



Fondation Sécurité Routière

Unité bénéficiaire
CETE de l'Est
Laboratoire Régional de Nancy
groupe ICE
71, rue de la Grande Haie
54510 Tomblaine
Tél.: 03 83 18 41 41
Fax: 03 83 18 41 00



Unité ayant effectué les travaux
LMOPS
2, rue E. Belin
57070 Metz
Tél.: 03 87 37 85 36
Fax: 03 87 37 85 59



Détection du taux d'Alcoolémie par spectroscopie Raman (DAR) Rapport final

Alcoolemey Detection by Raman Spectroscopy
Final report

Laura UNIPAN, David CHAPRON,
Mario MARCHETTI,
avec la participation de Patrice BOURSON et Marc FONTANA,

N° de contrat FSR : 2008/MP/03
date de notification du contrat : décembre 2008
durée du contrat : 12 mois, renouvelable une fois
nom du responsable FSR : Mme DEKKERS Marie-Antoinette
nom du rapporteur du projet : M. MOULIÈRE Stéphane

DIFFUSION RESTREINTE

Février 2011

page laissée blanche intentionnellement

Sommaire

Objectifs du contrat.....	5
1. Étude bibliographique. Contexte et enjeux.....	7
1.1. La peau et le sang.....	7
1.2. Propriétés optiques de l'épiderme et du derme.....	8
1.3. Métabolisme de l'alcool dans l'organisme.....	10
2. La spectroscopie Raman.....	13
2.1. Description de la spectroscopie Raman.....	13
2.2. La spectroscopie Raman et ses applications à l'étude de l'alcool dans le sang.....	14
3. Résultats DAR.....	21
3.1. Démarche scientifique.....	21
3.2. Description du matériel utilisé.....	23
3.3. Protocole expérimental de mise en œuvre des échantillons.....	23
3.4. Raman et alcool, sang et ses constituants.....	24
3.4.1. Alcool.....	24
3.4.2. Signatures Raman de produits sanguins.....	26
3.4.3. Cas des mélanges de sang et d'alcool.....	29
A. Mélanges préparés alcool-sang.....	29
B. Produits sanguins humains cliniques.....	31
B.1. Plasma alcoolisé.....	31
B.2. Sang total alcoolisé.....	40
3.4.4. Mesures <i>in vivo</i>	46
A. Étape préliminaire : la mesure à travers une paroi.....	46
A.1. Essais à travers un tube de prélèvement.....	46
A.2. Essais à travers un tube cathéter.....	48
B. Éléments de protocole pour des mesures <i>in vivo</i> à travers la peau.....	51
4. Conclusion et perspectives.....	52
5. Bibliographie.....	55

Résumé

Les techniques les plus couramment utilisées pour mesurer l'alcoolémie sont l'analyse du sang ou de l'urine prélevés ou de l'air pulmonaire expiré, avec des éthylotests ou des éthylomètres. Les tests sanguins nécessitent une prise de sang et des analyses dans un laboratoire agréé. Ces techniques fiables, présentent l'inconvénient d'être relativement coûteuses et surtout ne permettent pas d'obtenir un résultat immédiat (délai de 12 à 24 heures). L'utilisation de l'éthylomètre ou de l'alcootest nécessite la coopération active de la personne contrôlée, ce qui n'est pas toujours possible.

Des techniques optiques, en particulier la spectroscopie Raman, peuvent être des solutions très innovantes pour remplacer ces tests. En effet la spectroscopie Raman est une technique sans contact, non destructive et pouvant se faire à travers la peau. Ceci lui confère de nombreux avantages et potentialités pour remplacer ces tests.

Dans un premier temps, nous avons effectué une revue exhaustive de la littérature sur tous les éléments concernant une étude par la spectroscopie Raman pour l'analyse du sang et de l'alcool. Il a été démontré dans des études précédentes que cette spectroscopie peut être utilisée pour détecter l'éthanol et divers composants biologiques. Ces études suggèrent que la spectroscopie Raman peut fournir des informations sur les constituants sanguins *in situ*, détecter et doser spécifiquement l'éthanol.

Nous avons ensuite testé la capacité de la spectroscopie Raman pour mesurer le teneur en alcool dans un mélange d'eau et d'alcool. Les différences observées dans les spectres ont été utilisées pour décrire la relation entre la réponse Raman et la concentration d'éthanol. Dans un second temps nous avons effectué les mesures sur du plasma et du sang d'origine humaine. Ce sang brut non centrifugé est appelé sang total.

Nous avons analysé les spectres obtenus et étudié les conditions de mesure de l'éthanol dans des échantillons sanguins cliniques. Des modifications et des signatures pertinentes dues à la présence d'alcool dans ces échantillons ont été trouvées. Les mesures réalisées ont aussi montré une faisabilité de la détection d'alcool à travers des tubes de prélèvement contenant du sang total. Pour montrer la faisabilité d'une mesure *in vivo* nous avons réalisé des mesures préliminaires sur des échantillons sanguins à travers différentes parois, comme différents tubes de prélèvement, tube cathéter.

MOTS CLÉS : Raman, éthanol, boissons alcoolisées, plasma, sang, taux d'alcoolémie

Objectifs du contrat

Contexte

En France, 85% des cas d'accidents de la circulation sont liés à l'alcool et les responsables sont des buveurs occasionnels. L'alcool est à l'origine de 34% des accidents mortels. Cette substance est impliquée dans la moitié des accidents mortels qui surviennent le week-end et reste la principale cause de 42% des accidents mortels touchant les jeunes de 18 à 24 ans l'été.

Le risque d'accident mortel augmente considérablement avec le taux d'alcoolémie. Tout conducteur ou accompagnateur d'élève conducteur en état d'ébriété compromet gravement la sécurité de ses passagers et des autres usagers de la route. C'est pour cela qu'il est interdit de conduire avec un taux d'alcool égal ou supérieur à 0,5 gramme par litre de sang, soit 0,25 mg d'alcool par litre d'air expiré. Les méthodes traditionnelles actuellement disponibles sur le marché et exploitées sont parfois contestées par les contrevenants potentiels, soit contestables, ou encore parfois lourdes à mettre en œuvre. Les éthylotests donnent une indication quantitative de l'alcoolémie. En effet, de tels dispositifs devraient présenter un étalonnage, ou bien être raccordés à un dispositif de référence afin de garantir la mesure de l'infraction constatée. Les techniques de terrain (éthylotests chimiques ou électroniques) continuent de devoir se référer soit à une prise de sang, soit à une mesure par un dispositif homologué. Cette absence de souplesse limite et alourdit le champ d'action des fonctionnaires en charges du travail de dépistage.

Projet

L'objectif du projet est de montrer la faisabilité de l'utilisation de la spectroscopie Raman pour doser de manière fiable l'alcool dans le sang d'un individu. La maîtrise de la technique Raman à des fins que nous envisageons présuppose donc d'atteindre les objectifs intermédiaires suivants :

- Identification des signatures des différents alcools dans le spectre Raman du sang permettant de déterminer leur présence et leur concentration.
- Définition d'une méthode et d'un traitement du signal appropriés à mettre en œuvre afin

d'extraire ces signatures et de les rendre techniquement exploitables.

- Validation de cette méthode par des mesures expérimentales, à l'aveugle, et en conditions réelles sur des taux l'alcoolémie d'échantillons calibrés; quantifier la sensibilité, la précision et la reproductibilité de la mesure.

- Proposer un cahier des charges opérationnel de l'appareillage à mettre en œuvre pour l'utilisation de cette technique sur le terrain.

Afin d'atteindre ces objectifs et de satisfaire les ambitions globales du projet, nous avons proposé d'organiser le travail de nos équipes en deux temps : tout d'abord une première phase de démonstration de faisabilité, constituée de la tâche numérotée 1 ; puis d'une seconde phase de développement, de validation, et de valorisation.

La première phase de ce projet comprend deux axes de travail :

- La réalisation d'une étude bibliographique approfondie permettant d'orienter précisément nos travaux et de fournir des éléments d'explications et d'exploitation de nos résultats expérimentaux.
- Les mesures expérimentales du spectre Raman du sang, de différents alcools, et de mélanges des deux.

La seconde phase de projet comprend les tâches suivantes :

- Développer l'instrumentation, la méthode et le traitement du signal nécessaires à la mesure.
- Réaliser un prototype transportable; valider et calibrer la méthode de mesure; rédiger un cahier des charges opérationnel.
- Définir une stratégie de valorisation des résultats de l'étude; procéder à leur diffusion et à leur transfert; déterminer les perspectives industrielles et scientifiques envisageables.

Objectifs de ce projet	
Première année	Deuxième année
Étude bibliographique approfondie.	Développer l'instrumentation, la méthode et le traitement du signal nécessaires à la mesure
Mesures expérimentales du spectre Raman - du sang - de différents alcools,- du mélange des deux.	Réaliser un prototype transportable. Valider et calibrer la méthode de mesure. Rédiger un cahier des charges opérationnel.
	Définir la stratégie de valorisation des résultats de l'étude. Procéder à leur diffusion et à leur transfert. Déterminer les perspectives industrielles et scientifiques envisageables.

1. Étude bibliographique, contexte et enjeux

1.1. La peau et le sang

L'objectif de ce projet est la faisabilité de l'utilisation de la spectroscopie Raman pour mesurer l'alcoolémie dans le sang d'un individu à travers de la peau. La spectroscopie Raman est une technique efficace d'analyse de l'identification moléculaire d'échantillons biologiques, mais cette étude s'avère complexe à cause des recouvrements de spectres dans le cas de ces structures.

Dans notre cas, la peau est un milieu riche et les signatures Raman de certains constituants chimiques peuvent cacher celles d'autres espèces d'intérêt. D'une épaisseur de moins de cinq millimètres, le derme et l'épiderme contiennent les molécules naturelles de la protection (kératines), de la couleur (mélanines) et de la nutrition (polyglucosides, lipides, vitamines) (figure 1). L'épiderme, couche externe de la peau, mince d'un dixième de millimètre, assure l'imperméabilité de la peau et sa résistance. La concentration la plus importante de la mélanine reste dans la couche basale de l'épiderme.

Dans le derme, couche épaisse et charpentée de la peau, se trouvent les vaisseaux sanguins, les follicules pileux, les fibres de collagène et d'élastine, les glandes sudorales et les glandes sébacées. Ces dernières sécrètent le sébum, une substance grasseuse et acide, indispensable à la lubrification de la peau et à sa protection contre de nombreuses bactéries. L'hypoderme, zone sous-cutanée, est un tissu grasseux lobulé constitué d'adipocytes (lipides, acides gras).

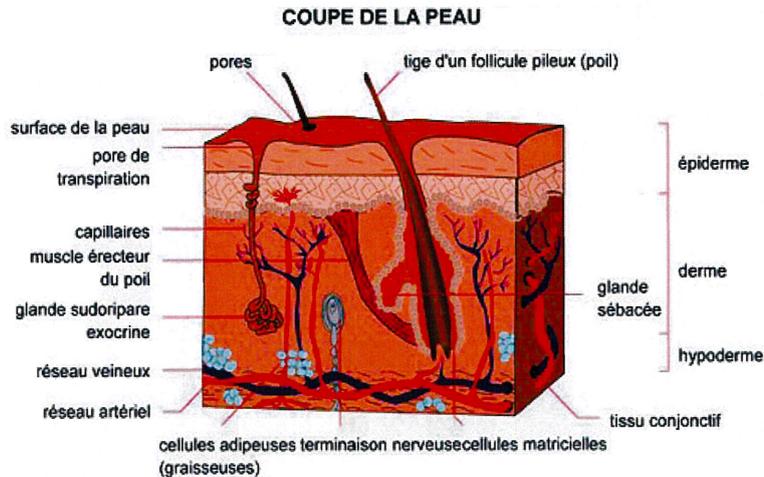


Figure 1 : Configuration de la peau humaine [1]

Dans les vaisseaux circule le sang composé à 55% de plasma (liquide contenant entre autres les protéines de la coagulation) et à 45% d'éléments figurés (globules rouges transportant l'oxygène, globules blancs assurant l'immunité, plaquettes adhérant aux brèches vasculaires et supportant la coagulation).

Le plasma est obtenu en laissant le sang coaguler puis en le centrifugeant. Il contient tous les constituants du sang sauf les éléments figurés [1]. Il désigne en particulier le plasma sanguin purifié, débarrassé des facteurs de coagulation (protéines de coagulation). L'eau est le principal constituant du plasma (90%), les 10% restants sont des protéines, des lipides, des glucides des sels et de métabolites.

1.2. Propriétés optiques de l'épiderme et du derme

La transmission à travers l'épiderme dépend de l'absorption des molécules comme les acides nucléiques (ADN), les acides aminés aromatiques : tryptophane et tyrosine, de l'acide urocanique et de la mélanine. Tous ces chromophores absorbent essentiellement dans l'ultra-violet. Au niveau des propriétés optiques, il faut noter que la mélanine absorbe essentiellement dans les courtes longueurs d'onde du spectre visible et dans l'ultra-violet. Les variations de leur concentration, leur distribution spatiale et leur quantité globale déterminent les variations des spectres de transmission de l'épiderme des individus. Dans la partie visible du spectre, la mélanine est essentiellement le seul pigment qui affecte la transmission de l'épiderme humain normal.

Des études sur le transfert de la lumière par le derme ont mis en évidence le comportement

typique d'un milieu multidiffusant. Plus le derme est épais, plus la transmission diminue et devient diffuse. Par ailleurs, à épaisseur de derme donnée, la transmission (diffuse) augmente avec la longueur d'onde dans la région comprise entre l'ultraviolet et le proche infrarouge. Quant au coefficient d'absorption, il reste largement inférieur au coefficient de diffusion dans le visible et le proche infrarouge jusque vers $1,5 \mu\text{m}$, où apparaissent les premières bandes d'absorption de l'eau.

Les études de la spectroscopie Raman sur les tissus biologiques utilisent des lasers dans le domaine infrarouge pour s'affranchir du phénomène de fluorescence [2]. Les lumières rouge et proche infrarouge sont peu absorbées par la peau, et la pénétration en profondeur du faisceau est plus importante [3]. Dans le visible (bleu, vert, jaune) l'absorption s'effectue principalement au niveau de l'hémoglobine et de la mélanine. Ensuite, dans l'infrarouge moyen et lointain, c'est l'eau qui absorbe intensément la lumière (figure 2).

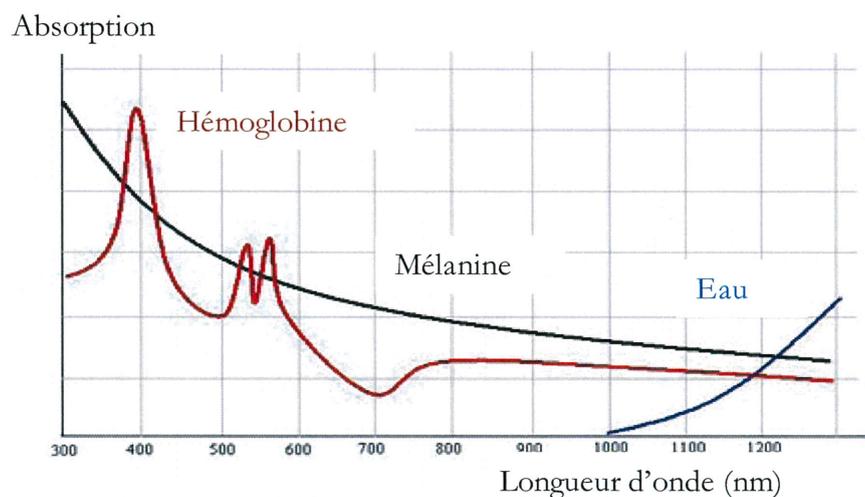


Figure 2 : Spectre l'absorption de l'hémoglobine, mélanine et l'eau [4]

La diffusion et l'absorption de la lumière déterminent une "fenêtre optique" ou "biologique" dans la région comprise entre 600 et 1300 nm ($0,6-1,3 \mu\text{m}$) où l'absorption est faible et donc la profondeur de pénétration de la lumière est suffisante pour permettre la recherche de différents constituants.

Nous pouvons constater que cette fenêtre est très large, ce qui laisse a priori plusieurs possibilités de choix de longueurs d'onde excitatrices à utiliser en spectroscopie Raman. Le choix s'opérera en fonction du rapport signal/bruit et de la discrimination des divers constituants.

