

**Titre:** Système spectroscopique multimodal pour la caractérisation intra-  
Title: opératoire des tissus cérébraux

**Auteur:** Jeanne Mercier  
Author:

**Date:** 2015

**Type:** Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

**Référence:** Mercier, J. (2015). Système spectroscopique multimodal pour la caractérisation  
Citation: intra-opératoire des tissus cérébraux [Master's thesis, École Polytechnique de  
Montréal]. PolyPublie. <https://publications.polymtl.ca/1998/>

 **Document en libre accès dans PolyPublie**  
Open Access document in PolyPublie

**URL de PolyPublie:** <https://publications.polymtl.ca/1998/>  
PolyPublie URL:

**Directeurs de  
recherche:** Frédéric Leblond  
Advisors:

**Programme:** Génie biomédical  
Program:

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

SYSTÈME SPECTROSCOPIQUE MULTIMODAL POUR LA CARACTÉRISATION  
INTRA-OPÉRATOIRE DES TISSUS CÉRÉBRAUX

JEANNE MERCIER

INSTITUT DE GÉNIE BIOMÉDICAL  
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION  
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES  
(GÉNIE BIOMÉDICAL)

OCTOBRE 2015

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé :

SYSTÈME SPECTROSCOPIQUE MULTIMODAL POUR LA CARACTÉRISATION  
INTRA-OPÉRATOIRE DES TISSUS CÉRÉBRAUX

présenté par : MERCIER Jeanne

en vue de l'obtention du diplôme de : Maîtrise ès sciences appliquées

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

M. GERVAIS Thomas, Ph. D., président

M. LEBLOND Frédéric, Ph. D., membre et directeur de recherche

M. COHEN-ADAD Julien, Ph. D., membre

## REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je voudrais remercier mon directeur de recherche, Frédéric Leblond, de m'avoir confié ce projet passionnant. Merci pour ton enthousiasme débordant et communicatif, mais surtout pour ton aide précieuse tout au long des nombreuses étapes de ma maîtrise. Merci aussi aux membres du jury, M. Thomas Gervais et M. Julien Cohen-Adad, d'avoir pris le temps de lire et de commenter ce mémoire.

Merci à l'équipe présente ou passée du Laboratoire de radiologie optique, avec qui le travail rime aussi avec plaisir : Andréanne, Joannie, Yoann, Michael, Audrey, Amélie, Karl, Liane, Cédric, Leticia, Julien, Kelly, Catherine, Marie-Andrée, et bien d'autres. Les moments passés ensemble, parfois en compagnie de mes collègues plus lointains du département de génie physique, Élyes, Gabriel, Philippe, Décoste, Victor et Sébastien, ont toujours été très enrichissants et mémorables.

A special thanks to my colleagues at Montreal Neurological Institute and Hospital, Dr. Kevin Petrecca, Kelvin Mok, and Dr. Marie-Christine Guiot for their trust and their support during this project, and Mike, thank you again for your great help with the numerous statistical subtleties. It could not have been done without you all!

Je tiens finalement à remercier ma famille de me soutenir depuis le tout début de mes études, et de continuer à le faire dans ce passage vers le monde du travail. Mathieu, merci pour ta foi en mes capacités et pour tes encouragements constants. Merci à mes parents pour leurs supports moral et financier durant mes nombreuses années d'études, mais avant tout, merci de m'avoir transmis leur amour de la science et de la langue française qui me permet maintenant de rédiger un mémoire qui, je l'espère, est rigoureux et compréhensible.

## RÉSUMÉ

La précision de l'excision complète d'une tumeur est un bon indicateur du pronostic du patient. En effet, des traces de cellules cancéreuses restantes peuvent compromettre la rémission du patient ou encore augmenter les risques de récurrence du cancer. Particulièrement en neurochirurgie, il faut donc retirer complètement la tumeur sans toutefois toucher au tissu sain qui l'entoure pour éviter le risque de dommages irréversibles. Les techniques utilisées actuellement pour guider les résections de tumeurs au cerveau comportent plusieurs lacunes : manque de précision, aucun suivi en temps-réel durant la chirurgie, complexité d'utilisation et/ou emploi d'agents de contraste externes.

Un système optique jumelant spectroscopie Raman, fluorescence et réflectance diffuse est développé, caractérisé et testé. La conception du système est faite en vue d'une utilisation en salle d'opération, avec une sonde maniable permettant une acquisition de données ponctuelle à la surface du tissu. Sa caractérisation détaillée démontre que son utilisation est pertinente avec des tissus biologiques. De plus, son efficacité de détection spécifique des marges des tumeurs cérébrales durant une chirurgie de résection est vérifiée en salle d'opération. Pour ce faire, des mesures spectrales sont prises dans la cavité chirurgicale afin d'obtenir cinq spectres, dont un de diffusion inélastique (Raman, excitation à 785 nm), un de réflectance diffuse et trois de fluorescence (excitations à 365, 405 et 455 nm). Ces spectres sont combinés dans un algorithme de classification par apprentissage machine afin de déterminer la nature cancéreuse ou non du tissu biologique étudié de manière automatique. Les résultats obtenus avec 12 patients (142 mesures et échantillons de biopsie) démontrent que la technique de spectroscopie combinée (exactitude, sensibilité et spécificité de 98,6 %, 100 % et 97,2 % respectivement) est supérieure à la spectroscopie Raman seule (89,4 %, 97,2 % et 81,7 % respectivement), et de loin supérieure au seul diagnostic du neurochirurgien (83,1 %, 84,3 % et 81,9 % respectivement).

