site web de la Medical School de l'Université de Virginie, Etats-Unis d'Amérique 15
Figure 2 : Schéma d'une coupe histologique de peau humaine avec dimensions typiques des trois couches. Iconographie adaptée du site web de la School of Anatomy and Human Biology, ... 15
Figure 3 : Photographie d'une coupe histologique marquée à l'Hématoxyline et à l'Eosine (H&E) de peau humaine et montrant les couches cellulaires au sein de l'épiderme correspondant aux différents stades de maturation des kératinocytes. C : couche Cornée, G : couche Granuleuse, S : couche Spineuse, B : couche Basale. Iconographie disponible sur le site web du CHU de la Pitié-Salpêtrière (Paris). 17
Figure 4 : Photographie montrant la morphologie des kératinocytes au sein de la couche spineuse (stratum spinosum) de l'épiderme, appelée ainsi à cause de l'apparence des jonctions intercellulaires (desmosomes) en forme d'épines. Iconographie adaptée du site web de la School of Anatomy and Human Biology, The University of Western Australia. 19
Figure 5 : Photographies de coupes histologiques de peau humaine marquée à l'Hématoxyline et à l'Eosine (H&E) montrant la variabilité régionale de l'épaisseur de la couche cornée : a) Peau fine, barre d'échelle = 50 µm, b) Peau épaisse, barre d'échelle = 100 µm. Iconographie adaptée du site web de la School of Anatomy and Human Biology, The University of Western Australia. 20
Figure 6 : Photographies de coupes histologiques de peau humaine montrant la localisation de la mélanine au sein de l'épiderme. 21
Figure 7 : Photographie de coupe histologique (coloration Goldner) de peau humaine sur laquelle on distingue le derme papillaire avec des fibres collagènes lâches et le derme réticulaire fibreux. Iconographie disponible sur le site web de l'unité d'anatomie de l'Université de Fribourg, Suisse. 24
Figure 8 : Évolution de l'indice de Breslow des mélanomes diagnostiqués en France entre 1988 et 1990 et entre 1997 et 1999[6]. 26
Figure 9 : Cancérogenèse. Figure tirée de Hoerni, 2006[16] 31
Figure 10 : Schéma illustrant le processus de préparation d'une biopsie (du prélèvement jusqu'à la lame histologique) dans le cas d'une étude histologique standard. 32
Figure 11 : Schéma de l'évolution cancéreuse typique d'un épithélium. 36
Figure 12 : Schéma de la loi de Snell-Descartes décrivant réflexion et réfraction d'un rayon lumineux à l'interface de milieux matériels d'indices de réfraction différents. 37
Figure 13 : Schéma de la réflexion spéculaire et diffuse en fonction de la rugosité de lasurface 38
Figure 14 : Taux de réflexion en fonction de l'angle d'incidence du rayon lumineux à l'interface de deux milieux d'indices de réfraction différents 39
Figure 15 : Spectres d'absorption des principaux chromophores biologiques. Iconographie adaptée de Vogel et al.[19] 40
Figure 16 : Diagramme de Jablonski illustrant le phénomène d'absorption portant la molécule à un niveau d'énergie excité ainsi que les différentes voies de retour à l'état fondamental : soit par émission lumineuse (fluorescence ou phosphorescence) soit pas dissipation de chaleur. 41
Figure 17 : Illustration de la loi de Beer-Lambert décrivant l'absorption de l'intensité lumineuse par un milieu homogène absorbant d'épaisseur dz et de coefficient d'absorption μ_a 41
Figure 18 : Distribution angulaire de la diffusion en fonction de la valeur du paramètre d'anisotropie g. 43
Figure 19 : Schéma de principe de la spectroscopie optique fibrée point par point 44
Figure 20 : Spectres typiques a) d'absorption et b) d'émission des principaux fluorophores endogènes 46
Figure 21 : Représentation moléculaire des deux types de mélanine : a) eumélanine noire et brune et b) phéomélanine. 52
Figure 22 : Spectre d'extinction de l'eumélanine et de la phéomélanine. Iconographie disponible sur le site web de l'OMLC (Oregon Medical Laser Center). 53
Figure 23 : Instrumentation pour la dermoscopie : a) Principe d'un dermoscope, b) Différentes pièces d'un dermoscope permettant une prise d'image, c) Dermoscope équipé d'une visualisation vidéo 57
Figure 24 : Schéma adapté de Liu et a.l[61] illustrant la résolution spatiale en profondeur permise par l'utilisation de plusieurs distances entre fibre optique excitatrice et fibres optiques réceptrices. Schéma simplifié d'un milieu non diffusant. 62
Figure 25 : a) Données tirées de Simpson et al[72] : coefficient d'absorption de peau caucasienne (carrés) et de peau négroïde (ronds) mesurés ex vivo (barre d'ereur : écart-type), b) Spectre d'absorption de la gélatine faite avec 2 g de café diluée dans 70 ml d'eau du robinet. 66

