

# LA SPECTROSCOPIE VIBRATIONNELLE EN MODE POLARISÉ

## pour imager l'orientation des fibres de collagène

Mohammed ESSENDOUBI, Cyril GOBINET, Michel MANFAIT, Olivier PIOT  
BioSpecT, Biophotonique et Technologies pour la Santé,  
UMR CNRS 7369, Université de Reims Champagne Ardenne  
[olivier.piot@univ-reims.fr](mailto:olivier.piot@univ-reims.fr)

La peau est un organe multifonctionnel dont la principale fonction est un rôle protecteur de l'organisme contre les agressions externes. Le collagène de type I est le constituant majeur du derme; au cours du vieillissement chronologique de la peau, les fibres de collagène subissent des altérations structurales entraînant des modifications morphologiques et fonctionnelles importantes [1-5]. Nous nous sommes intéressés aux changements d'orientation que pouvaient subir les fibres de collagène pendant le vieillissement chronologique de la peau.

### Imagerie infrarouge polarisée

La spectroscopie moyen-infrarouge (IR) est basée sur l'absorption non-destructive des rayonnements (longueur d'onde comprise entre 2,5 et 25  $\mu\text{m}$ ) par les constituants de l'échantillon à analyser. Cette technique permet non seulement de sonder la composition moléculaire sans utiliser de marquage exogène, mais aussi d'accéder à certaines informations structurales en conservant l'intégrité de l'échantillon. Au niveau des tissus cutanés, la microspectroscopie IR a été utilisée pour caractériser des échantillons de mélanome cutané de différents degrés d'agressivité [6] ou encore pour aider au diagnostic différentiel des

carcinomes de types basocellulaire et spinocellulaire [7].

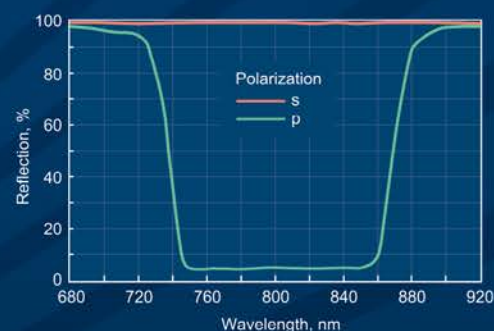
Associée à un contrôle de la polarisation des rayonnements, la microspectroscopie IR présente l'avantage de pouvoir accéder à des informations structurales sur l'orientation ou l'agencement de certaines molécules. À titre d'exemple, cette approche a été appliquée sur des polymères pour étudier la structure et la dynamique de films semi-cristallins [8]. Au niveau des biomolécules, les relations structure-propriétés de la soie produite par les glandes ampullaires majeures de l'araignée ont été étudiées en combinant l'analyse IR polarisée à l'application de contraintes mécaniques [9]. Bi *et al.* ont aussi montré l'avantage de cette technique pour différencier des

## FILM POLARISANT FIN

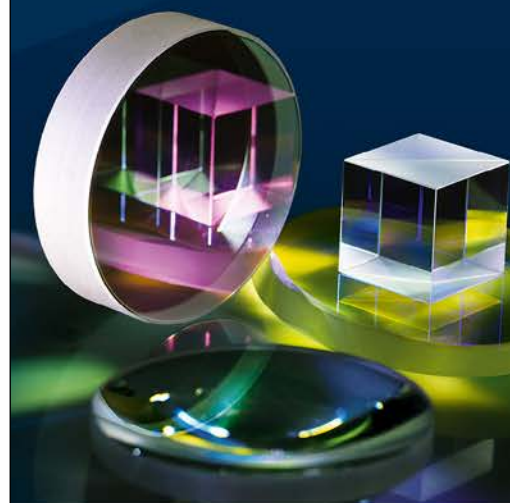
Gamme standard couvrant  
des angles d'incidence  
de 45° à 56° pour des longueurs  
d'onde de 257 à 2'000 nm

Haut ratio d'extinction,  
avec des rapports  $T_p/T_s > 1'000 : 1$

Ligne "large bande"  
dédiée aux gammes  
750 – 850 nm & 980 – 1080 nm  
avec un AOI jusqu'à 70°



[www.eksmaoptics.com](http://www.eksmaoptics.com)



Représenté en France par:

**ARDOP**  
INDUSTRIE

+33 1 69 63 26 09 | [www.ardop.com](http://www.ardop.com)

stades précoce et avancé d'ostéoarthritis par une imagerie de l'orientation du collagène de type II au sein de cartilage articulaire [10].