La nouvelle technologie contenue dans la sonde en tant que telle procure déjà plusieurs avantages : en effet, elle est maniable, peu encombrante, simple d'utilisation et n'utilise que des marqueurs intrinsèques au tissu. Le fait de combiner l'autofluorescence, la réflectance diffuse et la spectroscopie Raman dans un même système utilisable en salle d'opération est innovateur, cela n'ayant jamais été fait à ce jour. À long terme, ce projet a donc le potentiel d'améliorer de manière significative le pronostic de patients atteints de cancer au cerveau.

## ABSTRACT

The standard of care for brain tumors is open cranium surgery in order to directly remove the cancer cells. However, the imaging technologies currently used to guide the surgeon, including preoperative MRIs and the state-of-the-art neurosurgical microscope, are unable to fully detect low-grade tumors. More importantly, the most common types of brain cancer are characterized by invasive cancer cells, which can be seen as a gradient of cancer cells extending from the main cancer mass into the normal brain. To this day, these infiltrations also cannot be detected during the surgery and their remaining in the brain results in a poor prognosis for the patient. Therefore, there is a pressing need for a new technique that would allow surgeons to detect and safely remove previously undetectable cancer tissue without removing useful healthy parts.

With this goal in mind, a single-point detection system is conceived that combines near-infrared Raman spectroscopy, intrinsic fluorescence spectroscopy (excitation at 365 nm, 405 nm, and 455 nm) and diffuse reflectance spectroscopy. This system is first developed, characterized and tested (with fluorescent dilutions, biological tissues analysis, *in vivo* experiments with xenograft mice, etc.) before it is optimized to integrate the workflow of the operating room. In this next step, 12 patients undergoing cerebral tumor resection were assessed using this technology. Five spectra (one for each modality) were acquired covering different areas of the tumor and of the normal brain. A biopsy sample is then taken at each acquisition site and sent to histopathology where the standard information about its nature is determined. Later, we proceeded to a multiple machine-learning classification analysis in order to discriminate between normal and cancerous and infiltrated tissues. Accuracy, sensitivity and specificity respectively of 98.6 %, 100 % and 97.2 % were obtained with 71 series of normal data and 71 series of tumor data (main tumor mass and infiltrated tissue), compared with 89.4 %, 97.2 %, and 81.7 % for the Raman spectroscopy system alone and with 83.1 %, 84.3 %, and 81.9 % for the neurosurgeon's assessment.

Results show that the multimodal spectroscopic system provides reliable information about the cerebral tissue's nature, which can help guide the neurosurgeon through a more complete and selective tumor resection.

## TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS .....	III
RÉSUMÉ .....	IV
ABSTRACT .....	V
TABLE DES MATIÈRES .....	VI
LISTE DES TABLEAUX .....	IX
LISTE DES FIGURES .....	X
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS .....	XIII
LISTE DES ANNEXES .....	XV
INTRODUCTION .....	1
CHAPITRE 1 REVUE DE LITTÉRATURE .....	3
1.1 Problématique étudiée : physiologie du cerveau et cancer cérébral .....	3
1.1.1 Composition du cerveau .....	3
1.1.2 Gliomes et approches thérapeutiques .....	4
1.2 Diffusion inélastique .....	8
1.2.1 Technologies .....	10
1.2.2 Lien avec la problématique .....	12
1.2.3 Obstacles notés dans les études antérieures .....	14
1.3 Réflectance diffuse et fluorescence .....	15
1.3.1 Contraste endogène : théorie et applications .....	15
1.3.2 Contraste exogène : théorie, applications et quantification .....	21
1.4 Classification des tissus .....	24
CHAPITRE 2 SYSTÈME RAMAN .....	27
2.1 Montage du système Raman .....	27

2.2	Tests préliminaires .....	28
2.2.1	Calibration et choix des paramètres d'utilisation .....	28
2.2.2	Tests sur des souris xénogreffes .....	30
CHAPITRE 3 CONCEPTION, FABRICATION, CARACTÉRISATION ET OPTIMISATION DU SYSTÈME CHIRURGICAL MULTIMODAL .....		32
3.1	Choix d'une géométrie optimale des fibres optiques pour la détection .....	33
3.2	Fabrication du système .....	35
3.2.1	Choix de composants et montage .....	35
3.2.2	Validation du montage par la vérification des pertes de puissance au long du trajet optique .....	39
3.2.3	Modifications apportées et limitations .....	42
3.2.4	Intégration en salle d'opération .....	42
3.3	Développement de l'automatisation logicielle du système .....	45
3.4	Étude de caractérisation complète du système .....	47
3.4.1	Linéarité du système .....	47
3.4.2	Ratio signal sur bruit .....	51
3.5	Calibration du système .....	52
3.5.1	Normalisation des spectres de fluorescence pour l'atténuation .....	56
3.6	Exemple d'utilisation : détection de PpIX .....	59
3.6.1	Dilutions .....	59
3.6.2	Étude combinée à large champ et échantillons <i>ex vivo</i> .....	61
CHAPITRE 4 ÉTUDE DES CAS HUMAINS EN SALLE D'OPÉRATION ET CLASSIFICATION DES TISSUS .....		64
4.1	Approbations menant à l'utilisation du système en salle d'opération .....	64
4.1.1	Aspect éthique et sécurité .....	64