Figure 26 : Comparaison des spectres d'absorption de la peau négroïde mesuré ex vivo fourni par Simpson et al. (bleu) et de la couche de gélatine enrichie en café (2 g pour 70 ml d'eau) mise au point pour mimer l'absorption d'un mélanome (rose). *67*
Figure 27 : Schéma des fantômes utilisés pour mimer a) derme et mélanome ainsi que b) les différentes épaisseurs de mélanomes (indices de Breslow) testées *67*
Figure 28 : a) Photo d'un mélanome illustrant la pigmentation généralement inhomogène. Iconographie disponible sur le site web du National Cancer Institute ; b) Schéma d'une coupe transversale d'un mélanome telle qu'elle peut se retrouver sur coupe histologique pour illustrer la mesure de l'indice de Breslow. *68*
Figure 29 : Schéma bloc de l'instrumentation utilisée pour la spectroscopie de réflectance diffuse résolue spatialement pour la détermination non invasive de l'indice de Breslow du mélanome simulé par fantôme *69*
Figure 30 : Schéma en coupe de la sonde à fibres optiques utilisée pour les expérimentations montrant les différentes distances entre fibre excitatrice et fibres réceptrices choisies. *70*
Figure 31 : Spectres de Réflectance Diffuse à chaque distance inter-fibres (271 µm, bleu ; 536 µm, rose ; 834 µm, vert ; 1076 µm, orange ; 1341 µm, rouge) pour chaque épaisseur de couche mimant un mélanome : a) 2 mm, b) 3 mm, c) 4 mm, d) 5 mm et e) 6 mm. *71*
Figure 32 : Spectres de Réflectance Diffuse pour chaque épaisseur de couche mimant un mélanome (2 mm, bleu ; 3 mm, rose ; 4 mm, vert ; 5 mm, jaune et 6 mm, rouge) à chaque distance inter-fibres : a) 271 µm, b) 536 µm, c) 834 µm, d) 1076 µm, e) 1341 µm. *72*
Figure 33 : Valeur p du test de Student pour la discrimination de deux couches mélaniques dont les épaisseurs varient entre elles d'1 mm (2 mm vs. 3 mm, bleu ; 3 mm vs. 4 mm, rose ; 4 mm vs. 5 mm, vert ; 5 vs. 6 mm, orange) à chaque distance inter-fibres : a) 271 µm, b) 536 µm, c) 834 µm, d) 1076 µm, e) 1341 µm. *73*
Figure 34 : Intensité du signal de réflectance diffuse à 700 nm en fonction de la distance inter-fibres pour chaque épaisseur de couche mélanique *74*
Figure 35 : Régression linéaire de la décroissance de l'intensité du signal de reflectance diffuse à 700 nm en fonction de la distance inter-fibres : bleu, 2 mm ; rose, 3 mm ; vert, 4 mm ; orange, 5 mm et jaune, 6mm. *76*
Figure 36 : Valeur de pente de la décroissance de l'intensité du signal de reflectance diffuse à 700 nm en fonction de la distance inter-fibres pour chaque épaisseur de couche mélanique *77*
Figure 37 : Indices de Breslow des mélanomes pris en charge au Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Nancy en 2004. Données généreusement fournies par Dr. Florence Granel-Brocard (Dermatologue) et Mme Charlotte Carnin (Attachée de recherche clinique). *78*
Figure 38 : Intensité de réflectance diffuse à 700 nm en fonction de la distance entre fibre excitatrice et fibres récéptrices a) pour les fines couches testées (1-3,5 mm) et b) pour les couches les plus épaisses (4-6 mm) *78*
Figure 39 : Photographies de carcinomes épidermoïdes. a) Iconographie disponible sur le site web du South Coast medical Center. b) Iconographie disponible sur le site web du National Institute of Cancer. *83*
Figure 40 : a) Photographie de l'appareil d'irradiation ultraviolette (Research Irradiation Unit, Daavlin, Belgique), b) Spectre d'émission des tubes du Research Irradiation Unit utilisé pour l'irradiation des souris... *93*
Figure 41 : Schéma de l'instrumentation utilisée pour les mesures en spectroscopie bimodale. *95*
Figure 42 : Longueurs d'onde d'excitation et bandes d'illumination respectivement utilisées pour la spectroscopie d'autofluorescence et de réflectance diffuse *96*
Figure 43 : Schéma du cache troué réalisé en plastique translucide et utilisé pour repérer les sites antomiques de mesures spectroscopiques. *98*
Figure 44 : Photographie d'une souris anesthésiée installée sur la couverture chauffante et portant sur le dos le cache troué fixé à l'aide de sparadrap. *98*
Figure 45 : Schéma indiquant les tatouages (points noirs) utiliser pour repérer les lignes de mesures spectroscopiques sur les souris devant être sacrifiées. *100*
Figure 46 : Photo du site de mesure spectroscopique présentant la sonde optique fixée sur la platine motorisée pour contrôle d'angle et de pression de la sonde sur la peau des souris. *101*
Figure 47 : a) Mise en place de l'animal après sacrifice, pour prélèvement cutané. Les pattes sont maintenues collées à la paillasse grâce à du sparadrap ; b) Repères centimétriques marqués sur la peau de la souris (peau du ventre en l'occurrence) ; c) Lambeau de peau prélevé posé sur un support en polystyrène et maintenu dessus grâce à des aiguilles de couturière. *102*
Figure 48 : Processus de traitement de la peau murine prélévée jusqu'à la confection des lames histologiques. *103*
Figure 49 : Repérage du cache troué par tatouage (points rouges) et sites anatomiques de mesures spectroscopiques (ronds verts) sur le dos des souris *104*
Figure 50 : Moyenne (n=160) des épaisseurs d'épiderme mesurées pour chaque site anatomique de mesure spectroscopique. Les barres d'erreur indiquent l'écart-type. *107*
Figure 51 : Photos représentatives de coupe transversale de 5 µm d'épaisseur de peau de souris marquée à l'Hématoxyline et à l'Éosine (H&E) illustrant les différentes épaisseurs d'épiderme rencontrées pour un même

individu sain en fonction du site anatomique considéré et en fonction de la classe histologique pour un même site anatomique..... 108
Figure 52 : Photos représentatives de peau de souris irradiée aux ultraviolets pendant 1 mois (a) et 6 mois (b,c,d). Les coupes a, b, c) sont marquées avec Hématoxyline et Eosine ; la coupe d) est marqué avec un marquage Weigert spécifique des fibres élastiques. a) hyperplasie compensatoire : épiderme épaissi (i.e. dont l'épaisseur est supérieure au seuil sain correspondant) présentant une hyperkératose (flèche blanche). Cependant, les cellules sont encore organisées en couches, la kératine mature normalement (présence de la couche granuleuse : G et orthokératose) et la chromatine présente un aspect normal : confiné dans le noyau. b) Epiderme dysplasique : parakératose (flèche blanche), couches cellulaires non apparentes, chromatine hétérogène à l'intérieur des noyaux. c) épiderme dysplasique présentant une dyskératose (cercle noir). d) élastose : la flèche noire indique les fibres élastiques cassées et épaissies ; le cercle noir entoure un mastocyte, signe d'une inflammation. Les barres d'échelle correspondent à 10 µm pour les photos a,b,c) et à 50 µm pour d). 111
Figure 53 : Schéma d'une matrice « excitation-émission » utilisée pour représenter les données collectées en spectroscopie d'autofluorescence multi-excitation. 113
Figure 54 : Les quatre types de caractéristiques spectrales extraites pour l'analyse statistiques : a) Surface sous la courbe, b) Rapport de surfaces, c) Rapport d'intensités et d) Pente..... 114
Figure 55 : Matrices Excitation-Emission (EEMs) moyennes obtenues par spectroscopie d'autofluorescence multi-excitation (AF multi-excitation) pour chaque classe histologique : a) sain, b) hyperplasie compensatoire, c) hyperplasie atypique et d) dysplasie. Les modifications notables des spectres sont indiquées en a) : 1 et 2 correspondant respectivement aux excitation/émission des flavines et kératine ainsi que des porphyrines..... 117
Figure 56 : Spectres moyens obtenus pour chaque classe histologique (sain, hyperplasie compensatoire, hyperplasie atypique et dysplasie) en a) autofluorescence pour une excitation à 410 nm et b) en réflectance diffuse. a) 410 nm correspond au pic d'excitation des flavines et de la kératine dont l'émission apparaît à 510 nm et des porphyrines dont le double pic d'émission apparaît vers 633 et 672 nm. b) les chutes d'intensité observées sur les spectres de réflectance diffuse sont caractéristiques des pics d'absorption de l'hémoglobine (420, 542 et 577 nm) 118
Figure 57 : Diagramme ROC (Receiver Operating Characteristic) permettant de déterminer le couple (Se, Sp) optimal obtenu pour la classification des spectres de la modalité étudiée (ici Autofluorescence seule : AF ou réflectance diffuse seule : RD ou bimodalité : AF+RD) dans l'une des classes histologiques..... 119
Figure 58 : Sensibilité (a) et spécificité (b) obtenues dans le cas de l'autofluorescence en mono- et multi-excitation..... 121
Figure 59 : Sensibilité (SE) et spécificité (SP) obtenues par la spectroscopie de réflectance diffuse lors de la discrimination de chacune des 6 paires de classes histologiques..... 122
Figure 60 : Sensibilité (a) et spécificité (b) moyennes obtenues dans le cas de l'autofluorescence en mutli-excitation (AF multi-excitation, histogramme blanc), de la réflectance diffuse (gris) et de la bimodalité (AF multi-excitation +RD rayé)..... 123