Dans notre étude, les données de micro-imagerie infrarouge ont été collectées au moyen d'un système Spotlight 300 (Perkin Elmer Life Sciences, France). Avec ce système commercial, nous avons la possibilité d'enregistrer des images spectrales en mode non polarisé et avec un rayonnement infrarouge incident polarisé selon un angle donné par rapport à l'axe X de la platine motorisée.

### Le collagène de type I est sensible à la polarisation du faisceau IR

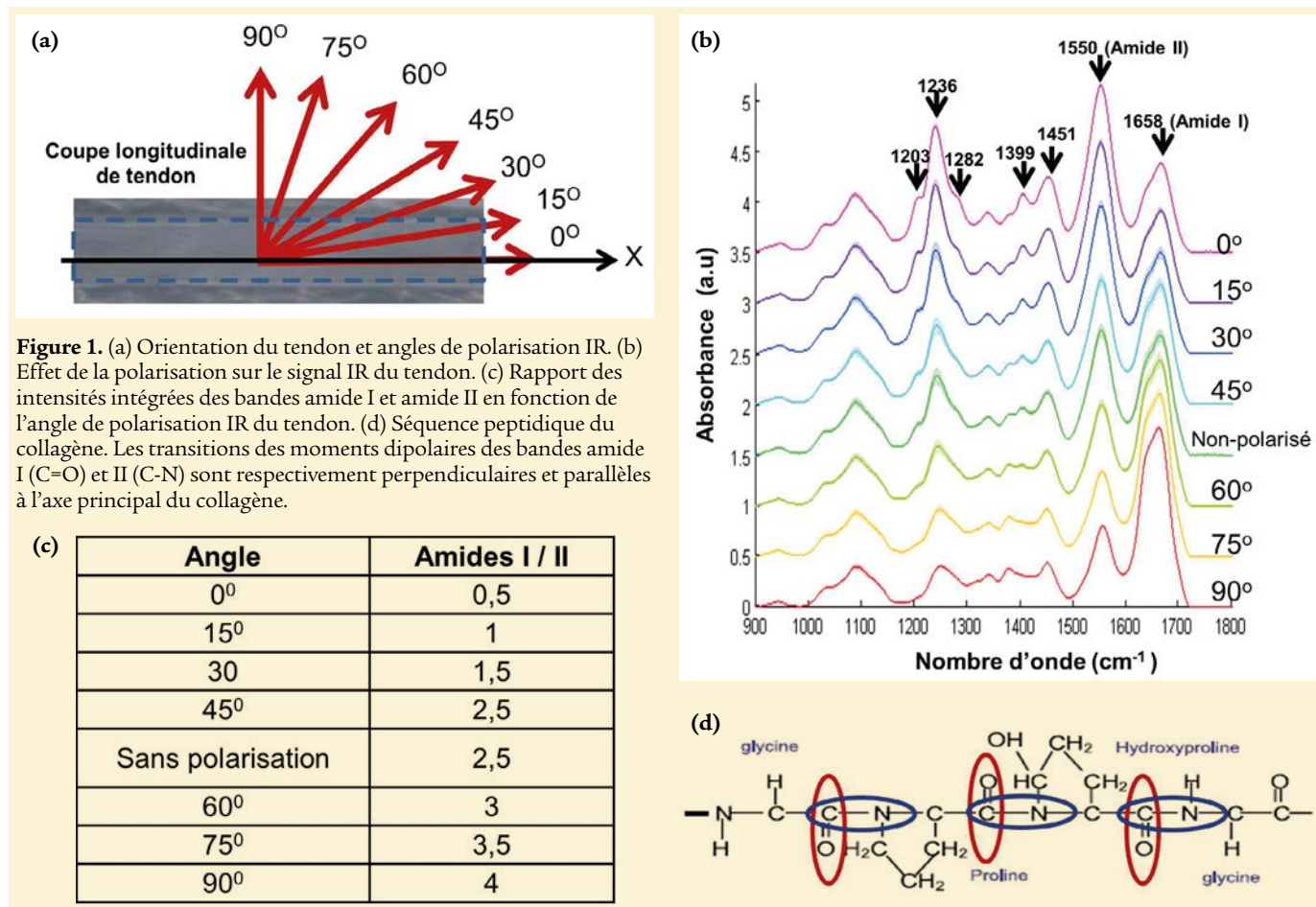
Avant d'analyser les échantillons de peau, nous avons utilisé un tendon de queue de rat en tant qu'échantillon de référence pour mesurer l'effet de la polarisation sur le signal infrarouge

du collagène de type I, principal composant du tendon.