1.3. Métabolisme de l'alcool dans l'organisme

La capacité de l'organisme à décomposer l'alcool dépend de plusieurs facteurs (âge, sexe, état physique, poids, facteurs génétiques), mais le processus d'absorption est identique pour tous. La plus grande partie de l'alcool absorbé (soit 90 % environ) est métabolisée (on dit encore "oxydée" ou "brûlée") dans l'organisme, principalement dans le foie. Le reste (soit environ 10 %) est éliminé par les poumons et l'haleine (ce qui permet de le doser à l'aide d'un appareil), par les reins (ce qui permet aussi le dosage dans les urines appelé alcoolurie) et par la peau. Ceci nous permet de souligner que la nouvelle méthode que nous préconisons et qui fait l'objet de cette étude dosera l'éthanol directement dans le sang.

L'alcool absorbé traverse rapidement la paroi de l'estomac et de l'intestin puis passe dans le sang. Dans l'organisme, son élimination correspond davantage à celle d'une substance toxique qu'à un aliment. En dehors d'une très faible partie, il ne subit aucune transformation de la part des sécrétions gastriques.

L'essentiel de l'éthanol ingéré est oxydé au niveau du foie en acétaldéhyde puis en acétate (figure 3). L'acétaldéhyde est oxydé en acétate par l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH) [5]. L'acétate est libéré en grande partie dans la circulation générale où il est métabolisé.

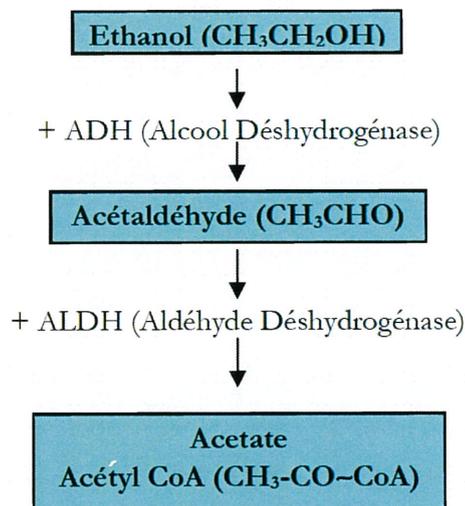


Figure 3 : Le métabolisme de l'éthanol [5]

L'acétaldéhyde se retrouve principalement fixé au niveau des hématies [6]. L'étude de Baraona et

al. [7] a montré qu'après consommation d'alcool, la concentration d'acétaldéhyde présente dans les hématies (globules rouges) est plus élevée que dans le plasma. Plusieurs études sur les marqueurs d'exposition à l'alcool démontrent que l'acétaldéhyde peut modifier la molécule d'hémoglobine [8].

Comme biomarqueurs autres que l'éthanol et liés à la consommation d'alcool, nous pouvons encore citer :

- adduits d'acétaldéhyde (consommation récente et passée d'alcool)
- 5-hydroxytryptophol/5-HIAA (consommation récente d'alcool 24 h)
- éthylglucuronide (EtG) (consommation récente et passée d'alcool)
- gamma glutamyl transférase (γ -GT)
- transferrine déficiente en carbohydrate (Carbohydrate Deficient Transferrin CDT) (consommation chronique excessive).

Le taux d'alcool dans l'organisme humain suit la trajectoire d'une courbe présentant deux phases, la phase d'absorption et celle de l'élimination (figure 4). Les deux courbes mettent bien en évidence les différences des niveaux d'alcoolémie en fonction de l'alimentation associée. Pendant l'absorption l'alcoolémie est en hausse, alors qu'en phase d'élimination elle descend. En l'espace de 20 à 30 minutes après ingestion, le sang se véhicule dans toutes les parties de l'organisme. La vitesse d'absorption varie selon de multiples facteurs: ralentie par la prise concomitante d'aliments ou plus rapide à jeun (15 mn). L'alcoolémie baisse en moyenne de 0,15 g/L par heure.

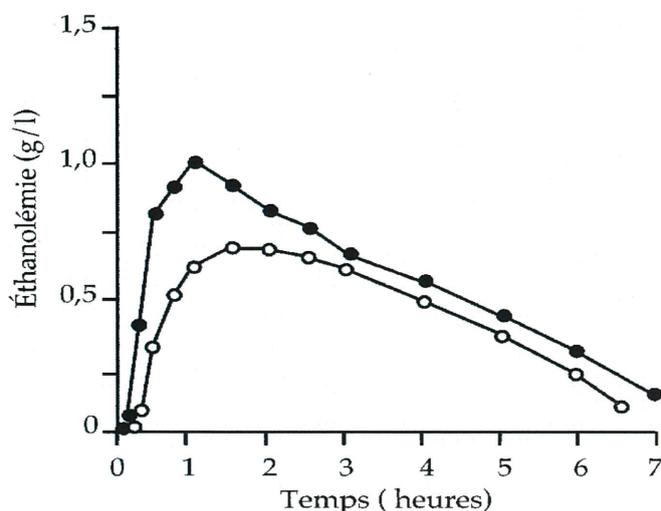


Figure 4 : Pharmacocinétique après ingestion d'éthanol à jeun ou après un repas [9]
Valeurs obtenues chez un homme ayant consommé 0,80 g d'alcool/kg de poids corporel pendant déjeuner (○)
ou à jeun (●)

Les augmentations d'alcoolémie entraînées par l'absorption de boissons alcoolisées, pour un homme de 75 kg sont :

- 1 demi de bière (25 cl) : 0,15 g
- 1 apéritif anise (2.5 cl) : 0,14 g
- 1 verre de vin (12 cl) : 0,15 g

La capacité de métabolisation de l'éthanol est plus importante chez l'éthylique chronique : 175 mg/kg/h contre 100 à 125 mg/kg/h chez le buveur occasionnel [9].

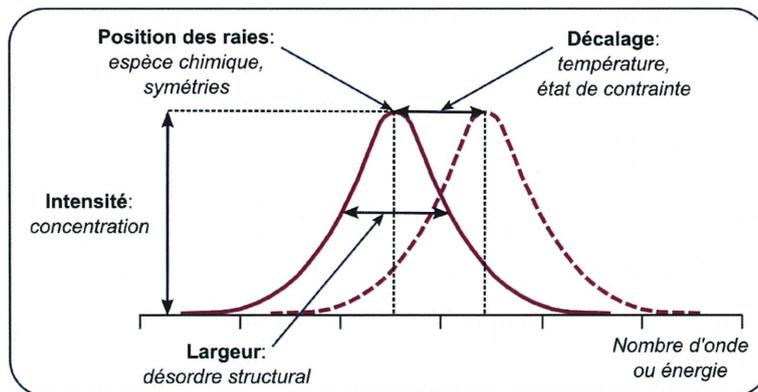
La variation des vitesses du métabolisme de l'éthanol est en partie due à des variants alléliques des gènes codant pour les enzymes métabolisant l'alcool, l'alcool déshydrogénase (ADH) et l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH) [10].

En conclusion de cette étude bibliographique, on veillera à s'assurer que pour la méthode alternative proposée par cette étude, le marqueur détecté par notre capteur ne puisse pas provenir d'une origine autre que celle de l'alcool ingéré.

2. La spectroscopie Raman

2.1. Description de la spectroscopie Raman

Le principe de la spectroscopie Raman est d'enregistrer les vibrations caractéristiques des liaisons chimiques d'un milieu. Ces vibrations s'effectuent à des fréquences caractéristiques d'une liaison que l'effet Raman permet de mesurer. Les informations que nous pouvons tirer d'un spectre Raman sont représentées dans la figure 5.



La spectroscopie Raman repose sur l'interaction entre un faisceau lumineux incident et le milieu, le spectre Raman enregistre les variations de la polarisabilité des ions impliqués dans une liaison ou vibration particulière.

C'est une méthode optique non destructive qui se satisfait d'échantillons de très petite taille et qui peut être utilisée à distance par l'intermédiaire de fibres optiques. L'échantillon n'a pas besoin de préparation préalable et par conséquent cette méthode est particulièrement bien adaptée pour réaliser des analyses *in situ*.

Elle est rapide (on peut obtenir un spectre Raman en quelques secondes) et offre des résolutions

spatiales variables dépendant de l'application voulue (allant de l'ordre de $1\mu\text{m}$ jusqu'à 1cm). L'utilisation de nouveaux lasers solides, compacts et à des longueurs d'onde permettant de s'affranchir d'effets de fluorescence, ouvre des voies d'utilisation nouvelles. La technologie CCD, le système confocal, et les filtres "Notch" (figure 6) permettent d'analyser de façon très localisée et sans détérioration la plupart des milieux, opaques ou colorés, avec la prise d'un spectre en près d'une seconde.

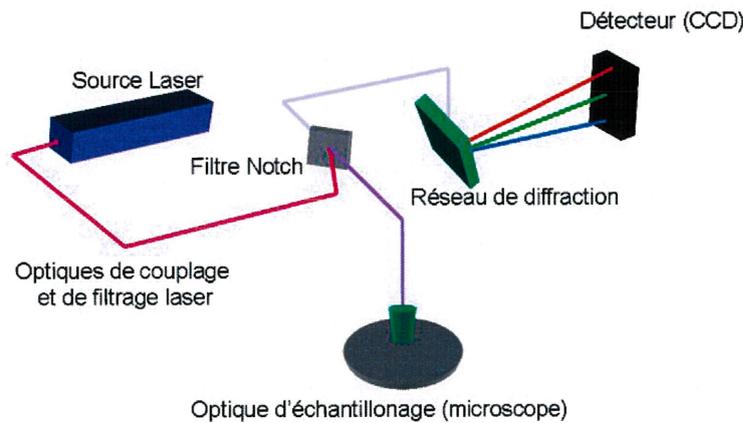


Figure 6 : Schéma de principe de l'appareillage d'un spectroscope Raman

2.2. La spectroscopie Raman et ses applications à l'étude de l'alcool dans le sang

Les nombreux développements instrumentaux ont permis un renouveau de la spectroscopie Raman au niveau des applications biologiques et médicales [12]. Il existe plusieurs méthodes pour les analyses de la peau et du sang comme l'imagerie ultrasonore, la tomographie en cohérence optique, l'imagerie par résonance magnétique, la spectroscopie de réflectance proche infrarouge (la méthode la plus utilisée). Les analyses cliniques basées sur l'utilisation de la spectrométrie Raman présentent l'avantage d'être non destructives puisque cette technique ne nécessite pas de prélèvement contrairement aux techniques utilisées dans le domaine médical. Dans les études sur les tissus biologiques, la spectroscopie Raman utilise des lasers dans le domaine infrarouge pour s'affranchir du phénomène de fluorescence [12]. Il est aussi important de choisir la longueur d'onde d'excitation en fonction de la distance de pénétration de la lumière utilisée.

Afin de déterminer la présence de traces de sang et de détecter la présence d'hémoglobine dans une étude de criminologie par la spectroscopie Raman, plusieurs longueurs d'onde ont été utilisées : 488 nm, 514 nm, 632 nm, 752 nm (figure 7). Les profils des spectres obtenus sont différents, mais la position des pics reste la même [13]. Aussi, des études ont été menées pour montrer que les signatures Raman du sang humain sont fonction de l'individu mais ne permettent pas d'identifier un individu par rapport à un autre [14]. En effet, la composition du sang d'un individu évolue au cours du temps et donc les signatures Raman de son propre sang évoluent également dans le temps.

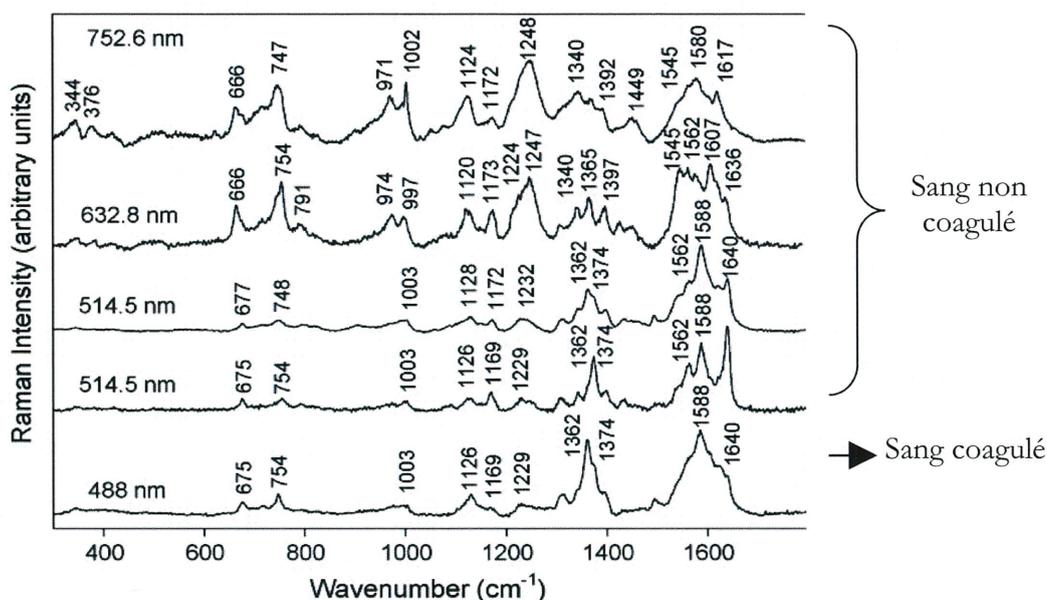


Figure 7 : Spectres Raman du sang non coagulé et coagulé pour différentes longueurs d'ondes d'excitation [13]

Pour les longueurs d'onde 532 nm et 785 nm, longueurs d'onde accessibles au laboratoire, les positions des raies Raman sont identiques mais la réponse à 532 nm est meilleure en raison d'un effet Raman plus intense. En utilisant une longueur d'onde proche de l'absorption Soret de l'hémoglobine, il se produit une forte résonance Raman provoquée par les vibrations de groupe fer-porphyrine. Le spectre Raman obtenu par l'excitation à 785 nm présente davantage d'informations. Dans l'étude qui concerne les traces de sang sur des fibres textiles, le signal Raman obtenu à 785 nm est bruité et dans ce cas les meilleurs résultats sont obtenus avec une excitation à 532 nm. Ceci montre que l'on ne peut pas considérer une seule longueur d'onde comme idéale et qu'elle dépend du composé que l'on souhaite mesurer et du milieu dans lequel il se trouve.

Les spectres Raman du sang seul ne sont pas aussi complexes que ceux du sang à travers la

peau, parce qu'il y a moins de constituants et que la fluorescence est diminuée [15]. Dans les échantillons de plasma, le signal Raman possède une distance de pénétration plus grande que pour les échantillons "turbides" comme le sang total et le signal est composé de pics moins nombreux.

De nombreuses études ont été faites sur l'identification de différents constituants du sang. Certains auteurs ont démontré que la spectroscopie Raman permet d'identifier les modifications de l'état de l'hémoglobine exposé à l'éthanol (figure 8) [16] ou en raison d'une maladie. L'identification de certaines vibrations Raman du sang est donnée dans le tableau 1.

Tableau 1 : Fréquences Raman associés aux modes de vibration dans le sang [17]

Fréquence Raman (cm ⁻¹)	Modes de vibration	Constituants
742	Vibrations de corone	Tryptophane
1001	Vibrations cycliques aromatiques	Phénylalanine
1123	L'étirement antisymétrique du mode C–O–C	Glucose
1247	Mode de déformation angulaire Amide III	Protéine
1341	Mode de déformation angulaire C–H	Tryptophane
1368	Mode de déformation CH ₃	Hème
1446	Mode de déformation angulaire CH ₂ , CH ₃	Tryptophane
1576	mode d'élongation C C	Hème
1619	mode d'élongation C N	Hème

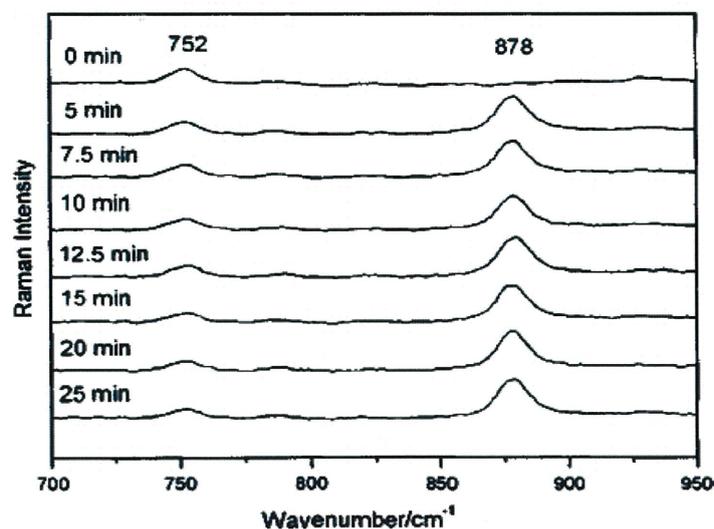


Figure 8 : Spectre Raman à 785nm de globules rouges dans une solution à 20% d'éthanol pour différents temps d'exposition [16]

Les facteurs clés qui influent sur les résultats de ces études sont le temps d'exposition de l'échantillon, la puissance du laser et la complexité de la solution.