Liste des Tableaux

Tableau I : Evolution de l'incidence du mélanome cutané et de la mortalité par mélanome en France, dans les deux sexes. Nombre de cas pour 100 000 habitants par an[6]*.* *27*
Tableau II : Phototypes de peau définis par Fitzpatrick. DEM : Dose Erythémateuse Minimale. Adapté de Astner et al., 2003[8] *28*
Tableau III : Rappels de terminologie *29*
Tableau IV : Nomenclature clinique de classification des lésions cancéreuses..... *35*
Tableau V : Indices de réfraction de matériaux biologiques *38*
Tableau VI : Principaux avantages et inconvénients de l'utilisation clinique de la fluorescence exogène et endogène *45*
Tableau VII : Définition des caractéristiques d'un test de dépistage *48*
Tableau VIII : Marges de résection recommandées autour du mélanome en fonction de l'indice de Breslow[33] .. *55*
Tableau IX : Survie globale à dix ans en fonction de l'indice de Breslow. Données sur la période 1977-1995 publiées en 1996 par le South Cancer Registry (Adelaide, Australie)[34] *56*
Tableau X : Score attribué à chaque critère utilisé en dermoscopie pour l'élaboration d'algorithme de diagnostic..... *58*
Tableau XI : Performances diagnostiques (SE : sensibilité et SP : spécificité) obtenues par la dermoscopie pour différents algorithmes visant à discriminer lésions cutanées pigmentées bénignes et mélanomes malins cutanés58
Tableau XII : Performances diagnostiques obtenues par l'imagerie couleur (SE : sensibilité et SP : spécificité)60
Tableau XIII : Performances diagnostiques des lésions pigmentées par les méthodes optiques référencées par Marchesini et al.[53] *(SE : sensibilité et SP : spécificité)*..... *60*
Tableau XIV : Coefficients optiques des différentes couches de la peau humaine à 520 nm d'après Zeng et al [65] *64*
Tableau XV : Taux d'eumélanine et de phéomélanine contenues dans la peau de différents phototypes et dans des mélanomes *65*
Tableau XVI : Valeur maximale (parmi les cinq valeurs obtenues) du p du test de Student pour chaque distance inter-fibres..... *74*
Tableau XVII : Coefficient de régression linéaire de la décroissance du signal de réflectance diffuse à 700 nm en fonction de la distance entre fibre inter-fibres pour chaque épaisseur de mélanome (Indice de Breslow) testée *76*
Tableau XVIII : Valeurs de p du test de Student fait pour discriminer des épaisseurs de couches mélaniques variant d'1 mm..... *77*
Tableau XIX : Valeurs de pente et de coefficient de régression linéaire obtenues en simulation numérique pour chaque indice de Breslow testé *79*
Tableau XX : Etudes ayant utilisé la photocarcinogenèse de peau de souris SKH1 et précisant les doses administrées, leur fréquence et leur durée, les effets biologiques observés et le matériel utilisé *87*
Tableau XXI : Caractéristiques et performances des différentes méthodes diagnostiques recensées par Mogensen et al. [96] *utilisées pour le diagnostic des carcinomes épidermoïdes* *89*
Tableau XXII : Caractéristiques des sept longueurs d'onde d'excitation utilisées pour la spectroscopie d'autofluorescence. *96*
Tableau XXIII : Caractéristiques des trois bandes d'illumination utilisées pour la spectroscopie de réflectance diffuse..... *96*
Tableau XXIV : Protocole d'irradiation et résultats obtenus avec notre expérimentation...... *106*
Tableau XXV : Seuil d'épaisseur de l'épiderme des souris SKH1 du groupe contrôle (non irradiées) pour distinguer épiderme "normal" d'un épiderme hyperplasique. Ces valeurs seuil sont définies par : moyenne + 2 x écart-type (ET) Les moyennes ont été calculées sur 8 souris saines, pour 2 échantillons par souris et pour 10 mesures par échantillons soit n= 160. ..... *108*
Tableau XXVI : Critères morphologiques utilisés pour classer les échantillons de peau dans les trois types d'hyperplasie définis: compensatoire (CH), atypique (AH) et dysplasique (D). ⊕: caractéristique qui doit être présente pour classer l'échantillon dans la classe correspondante, ⊗: caractéristique qui peut se retrouver également dans un échantillon de cette classe histologique. Les souris non irradiées étaient considérées comme saines (H) et les caractéristiques histologiques de leur peau étaient utilisées comme contrôles négatifs. Les caractéristiques histologiques et cytologiques retrouvées dans les CE ou les carcinomes intra-épithéliaux (maladie de Bowen) étaient utilisées comme contrôles positifs. *110*
Tableau XXVII : caractéristiques spectrales (19 pour l'autofluorescence et 4 pour la réflectance diffuse) utilisées pour la classification des spectres. L'énergie totale correspond à l'intégration de toutes les intensités spectrales sur la bande spectrale $[\lambda_i - \lambda_j]$*. Le rapport de surfaces est le rapport entre la somme des intensités sur la bande spectrale* $[\lambda_i - \lambda_j]$ *et la somme des intensités sur la bande spectrale* $[\lambda_k - \lambda_l]$*. Le rapport d'intensité*

correspond au rapport entre les pics d'intensité observés à λ_m et à λ_n. La pente correspond à la pente entre les pics d'intensité à λ_p et λ_q..... 114
Tableau XXVIII : Nombre de composantes principales (CPs) et de voisins les plus proches (k) testés pour chaque modalité de spectroscopie: autofluorescence (AF) en mono-excitation, autofluorescence (AF) en multi-excitation, Réflectance Diffuse (RD) et bimodalité (RD + AF en multi-escitation)..... 116

Liste des abréviations

AF	AutoFluorescence
AFA	Acide Formolé Acétique
B	Basale
CB	Couche Basale
CE	Carcinome Epidermoïde
CS	Couche Spineuse
D	Dysplasie
DMBA	DiMethylBenz(a)Anthracene
G	Granuleuse
g	Coefficient d'anisotropie
HA	Hyperplasie Atypique
H&E	Hématoxyline et Eosine
HC	Hyperplasie Compensatoire
IR	InfraRouge
KIN	*Keratinocyte Intraepidermal Neoplasia*
OCT	*Optical Coherent Tomography*
pTNM	*pathology Tumor Node Metastasis*
R	Résidu tumoral
RD	Réflectance Diffuse
S	Sain
SC	*Stratum Corneum*
SE	Sensibilité
SMA	*SubMiniature version A*
SP	Spécificité
TNM	Tumeur *Node* Métastases
TPA	TetradecanoylPhorbol-13-Acetate
u.a.	Unité Arbitraire
UV	UltraViolet
VHM	Virus Hématique Murin
VPN	Valeur prédictive négative
VPP	Valeur prédictive positive
λ	Longueur d'onde
λ_{exc}	Longueur d'onde d'excitation
λ_{em}	Longueur d'onde d'émission