Des sections longitudinales de tendon de 5  $\mu\text{m}$  d'épaisseur ont été déposées sur des supports de  $\text{CaF}_2$ , offrant une transmission élevée du rayonnement infrarouge. Le tendon était orienté parallèlement à l'axe X de la platine motorisée du microscope (figure 1a).

La figure 1b montre la moyenne et l'écart-type de spectres de tendon ( $n = 20$ ), sur la gamme spectrale 900–1800  $\text{cm}^{-1}$ , en mode non polarisé et pour différents angles de polarisation variant de  $0^\circ$  (parallèle à l'axe X) à  $90^\circ$  (perpendiculaire à l'axe X). Les vibrations IR caractéristiques du collagène de type I sont retrouvées au niveau des bandes amide I (1658  $\text{cm}^{-1}$ ) et amide II (1550  $\text{cm}^{-1}$ ) ainsi qu'à 1451, 1399, 1339, 1282, 1236 et 1203  $\text{cm}^{-1}$  attribuées aux vibrations de déformation et de type wagging des groupements  $\text{CH}_2$  et  $\text{CH}_3$ , et d'étirement des liaisons C-N. Selon le mode de polarisation utilisé,

il apparaît une variation marquée du rapport des intensités intégrées des bandes amide I et amide II (figure 1c). La valeur de ce rapport est maximale ( $\approx 4$ ) lorsque le rayonnement est polarisé perpendiculairement à l'orientation des fibres de collagène. Elle est minimale ( $\approx 0.5$ ) lorsque la polarisation est parallèle à l'orientation des fibres de collagène. Sans polariseur, le rapport amide I / II présente une valeur intermédiaire. Cette expérimentation montre la sensibilité des vibrations amide au regard de la polarisation de la lumière infrarouge. Ainsi, en mode polarisé, ce rapport peut être utilisé pour déterminer l'orientation des fibres de collagène de type I. La surface intégrée de la bande amide I (correspondant principalement à la vibration d'étirement de la liaison carbonyle  $\text{C}=\text{O}$  de la liaison peptidique) est maximale et celle de la bande amide II (correspondant principalement à la vibration d'étirement C-N) est minimale lorsque la polarisation du rayonnement

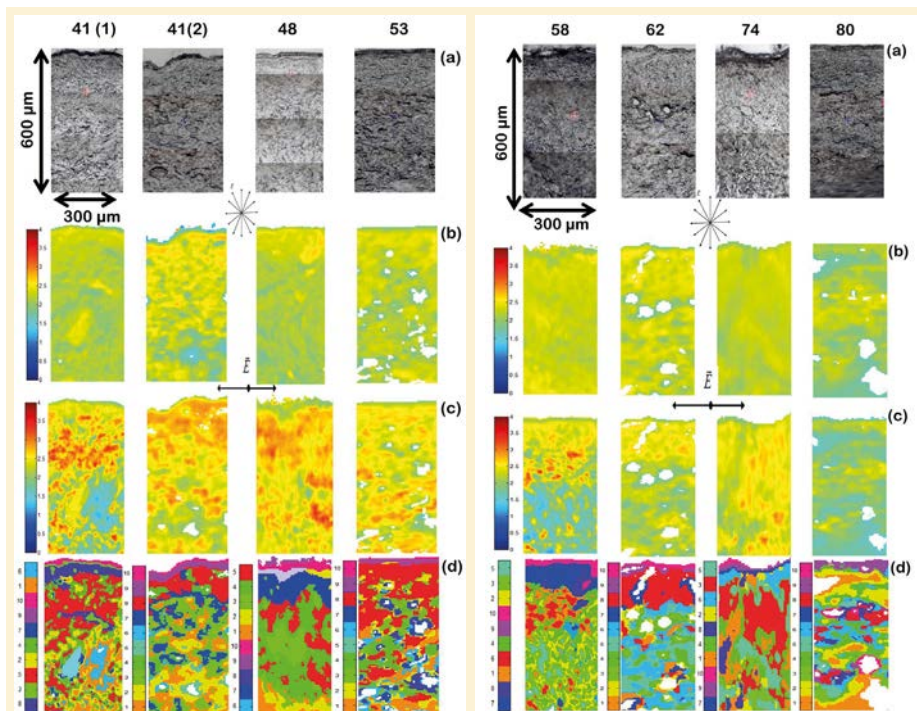


small components  
MASSIVE IMPACT



### Optical Filters

- Bandpass Filters
- Short-Pass / Long-Pass Filters
- Fluorescence Filters
- IR Filters



**Figure 2.** (a) Images visibles des échantillons de peau. (b) Images spectrales construites sur le rapport amide I / amide II sans polarisation, (c) pour la polarisation parallèle à l'axe X (i.e. à l'orientation de la surface de la peau). (d) Images pseudo-couleurs obtenues par classification hiérarchique ascendante des spectres.

infrarouge est perpendiculaire à l'axe du collagène, et inversement pour une polarisation en direction parallèle (figure 1d) [11].