Plusieurs études ont utilisé la spectroscopie Raman pour mesurer avec précision les concentrations de glucose, lactate, ascorbate, pyruvate, urée dans l'eau à des concentrations physiologiques. Cela a ouvert la voie pour des études plus complexes comme la détection de constituants dans le plasma et le sang total. Par exemple, les concentrations de glucose ont été déterminées dans le sang à des valeurs supérieures à la normale [18].

Comme tout composé biologique, le sang est un milieu vivant qui évolue dans le temps. Ainsi, ses interactions avec l'environnement, ses problèmes de stabilité et le grand nombre de molécules qui le constituent rendent son étude particulièrement complexe. Par exemple, la précision pour la détection de glucose diminue considérablement avec le temps même à température ambiante. Cela rend nécessaire que la détection et la prévision des concentrations se fassent en deux étapes : les mesures réelles suivies de corrections pour diminuer les pertes.

Les études récentes dans ce domaine se concentrent sur la détermination par la spectroscopie Raman, des concentrations de glucose dans le sang à travers la peau. Des études récentes portent sur l'identification et les modifications de différents constituants présents dans le sang à travers la peau. Les analyses effectuées *in vivo*, non invasives, par la spectroscopie Raman permettent entre autres d'évaluer à travers le tissu biologique la concentration de l'acide lactique, un acide organique qui s'accumule dans le sang et le muscle pendant un effort physique. Les changements au niveau des pics Raman des

différents éléments comme les protéines, l'hémoglobine, les lipides ont été utilisés pour diagnostiquer certaines maladies dont des cancers. La méthode est aussi de plus en plus utilisée pour la caractérisation non invasive de la peau et pour la détection d'anomalies comme certains cancers [19]. De même, des études sur la peau par spectroscopie Raman ont permis de suivre la pénétration en profondeur de différents composants (médicaments, crèmes hydratantes,...) [20]. Le développement de la méthode Raman a également permis d'identifier des différentes maladies en analysant le plasma humain et de développer des moyens de détection non invasif [21].

Le développement de nouveaux spectromètres dédiés à l'analyse in situ et les recherches pour la miniaturisation des équipements optiques ont permis l'avènement de spectromètres portatifs. La spectroscopie Raman se révèle donc être une technique privilégiée pour l'étude de tissus humains dans un environnement quelconque.

La détection d'alcool avec la spectroscopie Raman dans différents milieux biologiques n'a pas été encore étudiée en détail, mais les premières études sur des concentrations physiologiques de l'éthanol dans l'eau ont montré des résultats encourageants. Le dosage d'éthanol dans du plasma bovin a été déterminé par Joshua L. McKay [22]. Le modèle utilisé permet d'estimer la concentration d'éthanol pour des concentrations élevées, mais pour les concentrations faibles la méthode est peu précise (figure 9). On observe que pour des concentrations physiologiques d'éthanol mélangé dans du plasma, un modèle réalisé par l'auteur présente des grandes différences en comparaison avec les concentrations réelles.

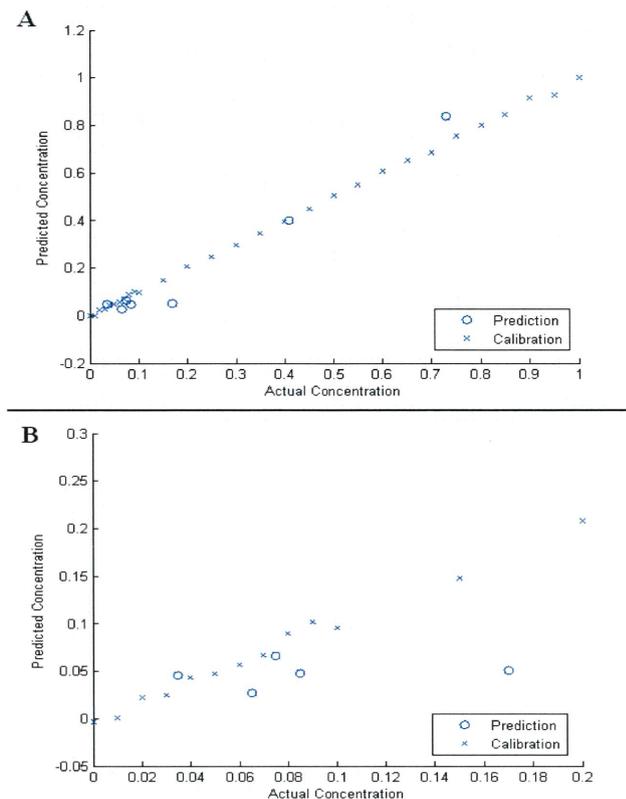


Figure 9 : Modèle PLS (régression linéaire) sur données collectées pour de l'éthanol dans du plasma
(A) modèle pour l'échelle entière (B) modèle pour l'échelle physiologique

Des résultats récents ont montré la possibilité d'analyse quantitative de l'éthanol par spectroscopie Raman dans des milieux diffus et fluorescents comme des solutions lipidiques [23]. La méthode utilisée permet la détermination de l'alcool par l'utilisation de plusieurs longueurs d'ondes avec un système optique spécialement développé. Les résultats sur des mélanges d'éthanol et d'une solution lipidique montrent que la méthode peut détecter les raies d'alcool en utilisant des traitements informatiques. Les auteurs ont mesuré des concentrations d'alcool avec une limite de détection de $8.10^{-2}g/L$ environ.

La littérature donne des nombreux travaux sur la détermination non invasive du glucose par la spectroscopie Raman. Ces études ont permis de montrer que le signal Raman de glucose est d'intensité plus importante que celle de l'alcool. Il est donc envisageable de construire un capteur pour déterminer le niveau de glucose dans le sang à travers de la peau.

La détection par Raman à travers une paroi (plastique, peau, veine) est possible à condition que le signal laser soit peu absorbé par celle-ci et qu'elle ne génère pas de fluorescence. Le spectre Raman de la paroi peut ensuite être soustrait du signal de détection. Cependant, la peau est également un milieu biologique composé de différentes substances ce qui rend encore plus complexe l'étude de composés

sanguins à travers celle-ci : problèmes de stabilité, superposition des spectres, peaux de différentes nature...

Dans le cas d'un spectre complexe et/ou bruité il est possible d'utiliser des outils de traitement numérique pour en extraire les signatures des différentes espèces de milieu. Dans ce but, les techniques de traitement chimiométrique et leurs algorithmes se sont développés et sont aujourd'hui appliqués à la spectrométrie Raman. Souvent développés pour une application particulière, ils n'exploitent pas toute l'information contenue dans les spectres.

3. Résultats DAR

Les résultats obtenus au cours de ces deux années de travail sont rassemblés dans ce chapitre. Ils concernent successivement les mesures Raman sur des échantillons d'alcool purs, sur des échantillons non-alcoolisés de plasma et de sang total, et enfin sur des échantillons alcoolisés de plasma et de sang total. Ainsi, des indicateurs du taux d'alcool ont pu être extraits et des mesures ont également été menées sur ce type d'échantillons à travers différentes parois comme les tubes de prélèvement et le cathéter. Le protocole de la phase de test sur cobaye humain, difficile à mettre en place étant données les précautions à prendre pour une irradiation laser focalisée sous la peau a également été défini.

3.1. Démarche scientifique

L'objectif de ce projet étant d'étudier la faisabilité de la détection d'alcool dans le sang par la technique Raman, nous avons dans un premier temps déterminé les signatures spectrales spécifiques des différents constituants. En effet, le préambule à la réalisation d'un capteur Raman sur un milieu aussi complexe que le sang à travers la peau est l'étude d'un champ restreint en commençant par des échantillons des composés purs puis l'étude d'échantillons cliniques. Ainsi, les signatures spectrales de l'éthanol à différentes concentrations, celles du plasma et celles du sang total ont été identifiées. Cette première étape nous a également permis d'établir un protocole de mesure, à savoir : longueur d'onde, puissance d'excitation, domaine spectral d'étude adaptés.

Des mélanges alcool-plasma et alcool-sang préparés au laboratoire ont ensuite été étudiés. Les signatures Raman d'un composé sont fonction de son environnement, il est donc utile d'analyser les spectres de l'éthanol et les éventuelles altérations provoquées par le plasma et le sang total sur ses signatures spectrales.

Une des difficultés majeure dans l'étude de milieux biologiques est le caractère « vivant » des échantillons qui les rend particulièrement sensibles aux changements des conditions extérieures. Une mesure directe sur le sang à l'intérieur du corps, mesure in vivo, et sur un échantillon prélevé de sang,

mesure ex vivo, peuvent conduire à des signatures optiques différentes si les conditions dans lesquelles ont été effectuées et conservées les échantillons prélevés ne sont pas maîtrisées. Dans une première approche, nous avons fait l'hypothèse que nos échantillons prélevés sont fixés chimiquement dans le temps. Cette hypothèse a été confirmée par le personnel des hôpitaux concernés. Lors de la conservation de leurs échantillons alcoolisés la concentration d'éthanol varie peu dans le temps. Cependant, le sang total peut subir une altération en présence d'alcool.

Les spectres Raman d'échantillons alcoolisés, fournis par deux hôpitaux et dont la concentration en alcool est connue, ont été analysés. Aussi, les différents effets liés à la reproductibilité des mesures comme la dégradation du sang en présence d'alcool ou le vieillissement ont été étudiés. Ces aspects seront également abordés dans ce rapport.

Avant de passer sur des cas in vivo à travers la peau et afin de valider nos résultats, des mesures ont été effectuées lors de prélèvements et de dons de sang. Suivant un protocole similaire à ce qui a été fait en Allemagne dans le programme de détermination du glucose dans le sang (projet Klinik), nous avons mesuré les spectres Raman du sang total à travers différents tubes de prélèvement et à travers un cathéter. Cette méthode nous a permis d'appréhender les mesures à travers une paroi plus complexe telle que la peau.

Cette démarche nous a permis d'envisager l'existence d'indicateurs d'alcool mesurables par spectrométrie Raman.

La méthodologie mise en œuvre peut être ainsi résumée :

- détermination des pics pertinents de l'éthanol en solution dans l'eau, principal constituant du plasma.
- détermination des pics pertinents de l'éthanol en solution dans du sang d'origine humaine.
- étude d'échantillons cliniques fournis par un hôpital.
- mesures in-vivo

3.2. Description du matériel utilisé

Nous avons utilisé spécifiquement un spectromètre Raman transportable de marque Horiba Jobin Yvon acquis pour cette étude par le laboratoire LMOPS. Le spectromètre Raman iHR 320 est essentiellement constitué d'une source laser puissante, de fibres optiques, d'une sonde, d'un réseau et d'un détecteur CCD. Le signal traité par le CCD est envoyé vers un PC qui enregistre le spectre de l'échantillon grâce à un logiciel de traitement de signal. Ce spectromètre peut être utilisé à 532nm et à 785nm, ces deux longueurs d'ondes ont été utilisées dans cette étude. Les puissances lasers utilisées sont de l'ordre de 200 mW à la sortie laser et environ 30 à 40 mW sur l'échantillon.

3.3. Protocole expérimental de mise en œuvre des échantillons

Les échantillons de plasma et de sang total alcoolisés ont été fournis par :

- l'hôpital de Bonsecours, Metz, collaboration avec le Dr. Marquis
- l'hôpital Bel Air, Thionville, collaboration avec le Dr. Capolaghi

Les échantillons ont été fournis tels qu'ils sont conditionnés pour être conservés à 4°C par les hôpitaux. En fonction des échantillons, plasma ou sang total, les tubes fournis comportaient différents anticoagulants.

Les échantillons de plasma alcoolisé proviennent d'individus différents dont l'histoire médicale nous est inconnue. Au préalable, le taux d'alcool des échantillons a été déterminé par chromatographie en phase gazeuse. Les dates de prélèvement nous ont été communiqués par les hôpitaux. Les prélèvements ont été réalisés dans des tubes gris Vacutainer® avec comme anticoagulant du NaF/Oxalate de potassium. La préparation des échantillons de plasma a été identique pour tous les échantillons fournis.

Les échantillons de sang total alcoolisé proviennent également d'individus dont l'histoire médicale nous est inconnue. Ils ont été recueillis sur des tubes de type BD Vacutainer®, avec un anticoagulant de type fluorure de sodium et conservés à +4°C.

Tous les échantillons ont été conservés dans les mêmes conditions, à 4°C, au laboratoire.

3.4. Raman et alcool, sang et ses constituants

3.4.1. Alcool

Il nous est apparu nécessaire de vérifier tout d'abord que nous pouvions mesurer la concentration d'alcool dans un mélange simple tel qu'un mélange eau-alcool qui doit être comparable à un mélange avec alcool-plasma, le plasma étant essentiellement composé d'eau.

Le spectre de transmission de l'éthanol (cf. figure 10) montre des bandes d'absorption dans l'infrarouge proche et l'infrarouge moyen. La bande d'absorption au-dessus de 3 μm est attribuée à la vibration C-H et la bande d'absorption entre 2,8 et 3 μm est attribuée à la vibration OH. Les vibrations CH_3 , CO sont situées respectivement à 5 μm , 4 μm et non accessibles avec le spectromètre Brucker utilisé (limité à 4 μm).

Les spectres Raman de référence de l'éthanol pur sont obtenus pour les longueurs d'onde d'excitation 532 nm et 785 nm. (figure 11)

Après analyse des spectres, nous avons identifié les profils, les positions et les intensités de pics caractéristiques. On peut voir que les profils sont identiques mais que les intensités des spectres sont différentes pour les deux longueurs d'ondes utilisées. Ces spectres nous permettent d'identifier les signatures spécifiques de l'éthanol (tableau 2), en particulier la raie à 893 cm^{-1} correspondant à la vibration du groupement C-C et qui semble être une signature possible de l'alcool avec la longueur d'onde 785 nm.

Il est également intéressant de noter les différences d'intensité entre les signatures Raman de l'alcool sous une excitation à 532 nm et à 785 nm. A 785 nm, les raies les plus intenses se situent dans les basses fréquences, notamment autour de 1000 cm^{-1} , soit autour d'une longueur d'onde de 850 nm. A 532 nm, les raies les plus intenses sont au contraire dans les hautes fréquences, autour de 2900 cm^{-1} , soit autour d'une longueur d'onde de 630 nm. Ces deux plages de réponse Raman de l'éthanol se situent dans la fenêtre de transparence de la peau.

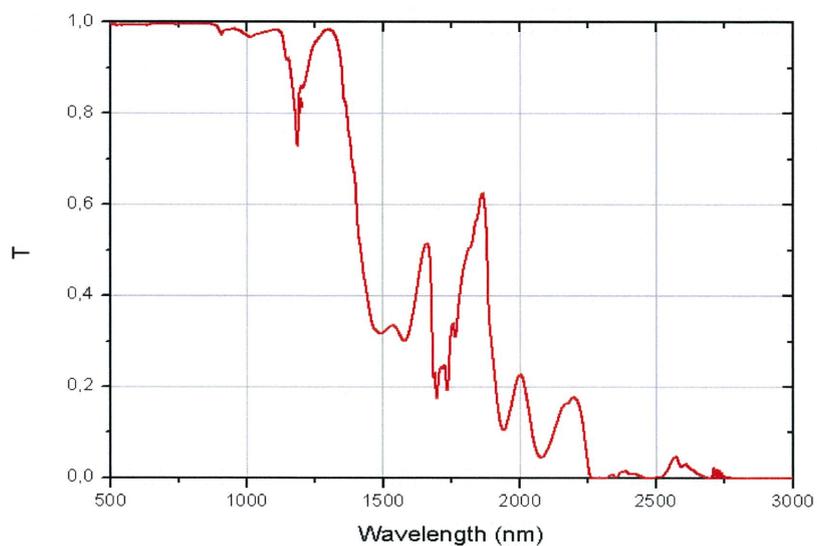


Figure 10 : Spectre de transmission de l'éthanol (cuve 1 mm)

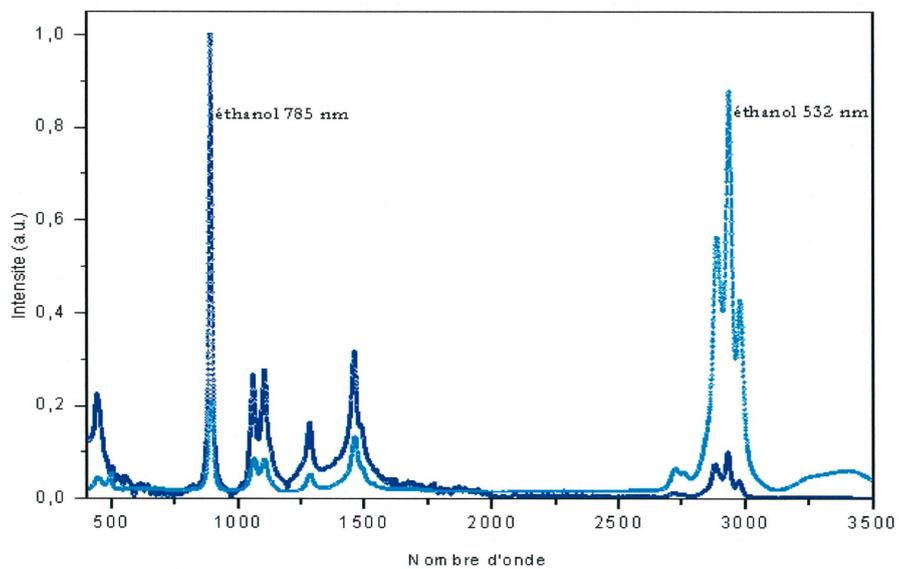


Figure 11 : Spectre Raman de l'éthanol pur (longueurs d'onde 785 nm et 532 nm)

Tableau 2 : Fréquences Raman associées aux modes des vibrations de l'éthanol

Fréquence Raman (cm ⁻¹)	Modes de vibration
893	C-C
1061	C-O
1104	CH ₃
1285	CH ₂
1462	CH ₃
2887	CH ₂
2942	CH ₃
2984	CH ₃

Pour tester la capacité de la technique Raman à la détection de l'alcool, différents essais ont été menés dans des mélanges eau-alcool à différentes concentrations et dans différentes boissons alcoolisées. Les raies caractéristiques de l'alcool ont pu être identifiées.