Références bibliographiques

1. D. J. Tobin, "Biochemistry of human skin--our brain on the outside," Chem Soc Rev **35,** 52-67 (2006).
2. R. K. Freinkel, and D. T. Woodley, "Structures and functions of epidermis and dermis," in *The biology of the skin*, The Parthenon Publishing Group, ed. (Londres, 2001), pp. 8-24.
3. G. Li, K. Satyamoorthy, and M. Herlyn, "Dynamics of cell interactions and communications during melanoma development," Crit Rev Oral Biol Med **13,** 62-70 (2002).
4. C. Dezutter-Dambuyant, S. Peyrol, and E. Roux, "Ultrastructure de la matrice extracellulaire dermique," in *Actualités en biologie cutanée*, ESKA, ed. (Paris, 2007), pp. 41-45.
5. E. LeBoit, G. Burg, D. Weedon, and A. Sarasin, "Introduction," in *Pathology and Genetics of Skin Tumours*, IARC Press, ed. (Lyon, 2006), pp. 5-10.
6. B. Guillot, and F. Grange, "Epidémiologie des cancers cutanés en France," in *Dépistage et cancers cutanés*, Springer, ed. (Paris, 2008), pp. 9-20.
7. L. Remontet, J. Esteve, A. Bouvier, P. Grosclaude, and G. Launoy, "Cancer incidence and mortality in France over the period 1978-2000.," Rev Epidemiol Sante Publique **51,** 3-30 (2003).
8. S. Astner, and R. R. Anderson, "Skin phototypes 2003," J Invest Dermatol **122,** xxx-xxxi (2004).
9. F. Afaq, V. M. Adhami, and H. Mukhtar, "Photochemoprevention of ultraviolet B signaling and photocarcinogenesis," Mutat Res **571,** 153-173 (2005).
10. V. Molho-Pessach, and M. Lotem, "Ultraviolet radiation and cutaneous carcinogenesis," Curr Probl Dermatol **35,** 14-27 (2007).
11. C. Dezutter-Dambuyant, S. Franck, and B. Coulomb, "Interaction infrarouges et ultraviolets : rôle clef de la mitochondrie," in *Actualités en biologie cutanée*, ESKA, ed. (Paris, 2007), pp. 97-101.
12. S. Menezes, B. Coulomb, C. Lebreton, and L. Dubertret, "Non-coherent near infrared radiation protects normal human dermal fibroblasts from solar ultraviolet toxicity," J Invest Dermatol **111,** 629-633 (1998).
13. M. R. Hussein, "Melanocytic dysplastic naevi occupy the middle ground between benign melanocytic naevi and cutaneous malignant melanomas: emerging clues," J Clin Pathol **58,** 453-456 (2005).
14. E. L. Franco, T. E. Rohan, and R. M. Santella, "Mechanisms and biological markers of carcinogenesis," in *Cancer precursors. Epidemiology, detection, and, prevention*, Springer-Verlag, ed. (New York, 2002), pp. 7-19.
15. R. Lacave, C.-J. Larsen, and J. Robert, "Histoire naturelle des cancers. Biologie des lésions précancéreuses.," in *Cancérologie fondamentale*, John Libbey Eurotext, ed. (Montrouge, 2005), pp. 165-172.
16. B. Hoerni, "Introduction," in *Dictionnaire des Cancers*, Frison-Roche, ed. (Paris, 2006), pp. 3-5.
17. G. Rassner, "Le patient en dermatologie," in *Dermatologie manuel et atlas*, Maloine, ed. (Paris, 2006), pp. 11-18.
18. H. Tehrani, J. Walls, S. Cotton, E. Sassoon, and P. Hall, "Spectrophotometric intracutaneous analysis in the diagnosis of basal cell carcinoma: a pilot study," Int J Dermatol **46,** 371-375 (2007).
19. A. Vogel, and V. Venugopalan, "Mechanisms of pulsed laser ablation of biological tissues," Chem Rev **103,** 577-644 (2003).

20. L. T. Perelman, and V. Backman, "Light scattering spectroscopy of epithelial tissues: principles and applications," in *Handbook of optical biomedical diagnostics*, V.V. Tuchin, ed. (Bellingham, 2002), pp. 675-724.
21. V. Backman, M. B. Wallace, L. T. Perelman, J. T. Arendt, R. Gurjar, M. G. Muller, Q. Zhang, G. Zonios, E. Kline, J. A. McGilligan, S. Shapshay, T. Valdez, K. Badizadegan, J. M. Crawford, M. Fitzmaurice, S. Kabani, H. S. Levin, M. Seiler, R. R. Dasari, I. Itzkan, J. Van Dam, and M. S. Feld, "Detection of preinvasive cancer cells," Nature **406,** 35-36 (2000).
22. K. Sokolov, M. Follen, and R. Richards-Kortum, "Optical spectroscopy for detection of neoplasia," Curr Opin Chem Biol **6,** 651-658 (2002).
23. A. Mayevsky, and G. G. Rogatsky, "Mitochondrial function in vivo evaluated by NADH fluorescence: from animal models to human studies," Am J Physiol Cell Physiol **292,** C615-640 (2007).
24. P. Kosterin, G. H. Kim, M. Muschol, A. L. Obaid, and B. M. Salzberg, "Changes in FAD and NADH fluorescence in neurosecretory terminals are triggered by calcium entry and by ADP production," J Membr Biol **208,** 113-124 (2005).
25. S. Villette, S. Pigaglio-Deshayes, C. Vever-Bizet, P. Validire, and G. Bourg-Heckly, "Ultraviolet-induced autofluorescence characterization of normal and tumoral esophageal epithelium cells with quantitation of NAD(P)H," Photochem Photobiol Sci **5,** 483-492 (2006).
26. E. LeBoit, G. Burg, D. Weedon, and A. Sarasin, "Melanocytic tumours," in *Pathology and genetics of skin tumours*, IARC Press, ed. (Lyon, 2006).
27. Collège Des Enseignants En Dermatologie De France, "Tumeurs cutanées épithéliales et mélaniques : mélanomes," in *Dermatologie*, Masson, ed. (Paris, 2005), pp. 203-212.
28. P. A. Riley, "Melanogenesis and melanoma," Pigment Cell Res **16,** 548-552 (2003).
29. A. Hennessy, C. Oh, B. Diffey, K. Wakamatsu, S. Ito, and J. Rees, "Eumelanin and pheomelanin concentrations in human epidermis before and after UVB irradiation," Pigment Cell Res **18,** 220-223 (2005).
30. C. M. Balch, T. M. Murad, S. J. Soong, A. L. Ingalls, N. B. Halpern, and W. A. Maddox, "A multifactorial analysis of melanoma: prognostic histopathological features comparing Clark's and Breslow's staging methods," Ann Surg **188,** 732-742 (1978).
31. A. Breslow, "Thickness cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma," Ann Surg**,** 172-902 (1970).
32. W. Liu, J. P. Dowling, W. K. Murray, G. A. McArthur, J. F. Thompson, R. Wolfe, and J. W. Kelly, "Rate of growth in melanomas: characteristics and associations of rapidly growing melanomas," Arch Dermatol **142,** 1551-1558 (2006).
33. A. Girod, R. Salmon, and J. Rodriguez, "[Cutaneous melanoma and sentinel lymph node biopsy: where are we today?]," Bull Cancer **94,** 687-691 (2007).
34. National health and medical reserch council, and T. Reeve, "Clinical practice guidelines, the management of cutaneous melanoma," (Adelaide, Australie, 1999), p. 38.
35. A. A. Marghoob, R. P. Braun, A. W. Kopf, J. Malvehy, and S. Puig, "Prédiction de l'indice de Breslow par la dermoscopie," in *Précis illustré de dermoscopie*, Groupe Liaisons, ed. (Rueil-Malmaison, 2007), pp. 257-270.
36. S. M. Strayer, and P. L. Reynolds, "Diagnosing skin malignancy: assessment of predictive clinical criteria and risk factors," J Fam Pract **52,** 210-218 (2003).
37. S. Girardi, C. Gauchy, J. Gouvernet, J. Teston, M. A. Richard, and J. J. Grob, "Superiority of a cognitive education with photographs over ABCD criteria in the education of the general population to the early detection of melanoma: a randomized study.," Int J Cancer **118,** 2276-2280 (2006).
38. R. Johr, H. P. Soyer, G. Argenziano, R. Hofmann-Wellenhof, and M. Scalvenzi, "Introduction," in *La dermoscopie*, Med'Com, ed. (Paris, 2006), pp. 3-12.