### Intérêt de la polarisation en micro-imagerie IR des échantillons de peau

Sur la base des résultats obtenus sur le tendon de queue de rat, les échantillons cutanés de différents âges ont été analysés en utilisant le rapport des intensités intégrées des bandes amide I et amide II.

Dans cette étude, huit échantillons de peau de personnes âgées de 41 à 80 ans, et de phototype 2<sup>1</sup>, ont été analysés. Ces échantillons cutanés provenaient de résections chez des patientes opérées pour un cancer du sein. Les échantillons cutanés prélevés

<sup>1</sup> Le phototype correspond à un classement des types de peau selon leur sensibilité au rayonnement ultraviolet de l'exposition solaire. Il comprend 6 niveaux: le niveau 1 est associé à une peau très claire et le niveau 6 à une noire. Un phototype 2 correspond à une peau claire, très sensible aux coups de soleil et ne bronzant que légèrement.

à distance de la tumeur ont été examinés par histologie de routine pour confirmer l'absence de pathologie cutanée. La peau au niveau du sein est un site anatomique habituellement peu exposé au soleil, et est considéré comme un bon modèle d'étude de vieillissement chronologique. Des sections minces de tissu (5 μm) ont été déposées sur des fenêtres en CaF<sub>2</sub> (transparent en IR), avec la surface de la peau orientée parallèlement à l'axe des X de la platine motorisée.

La figure 2a permet de visualiser les zones tissulaires imagées. Les figures 2b et 2c correspondent aux images spectrales construites sur le rapport amide I / amide II avec une échelle de couleurs de 0 (bleu) à 4 (rouge) selon les valeurs obtenues pour le tendon, respectivement en mode conventionnel non polarisé et pour une polarisation parallèle. L'intérêt de la polarisation apparaît clairement par une augmentation du contraste des images spectrales. Au sein de chacune des sections de peau, une variabilité importante du signal apparaît, révélant l'hétérogénéité tissulaire à l'échelle microscopique. La couche mince superficielle, correspondant au

Age (ans)	41(1)			41(2)			48			53		
# centroïde	5	4	2	8	7	3	5	4	3	1	5	6
Contribution de cluster (%)	46	30	24	23	30	47	30	47	23	20	68	13
Ratio de la bande amide I / II	3,6	3,5	3,4	3,4	3,3	3,1	3,2	3,1	2,7	3,1	2,9	2,8
Age (ans)	58			62			74			80		
# centroïde	6	1	4	6	1	8	3	5	6	7	3	4
Contribution de cluster (%)	19	28	53	22	26	52	63	26	11	26	23	50
Ratio de la bande amide I / II	3	2,9	2,6	2,9	2,7	2,6	2,6	2,2	2,1	2,6	2,2	1,7

**Tableau 1.** Rapport des intensités intégrées des bandes amide I / amide II pour les centroïdes des clusters associés au derme à l'issue de la classification hiérarchique ascendante des images spectrales.

*stratum corneum*<sup>2</sup>, présente un rapport de valeur d'environ 2, en présence ou en l'absence de polarisation. Cette observation montre que les principaux composants moléculaires (de nature lipidique) du *stratum corneum* sont insensibles à la polarisation du rayonnement infrarouge. Ces images spectrales construites à partir du rapport amide I / amide II ne permettent pas de distinguer les structures histologiques de la peau. Par exemple, aucune distinction entre l'épiderme et le derme n'apparaît, ce qui ne permet pas une étude comparative des différents échantillons inclus. Pour pallier cette limitation, une analyse statistique multivariée de type classification hiérarchique ascendante

<sup>2</sup> Le *stratum corneum*, ou couche cornée, correspond à la couche la plus externe de la peau et de l'épiderme. Composé de cellules aplaties sans noyau (cornéocytes) reliées entre elles par une matrice riche en lipides, il participe à la fonction barrière de la peau, assurant la protection de l'organisme vis à vis des agressions extérieures.