4.1.2	Protocole d'utilisation en salle d'opération.....	66
4.2	Méthodologie finale en salle d'opération.....	68
4.2.1	Sélection des patients et procédure chirurgicale .....	68
4.2.2	Acquisitions.....	69
4.3	Étude des algorithmes de classification .....	71
4.3.1	Spectroscopie Raman seule.....	71
4.3.2	Système multimodal : échantillons biologiques <i>ex vivo</i> .....	72
4.3.3	Système multimodal : classification des tissus humains <i>ex vivo</i> .....	73
4.3.4	Système multimodal : étude de classification préliminaire de tissus <i>in vivo</i> durant les premiers cas chirurgicaux.....	75
4.4	Analyse des cas humains.....	77
4.4.1	Base de données finale .....	77
4.4.2	Aspect des spectres finaux .....	78
4.4.3	Méthode de classification améliorée .....	80
4.4.4	Résultats de l'étude de classification finale .....	81
CHAPITRE 5 DISCUSSION GÉNÉRALE .....		86
5.1	Retour sur les objectifs.....	86
5.2	Retour sur les résultats et perspectives.....	87
5.3	Limitations et recommandations .....	90
CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....		92
RÉFÉRENCES .....		94
ANNEXES .....		102

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 : Pics Raman associés à différentes molécules ou composants des tissus.....	12
Tableau 3.1 : Puissance optique mesurée à différentes connexions dans le montage.....	40
Tableau 3.2 : Ratio de puissance transmise entre l'entrée d'une connexion jusqu'à la sortie .....	41
Tableau 4.1 : Effet de l'éclairage en salle opératoire sur les signaux d'échantillon de biopsie.....	66
Tableau 4.2 : Résultats de classification pour divers tissus biologiques <i>ex vivo</i> .....	73
Tableau 4.3 : Répartition des cas humains étudiés selon leur type de cancer .....	77
Tableau 4.4 : Exactitude de la classification multiple finale sans normalisation.....	83
Tableau 4.5 : Résultats de classification avec l'algorithme <i>Boosted Trees</i> optimisé.....	85

## LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 : Visualisation d'une masse cancéreuse (grade 4) avec des images par résonance magnétique préopératoires .....	5
Figure 1.2 : Représentation d'une tumeur glioblastome de grade 4 en trois dimensions grâce aux pondérations T1 et T2 de l'IRM d'un patient .....	7
Figure 1.3 : Quatre types de spectroscopie .....	8
Figure 1.4 : Schématisation de l'utilisation de la diffusion inélastique pour l'étude des tissus biologiques. ....	9
Figure 1.5 : Réflectance diffuse pour extraire les propriétés optiques du tissu. ....	16
Figure 1.6 : Graphique présentant les pics d'absorption de l'oxy- et déoxyhémoglobine.....	18
Figure 1.7 : Les spectres de fluorescence intrinsèque sont la somme des molécules à contraste endogène présentes dans les tissus humains .....	20
Figure 1.8 : Spectres d'absorption et d'émission de la protoporphyrine-IX. Tiré de [55]. ....	22
Figure 2.1 : Représentation schématique du montage pour la spectroscopie Raman. ....	27
Figure 2.2 : Premier montage expérimental utilisable en salle d'opération .....	28
Figure 2.3 : Montage pour les tests sur modèles murins xénogreffes .....	31
Figure 2.4 : Exemple de spectres Raman obtenus, tissu sain en bleu et tumeur en rouge. ....	31
Figure 3.1 : Configuration interne des composants de la sonde pour deux modèles différents, vue selon une coupe transversale de la portion distale .....	33
Figure 3.2 : Montage optique réalisé.....	36
Figure 3.3 : Instruments connectés entre eux pour le test du premier montage.....	38
Figure 3.4 : Positions où les mesures de puissance sont effectuées afin de mesurer les pertes dans le système selon différentes configurations .....	39
Figure 3.5 : Différents étages dans le boîtier du système de fluorescence et réflectance diffuse ..	43
Figure 3.6 : Montage expérimental transporté et utilisé en salle d'opération.....	44
Figure 3.7 : Nouveau système amélioré en termes de robustesse pour la salle d'opération .....	45