39. W. Stolz, A. Riemann, A. B. Cognetta, and L. Pillet, "ABCD rule of dermatoscopy: a new practical method for early recognition of malignant melanoma," Eur J Dermatol **4,** 864-865 (1994).
40. M. Binder, H. Kittler, A. Seeber, A. Steiner, H. Pehamberger, and K. Wolff, "Epiluminescence microscopy-based classification of pigmented skin lesions using computerized image analysis and an artificial neural network," Melanoma Res **8,** 261-266 (1998).
41. M. Binder, H. Kittler, S. Dreiseitl, H. Ganster, K. Wolff, and H. Pehamberger, "Computer-aided epiluminescence microscopy of pigmented skin lesions: the value of clinical data for the classification process," Melanoma Res **10,** 556-561 (2000).
42. M. Elbaum, A. W. Kopf, H. S. Rabinovitz, R. G. Langley, H. Kamino, M. C. Mihm, Jr., A. J. Sober, G. L. Peck, A. Bogdan, D. Gutkowicz-Krusin, M. Greenebaum, S. Keem, M. Oliviero, and S. Wang, "Automatic differentiation of melanoma from melanocytic nevi with multispectral digital dermoscopy: a feasibility study," J Am Acad Dermatol **44,** 207-218 (2001).
43. L. Andreassi, R. Perotti, P. Rubegni, M. Burroni, G. Cevenini, M. Biagioli, P. Taddeucci, G. Dell'Eva, and P. Barbini, "Digital dermoscopy analysis for the differentiation of atypical nevi and early melanoma: a new quantitative semiology," Arch Dermatol **135,** 1459-1465 (1999).
44. S. Seidenari, G. Pellacani, and A. Giannetti, "Digital videomicroscopy and image analysis with automatic classification for detection of thin melanomas," Melanoma Res **9,** 163-171 (1999).
45. G. Argenziano, G. Fabbrocini, P. Carli, V. De Giorgi, and M. Delfino, "Clinical and dermatoscopic criteria for the preoperative evaluation of cutaneous melanoma thickness," J Am Acad Dermatol **40,** 61-68 (1999).
46. P. Carli, V. de Giorgi, D. Palli, V. Giannotti, and B. Giannotti, "Preoperative assessment of melanoma thickness by ABCD score of dermatoscopy," J Am Acad Dermatol **43,** 459-466 (2000).
47. G. Pellacani, and S. Seidenari, "Preoperative melanoma thickness determination by 20-MHz sonography and digital videomicroscopy in combination," Arch Dermatol **139,** 293-298 (2003).
48. R. Marchesini, N. Cascinelli, M. Brambilla, C. Clemente, L. Mascheroni, E. Pignoli, A. Testori, and D. R. Venturoli, "In vivo spectrophotometric evaluation of neoplastic and non-neoplastic skin pigmented lesions. II: Discriminant analysis between nevus and melanoma," Photochem Photobiol **55,** 515-522 (1992).
49. A. Green, N. Martin, G. McKenzie, J. Pfitzner, F. Quintarelli, B. W. Thomas, M. O'Rourke, and N. Knight, "Computer image analysis of pigmented skin lesions," Melanoma Res **1,** 231-236 (1991).
50. N. Cascinelli, M. Ferrario, R. Bufalino, S. Zurrida, V. Galimberti, L. Mascheroni, C. Bartoli, and C. Clemente, "Results obtained by using a computerized image analysis system designed as an aid to diagnosis of cutaneous melanoma," Melanoma Res **2,** 163-170 (1992).
51. A. Green, N. Martin, J. Pfitzner, M. O'Rourke, and N. Knight, "Computer image analysis in the diagnosis of melanoma," J Am Acad Dermatol **31,** 958-964 (1994).
52. B. W. Chwirot, S. Chwirot, J. Redzinski, and Z. Michniewicz, "Detection of melanomas by digital imaging of spectrally resolved ultraviolet light-induced autofluorescence of human skin," Eur J Cancer **34,** 1730-1734 (1998).
53. R. Marchesini, A. Bono, C. Bartoli, M. Lualdi, S. Tomatis, and N. Cascinelli, "Optical imaging and automated melanoma detection: questions and answers," Melanoma Res **12,** 279-286 (2002).