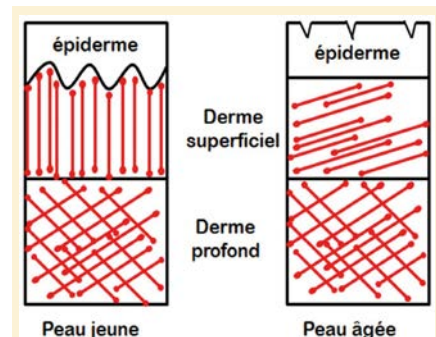
(CHA) a été appliquée à chacune des images infrarouges enregistrées en polarisation parallèle.

### Identification des régions tissulaires d'intérêt au sein des échantillons cutanés

L'exploitation des données nécessite une première étape de pré-traitement. Ainsi, les spectres des images (à chaque pixel correspond un spectre d'absorbance infrarouge) subissent-ils un prétraitement par EMSC (*extended multiplicative signal correction*) [6,7] permettant simultanément une correction de ligne de base et une normalisation. À noter que dans le cas de tissus inclus en paraffine, ce prétraitement EMSC permet la neutralisation des interférences spectrales de la paraffine, évitant ainsi un déparaffinage chimique du tissu. Les données sont ensuite traitées par CHA. Pour une image spectrale, les spectres sont regroupés en un nombre de

clusters fixé par l'opérateur. À chaque cluster correspond une couleur. Selon notre méthodologie, chaque image étant traitée indépendamment des autres, il n'y a donc pas de correspondance des couleurs d'une image à l'autre. Néanmoins, pour faciliter l'interprétation de l'ensemble des images clusterisées par CHA, dans la mesure du possible une couleur commune a été attribuée à une structure spécifique de la peau : par exemple, l'épiderme a été coloré en violet pour l'ensemble des images.

L'analyse statistique multivariée de type CHA permet de reconstruire de nouvelles images pseudo-couleurs (*figure 2d*). En utilisant 10 clusters, les principales structures histologiques de la peau peuvent être efficacement mises en évidence. Ce traitement permet également de révéler l'hétérogénéité tissulaire, en particulier dans le derme, partie de la peau d'intérêt dans cette étude. Ainsi, plusieurs clusters sont attribués au derme. Par exemple, pour la peau de 41 ans, trois clusters (# 2, 4 et 5) sont associés au derme. Fait intéressant, le cluster # 5 correspond aux pixels ayant la valeur la plus élevée du rapport amide I / amide II sur la *figure 2c*. En outre, sur cette même section de peau, le *stratum corneum* et l'épiderme sont représentés par les clusters # 10 et 8 respectivement; d'autres structures susceptibles de correspondre aux appendices cutanés



**Figure 3.** Représentation schématique de l'évolution de l'orientation des fibres de collagène au cours du vieillissement cutané. Le changement d'orientation des fibres de collagène au niveau du derme superficiel entraîne un aplatissement de la jonction dermo-épidermique avec pour effet l'apparition des rides en surface.

sont également mises en évidence (clusters # 1, 6 et 9). L'attribution des clusters révélés par CHA aux structures histologiques cutanées s'appuie sur l'examen du dendrogramme reflétant les distances spectrales entre les centroïdes [12].

## Extraction d'un marqueur de l'orientation des fibres de collagène

À partir de ces images pseudo-couleurs, les centroïdes des clusters correspondant au derme (au nombre de 3 pour chacune des images) ont été extraits. Le rapport amide I / amide II de ces centroïdes a été calculé (tableau 1); les valeurs les plus élevées sont observées pour la peau de 41 ans (3,6, 3,5 et 3,4). Ces valeurs diminuent avec l'âge et sont minimales pour la peau de 80 ans (2,6, 2,2 et 1,7). Ces résultats indiquent que l'orientation des fibres collagènes est préférentiellement perpendiculaire à la surface de la peau pour les échantillons cutanés les plus jeunes et deviennent parallèles lors du vieillissement (figure 3). La contribution relative de chacun des clusters est également indiquée au tableau 1. En général, au sein des sections de peau analysées, le cluster spectral avec le rapport amide I / amide II le plus élevé correspond au derme papillaire.