Figure 3.8 : Interface finale du programme <i>Labview</i> .....	46
Figure 3.9 : Graphiques démontrant l'aspect linéaire de la puissance des sources lumineuses à la sortie de la sonde en fonction de l'intensité envoyée .....	48
Figure 3.10 : Graphiques démontrant l'aspect linéaire de l'intensité du signal (spectralon) collecté par le spectromètre en fonction du temps d'intégration de celui-ci .....	49
Figure 3.11 : Graphique démontrant le caractère linéaire de l'intensité maximale du signal (sur la peau) pour une excitation à 405 nm .....	50
Figure 3.12 : SNR pour chaque source en fonction du temps d'intégration .....	52
Figure 3.13 : Démonstration de la calibration de spectre de peau pour la source blanche. ....	54
Figure 3.14 : Calibration pour les sources de fluorescence avec des spectres de peau.....	55
Figure 3.15 : Comparaison de trois méthodes de normalisation des spectres de fluorescence de la peau par la réflectance diffuse.....	57
Figure 3.16 : Visualisation de l'effet des méthodes de normalisation sur un spectre de fluorescence de PpIX, à différentes valeurs d'absorbance (excitation à 405 nm).....	58
Figure 3.17 : Spectres bruts de fluorescence de la protoporphyrine IX en solution. ....	59
Figure 3.18 : Proportionnalité de l'intensité du pic de fluorescence à 635 nm par rapport à la concentration de PpIX pour les dilutions C et F .....	61
Figure 3.19 : Spectre expérimental normalisé du signal de fluorescence de la molécule PpIX dont la production a été induite dans une tumeur chez un rat .....	62
Figure 3.20 : À gauche, la fluorescence visible grâce au microscope chirurgical. À droite, la fluorescence telle qu'elle est visible avec le système hyperspectral.....	62
Figure 3.21 : Corrélation entre la fluorescence telle que décrite par l'imagerie avec caméra EMCCD et celle obtenue avec les spectres donnés par la sonde .....	63
Figure 4.1 : Installation du système en salle d'opération durant la chirurgie .....	69
Figure 4.2 : Les spectres bruts normalisés sont concaténés à des fins de classification. ....	72
Figure 4.3 : Graphique représentant les divers composants de l'échantillon de biopsie ex vivo préservé à l'hôpital .....	74

Figure 4.4 : Spectres Raman d'échantillons de biopsie congelés par azote liquide. ....	75
Figure 4.5 : Discrimination visible de deux classes de tissus, normaux (croix bleues) et cancéreux (cercles rouges), pour les analyses préliminaires des cas humains <i>in vivo</i> .....	76
Figure 4.6 : Tissus cérébraux classés selon l'analyse pathologique .....	78
Figure 4.7 : Représentation moyennée des spectres calibrés (mais non normalisés) de tissus sains en noir ( <i>normal</i> ) et cancéreux en rouge ( <i>tumor</i> ) pour les différentes modalités utilisées.....	79
Figure 4.8 : Schématisation de la classification multiple utilisée .....	81

## LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

Cette liste décrit les sigles et les abréviations qui sont utilisés dans ce mémoire, en ordre alphabétique. Plusieurs abréviations sont dérivées de l'appellation anglaise, comme il est noté ci-dessous, mais seront tout de même utilisées dans le présent document.

5-ALA	<i>δ-aminolevulinic acid</i> , ou acide $\delta$ -aminolévulinique
A	Ampères (unités d'intensité)
AUC	<i>Area under the curve</i> , ou aire sous la courbe
CCD	<i>Charged-coupled device</i> , ou dispositif à transfert de charge (DTC)
CT	<i>Computerized tomography</i> , ou tomodensitométrie (TDM)
DEL	Diode électroluminescente
DRS	<i>Diffuse reflectance spectroscopy</i> , ou spectroscopie par réflectance diffuse
EMCCD	<i>Electron multiplying charged-coupled device</i>
FC/PC	<i>Ferrule connector</i> ou <i>fiber channel</i> , un type de connecteur pour fibres optiques avec contact physique (PC pour <i>physical contact</i> )
FTIR	<i>Fourier transform infrared spectroscopy</i> , ou spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
GBM	Glioblastome multiforme
GFP	<i>Green fluorescent protein</i> , ou protéine fluorescente verte
H&E	Hématoxyline et éosine (coloration de tissus pour histologie)
IFS	<i>Intrinsic fluorescence spectroscopy</i> , ou spectroscopie par fluorescence intrinsèque
IRM	Imagerie par résonance magnétique
J	Joules (unités d'énergie)
NA	<i>Numerical aperture</i> , ou ouverture numérique
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) sous forme réduite (-H)
NIR	<i>Near infrared</i> , ou proche-infrarouge

OD	<i>Optical density</i> , ou densité optique (opacité d'un filtre)
PpIX	Protoporphyrine IX
PCA	<i>Principal component analysis</i> , ou analyse par composantes principales
qFI	<i>Quantitative fluorescence imaging</i> , ou imagerie quantitative par fluorescence
SMA	SubMiniature version A, un type de connecteur coaxial
SNR	<i>Signal-to-noise ratio</i> , ou ratio signal-sur-bruit
SVM	<i>Support vector machine</i> (C-SVM : <i>conventional SVM</i> )
U.A.	Unités arbitraires (parfois <i>a.u.</i> pour <i>arbitrary units</i> )
R	Spectroscopie Raman
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i> , ou fonction d'efficacité du récepteur
W	Watts (unités de puissance)
WHO	<i>World Health Organization</i> , ou Organisation mondiale de la Santé

## LISTE DES ANNEXES

Annexe A – Spectres Raman de tissus cérébraux <i>ex vivo</i> de souris injectées avec des cellules de rat (cellules de gliome C6) .....	102
Annexe B – Liste des bandes raman caractéristiques provenant de la littérature .....	103
Annexe C – Procédure d'utilisation du laser NIR - sécurité McGill .....	106
Annexe D – Expérience tissus biologiques avec tumeurs et PpIX fluorescent.....	107
Annexe E – Spectres moyens et répartition des aires sous la courbe (AUC).....	108
Annexe F – Résultats de la classification pour comparer les méthodes de normalisation.....	112
Annexe G – Résultats détaillés et complets de la classification .....	113
Annexe H – Courbes ROC décrivant la performance de la classification combinée optimisée pour <i>Boosted Trees</i> , sans normalisation pour IFS .....	117