54. V. P. Wallace, D. C. Crawford, P. S. Mortimer, R. J. Ott, and J. C. Bamber, "Spectrophotometric assessment of pigmented skin lesions: methods and feature selection for evaluation of diagnostic performance," Phys Med Biol **45,** 735-751 (2000).
55. S. Tomatis, C. Bartoli, A. Bono, N. Cascinelli, C. Clemente, and R. Marchesini, "Spectrophotometric imaging of cutaneous pigmented lesions: discriminant analysis, optical properties and histological characteristics," J Photochem Photobiol B **42,** 32-39 (1998).
56. B. Farina, C. Bartoli, A. Bono, A. Colombo, M. Lualdi, G. Tragni, and R. Marchesini, "Multispectral imaging approach in the diagnosis of cutaneous melanoma: potentiality and limits," Phys Med Biol **45,** 1243-1254 (2000).
57. T. Gambichler, P. Regeniter, F. G. Bechara, A. Orlikov, R. Vasa, G. Moussa, M. Stucker, P. Altmeyer, and K. Hoffmann, "Characterization of benign and malignant melanocytic skin lesions using optical coherence tomography in vivo," J Am Acad Dermatol **57,** 629-637 (2007).
58. U. Utzinger, and R. R. Richards-Kortum, "Fiber optic probes for biomedical optical spectroscopy," J Biomed Opt **8,** 121-147 (2003).
59. R. Drezek, A. Kamath, C. MacAulay, and R. Richards-Kortum, "Light scattering from normal and neoplastic cells: FDTD modeling based on quantitative cytology," in *Proc. OSA Biomed. Topical Mtg., Technical Digest*, (2000), pp. 326-328.
60. I. V. Meglinski, and S. J. Matcher, "Modeling of skin reflectance spectra," in *Saratov Fall Meeting: Optical technologies in Biophysics and Medicine II*, V. V. Tuchin, ed. (SPIE, 2001), pp. 78-87.
61. Q. Liu, and N. Ramanujam, "Sequential estimation of optical properties of a two-layered epithelial tissue model from depth-resolved ultraviolet-visible diffuse reflectance spectra," Appl Opt **45,** 4776-4790 (2006).
62. E. C. De Fabo, F. P. Noonan, T. Fears, and G. Merlino, "Ultraviolet B but not ultraviolet A radiation initiates melanoma," Cancer Res **64,** 6372-6376 (2004).
63. G. Egidy, S. Jule, P. Bosse, F. Bernex, C. Geffrotin, S. Vincent-Naulleau, V. Horak, X. Sastre-Garau, and J. J. Panthier, "Transcription analysis in the MeLiM swine model identifies RACK1 as a potential marker of malignancy for human melanocytic proliferation," Mol Cancer **7,** 34 (2008).
64. E. C. De Fabo, "Initial studies on an in vivo action spectrum for melanoma induction," Prog Biophys Mol Biol **92,** 97-104 (2006).
65. H. Zeng, C. MacAulay, D. I. McLean, and B. Palcic, "Reconstruction of in vivo skin autofluorescence spectrum from microscopic properties by Monte Carlo simulation," J Photochem Photobiol B **38,** 234-240 (1997).
66. O. O. Soyemi, M. R. Landry, Y. Yang, P. O. Idwasi, and B. R. Soller, "Skin color correction for tissue spectroscopy: demonstration of a novel approach with tissue-mimicking phantoms," Appl Spectrosc **59,** 237-244 (2005).
67. J. A. Viator, B. Choi, G. M. Peavy, S. Kimel, and J. S. Nelson, "Spectra from 2.5-15 microm of tissue phantom materials, optical clearing agents and ex vivo human skin: implications for depth profiling of human skin," Phys Med Biol **48,** N15-24 (2003).
68. M. Shimada, J. Hata, Y. Yamada, M. Itoh, A. Uchida, and T. Yatagai, "Experimental and numerical study of the colour appearance of tattoo models," Med Biol Eng Comput **40,** 218-224 (2002).
69. M. Bartlett, and H. Jiang, "Measurement of particle size distribution in multilayered skin phantoms using polarized light spectroscopy," Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys **65,** 031906 (2002).
70. R. J. Hunter, M. S. Patterson, T. J. Farrell, and J. E. Hayward, "Haemoglobin oxygenation of a two-layer tissue-simulating phantom from time-resolved reflectance: effect of top layer thickness," Phys Med Biol **47,** 193-208 (2002).

71. A. Amelink, M. P. Bard, S. A. Burgers, and H. J. Sterenborg, "Single-scattering spectroscopy for the endoscopic analysis of particle size in superficial layers of turbid media," Appl Opt **42,** 4095-4101 (2003).
72. C. R. Simpson, M. Kohl, M. Essenpreis, and M. Cope, "Near-infrared optical properties of ex vivo human skin and subcutaneous tissues measured using the Monte Carlo inversion technique," Phys Med Biol **43,** 2465-2478 (1998).
73. S. Willmann, A. Terenji, J. Osterholz, J. Meister, P. Hering, and H. J. Schwarzmaier, "Small-volume frequency-domain oximetry: phantom experiments and first in vivo results," J Biomed Opt **8,** 618-628 (2003).
74. Q. Liu, C. Zhu, and N. Ramanujam, "Experimental validation of Monte Carlo modeling of fluorescence in tissues in the UV-visible spectrum," J Biomed Opt **8,** 223-236 (2003).
75. M. Shimada, Y. Yamada, M. Itoh, and T. Yatagai, "Melanin and blood concentration in human skin studied by multiple regression analysis: experiments," Phys Med Biol **46,** 2385-2395 (2001).
76. S. Ito, and K. Wakamatsu, "Quantitative analysis of eumelanin and pheomelanin in humans, mice, and other animals: a comparative review," Pigment Cell Res **16,** 523-531 (2003).
77. T. Tadokoro, N. Kobayashi, B. Z. Zmudzka, S. Ito, K. Wakamatsu, Y. Yamaguchi, K. S. Korossy, S. A. Miller, J. Z. Beer, and V. J. Hearing, "UV-induced DNA damage and melanin content in human skin differing in racial/ethnic origin," FASEB J **17,** 1177-1179 (2003).
78. T. Morishima, and E. Fukada, "Quantitative analysis of eumelanin and pheomelanin in human malignant-melanoma tissues," Arch Dermatol Res **277,** 248-250 (1985).
79. E. Péry, "Spectroscopie bimodale en diffusion élastique et autofluorescence résolue spatialement : instrumentation, modélisation des interactions lumière-tissus et application à la caractérisation de tissus biologiques ex vivo et in vivo pour la détection de cancers," in *IAEM*, (Nancy-Université INPL, Vandoeuvre-lès-Nancy, 2007).
80. S. A. Prahl, M. Keizjer, S. L. jacques, and A. J. Welch, "A Monte-Carlo method of light propagation in tissue," in *SPIE*, (SPIE, 1989), pp. 102-113.
81. L. Wang, S. L. Jacques, and L. Zheng, "Monte Carlo modeling of light transport in multi-layered tissues," Computer methods and programs in biomedicine **47,** 131-146 (1995).
82. S. L. Jacques, "Light distributions from point, line and plane sources for photochemical reactions and fluorescence in turbid biological tissues," Photochem Photobiol **67,** 23-32 (1998).
83. W. Fu, and C. J. Cockerell, "The actinic (solar) keratosis: a 21st-century perspective," Arch Dermatol **139,** 66-70 (2003).
84. E. LeBoit, G. Burg, D. Weedon, and A. Sarasin, "Keratinocytic tumours," in *Pathology and genetics of skin tumours*, IARC Press, ed. (Lyon, 2006).
85. R. Lacave, C.-J. Larsen, J. Robert, N. Basset-Séguin, and N. Soufir, "Cancers cutanés," in *Cancérologie fondamentale*, John Libbey Eurotext, ed. (Montrouge, 2005), pp. 267-275.
86. A. P. Pentland, G. Scott, J. VanBuskirk, C. Tanck, G. LaRossa, and S. Brouxhon, "Cyclooxygenase-1 deletion enhances apoptosis but does not protect against ultraviolet light-induced tumors," Cancer Res **64,** 5587-5591 (2004).
87. F. R. de Gruijl, and J. C. van der Leun, "Physical variables in experimental photocarcinogenesis and quantitative relationships between stages of tumor development," Front Biosci **7,** d1525-1530 (2002).
88. A. Chiron de la Casinière, "Introduction," in *Le rayonnement solaire dans l'environnement terrestre*, Publibook, ed. (Paris, 2003), pp. 2-12.