3.4.2. Signatures Raman de produits sanguins

Les premières études ont été faites sur des échantillons de sang total sans alcool, essentiellement afin de définir le protocole optimal de mesure (choix de configuration, influence des constituants, temps d'exposition, longueurs d'onde d'excitation) pour ensuite étudier et appliquer ces protocoles à des échantillons cliniques d'alcoolémie contrôlée. Le but de ces mesures est aussi d'obtenir des indications sur la signature Raman de composants sanguins.

La figure 12 montre les spectres du sang humain établis avec deux longueurs d'onde différentes, à savoir 532 et 785 nm, à travers une cuve de quartz.

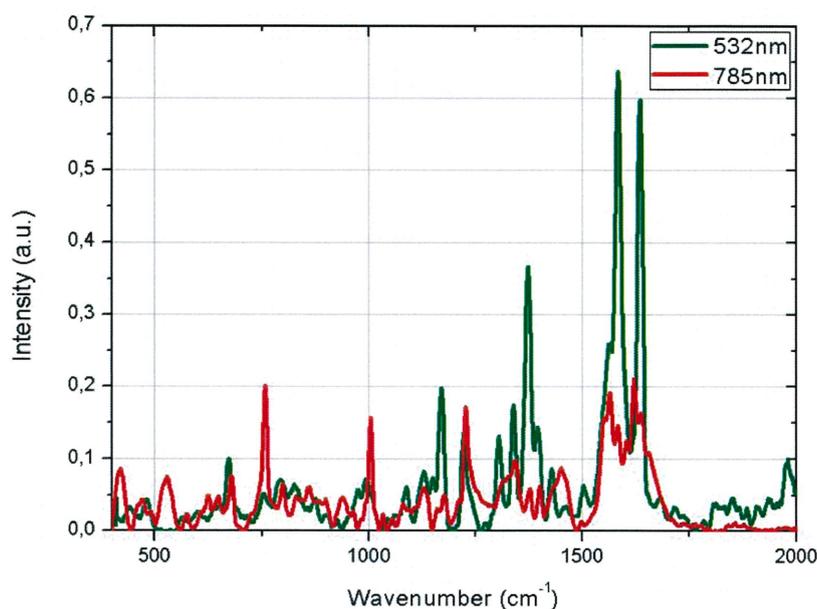


Figure 12 : Comparaison des spectres Raman du sang total réalisés à 532nm (30mW, temps d'intégration de 5s) et 785nm (100mW, temps d'intégration de 30s). La ligne de base des spectres a été post-traitée afin de supprimer la fluorescence.

On remarque que d'une part les spectres sont différents mais surtout que les spectres obtenus avec la longueur d'onde de 785 nm sont plus bruités et de plus faible intensité, en tenant compte du temps d'intégration supérieur. C'est une des raisons qui nous a amené à utiliser la longueur d'onde 532 nm pour les mesures des échantillons avec alcool dans nos premières analyses. Ces études nous ont permis de dresser un tableau des raies Raman des différentes vibrations du sang (tableau 3).

Tableau 3 : Fréquences Raman associées aux modes de vibration dans le sang sur le domaine spectral [500cm⁻¹, 3500cm⁻¹]

Fréquence Raman (cm ⁻¹)	Intensité à 532nm (u.a)	Constituants
715	peu intense	Tryptophane
828	peu intense	Tyrosine
1033	peu intense	Phénylalanine
1205	moyennement intense	Glucose, Amides, Tyrosine
1407	intense	Phénylalanine, Hème
1615, 1666	intense	Hème
2163, 2368, 2710	peu intense	-
2957	moyennement intense	C-H ₂
3196	intense	C-H ₂ et C-H ₃
3243, 3294	intense	C=C-H

Les signatures Raman du sang sont conformes à ce que l'on trouve dans la littérature, nous permettant d'identifier les raies Raman mesurées. De même, nous avons réalisé les spectres du plasma humain (figure 13) et ceux-ci sont comparables à ceux publiés dans la littérature [18].

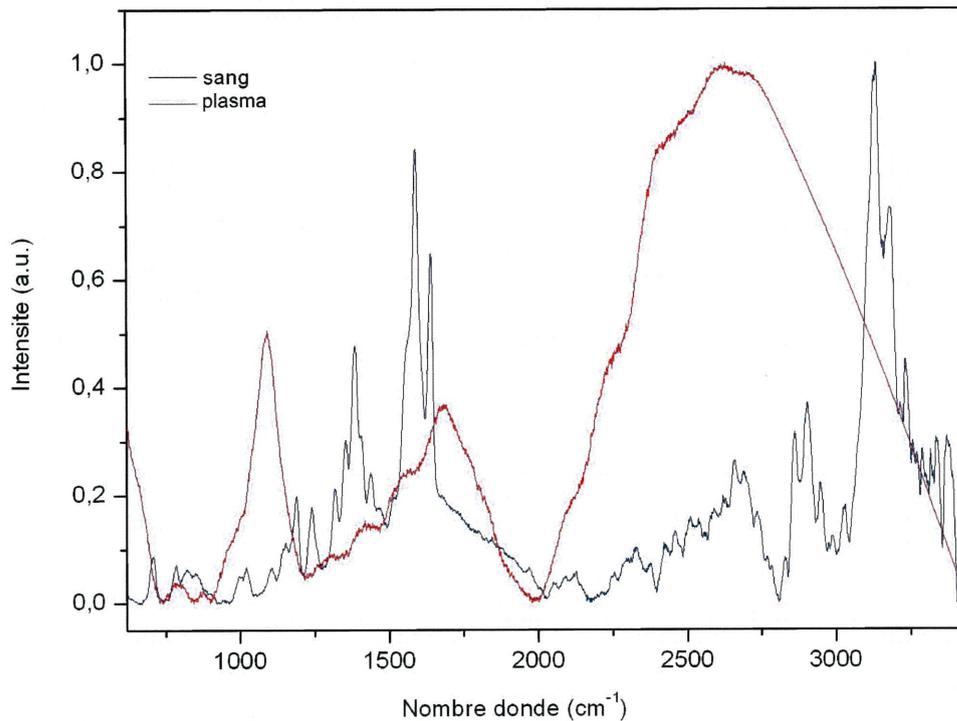


Figure 13 : Spectre Raman de plasma humain sans alcool (échantillon clinique) (532 nm, 1 s) en comparaison avec celui du sang humain sans alcool.

La comparaison entre ces spectres du sang et du plasma (figure 13) montre un spectre Raman du sang beaucoup complexe dû à ses différents constituants (globules rouges, protéines, etc.). Dans le plasma les composants les plus importants en concentration et les plus nombreux sont les protéines plasmatiques. Nous avons déterminé les contributions spectrales des protéines. Le but de notre travail est de trouver et de séparer les signatures de l'alcool de celles des protéines.

3.4.3. Cas des mélanges de sang et d'alcool

Le but de cet analyse est :

–d'une part, isoler les spectres des différentes espèces chimiques présentes dans le mélange, chaque espèce étant identifiée de façon unique par sa signature spectrale. Le mélange ou la réaction chimique peuvent donc être caractérisés par leur composition chimique ou par l'évolution des espèces présentes.

–d'autre de part, quantifier les concentrations de chaque espèce chimique. L'étude des intensités des spectres isolés des espèces chimiques pures faites dans le paragraphe précédent permet d'acquérir ces connaissances puisque les intensités des bandes spectrales d'un spectre sont directement reliées à la concentration des espèces dans le mélange.

A. Mélanges préparés alcool-sang

Pour ces mélanges alcool-sang réalisés au laboratoire, les échantillons ont été préparés en mélangeant 1 mL de sang total avec différentes concentrations d'éthanol en solution dans du plasma physiologique 0.9% NaCl.

Les spectres obtenus sur des échantillons de sang mélangés avec de l'alcool à différentes concentrations sont plus complexes que ceux de l'alcool préparés avec de l'eau. Les spectres à 532 nm sont de meilleure qualité, moins bruités et plus intenses malgré la fluorescence (figure 14).

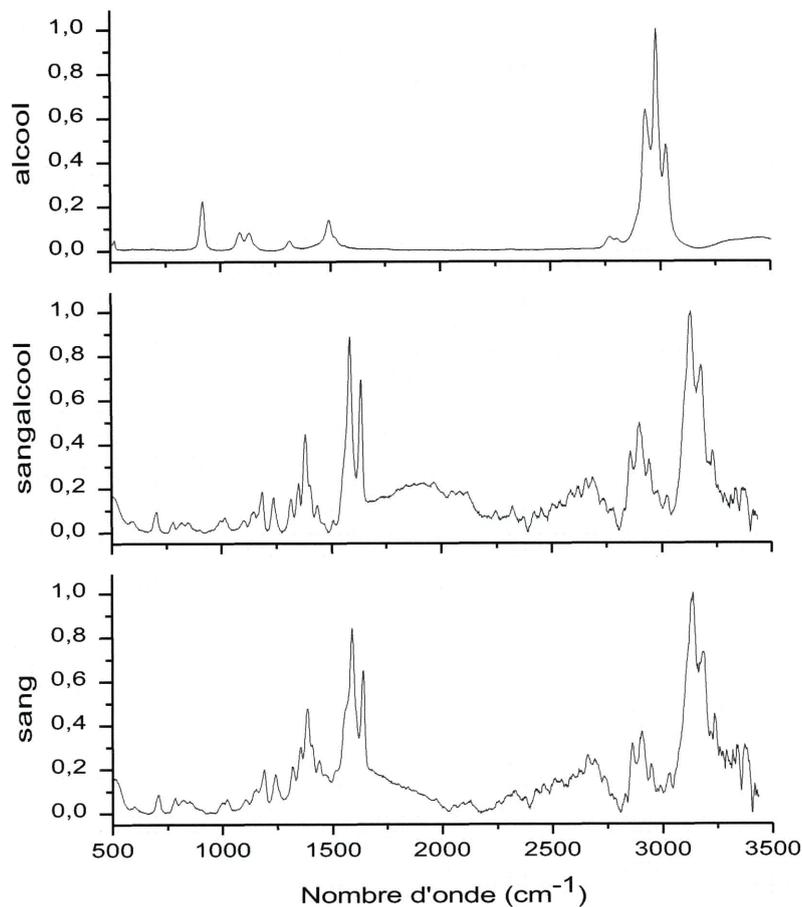


Figure 14 : Spectres Raman du mélange préparé sang + alcool
(longueur d'onde 532 nm, 50x, 25 s, dosage sur 2 ml)

On observe, dans la figure 14, la signature de l'alcool vers $(890-900) \text{ cm}^{-1}$ pour de grandes concentrations d'éthanol. L'analyse du spectre du sang total avec de l'éthanol nous montre deux domaines avec des changements importants : le domaine $(1500 - 2000) \text{ cm}^{-1}$ et la plage $(2500 - 3000) \text{ cm}^{-1}$. Les spectres Raman présentés dans la figure 14 mettent en évidence l'apparition de modifications significatives dans ces deux parties des nombres d'ondes. Ceci peut s'interpréter par la présence d'éthanol dans le sang.

De même, nous avons choisi d'utiliser dans nos caractérisations uniquement des ratios de pics pour d'une part s'affranchir d'éventuelles fluctuations de l'intensité (absorption, laser ...). D'autre part, cette méthode est beaucoup plus facile à modéliser et donc à intégrer dans un futur capteur.

Malgré la faiblesse du signal de l'alcool pour les faibles concentrations, nous pouvons obtenir à l'aide d'un ratio des bandes caractéristiques de l'éthanol et de celles de sang dans le domaine $(1000-1200) \text{ cm}^{-1}$ une méthode de caractérisation de ce mélange (figure 15).

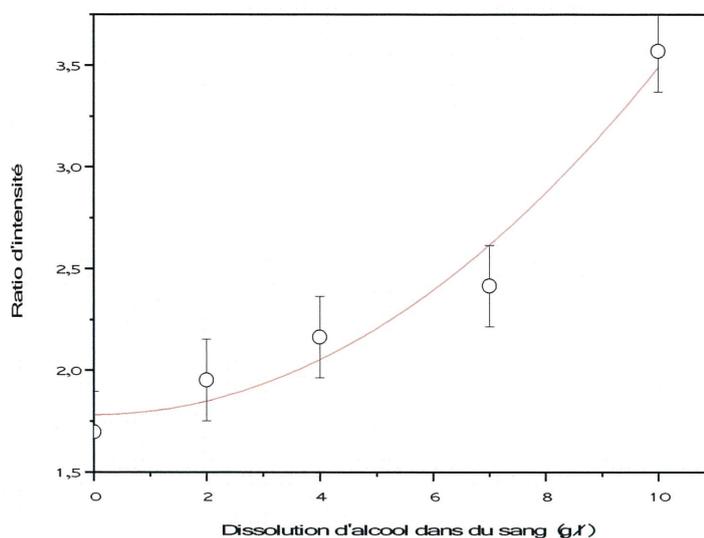


Figure 15 : Ratio de bandes spécifiques de l'éthanol et de celles de sang en fonction de la dissolution d'alcool dans du sang (532 nm, 1 sec)

Ce résultat montre la capacité de la technologie Raman pour le dosage rapide de l'alcool d'un mélange simple.

B. Produits sanguins humains cliniques

Les résultats présentés dans ce paragraphe sont divisés en deux grandes sections : B.1 les mesures et résultats sur les échantillons de plasma alcoolisés et B.2 les mesures et résultats sur les échantillons de sang total alcoolisés. Les réponses spectrales du plasma et du sang total étant différentes, il est intéressant de montrer si des indicateurs d'alcool existent pour ces deux milieux. De même, si ils existent, sont ils identiques ou fonction du milieu étudié.

B.1. Plasma alcoolisé

B.1.1. Indicateurs de la présence d'alcool

Il est intéressant de remarquer avant toute mesure que la couleur et la texture des échantillons de plasma varient beaucoup d'un échantillon à l'autre (figure 16). Contrairement aux échantillons de

sang total, où il est difficile de différencier visuellement deux échantillons, les différences visibles entre les échantillons de plasma montrent des différences optiquement remarquables entre les individus. Cette variation relative de couleur et de texture est notamment fonction de la présence de bilirubine, dont la concentration est propre à chaque individu, et de traces d'hémoglobine due à l'action de l'anticoagulant sur les cellules sanguines.



Figure 16 : *Échantillons cliniques de plasma alcoolisé.*

Les tests ont été réalisés sur 3 séries d'échantillons de plasma fournies par Bonsecours à trois mois d'intervalle avec une concentration en alcool comprise entre 0 et 4 g/L.

Les spectres de transmission d'échantillons représentatifs sont présentés figure 17. Les deux bandes d'absorption entre 500 et 600 nm sont dues à l'hémoglobine oxygénée. Par exemple, les échantillons 4 et 12 ont une couleur rougeâtre due à la présence d'hémoglobine et ils possèdent effectivement les bandes d'absorption les plus intenses.