Dans notre approche, les valeurs du ratio amide I / amide II ont été calculées car elles représentent l'orientation des liaisons covalentes C=O et C-N des liaisons peptidiques du collagène. La présence d'autres constituants protéiques du derme tels que l'élastine ou les protéoglycanes pourrait interférer dans l'évaluation de ce ratio. Cependant, le collagène correspond à environ 90% du poids sec de la peau, et présente un alignement structural exceptionnel en comparaison des autres constituants. En conséquence, le ratio amide I / amide II calculé à partir de spectres infrarouges polarisés apparaît comme un indicateur de l'orientation du collagène.

Notre étude démontre que la micro-imagerie IR polarisée est un outil permettant d'accéder à des informations d'ordre structural sur l'orientation des fibres de collagène au sein d'échantillons cutanés. Dans le cadre du vieillissement cutané, cette approche fournit à une échelle microscopique des données quantitatives, associées à des mécanismes moléculaires et à des modifications physiologiques et biomécaniques du vieillissement. Ce travail doit néanmoins être considéré comme un développement méthodologique mené sur un nombre limité d'échantillons [12].

### POUR EN SAVOIR PLUS

- [1] R.M. Lavker, J. Invest. Dermatol., 1979, 73, 59-66.
- [2] C.R. Lovell, K.A. Smolenski, V.C. Duance, N.D. Light, S. Young, M. Dyson, Br. J. Dermatol., 1987, 117, 419-428.
- [3] M. Gniadecka, R. Gniadecki, J. Serup, J. Søndergaard, J. Invest. Dermatol., 1994, 102, 362-365.
- [4] E.F. Bernstein, Y.Q. Chen, J.B. Kopp, L. Fisher, D.B. Brown, P.J. Hahn, F.A. Robey, J. Lakkakorpi, J. Uitto, J. Am. Acad. Dermatol., 1996, 34, 209-218.
- [5] J. Varani, M.K. Dame, L. Rittie, S. E. G. Fligiel, S. Kang, G.J. Fisher, J.J. Voorhees, Am. J. Pathol., 2006, 168, 1861-1868.
- [6] E. Ly, N. Cardot-Leccia, J.-P. Ortonne, M. Benchetrit, J.-F. Michiels, M. Manfait, O. Piot, Br. J. Dermatol., 2010, 162, 1316-1323.
- [7] E. Ly, O. Piot, A. Durlach, P. Bernard, M. Manfait, Analyst, 2009, 134, 1208-1214.
- [8] O. Urakawa, F. Kaneko, H. Kobayashi, J. Phys. Chem. B, 2012, 116, 14461-14469.
- [9] P. Papadopoulos, J. Sölter, F. Kremer, Eur. Phys. J. E, 2007, 24, 193-199.
- [10] X. Bi, G. Li, S.B. Dory, N.P. Camacho, Osteoarthritis and Cartilage, 2005, 13, 1050-1058.
- [11] N.P. Camacho, P. West, P.A. Torzilli, R. Mendelsohn, Biopolymers, 2001, 62, 1-8.
- [12] T.T. Nguyen, C. Eklouh-Molinier, D. Sebiskveradze, J. Feru, C. Terryn, M. Manfait, S. Brassart-Pasco, O. Piot, Analyst, 2014, 139, 2482-2488

## Le Micro-usinage

ne doit pas être une tâche impossible

### Platines de translation

- Modèles de course allant de 50mm à 1.5m
- Vitesse jusqu'à 2 m/s
- Conception à joints latéraux et capot acier
- Faible coût, haute performance
- Vis à billes ou à moteurs linéaires



### Système intégré Axes servo / Scanner

- Grand choix de focales et ouvertures
- Précision ultime et stabilité thermique
- Synchro tirs laser en temps réel sur les positions scanner/axes servo



### Système d'usinage cylindrique

- Plateforme de déplacement translation / rotation
- Architecture de contrôle avancée
- Configurations à simple ou double broche



### Système gantry à moteurs linéaires

- Vitesse 3 m/s et acceleration 5g
- Précision exceptionnel et performance pour une productivité maximale
- Versions "étanches" et options customisées pour votre application



Notre brochure gratuite Usinage LASER et Micro-usinage



<http://www.aerotech.com/resources/brochures.aspx>



Entièrement dévoué à la science du positionnement.

Téléphone: +33 2 37 21 87 65

Email: [cmonnier@aerotech.com](mailto:cmonnier@aerotech.com)

[www.aerotech.co.uk](http://www.aerotech.co.uk)

WORLD HEADQUARTERS: USA  
THE AMERICAS •  
EUROPE & MIDDLE EAST •  
ASIA-PACIFIC

AT0701A-1394-FR