89. V. E. Reeve, S. Widyarini, D. Domanski, E. Chew, and K. Barnes, "Protection against photoaging in the hairless mouse by the isoflavone equol," Photochem Photobiol **81,** 1548-1553 (2005).
90. Y. Liu, G. Viau, and R. Bissonnette, "Multiple large-surface photodynamic therapy sessions with topical or systemic aminolevulinic acid and blue light in UV-exposed hairless mice," J Cutan Med Surg **8,** 131-139 (2004).
91. W. Zhang, A. N. Hanks, K. Boucher, S. R. Florell, S. M. Allen, A. Alexander, D. E. Brash, and D. Grossman, "UVB-induced apoptosis drives clonal expansion during skin tumor development," Carcinogenesis **26,** 249-257 (2005).
92. P. Juzenas, S. Sharfaei, J. Moan, and R. Bissonnette, "Protoporphyrin IX fluorescence kinetics in UV-induced tumours and normal skin of hairless mice after topical application of 5-aminolevulinic acid methyl ester," J Photochem Photobiol B **67,** 11-17 (2002).
93. T. Davidson, T. Kluz, F. Burns, T. Rossman, Q. Zhang, A. Uddin, A. Nadas, and M. Costa, "Exposure to chromium (VI) in the drinking water increases susceptibility to UV-induced skin tumors in hairless mice," Toxicol Appl Pharmacol **196,** 431-437 (2004).
94. F. J. Burns, A. N. Uddin, F. Wu, A. Nadas, and T. G. Rossman, "Arsenic-induced enhancement of ultraviolet radiation carcinogenesis in mouse skin: a dose-response study," Environ Health Perspect **112,** 599-603 (2004).
95. H. Ahsan, M. H. Aziz, and N. Ahmad, "Ultraviolet B exposure activates Stat3 signaling via phosphorylation at tyrosine705 in skin of SKH1 hairless mouse: a target for the management of skin cancer?," Biochem Biophys Res Commun **333,** 241-246 (2005).
96. M. Mogensen, and G. B. Jemec, "Diagnosis of nonmelanoma skin cancer/keratinocyte carcinoma: a review of diagnostic accuracy of nonmelanoma skin cancer diagnostic tests and technologies," Dermatol Surg **33,** 1158-1174 (2007).
97. I. Georgakoudi, B. C. Jacobson, J. Van Dam, V. Backman, M. B. Wallace, M. G. Muller, Q. Zhang, K. Badizadegan, D. Sun, G. A. Thomas, L. T. Perelman, and M. S. Feld, "Fluorescence, reflectance, and light-scattering spectroscopy for evaluating dysplasia in patients with Barrett's esophagus," Gastroenterology **120,** 1620-1629 (2001).
98. S. K. Chang, Y. N. Mirabal, E. N. Atkinson, D. Cox, A. Malpica, M. Follen, and R. Richards-Kortum, "Combined reflectance and fluorescence spectroscopy for in vivo detection of cervical pre-cancer," J Biomed Opt **10,** 024031 (2005).
99. T. M. Breslin, F. Xu, G. M. Palmer, C. Zhu, K. W. Gilchrist, and N. Ramanujam, "Autofluorescence and diffuse reflectance properties of malignant and benign breast tissues," Ann Surg Oncol **11,** 65-70 (2004).
100. L. Brancaleon, A. J. Durkin, J. H. Tu, G. Menaker, J. D. Fallon, and N. Kollias, "In vivo fluorescence spectroscopy of nonmelanoma skin cancer," Photochem Photobiol **73,** 178-183 (2001).
101. M. Panjehpour, C. E. Julius, M. N. Phan, T. Vo-Dinh, and S. Overholt, "Laser-induced fluorescence spectroscopy for in vivo diagnosis of non-melanoma skin cancers," Lasers Surg Med **31,** 367-373 (2002).
102. P. Diagaradjane, M. A. Yaseen, J. Yu, M. S. Wong, and B. Anvari, "Autofluorescence characterization for the early diagnosis of neoplastic changes in DMBA/TPA-induced mouse skin carcinogenesis," Lasers Surg Med **37,** 382-395 (2005).
103. W. J. Marshall, and S. K. Bangert, "Introduction," in *Biochimie médicale physiopathologie et diagnostic*, Elsevier, ed. (Paris, 2005), pp. 12-18.
104. Y. Wu, P. Xi, J. Y. Qu, T.-H. Cheung, and M.-Y. Yu, "Depth-resolved fluorescence spectroscopy reveals layered structure of tissue," Opt. Express **12,** 3218-3223 (2004).
105. A.-M. Pena, M. Strupler, T. Boulesteix, G. Godeau, and M.-C. Schanne-Klein, "Spectroscopic analysis of keratin endogenous signal for skin multiphoton microscopy," Opt. Express **13,** 6268-6274 (2005).

106. M. Mokry, P. Gal, M. Harakalova, Z. Hutnanova, J. Kusnir, S. Mozes, and J. Sabo, "Experimental study on predicting skin flap necrosis by fluorescence in the FAD and NADH bands during surgery," Photochem Photobiol **83,** 1193-1196 (2007).
107. J.-L. Lévy, and L. Agopian, "Evaluation biométrologique des cosmétiques anti-âge et antiride," in *Les secrets de l'anti-âge*, Groupe Liaisons, ed. (Rueil-Malmaison, 2007), pp. 44-67.
108. Y. Gauthier, "Lentigo, lentiginose," in *Troubles pigmentaires cutanés, de la clinique au traitement*, Med'Com, ed. (Paris, 2005), pp. 57-59.
109. C. Beylot, "Comment la peau vieillit," in *Vieillissement cutané : prévenir, corriger, rajeunir*, Med'Com, ed. (Paris, 2007), pp. 11-28.
110. R. Lewis Kelso, M. I. Colome-Grimmer, T. Uchida, H. Q. Wang, and R. F. Wagner, Jr., "p75(NGFR) immunostaining for the detection of perineural invasion by cutaneous squamous cell carcinoma," Dermatol Surg **32,** 177-183 (2006).

Production scientifique

Publications en journaux scientifiques internationaux à comité de lecture

- Amouroux M., Blondel W.C.P.M., Granel-Brocard F., Marchal F., Guillemin F.