## INTRODUCTION

La précision et la totalité de l'excision d'une tumeur au cerveau sont de bons indicateurs du pronostic du patient, en particulier pour les gliomes. En effet, des traces de cellules cancéreuses restantes peuvent compromettre la rémission du patient ou encore augmenter les risques de récurrence du cancer [1], [2]. En neurochirurgie, il faut tenter de retirer complètement la tumeur sans toutefois toucher au tissu sain qui l'entoure pour éviter le risque de dommages irréversibles. Échouer dans cette tâche est synonyme de perte de qualité de vie, voire de mort précipitée pour les patients, en plus d'imposer une réitération de la chirurgie. Enfin, les techniques utilisées actuellement pour guider les résections de tumeurs au cerveau comportent plusieurs lacunes : manque de précision (attribuable au fait que les tumeurs cérébrales soient souvent piètrement délimitées), aucun suivi en temps-réel, complexité et/ou utilisation d'agents de contraste externes. À ce jour, les résections ne sont toujours pas optimales et un volume non négligeable de cellules cancéreuses demeure dans le cerveau après l'opération. En effet, la récurrence des gliomes se produit aux marges de la région enlevée durant la chirurgie dans 85 % des cas [3], même en considérant les images par résonnance magnétique pré-opératoire, la neuronavigation tridimensionnelle en temps réel et la microscopie en champ large.

Il a été démontré qu'une technique précise et quantitative pour détecter les marges des tumeurs est nécessaire mais inexistante à ce jour [4]. Par exemple, la technique de détection par fluorescence permet d'atteindre une exactitude de près de 85 % avec l'utilisation du microscope chirurgical mais nécessite l'utilisation de molécules telles que l'acide aminolévulinique qui doit être administrée au patient [5]. La fluorescence intrinsèque ne nécessite, quant à elle, aucune substance externe et peut être utilisée pour détecter des porphyrines intrinsèques, différentes protéines ou autres molécules. En jumelant une technique de spectroscopie par fluorescence intrinsèque avec la spectroscopie Raman qui, elle aussi, est intrinsèque au tissu, il serait possible d'améliorer significativement l'analyse et la classification des tissus durant la chirurgie [2], [6] sans ajout de marqueurs externes.

Toutefois, il n'existe jusqu'à présent aucune technique assez sensible pour détecter des concentrations faibles de cellules cérébrales tumorales, ce qui permettrait d'obtenir une résection optimale. Considérant ce besoin clinique, **l'objectif général de cette maîtrise est de développer et tester un système d'imagerie optique permettant de détecter spécifiquement les marges**

**des tumeurs cérébrales durant une opération de résection.** La **première hypothèse** est que plusieurs modalités (spectroscopie Raman, par fluorescence et par réflectance diffuse) peuvent être jumelées et intégrées dans un système clinique utilisé durant la chirurgie à crâne ouvert sans perturber l'opération. L'**objectif associé** est donc de concevoir, fabriquer et caractériser un système multimodal versatile pouvant s'intégrer à l'état de l'art en neurochirurgie. La **seconde hypothèse** est que la fluorescence intrinsèque combinée à la spectroscopie Raman augmente l'exactitude de la détection des tumeurs *in vivo*. Le **deuxième objectif** est alors de classifier les types de tissus imagés avec le système multimodal et de comparer les résultats de précision diagnostique obtenus avec le système Raman seul. Une exactitude de plus de 90 % sur les résultats de classification serait considérée comme une amélioration notable des techniques de détection utilisées à ce jour, surtout en tenant compte des nombreux autres avantages de la technique présentée.

Avant d'arriver au système multimodal final, le système de spectroscopie Raman seule a d'abord été mené en salle d'opération après plusieurs étapes cruciales : montage du système, calibration, tests préliminaires, protocole éthique et méthodologie durant la chirurgie. Ces phases du projet sont détaillées au chapitre 2, suivant la revue de la littérature (chapitre 1). Par la suite, le système de fluorescence intrinsèque et de réflectance diffuse a pu être fabriqué. Ainsi retrouve-t-on au chapitre 3 les étapes du choix des composants, du montage du système, de son automatisation, de la calibration détaillée, des tests préliminaires avec des solutions fluorescentes et des tissus *ex vivo*, et finalement celle de l'intégration du système en salle d'opération. Au chapitre 4, il est question des algorithmes qui permettent spécifiquement de classifier les tissus biologiques. En effet, la détection des marges des tumeurs cérébrales se fait de manière automatisée, c'est-à-dire qu'aucune évaluation manuelle des spectres n'est nécessaire afin de déterminer la nature du tissu. Différents algorithmes de classification par apprentissage machine sont testés et les résultats sur des tissus *ex vivo* aussi bien qu'*in vivo* durant la chirurgie de résection de tumeurs sont présentés. Ce chapitre comprend aussi la description détaillée de la méthodologie finale en salle d'opération et, enfin, les résultats *in vivo* obtenus avec le système multimodal durant des cas de chirurgie. Finalement, un dernier chapitre vise à revoir les points importants dans une discussion générale, où il sera possible de mieux comprendre les conclusions à tirer de manière globale et de valider l'atteinte des objectifs susmentionnés.