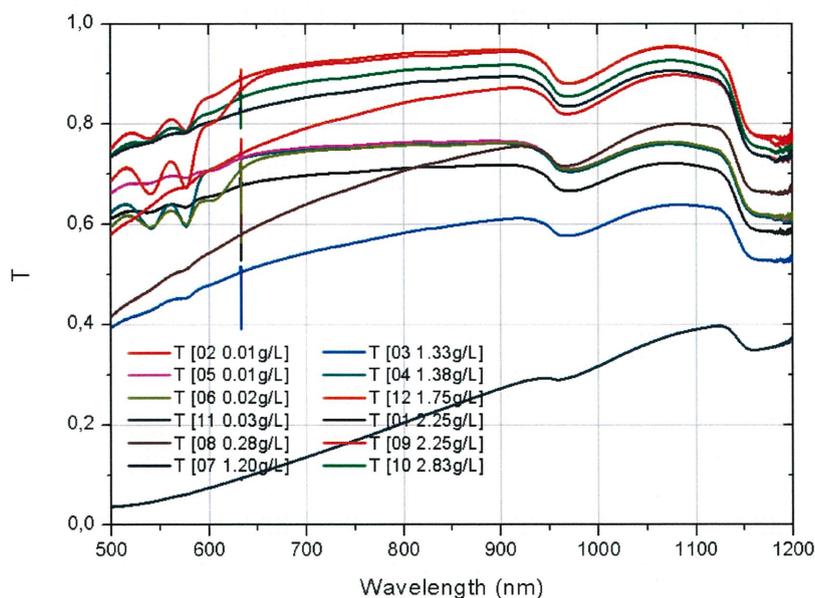


Figure 17 : Spectre de transmission des échantillons cliniques de plasma alcoolisé. La légende fait apparaître le numéro d'échantillon suivi de la quantité d'alcool dosée par chromatographie

En figure 18, nous donnons les spectres Raman mesurés à 532 nm des échantillons de plasma, d'éthanol et d'un échantillon clinique de plasma de forte alcoolémie (4 g/L).

Nous observons un changement important dans le domaine autour de 3000 cm^{-1} , correspondant à la partie due aux vibrations des protéines du sang. La diminution de ces bandes est liée à la modification du plasma en raison de la présence d'alcool. Nous nous sommes donc focalisés sur la partie du spectre entre 800 et 2000 cm^{-1} (figure 18).

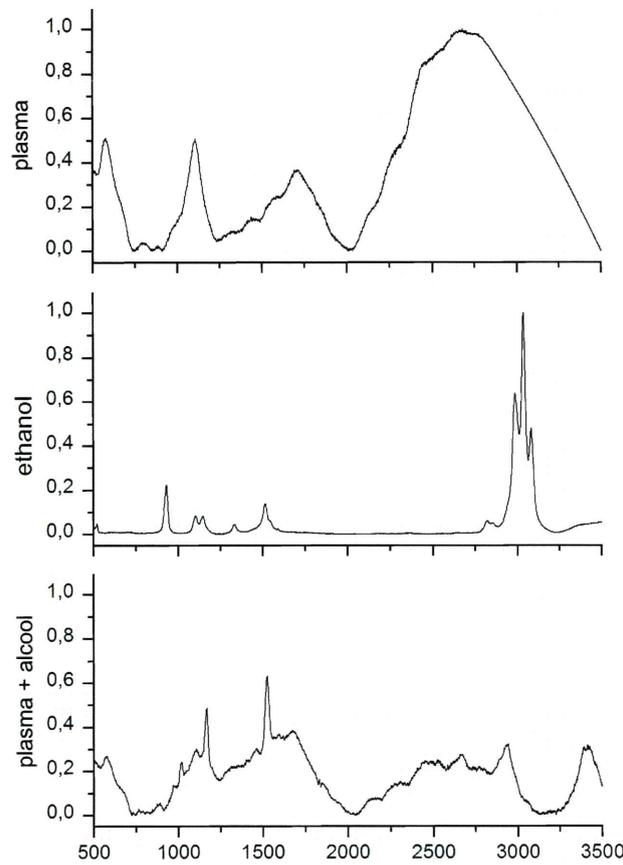
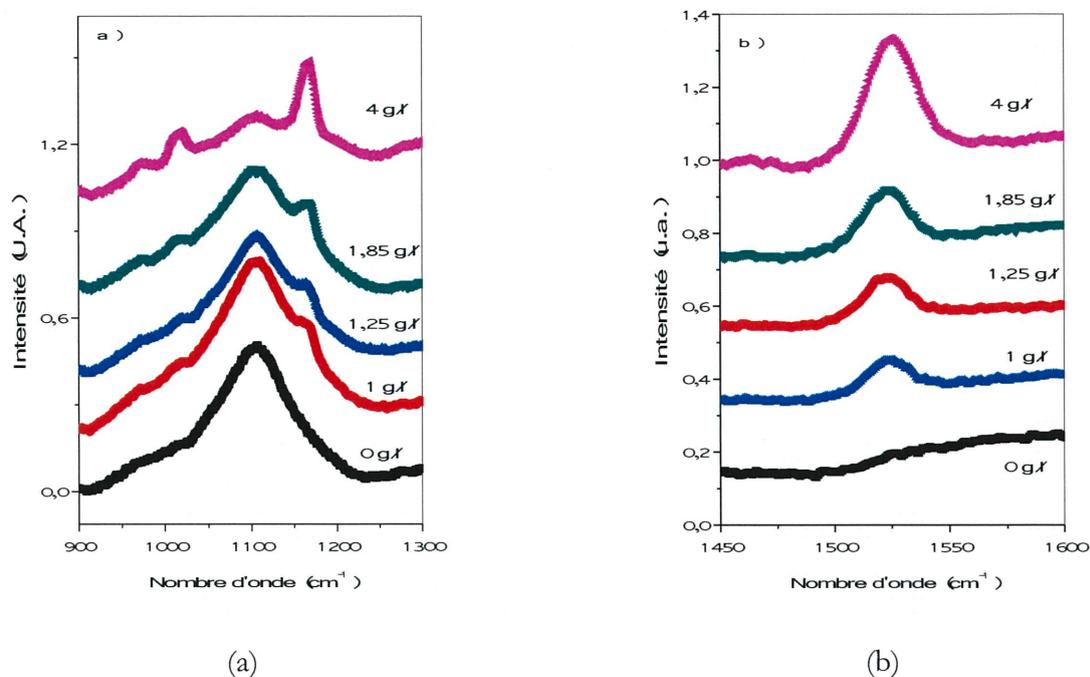


Figure 18 : *Spectre Raman de plasma avec alcool (échantillons cliniques) (532 nm, 50x, 25 s, dosage sur 2 ml), comparé aux spectres du plasma et de l'éthanol seul*

Nous observons (figure 19) un changement significatif du spectre des échantillons contenant de l'alcool, en particulier vers les raies 1017, 1168 et 1525 cm^{-1} . La raie 1168 cm^{-1} (figure 19a) est proche de la raie 1165 cm^{-1} de l'acétaldéhyde [27], et n'existe pas dans le spectre du plasma non alcoolisé. De plus, nous pouvons observer que l'intensité de la raie vers 1522 cm^{-1} (figure 19b) est modifiée en fonction de la concentration d'alcool. L'évolution de l'intensité de cette raie avec l'alcool présent dans le plasma, comme le montre la figure 20, permet d'évaluer avec une bonne sensibilité la concentration d'alcool dans le plasma et ceci sur des échantillons cliniques. Ce pic non présent dans le plasma non alcoolisé est donc spécifique à l'alcool, et détectable par Raman.



(a) (b)
Figure 19 : Deux parties du spectre Raman de plasma avec alcool (échantillons cliniques) pour différentes concentrations d'alcool, comparés au spectre du plasma seul (532 nm, 50x, 25 s, dosage sur 2 mL)

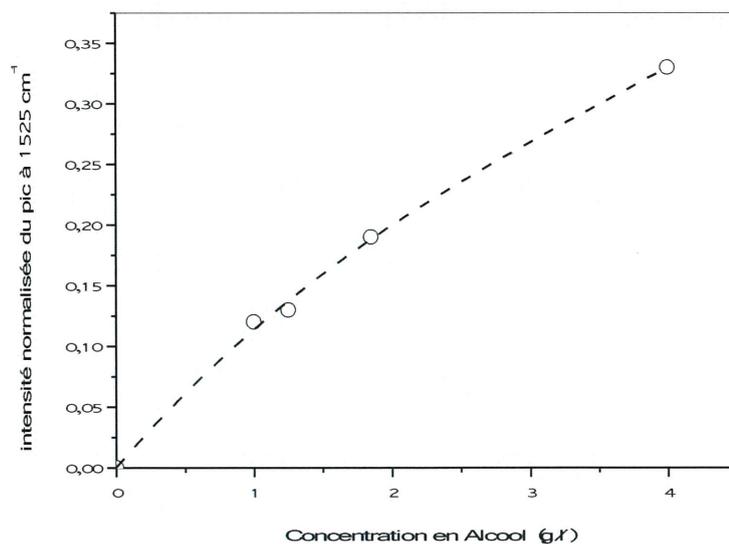


Figure 20 : Intensité normalisée de la bande à 1525 cm⁻¹ en fonction d'échantillons cliniques de plasma de personnes avec des alcoolémies connues

On a donc considéré comme indicateurs d'alcool présent dans du plasma les raies:

- à 1100 cm^{-1}
- à 1168 cm^{-1} , potentiellement de l'acétaldéhyde
- à 1525 cm^{-1} , potentiellement de l'éthanol

A noter que se référencer à un métabolite, tel que l'acétaldéhyde, n'est pas conseillé pour un dosage d'alcool puisque sa présence peut résulter d'une prise médicamenteuse indépendante de l'absorption ou non d'alcool. C'est pourquoi l'indicateur le plus fiable par rapport aux raies observées est la raie à 1525 cm^{-1} .

B.1.2. Reproductibilité de la méthodologie

Au cours des différentes expériences menées sur les échantillons, des difficultés ont été rencontrées. En effet, ceux-ci se dégradent rapidement et cette dégradation nous a empêché une étude fiable de reproductibilité de nos résultats, et ainsi de confirmer de façon certaine les signatures observées sur le plasma.

Les trois séries d'échantillons ont été étudiées à 532 nm . Comme l'ont montré nos précédentes mesures, une partie des échantillons possèdent des indicateurs significatifs de la présence d'alcool. Par contre, certains échantillons ont montré des spectres difficilement exploitables. Par exemple, les spectres Raman bruts de quelques uns de ces échantillons sont donnés figure 21. Ces spectres Raman bruts, mesurés dans les mêmes conditions, montrent une fluorescence marquée toujours fonction de l'échantillon et surtout des différences dans les amplitudes des signatures Raman. Certains échantillons ne montrent étonnamment aucune raie caractéristique, par exemple l'échantillon sans alcool ($0,01\text{ g/L}$) du spectre bleu.

De ces spectres, on peut tout de même distinguer 3 raies : 1005 cm^{-1} , 1158 cm^{-1} et 1515 cm^{-1} qui sont présentes sur les spectres avec et sans alcool. Ce qui ne correspond pas aux résultats de la figure 19 où la raie autour de 1525 cm^{-1} était identifiée comme signature de l'alcool. Or dans la figure 21 elle apparaît également dans des échantillons avec un taux d'alcool quasi nul. De plus, la raie fine à 1168 cm^{-1} qui était attribuée à l'acétaldéhyde n'apparaît pas pour ces échantillons.

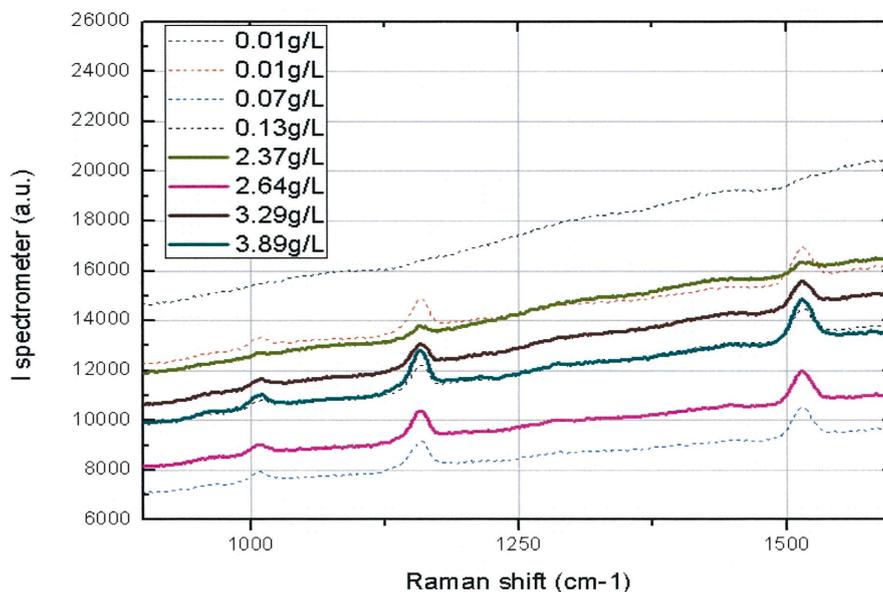


Figure 21 : Spectres Raman bruts de plasma avec alcool.
Réseau 1200 traits/mm – objectif 50x – 1s – moyenne sur 15 acquisitions – $P_{532nm} = 30mW$.

Les spectres Raman post-traités de certains échantillons sont aussi présentés figure 22. Le spectre Raman de l'éthanol a également été ajouté afin d'avoir une référence sur les positions approximatives des raies caractéristiques de l'alcool.

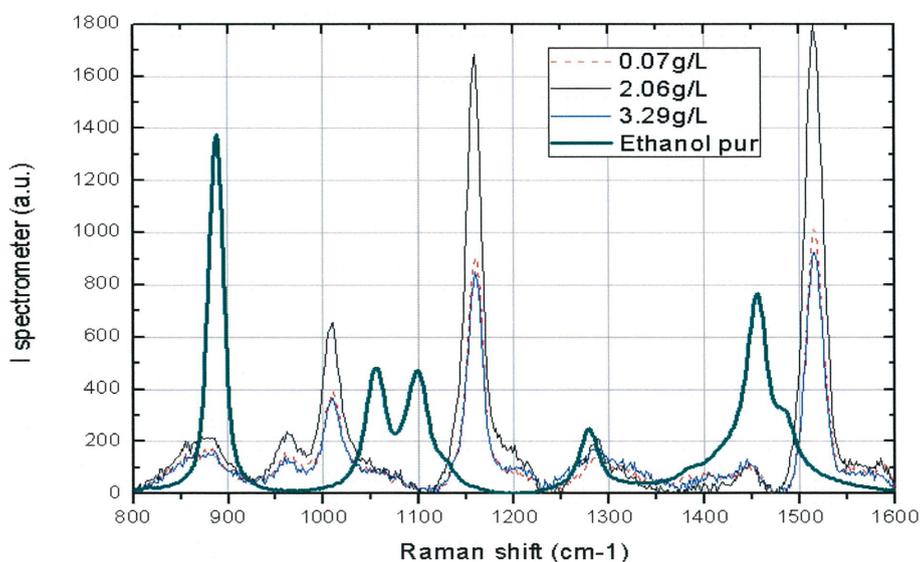


Figure 22 : Spectres Raman de plasma avec alcool, 2^{ème} série d'échantillons, après apodisation.
Réseau 1200 traits/mm – objectif 50x – 1s – moyenne sur 15 acquisitions – $P_{532nm} = 30mW$.

L'échantillon montrant les raies les plus marquées est celui pour une alcoolémie de 2,06 g/L. Les spectres à 0,07 g/L et 3,29 g/L sont très proches. Après des essais de normalisation sur chacune des raies, aucune corrélation entre la présence d'alcool et les signatures Raman n'a pu être mise en évidence. Aussi, le spectre de l'éthanol pur ne montre pas de concordance particulière avec une raie des spectres d'échantillons alcoolisés. Même après apodisation, c'est-à-dire un traitement de la ligne de base de part et d'autre des raies Raman, et normalisation, aucun signal ne peut être corrélé à la présence d'alcool.

Des mesures à la longueur d'onde de 785 nm dans des cuves de quartz montrent, pour certains échantillons, des spectres également peu exploitables avec des intensités mesurées très faibles malgré un temps d'acquisition long comme le montre la figure 23.