A preliminary study on skin phantoms to test spatially resolved – diffuse reflectance spectroscopy as a tool to help diagnose cutaneous melanoma: a non-invasive measurement of Breslow index.
Acceptée dans : *Biomedical Materials and Engineering* (IOS Press)
Parution prévue en Octobre 2008.
Voir l'attestation d'acceptation ci-jointe.

- Amouroux M., Díaz-Ayil G., Blondel W.C.P.M., Bourg-Heckly G., Leroux A., Guillemin F.

Classification of ultra-violet irradiated mouse skin histological stages by bimodal spectroscopy (multiple excitation autofluorescence and diffuse reflectance)
Soumise le 13 mai 2008 à : *Journal of Biomedical Optics* (SPIE Press)

- Díaz-Ayil G., Amouroux M., Blondel W.C.P.M., Bourg-Heckly G., Leroux A., Guillemin F., Granjon Y.

Bimodal spectroscopic evaluation of ultra violet-irradiated mouse skin inflammatory and pre-cancerous stages: instrumentation, spectral feature extraction/selection and classification (K-NN, LDA and SVM)
Soumise le 01 Juin 2008 à : *European Physical Journal – Applied Physics*

Congrès scientifiques internationaux avec comité de lecture

- Amouroux M., Díaz-Ayil G., Péry E., Blondel W.C.P.M., Guillemin F.

Diffuse reflectance spectroscopy's sensitivity to a melanic layer thickness variations: an in vitro study on skin phantoms.
Proceedings of SPIE, vol. 6628, 66280Y, 2007.
Congrès SPIE-ECBO *Society of Photo-optical Instrumentation Engineers-European Conferences on Biomedical Optics,* Présentation orale le 21 Juin 2007 à Munich, Allemagne.

- Péry E., Amouroux M., Díaz-Ayil G., Blondel W.C.P.M., Bourg-Heckly G., D'Hallewin M.-A., Leroux A., Guillemin F.

Multi-modality Point Spectroscopy: interests, development and application to in vivo diagnosis of bladder and skin cancers
Congrès MED 08, *16th Mediterranean Conference on Control and Automation (IEEE Control Systems Society)*
Ajaccio, 25-27 Juin 2008.

- Díaz-Ayil G., Amouroux M., Blondel W.C.P.M., Bourg-Heckly G., Péry E., Granjon Y., Guillemin F., A'Amar O.

Instrumentation for in vivo bimodal spectroscopy (autofluorescence and diffuse reflectance): experimental validation and preliminary results
Congrès JIBEC 07 *Jordanian International Biomedical Engineering Conference*
Amman, Jordanie, 04-08 Novembre 2007.

Congrès scientifique national avec comité de lecture

Díaz-Ayil G., Amouroux M., Blondel W.C.P.M., Bourg-Heckly G., Péry E., Granjon Y., Guillemin F., A'Amar O.
Instrumentation pour la spectroscopie bimodale *in vivo* (autofluorescence et diffusion élastique)- Validation expérimentale et résultats préliminaires sur la peau de souris irradiées aux UV.
Colloque Interdisciplinaire en Instrumentation
Nancy, 17-19 octobre 2007

Communications affichées en colloques nationaux

- Société Française d'Optique (Paris, 2006)
- Imagerie et Diagnostic Optique en Médecine (Paris, 2007)
- 4ème colloque international en Bioingénierie et Biothérapies (Nancy, 2007)
- 3ème journée de la Recherche Médicale Claude Huriet (Nancy, 2007)

Résumé - *Abstract*

L'objectif de ce travail de recherche est d'évaluer la capacité des spectroscopies optiques d'autofluorescence et de réflectance diffuse à caractériser les différents stades de la transformation néoplasique de la peau et ainsi d'aider au diagnostic des deux lésions de peau les plus létales : le mélanome malin et le carcinome épidermoïde. Dans l'étude portant sur le mélanome, un objet-test (« fantôme ») a été développé pour modéliser différentes épaisseurs de mélanome (indice de Breslow). La spectroscopie de réflectance diffuse résolue spatialement (grâce à l'utilisation de cinq fibres optiques réceptrices situées à cinq distances différentes de la fibre optique excitatrice) a montré sa capacité à discriminer ($p<0,05$) des indices de Breslow simulés grâce à des fantômes d'épaisseur variant par pas d'1 mm. D'autre part, des mesures de spectroscopie bimodale (combinant autofluorescence en multi-excitation et réflectance diffuse) ont été réalisées sur peau murine tout au long des sept mois de photocarcinogenèse. Des prélèvements cutanés ont permis d'établir trois classes histologiques (en plus de la classe saine du groupe contrôle) : hyperplasie compensatoire, hyperplasie atypique et dysplasie. Puis la précision diagnostique a été évaluée par analyse statistique multivariée. Nos principaux résultats montrent que la bimodalité associant autofluorescence (excitation à 410 nm) et réflectance diffuse permet une amélioration de la spécificité de 9% comparées aux performances de chacune des modalités utilisée seule lors de la discrimination des trois types d'hyperplasie. Des études cliniques doivent maintenant confirmer l'intérêt de ces résultats.

Mots-clés : Spectroscopie ; cancer de la peau ; diagnostic ; photocarcinogenèse ; indice de Breslow ; autofluorescence ; réflectance diffuse ; anatomo-pathologie ; mélanome cutané malin ; carcinome épidermoïde

Spectroscopic characterisation of skin neoplastic transformation using melanoma phantoms and ultraviolet-induced squamous cell mouse carcinoma

Autofluorescence and diffuse reflectance spectroscopies were studied as non-invasive tools to discriminate different stages of skin neoplastic transformation and thus to help diagnose the two most lethal skin lesions: cutaneous melanoma and squamous cell carcinoma. Concerning melanoma, skin phantoms were made to simulate several melanoma thicknesses (Breslow index). Spatially-resolved diffuse reflectance spectroscopy (using five collection optical fibers set at five different distances from the excitation optical fiber) allowed discrimination ($p<0.05$) of melanoma layers, the thickness of which was 1 mm different. Since diffuse reflectance spectroscopy has already shown good results in assessing malignancy of pigmented skin lesions, such a spectroscopy could be used as a complementary tool of cutaneous melanoma diagnosis. Using ultra-violet induced squamous cell carcinoma of mouse skin, bimodal spectra (multi-excitation fluorescence and diffuse reflectance) were acquired throughout the 7 month-carcinogenesis. Histological sampling followed spectral acquisition and three histological classes were determined by histo-pathological examination: compensatory hyperplasia, atypical hyperplasia and dysplasia. A fourth "healthy" class consisted in the skin sampled on mice that were never irradiated (control group). Multivariate statistical analysis of the spectral data set showed that combining autofluorescence (best results obtained with a 410 nm excitation) and diffuse reflectance resulted in a 9% increase of specificity when discriminating the three types of hyperplasia from one another compared to each modality used alone. Such results need to be confirmed through clinical trials on human patients.

Key words: Spectroscopy; skin cancer; diagnosis; Breslow index; photocarcinogenesis; autofluorescence; diffuse reflectance; histo-pathology; cutaneous malignant melanoma; squamous cell carcinoma