## CHAPITRE 1 REVUE DE LITTÉRATURE

### 1.1 Problématique étudiée : physiologie du cerveau et cancer cérébral

#### 1.1.1 Composition du cerveau

La matière grise est formée par les dendrites des neurones qui se concentrent à la surface externe du cerveau, aussi appelée cortex cérébral. La matière blanche, quant à elle, est la partie interne du cerveau et est formée par les axones des cellules neuronales. À l'œil nu, la substance du cerveau est d'une couleur rosâtre due à la présence de capillaires. La taille de ceux-ci est comparable à celle des cellules sanguines qui transportent l'oxygène vers le cerveau, soit les molécules d'hémoglobine (entre 5 et 10 micromètres de diamètre) [7]. En comparaison, les artères qui conduisent le sang au cerveau possèdent un diamètre d'environ 700 micromètres. De là partent de plus petites artères qui se ramifient ensuite en artérioles. La taille des vaisseaux est très variable tout au long du chemin parcouru par le sang et, règle générale, plus leur diamètre est grand, moins le nombre de vaisseaux nécessaires à l'approvisionnement doit être grand. Par exemple, les artères principales permettent de distribuer du sang sur une surface étendue du cortex, soit sur environ 7 mm<sup>2</sup>, alors que les plus petites pourvoient une surface de 1 mm<sup>2</sup> [8]. En raison de l'activité métabolique des cellules, la densité du système sanguin cérébral est plus grande lorsqu'il y a une grande concentration de corps cellulaires, comme c'est le cas par exemple sur le cortex.

Toutes les cellules neuronales sont au même stade de maturation puisqu'elles sont post-mitotiques, donc plus aucune division cellulaire n'a lieu [9]. Les axones des neurones sont généralement entourés d'une gaine de myéline. Cette myélinisation est possible grâce aux cellules gliales qui constituent 50 % du volume cérébral [10]. En plus de la production de myéline par les oligodendrocytes, plusieurs types de cellules gliales existent pour conserver l'homéostasie du cerveau, dont les astrocytes. Les astrocytes sont les plus grosses cellules du tissu nerveux et sont répartis en deux types distincts, les astrocytes de type I qui sont en contact avec les capillaires sanguins et ceux de type II qui entourent les neurones et la fente synaptique afin de contenir les neurotransmetteurs.

Les tissus normaux du cerveau humain contiennent de 68 à 80 % d'eau, de 10 à 11 % de protéines et de 5 à 15 % de lipides. Dans la matière grise, il y a une proportion élevée d'eau (~80 %) mais moindre de lipides (~5 %) que dans la matière blanche, où se trouve une quantité importante de lipides (~15 %), ainsi qu'une faible concentration d'eau (~68 %) [9]. La quantité d'eau peut augmenter chez des personnes atteintes de néoplasmes intracrâniens, de certaines pathologies cérébrovasculaires ou d'épilepsie [11]. Si une proportion moindre de lipides est mesurée dans le cerveau, cela peut aussi indiquer qu'un autre type de tissu, normal ou non, est présent tel que la *dura mater*, les leptoméniges, une hémorragie ou un cancer cérébral [9].

### 1.1.2 Gliomes et approches thérapeutiques

Les gliomes qui prennent origine dans les astrocytes sont les tumeurs primaires les plus répandues [9]. L'appellation astrocytome correspond à un astrocyte cancéreux. Il est connu que les gliomes sont aussi caractérisés par une forte vascularisation dans la tumeur [12], [13]. En effet, un processus oncogénique appelé angiogenèse a lieu dans les régions tumorales et se définit par un réseau désorganisé et inefficace de vaisseaux sanguins. Cela favorise d'ailleurs la formation et la croissance d'autres cellules tumorales [6]. Les cancers primaires se développent directement dans l'organe affecté, tandis que les cancers secondaires sont formés des métastases associées à des cellules cancéreuses provenant d'une tumeur primaire située ailleurs dans le corps. Les métastases comptent pour 25 à 50 % des cas hospitalisés pour cancer cérébral et proviennent surtout (dans 80 % des cas) de cancers des poumons, des reins et des seins ainsi que de mélanomes (cancers de la peau) et de cancers de la voie gastrointestinale. Les cancers neuroépithéliaux, quant à eux, constituent environ 50 % des cas de cancers cérébraux et incluent les astrocytomes primaires (44 %), les médulloblastomes (3 %) et les oligodendrogliomes (2 %). Les méningiomes forment 15 % des cas de cancers cérébraux et, comme le nom l'indique, proviennent des méninges et naissent donc en périphérie du cerveau dans la matière grise. Ceux-ci ne sont pas de nature gliale et sont rarement malins [14].

La classification des tumeurs cérébrales est déterminée par l'Organisation mondiale de la Santé (en anglais, *World Health Organization* ou WHO) [15]. De manière très sommaire, les cancers cérébraux peuvent être divisés en quatre catégories : les grades WHO 1 et 2 sont dits de bas grades, alors que les tumeurs de grades WHO 3 et 4 sont associées aux hauts grades. Les tumeurs de grade 1 sont bénignes et croissent lentement, à l'opposé des tumeurs de hauts grades.