Les spectres obtenus à 785 nm sur du plasma présentent un rapport signal/bruit encore plus faible que le rapport obtenu pour les spectres présentés figure 12. Aussi, il n'y a pas de différence visible entre la présence ou non d'alcool même en quantité importante. Sur certaines séries de mesures, le signal Raman est si faible qu'il est difficile de retrouver les spectres du plasma/sang de la littérature à 785 nm. Une des causes est un problème lié à la puissance laser sur échantillon, due à la tête Raman à 785 nm acquise pour ce projet. Ce problème matériel a été confirmé par Horiba Jobin Yvon. La perte de 90% de puissance laser entre la sortie laser fibrée, environ 200 mW, et la puissance en sortie de tête Raman est anormale. Ceci a également été accompagné d'un problème d'obturateur découvert dans les derniers mois du projet.

Il est possible que ce manque de puissance sur l'échantillon soit la cause du manque de corrélation entre nos mesures et celles recensées dans la littérature à 785 nm où souvent les puissances sur échantillons de plasma/sang sont importantes, jusqu'à 200 mW.

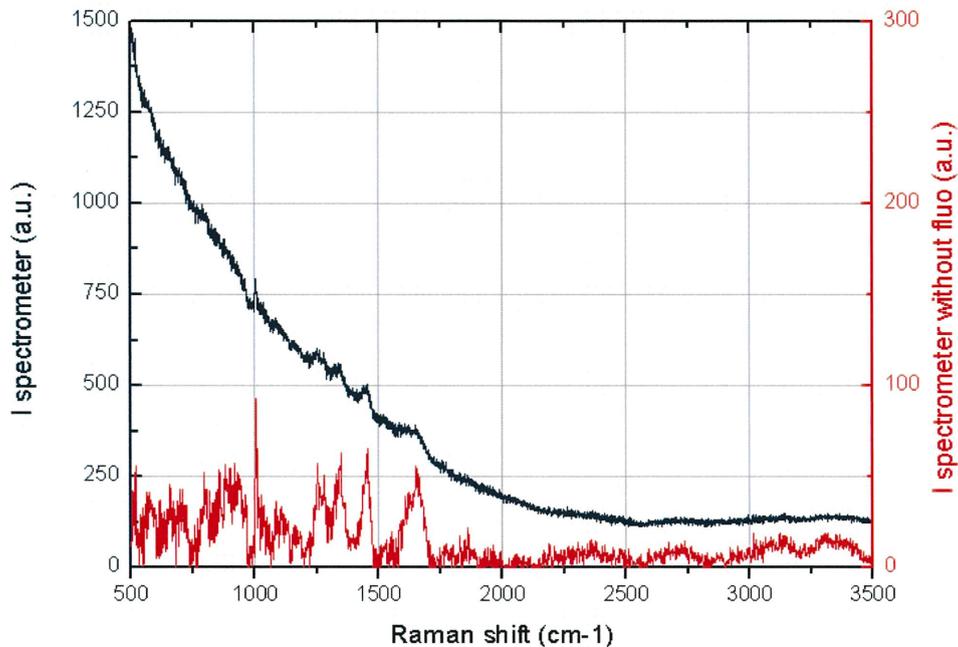


Figure 23 : Spectre Raman d'un échantillon clinique de plasma alcoolisé (1,75g/L) à 785nm.
Réseau 1200 traits/mm – objectif 50x – 60s – $P_{785nm} = 22mW$.
Spectre Raman brut (bleu) et spectre avec correction de la ligne de base (rouge).

A retenir pour ce paragraphe :

- La nature ou l'état d'un échantillon biologique est lié à sa composition chimique et la spectroscopie Raman permet de déterminer la signature spectrale liée à cet état. Pour un individu donné, les concentrations relatives des constituants du sang évoluent au cours du temps. Aussi, certains composés peuvent apparaître ou disparaître sur une période donnée en fonction du comportement de l'individu : prise ponctuelle de médicaments, régime alimentaire, etc. De même, pour nos échantillons sanguins, considérés comme des systèmes « vivants » à cause leur d'évolution en temps, l'information spectrale est donc variable et peut être masquée par leur variabilité inhérente.
- Nous avons extrait des indicateurs de la présence d'alcool dans le cas de différents échantillons de plasma. La méthode sur échantillons prélevés est limitée du fait de la variabilité des échantillons et de leur évolution au cours de temps.

B.2. Sang total alcoolisé

B.2.1. Indicateurs de la présence d'alcool

Les échantillons de sang total (figure 24) sont fournis par l'Hôpital Bel Air de Thionville. La technique chromatographique est utilisée pour connaître l'alcoolémie dans ces échantillons.

L'hôpital nous a fourni des échantillons de sang total dans des tubes contenant du NaF comme anticoagulant, avec des taux d'alcool entre 0 et 4 g/L. Ces échantillons sont conservés un an par l'hôpital à 4°C, ceci pouvant entraîner une faible diminution du taux d'alcool de l'ordre de 0,1 g/L.



Figure 24 : Échantillons cliniques de sang total alcoolisé.

La figure 25 montre les spectres d'absorption des échantillons de sang total dans le visible et proche IR. Quatre larges bandes d'absorption sont présentes. La bande à 500 nm est en partie due à l'hémoglobine oxygénée et à l'hémoglobine désoxygénée. Une bande d'absorption entre 800 et 1000 nm est également présente dans les spectres de transmission des échantillons de plasma (figure 17) et sont attribuées à des protéines. Les larges bandes d'absorption autour de 1450 nm, 2000 nm et 2500 nm ont pour origine les vibrations de la liaison OH de l'eau [1].

Un exemple de spectres Raman à 532 nm brut et corrigé d'un échantillon de sang total alcoolisé est donné figure 26.

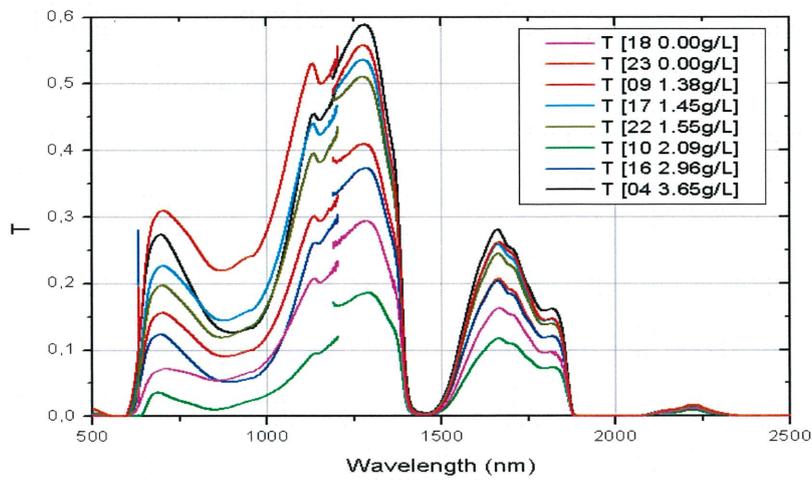


Figure 25 : Spectre de transmission des échantillons cliniques de sang total alcoolisé. La coupure des spectres à 1200nm est due au changement de configuration source/détecteur du spectromètre. La légende fait apparaître le numéro d'échantillon suivi de la quantité d'alcool dosée par chromatographie.

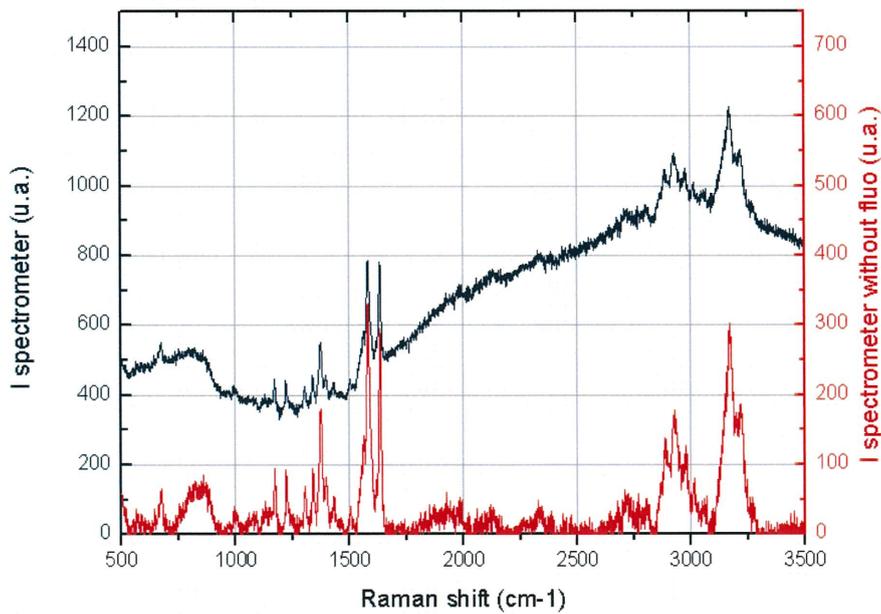


Figure 26 : Échantillon clinique de sang total alcoolisé (2,45g/L) à 532nm.
Réseau 1800 traits/mm – objectif 50x – 20s – $P_{532nm} = 30mW$.
Spectre Raman brut (bleu) et spectre avec correction de la ligne de base (rouge).

La réponse Raman du sang total est bien plus riche que celle du plasma. Sa fluorescence est moindre, à puissance laser égale, que celle mesurée sur les échantillons de plasma. Cet effet est lié à une absorption plus importante et à des phénomènes d'extinction de la fluorescence dus au nombre important de composés présents dans le sang total. De ce fait, des acquisitions sur 20 s ont été possibles sur le sang total alors qu'une acquisition de quelques secondes saturer le spectromètre pour les échantillons de plasma. En comparant les spectres de sang total alcoolisé et non alcoolisé il est difficile de mettre en évidence l'apparition de raies directement liées à l'éthanol. Ainsi, en comparant le spectre d'un échantillon de sang total alcoolisé par rapport à celui de l'éthanol, aucune raie ne semble se corrélérer à la présence d'alcool. Même si les trois raies de l'éthanol dans les hautes fréquences semblent correspondre, celles-ci sont présentes également dans tous les échantillons ne contenant pas ou peu d'alcool.

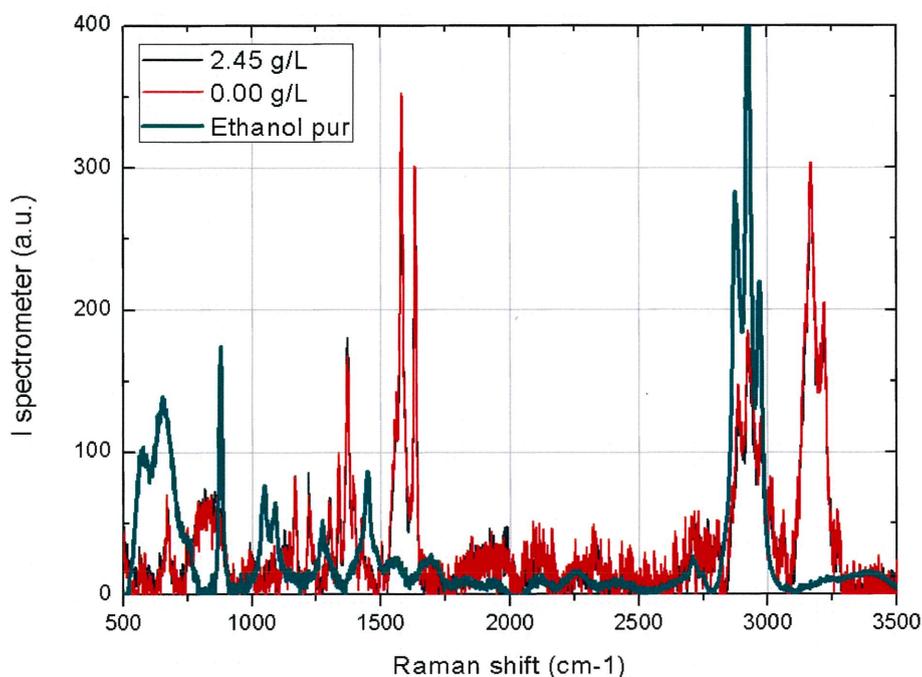


Figure 27 : Spectres Raman d'échantillons cliniques de sang total non alcoolisé et alcoolisé (2,45g/L) à 532nm.

Le spectre de l'éthanol pur est donné à titre indicatif.

Réseau 1800 traits/mm – objectif 50x – 20s – $P_{532nm} = 30mW$.

Spectre Raman brut (bleu) et spectre avec correction de la ligne de base (rouge).

Cependant, en réalisant une nouvelle apodisation, sur les deux raies principales dans les basses fréquences, 1580 cm^{-1} et 1634 cm^{-1} (figure 28), on remarque une évolution relative de ces deux raies qui est différentes suivant ou non la présence d'alcool.

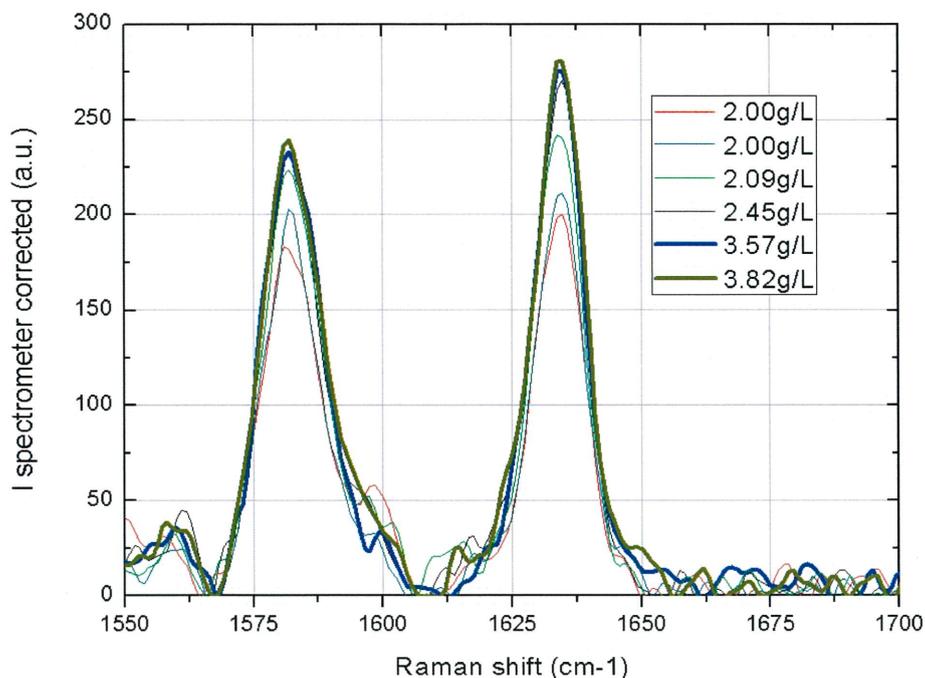


Figure 28 : Spectres Raman à 532nm des échantillons cliniques de sang total alcoolisé après apodisation autour des raies à 1580cm⁻¹ et 1634cm⁻¹. Réseau 1800 traits/mm – objectif 50x – 20s – P532nm = 30mW.

En calculant le rapport des intensités de ces pics, en comparant à un échantillon de sang total non alcoolisé, on note une évolution croissante en fonction du taux d'alcool (figure 29).

On détermine qu'un indicateur de la présence de l'alcool dans sang total peut être la variation relative des raies à 1580 cm⁻¹ et à 1634 cm⁻¹. Cet indicateur étant un rapport d'intensité de pics, il permet de s'affranchir de la variabilité de signature entre différents individus.

Les signatures spectrales du sang total à 785 nm ont également été mesurés. Comme il a été évoqué pour les spectres Raman de la figure 12, et de manière comparable aux spectres du plasma à 785 nm, ils sont peu exploitables du fait de leur faible rapport signal/bruit.

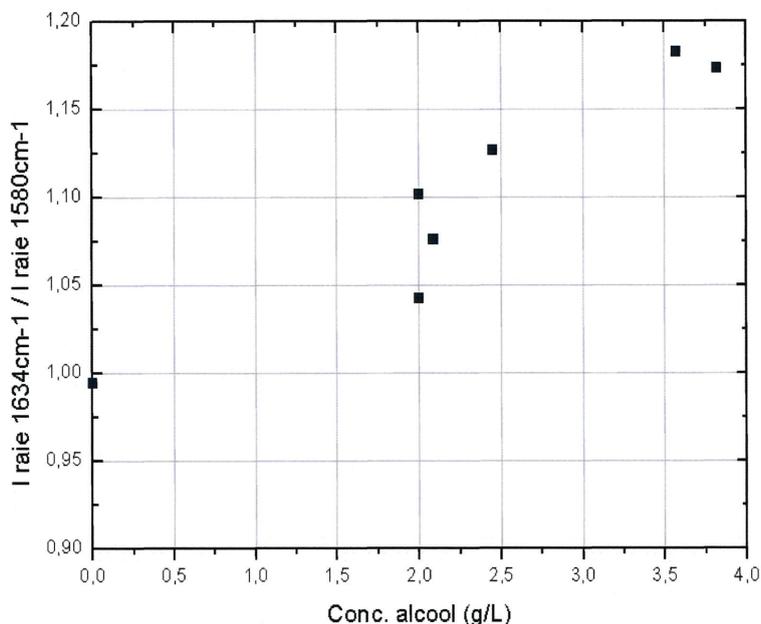


Figure 29 : Rapport d'intensité des raies à 1634 cm^{-1} et 1580 cm^{-1} en fonction de la concentration d'alcool dans les échantillons de sang total.