Elles sont caractérisées par un faible potentiel de prolifération et peuvent être traitées par la chirurgie seulement. Les tumeurs de grade 2 montrent des cellules atypiques et sont généralement infiltratives dans les tissus sains du cerveau, malgré leur activité mitotique faible. Leur récurrence est plus élevée que les grades 1 après thérapie, et les tumeurs de grade 2 ont aussi une forte tendance à évoluer vers un grade supérieur. Les tumeurs WHO grade 3 montrent une évidence histopathologique de malignité (activité mitotique élevée et cellules atypiques) et sont traitées avec des techniques agressives, combinant ou non la radiothérapie avec la chimiothérapie. Les tumeurs de grade 4 sont semblables à celles de grade 3 avec cependant une propension plus grande vers la nécrose et sont généralement associées à la présence d'une vascularisation anormale, à de fortes infiltrations tumorales dans les tissus adjacents ainsi qu'à une progression rapide et ce, même après une opération chirurgicale consistant en l'exérèse aussi complète que possible de la tumeur [16].

Les tumeurs gliales de grade 4 appelées glioblastomes multiformes, ou GBM, sont les gliomes les plus malins et ne sont jamais curables, avec une durée de survie médiane de seulement 14,6 mois. Un pronostic peut être suggéré selon le grade du cancer. Par exemple, les patients atteints de tumeurs de grade 2 survivent un peu plus de 5 ans contre 3 ans pour les grades 3 [15]. Les GBMs sont les néoplasmes intracrâniens primaires les plus communs chez les adultes, représentant de 12 à 15 % des cas totaux, et constituent environ 55 % des cas d'astrocytomes. Comparativement, les WHO grades 2 forment de 10 à 15 % des cas d'astrocytomes, contre 25 % pour les grades 3.

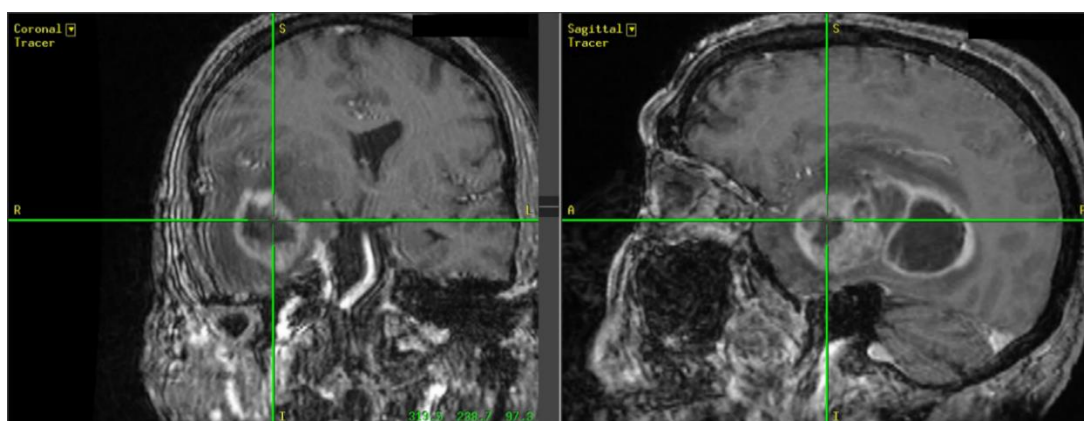


Figure 1.1 : Visualisation d'une masse cancéreuse (grade 4) avec des images par résonance magnétique préopératoires (séquence T1 suivant l'injection de l'agent de contraste gadolinium, coupe frontale à gauche et coupe sagittale à droite). La présence d'une capsule tumorale est

clairement identifiée par l'existence de cellules cancéreuses croissantes (blanc) encerclant une région nécrotique (foncé). Le neurochirurgien peut localiser ses outils en trois dimensions grâce à un système de positionnement (croix verte sur l'image, représentant ici le plan focal du microscope chirurgical), mais un déplacement des tissus durant la chirurgie à crâne ouvert crée une erreur de positionnement par rapport aux images pré-opératoires.

Une résection complète est gage de pronostic plus favorable pour les patients atteints de gliomes [17] : il est donc primordial de retirer un volume maximal de tumeur. Pour ce faire, la chirurgie à crâne ouvert est la méthode standard utilisée, en plus de la radiation et/ou de la chimiothérapie dans plusieurs cas après la chirurgie. Le neurochirurgien détermine la nature du tissu en analysant l'aspect visuel et la texture des tissus dans la cavité grâce à un microscope chirurgical. Il peut habituellement aussi s'appuyer sur l'imagerie par résonance magnétique (IRM) (Figure 1.1) ou parfois sur des scans de tomodensitométrie (CT) [18]. Sans entrer dans les détails, les temps de relaxation longitudinal (T1) et transversal (T2) sont différents pour chaque tissu, selon leur composition en atomes d'hydrogène. En effet, le temps nécessaire pour que ce type d'atomes reviennent à l'équilibre (les moments magnétiques sont de nouveau alignés) diffère d'un tissu à l'autre. En modifiant la pondération de l'image, ce qui a pour effet de faire apparaître les différences de temps T1 ou T2, il est possible de faire ressortir davantage différents tissus.

La Figure 1.2 en est un bon exemple, où la masse brute de la tumeur (nécrose et une partie importante des cellules tumorales) démontre un contraste clair en B grâce à la pondération T1, alors que c'est l'œdème autour de la masse qui apparaît avec T2 en D. L'œdème est constitué de tissus enflés, d'inflammation locale et d'infiltrations majeures de cellules cancéreuses dans les tissus autour de la masse tumorale. Avec une tumeur de grade 2, la pondération T1 n'offre que rarement un bon outil visuel diagnostique. Avec T2 par contre, le contraste est plus élevé qu'avec T1. Somme toute, l'IRM est relativement sensible aux tumeurs et constitue donc la modalité de choix, malgré le déplacement des tissus durant la chirurgie qui crée une erreur de recalage avec les techniques de localisation. Par contre, il existe une lacune flagrante lorsque vient le temps de détecter les tissus sains infiltrés de cellules cancéreuses.