B.2.2. Reproductibilité de la méthodologie

Afin de vérifier si les signatures Raman trouvées sont réellement corrélées à la présence d'alcool et si celles-ci sont fiables, une nouvelle série de mesure a été réalisée sur ces mêmes échantillons trois semaines après les mesures précédentes de la figure 29. Les résultats sont présentés sur la figure 30.

L'évolution de cet indicateur est toujours fonction de la présence d'alcool, cependant les valeurs du rapport d'intensité ne sont plus les mêmes. La variabilité de ce rapport indique une évolution des échantillons et qu'une étude complémentaire sur les facteurs influençant cette variation est nécessaire dans le cas de l'utilisation de cet indicateur d'alcoolémie.

Aussi, comme il a été montré au B.1.2 pour les échantillons de plasma, certains échantillons montrent des spectres difficilement exploitables étant donnée leur faible réponse Raman. Pour ceux-ci, l'imprécision sur le rapport des raies est trop importante.

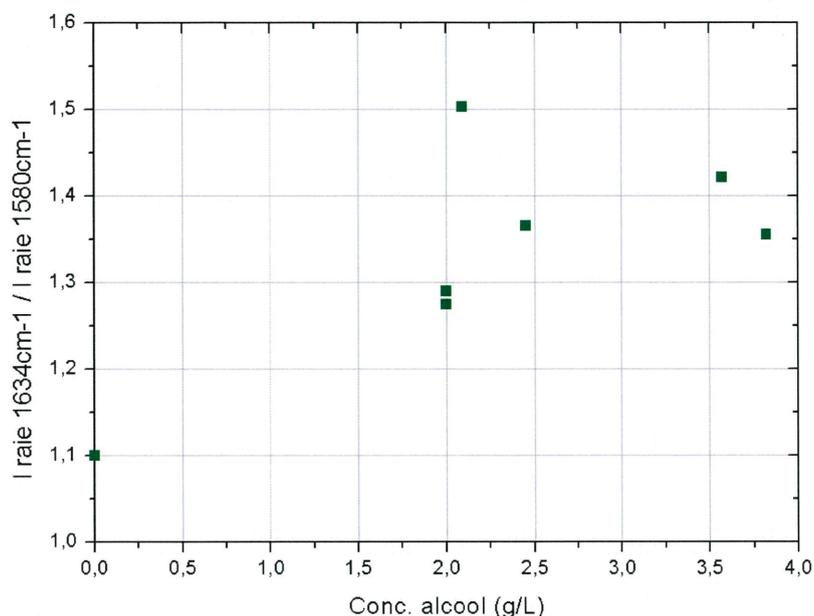


Figure 30 : Rapport d'intensité des raies à 1634 cm^{-1} et 1580 cm^{-1} en fonction de la concentration d'alcool dans les échantillons de sang total, trois semaines après les mesures de la figure 29.

A retenir pour ce paragraphe :

- Les résultats nous ont permis de montrer la possibilité de mise en évidence de modifications spectrales des échantillons en présence d'alcool.
- Nous avons comparé les signatures Raman de sang total alcoolisé pour trouver les indicateurs significatifs du taux d'alcoolémie. Les raies à 1580cm^{-1} et 1634cm^{-1} sont susceptibles d'être reliés à l'alcoolémie.
- Une analyse des signatures Raman sur plusieurs échantillons nous a montré que la reproductibilité de notre méthodologie est limitée par les facteurs suivants : individu, préparation des échantillons, vieillissement et dégradation des échantillons. Il est donc important de tenir compte de l'état d'échantillon pour son analyse.

3.4.4. Mesures in vivo

Ce paragraphe a pour but de présenter les études réalisées pour les mesures in vivo. L'étude « à travers la peau » est d'une telle complexité qu'elle nécessite un travail préalable sur l'utilisation de la technique Raman à travers une paroi de composition plus simple que la peau. Un travail de mesure de composants sanguins et d'alcool à travers des différents matériaux a donc été réalisé.

A. Étape préliminaire : la mesure à travers une paroi

La présence de la peau peut constituer une difficulté pour accéder à la détermination de l'alcoolémie. En effet, les constituants chimiques de la peau peuvent absorber une partie du signal ou avoir leur propre signal Raman et ainsi masquer le signal utile. Pour palier cette difficulté avant de passer sur des cas in vivo, et pour valider nos mesures, nous voudrions, comme il est fait en Allemagne dans le programme de détermination du glucose dans le sang, procéder à des mesures directement lors de prélèvements et de dons de sang à travers une tubulure plastique. Cette étape consiste à :

- mesurer le signal Raman du sang lors d'une transfusion à travers des tuyaux ou cathéters,
- ajouter de l'alcool dans le cathéter pour une mesure en ligne.

A.1. Essais à travers un tube de prélèvement

Des essais de mesures des spectres Raman du sang total à travers différents tubes de prélèvement ont été effectués : - à travers des tubes Vacutainer® contenant différents anticoagulants (figure 31a)
- à travers des tubes de prélèvement de l'hôpital de Thionville (figure 31b).

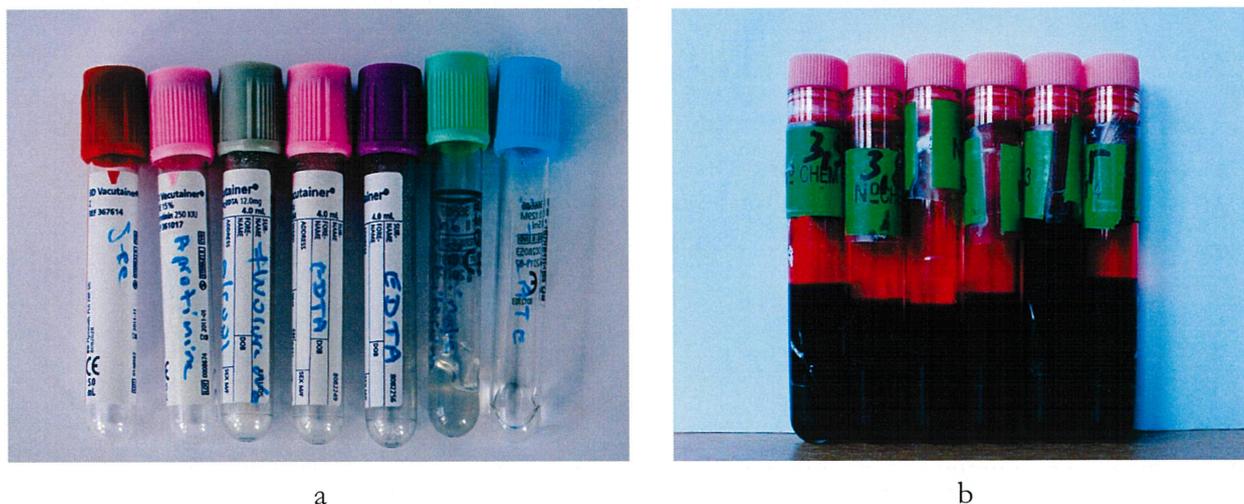


Figure 31 : (a) tubes Vacutainer[®], (b) des tubes de prélèvement de l'hôpital de Thionville.

Nous avons donc mesuré les spectres Raman du sang total à travers ces différents tubes de prélèvement. Le signal Raman du sang total a pu ainsi être mesuré à travers la paroi polymère. Le schéma de droite montre une coupe du tube et les points de focalisation du laser pour obtenir les deux spectres du polymère et du sang total à l'intérieur du tube.

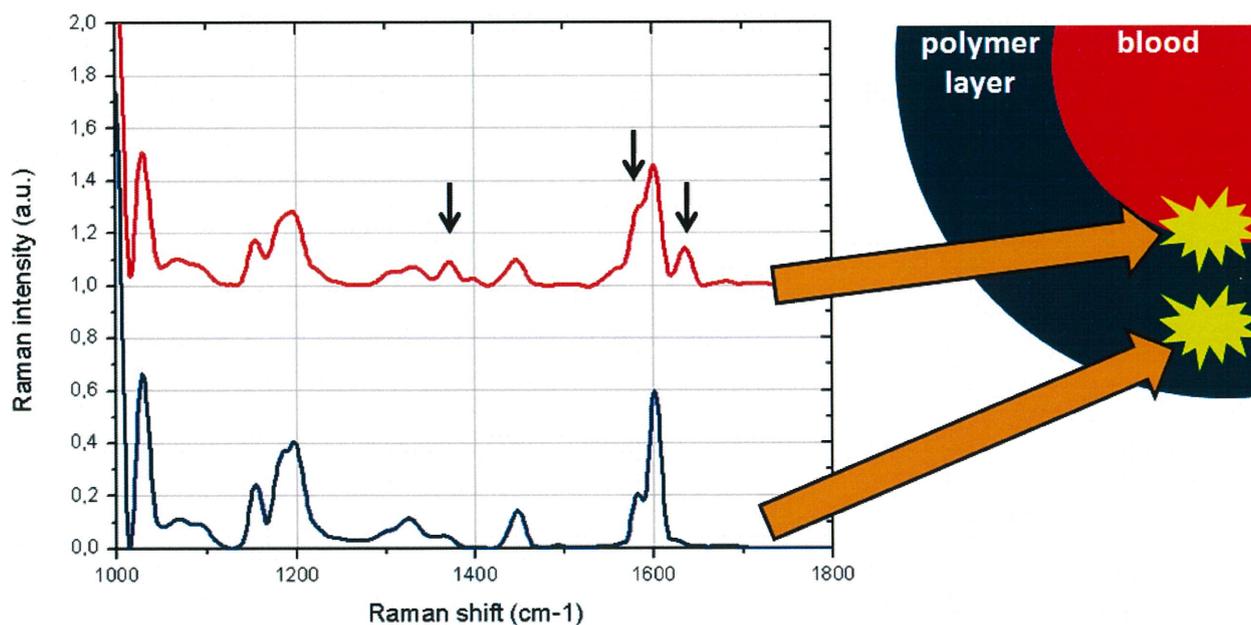


Figure 31 : Spectres Raman d'un tube Vacutainer[®] (bleu) en comparaison avec le spectre Raman du même tube contenant du sang total. Laser 532nm, 30mW, objectif de microscope 50x, temps d'intégration : 10s.

Les essais nous montrent que la technique est capable de discriminer efficacement les signatures des composants du sang à travers différentes parois.

La mesure Raman confocale, permettant d'avoir une résolution en profondeur, nécessite un positionnement précis de la tête Raman. La figure 32 montre la réponse Raman du sang total à travers la paroi d'un tube Vacutainer[®] suivant la pénétration du point focal laser.

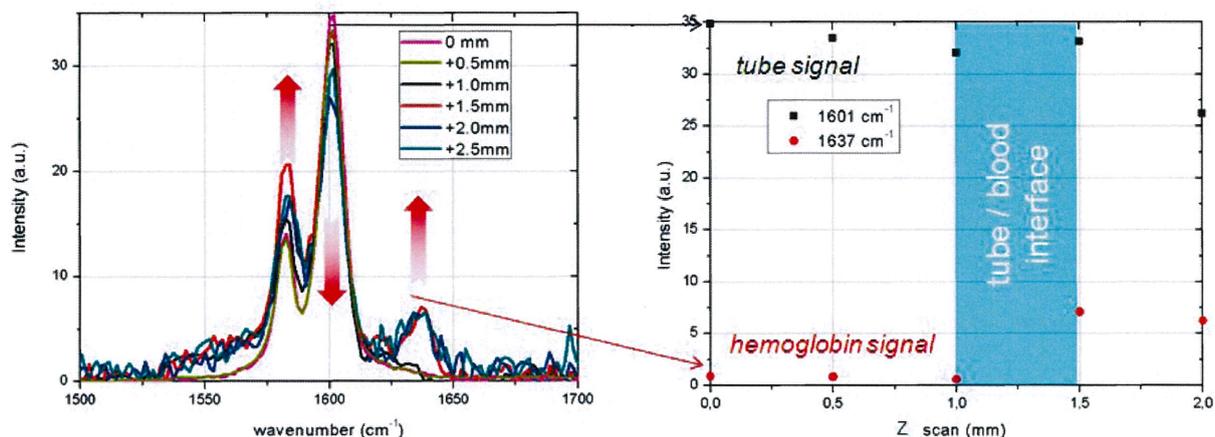


Figure 32 : Spectres Raman à l'interface tube Vacutainer[®] / sang total lors d'un scan en Z. A gauche, évolution du spectre Raman avec la pénétration du point de focalisation laser dans le tube. A droite, évolution d'une raie caractéristique du polymère (noir) et d'une raie caractéristique du sang total (rouge).
Laser 532nm, 20mW, objectif de microscope 50x, temps d'intégration : 10s.

Le raie polymère à 1600 cm^{-1} diminue lors de la pénétration du point focal et celle liée au sang total à 1637 cm^{-1} augmente. A l'interface, les deux signaux du sang total et du polymère coexistent. L'épaisseur de cette interface est fonction des propriétés optiques des matériaux et de la profondeur de champ d'analyse. Il faut noter également qu'au delà d'une certaine distance de pénétration le signal Raman du sang total diminue de façon drastique à cause de l'absorption. Il existe donc une zone idéale d'extraction du signal Raman du sang total, généralement de quelques dizaines de micromètres, située juste en-dessous de l'interface.

A.2. Essais à travers un tube cathéter

Des essais ont été menés pour montrer la faisabilité d'une mesure in vivo à travers un cathéter en plaçant des liquides statiques dans le tube. Un exemple de cathéter de débit 345 mL/min est présenté figure 33.



Figure 33 : Tube cathéter (a) avec l'aiguille d'insertion du tube dans la veine, (b) sans l'aiguille et avec la tubulure PVC branchée sur le cathéter.

Des mesures ont été effectuées à travers un tube cathéter de débit 345 mL/min contenant différents liquides en statique : de l'éthanol et du sang total. Les spectres en présence d'éthanol et de sang total sont présentés respectivement dans les figures 34a et 34b.

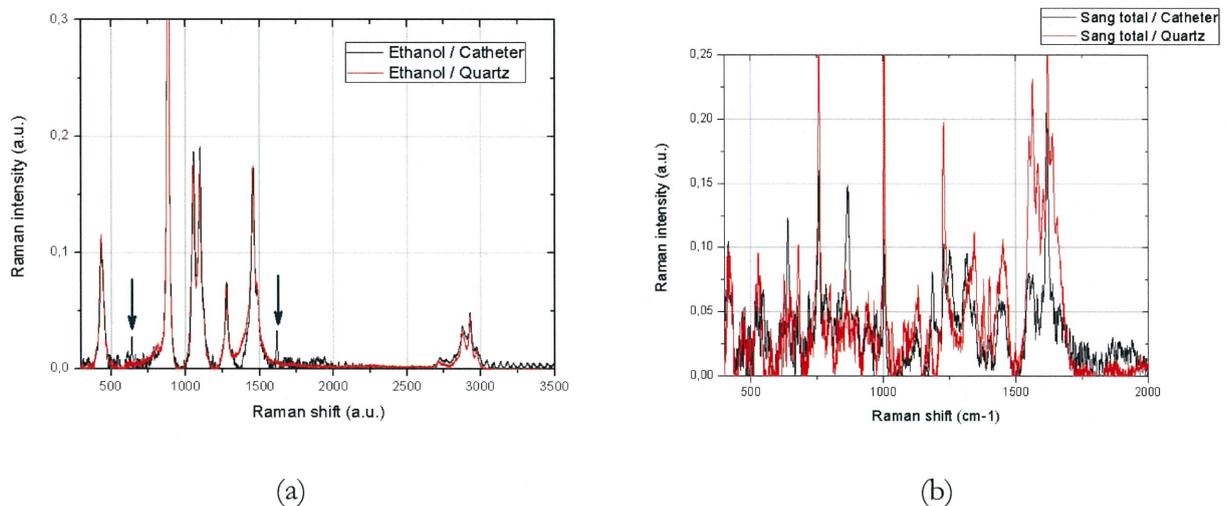


Figure 34 : Spectres Raman (a) de l'éthanol dans une cuve de quartz en comparaison avec le spectre Raman à travers le cathéter sans soustraction du spectre du polymère. Laser 785 nm, 110 mW, objectif $\times 50$, 10s; (b) de sang total dans une cuve de quartz en comparaison avec le spectre Raman à travers le cathéter avec soustraction du spectre du polymère. Laser 785 nm, 100 mW, objectif $\times 50$, 10s.

Ces mesures montrent qu'il est possible d'extraire à la fois le signal du sang total et de l'éthanol à travers la paroi du cathéter rendant possible une mesure pendant une transfusion. En effet, le résidu de la signal du polymère dans le spectre final est extrêmement faible et facilement supprimable.

La configuration de mesure à travers cathéter pendant une transfusion est présentée figure 35. Les résultats montrent qu'il est possible d'extraire le signal du sang total à travers le cathéter (figure 36).

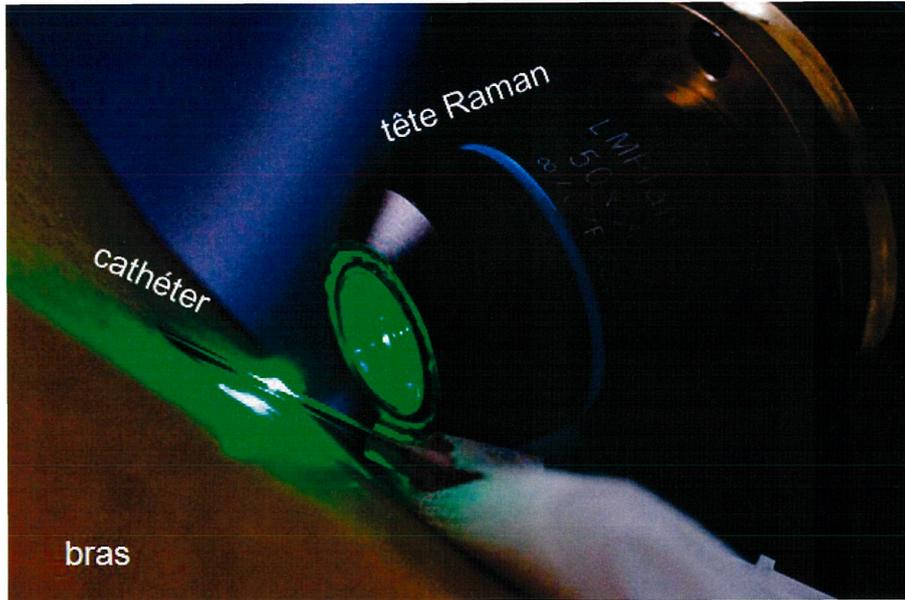


Figure 35 : Mesure du signal Raman du sang total à travers un cathéter pendant une transfusion.

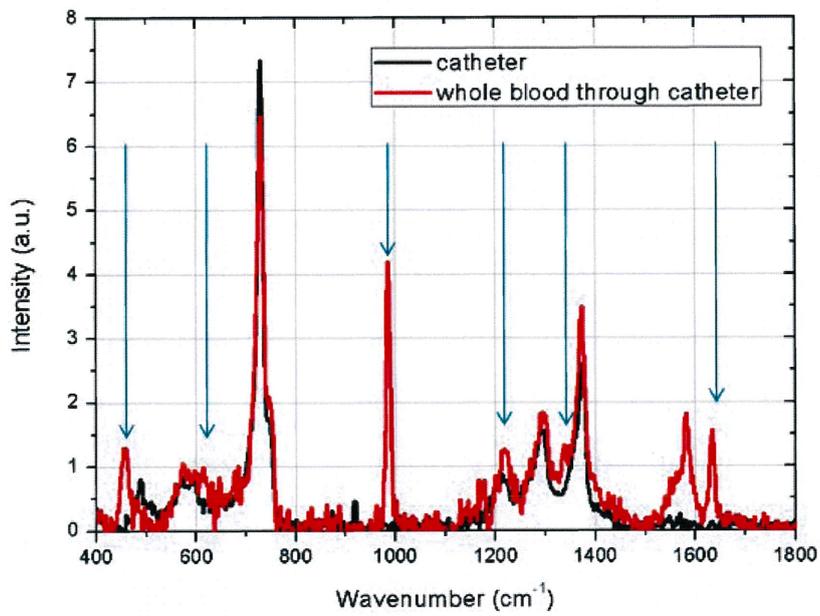


Figure 36 : Spectres Raman du cathéter (noir) et du sang total à travers le cathéter (rouge).
 Laser 532nm, 20mW, objectif $\times 50$, 10s.

B. Éléments de protocole pour des mesures in vivo à travers la peau

Les résultats décrits dans les paragraphes précédents montrent une faisabilité d'une détection du taux d'alcoolémie par spectrométrie Raman.

La principale limitation de la spectroscopie Raman in vivo réside dans les nombreux problèmes techniques à surmonter pour réaliser une instrumentation clinique. Les autres inconvénients sont liés aux risques de présence de signaux de fluorescence souvent très intenses dans les milieux organiques et aux risques d'altération (décomposition) des échantillons due à l'échauffement.

Le protocole de mesure in vivo doit tenir compte de :

- Densité de puissance limitée du laser : même si le laser utilisé est dans la fenêtre de transparence de la peau, une focalisation du laser peut être telle qu'elle entraîne des dommages irréversibles dans les tissus. L'utilisation d'une focalisation modérée est donc souhaitable, idéalement un faisceau parallèle serait plus simple d'utilisation, une puissance de quelques dizaines de mW à 785 nm peut ainsi être utilisée. Cependant, il est difficile d'extraire un signal exploitable sans focalisation.
- Essais sur animaux : un préalable à l'étude sur cobaye humain est à envisager. Le cochon possède une peau de structure et de composition proches de celle de l'homme. Par contre, nos mesures ont montré un spectre Raman du sang total du cochon et du sang total de l'homme bien différents. Ces essais ont donc leurs limites, ils peuvent démontrer une faisabilité pour extraire le signal du sang à travers la peau, mais ne peuvent être pris en considération pour l'étude des signatures Raman de l'alcoolémie chez l'homme.
- Essais sur des cobayes humains : un travail en amont de l'étude doit être effectué pour trouver un panel de cobayes dont l'historique médical est connu. Ce travail doit être fait en étroite collaboration avec des biologistes, avec implication de ces derniers dès le début du projet.

4. Conclusion et perspectives

1. Résumé des résultats les plus probants.

Cette étude a mis en évidence des différences significatives entre les spectres du plasma et du sang total du point de vue de leurs signatures Raman. Le plasma et le sang total possèdent des spectres Raman complexes dont les raies sont identifiées. L'étude sur échantillons a montré une variabilité du signal en fonction du temps due à l'instabilité des prélèvements sanguins. Elle a aussi indiqué que la présence d'anticoagulants n'interférait pas dans l'analyse des spectres.

Des signatures Raman de la présence d'alcool dans le plasma et le sang total ont été identifiées : signature directe (raie à 1525 cm^{-1}) pour le plasma, signature indirecte (raies à 1580 cm^{-1} et à 1634 cm^{-1}) pour le sang total.

Pour la longueur d'onde, il est difficile de faire un choix définitif. Même si 785 nm apparaît être comme le choix le plus raisonnable du point de vue de l'absorption faible, la piètre qualité des spectres obtenus laisse perplexe quant à l'utilisation de cette longueur d'onde pour un capteur d'alcoolémie. A 532 nm , les spectres obtenus sont de bien meilleure qualité avec des signatures spectrales exploitables

Mais nos résultats ne sont finalement pas à la hauteur de nos attentes. Nous avons été confrontés à divers problèmes « externes » : 1/ les performances pour le moins fluctuantes du matériel de spectrométrie Raman iHR destiné à effectuer les tests à 785 nm 2/ le changement de personnel post-doc recruté sur contrat en raison du congé maternité de Laura Unipan. 3/ l'impossibilité d'effectuer des tests in vivo en milieu hospitalier, et ce malgré la collaboration avec le CHR qui a fourni de nombreux échantillons.

Ces problèmes n'expliquent pas tout. Nous abordonsci-dessous des questions inhérentes à la problématique de l'étude et essayons de tracer quelques voies d'approche pour le futur.

2. Conclusion

Il nous est difficile de tirer des conclusions définitives sur la faisabilité d'utilisation d'une sonde Raman in vivo pour la détection d'alcool dans le sang. Nos résultats et notre sentiment sont en effet assez contradictoires. Si des résultats sur la détectabilité par spectrométrie Raman de la présence d'alcool dans le sang ou le plasma, peuvent être positivement mis en avant, il n'en pas moins vrai qu'ils ne sont pas suffisamment répétables et reproductibles pour en tirer une conclusion définitive. Le faible nombre d'échantillons cliniques disponibles rend difficile une appréciation de la répétabilité et de la reproductibilité.

Notre scepticisme repose sur plusieurs constats et problèmes.

Nous avons obtenu des signatures Raman de présence d'alcool dans le sang, mais ses indicateurs sont très divers : pic de l'éthanol, qui est la trace a priori la plus pertinente, pic de l'acétaldéhyde, trace liée à une transformation, mais susceptible de provenir aussi d'autres effets que celui de l'alcool, pics du sang affectés par la présence d'alcool, et là encore susceptibles de provenir d'autres effets inconnus a priori (ingestion médicaments, ...).

Par ailleurs, ces résultats dépendent des individus, et varient dans le temps. C'est vrai à la fois du sang même, mais aussi de l'interaction du sang avec l'alcool. Ceci affecte évidemment la reproductibilité et répétabilité des mesures, et donc la fiabilité des résultats. Une question importante qui n'a pu être abordée : celle du chemin inverse. Les signatures décelées et assignées à la présence d'alcool, peuvent elles avoir d'autres origines ?

Suite à notre étude se posent aussi des questions liées à la méthodologie.

Il paraissait indispensable de valider des techniques sur des échantillons, avant d'aborder des études in vivo. Or la définition même d'échantillons pose question dans ce type d'études. Sont-ils suffisamment significatifs d'une population ? En quoi peuvent-ils être considérés comme des échantillons-tests ? Les personnes sur lesquelles ces prélèvements ont été effectués n'étaient elles pas porteurs d'autres germes pouvant affecter le signal Raman du sang ?

Comment transposer des résultats sur des échantillons prélevés sur des expérimentations in vivo ?

Les mesures in vivo, pourtant l'un des objectifs de l'étude, n'ont pu être réellement abordés. Toutefois nous considérons que si la fiabilité des signatures est démontrée sur des populations suffisamment représentatives, le passage in vivo ne constituerait pas un obstacle important puisque la faisabilité de mesures à travers la peau, a été prouvée sur d'autres applications de sonde Raman à travers la peau, en particulier pour la détection du glucose [24].

Après le démarrage de notre étude, un brevet [25] a été publié sur le même objet. Cela démontre la pertinence de notre projet, et pourrait nous laisser quelques regrets. Toutefois la lecture de ce document ne fournit pas de réponses satisfaisantes à nos questions et nourrit encore davantage notre perplexité. Ce brevet et les divers publications des auteurs donnent peu de données sur les mesures, ces documents se concentrent sur le matériel de détection, à savoir une sonde Raman constituée d'un "bundle" de fibres optiques de collection du signal entourant la fibre optique du laser, et sur le traitement du signal. A notre connaissance, aucune démonstration sur une faisabilité in vivo a été démontré.

Quelle perspective ?

Nous estimons que même si nous n'avons pas réalisé la démonstration in vivo, nos résultats sont extrêmement positifs et peuvent être utilement repris par la Fondation Sécurité Routière. Si une telle étude est reprise ou prolongée il apparaît indispensable d'être désormais menée en milieu hospitalier, directement sur des patients qui soient représentatifs de la population. Ceci soulève de nombreuses questions du domaine de l'éthique et des réglementations.

5. Bibliographie

- [1] http://www.lpasteur.org/IMG/pdf/_TSMS.Cours.BH_.Chap1.-.I.-.Le.Milieu.interieur.pdf
- [2] Multicomponent blood analysis by near-infrared Raman spectroscopy, Berger A., Koo T.W., Itzkan I., Horowitz G., Feld M., 1999, *Applied Optics*, 38, 2919-2926.
- [3] Surface sensitive polarized Raman spectroscopy of biological tissue, Z. Smith and A. J. Berger, 2005, *Optics Letters*, 30(11): 1363-1365.
- [4] <http://www.yperion.net/content/section/5/39/lang,english>
- [5] La neurotoxicité de l'alcool, Hélène Ollat, 2004, *Neuropsychiatrie : Tendances et Débats* 2004 ; 24 : 25-29.
- [6] Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques -2008, INERIS DCR-07-83451-14535A.
- [7] Red blood cells: a new major modality for acetaldehyde transport from liver to other tissues, Baranoa E., Di Padova C., Tabasco J. and Lieber C.S., 1987, *Life Sci*, 40, 253-258.
- [8] Stable Acetaldehyde protein adducts as biomarkers of alcohol exposure, Conduah Birt J., Shuker D., Farmer P., 1998, *Chem. Res. Toxicol.*, 11, 136-142.
- [9] Alcool et urgences, H. Cardot 2003, *Physiologie des états d'alcoolisation*.
- [10] Research advances in ethanol metabolism, Ramchandani V. A., Bosron W. F., Li T. K., 2001, *Pathol. Biol.*, 49, 676-82.
- [11] Imagerie Raman de matériaux et dispositifs hétérogènes, Philippe Colomban, 2002, 5-1
- [12] Prospects for in vivo Raman spectroscopy, E. B. Hanlon, R. Manoharan, T.-W. Koo, K. E. Shafer, J. T. Motz, M. Fitzmaurice, J. R. Kramer, I. Itzkan, R. R. Dasari and M. S. Feld, 2000, *Phys. Med. Biol.* 45.
- [13] In search of blood—Detection of minute particles using spectroscopic methods, De Wael K., Lepot L., Gason F., Gilbert B., 2008, *Forensic Science International*, 180, 37-42.
- [14] Raman spectroscopic signature of blood and its potential application to forensic body fluid identification, Kelly Virkler & Igor K. Lednev *Anal Bioanal Chem* (2010) 396:525–534.
- [15] De l'importance des traitements préalables à l'application de l'analyse en composantes indépendantes en spectroscopie Raman, Gobinet C., Vrabie V., Perrin E., Huez R., 2007, *Colloque CRETSI*, 145-148.
- [16] Study of the effect of alcohol on single human red blood cells using near-infrared laser tweezers Raman spectroscopy, Deng J.L., Wei Q., Zhang M. H., Wang Y. Z., Li Y. Q., 2005, 36, 257-261.
- [17] Raman spectroscopy offers great potential for the nondestructive confirmatory identification of body fluids, Kelly Virkler, Igor K. Lednev, 2008, *Forensic Science International*, 181, e1–e5
- [18] Raman-spectroscopy for clinical laboratory analysis, Petrich W., 2008, *Photonik international*, 2, 32-35.
- [19] Digital dewaxing of Raman signals: discrimination between nevi and melanoma spectra obtained from paraffin-embedded skin biopsies, Tfayli A, Gobinet C, Vrabie V, Huez R, Manfait M, Piot O., 2009, *Appl Spectrosc.*;63(5):564-70.
- [20] Confocal Raman microspectroscopy on excised human skin: uncertainties in depth profiling and mathematical correction applied to dermatological drug permeation. Tfayli A, Piot O, Manfait M. *J Biophotonics*. 2008;1(2):140-53.

- [21] Optical spectroscopy and multivariate analysis of biomedical optics, J.L. Pichardo-Molina and C. Araujo-Andrade, *Revista Mexicana de Física* 54 (3) 180–187 Junio 2008.
- [22] Detection of physiologically relevant alcohol concentrations using Raman spectroscopy, Joshua L. McKay, 2006.
- [23] Multimodal, multiplex, Raman spectroscopy of alcohol in diffuse, fluorescent media, Scott T. McCain, Michael E. Gehm, Yanqia Wang, Nikos P. Pitsianis, Michael E. Sullivan and David J. Brady, *SPIE-OSA/ Vol. 5864 58640L-8*, 2009.
- [24] *In Vivo Glucose Sensing*, David D. Cunningham, Julie A. Stenken, Wiley 2010.
- [25] Apparatuses for Noninvasive Determination of in vivo Alcohol Concentration using Raman Spectroscopy, United States Patent Application 20080208018, Ridder Trent, Johnson Rob, Abbink Russell, Maynard John D., 2008.