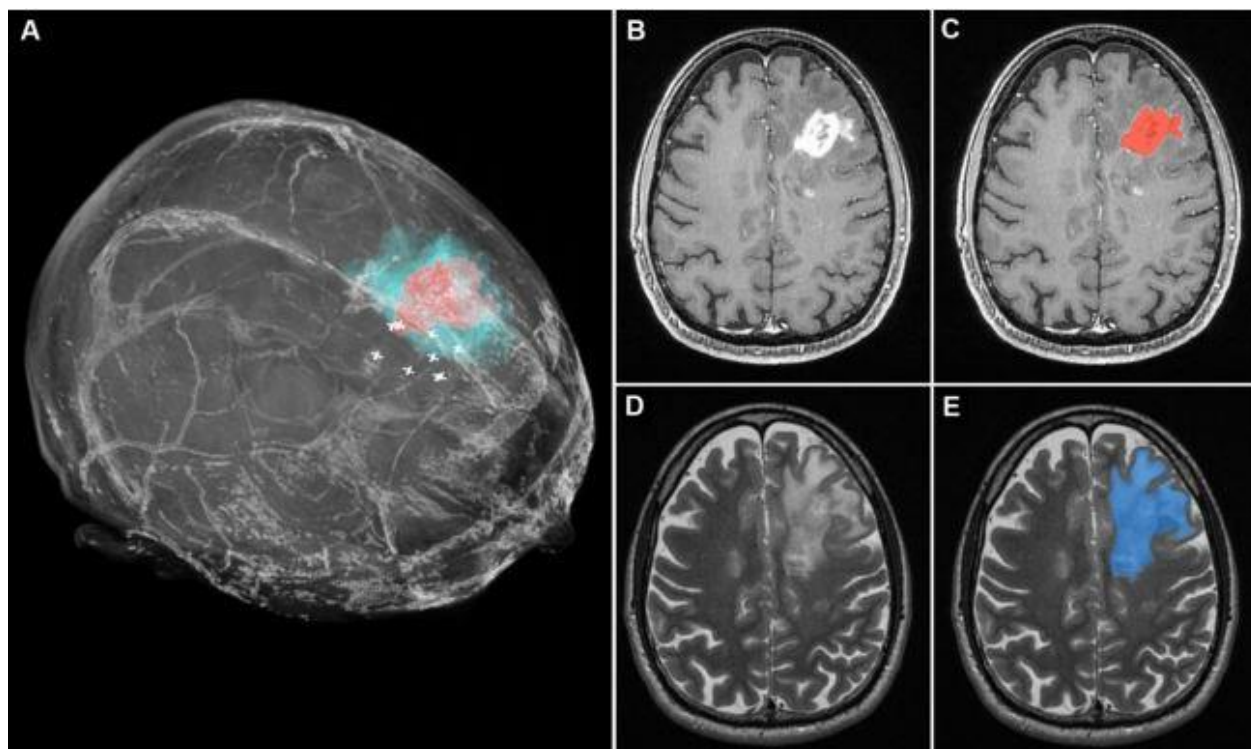


Figure 1.2 : **A.** Représentation d'une tumeur glioblastome de grade 4 en trois dimensions grâce aux pondérations T1 et T2 de l'IRM d'un patient. La masse principale (incluant la région nécrotique et la zone de tumeur croissante) est visible en rouge alors que l'œdème (incluant l'inflammation, le renflement et les infiltrations majeures des tissus) est en bleu. **B.** Image provenant de la pondération T1 et **C.** rendu coloré en rouge. **D.** Image provenant de la pondération T2 du même patient et **E.** rendu coloré en bleu. Tiré de [19].

En effet, les cas de GBM sont difficiles puisqu'ils sont caractérisés par une forte infiltration de cellules cancéreuses partant de la masse tumorale et s'étendant vers les tissus sains de manière graduelle. Ces cancers, dits invasifs, incluent aussi les grades 2 et 3 (astrocytomes et oligodendrogliomes). L'IRM, de même que les scans CT, ne peuvent pas détecter toute l'ampleur de ces infiltrations, en plus d'être inefficaces pour détecter quelques tumeurs de petite taille. Or, un petit gliome de bas grade peut éventuellement évoluer en tumeur maligne [20], tout comme des infiltrations laissées dans le cerveau. En effet, 85 % des cas de GBM récurrents proviennent d'infiltrations associées à des cellules cancéreuses n'ayant pas été retirées lors de la chirurgie. Il est à noter que pour toutes les techniques de détection utilisées, le standard de référence reste

l’histopathologie avec une analyse d’échantillons après la chirurgie ou, parfois, durant l’opération en utilisant des sections congelées, et ce malgré la présence d’erreurs intra- et inter-observateurs.

En plus des techniques d’imagerie par résonance magnétique ou utilisant les rayons-X, des techniques d’imagerie optiques existent. En étudiant l’interaction entre la lumière et les tissus biologiques, il est possible d’extraire des informations cruciales qui pourraient guider la chirurgie et, ainsi, éventuellement améliorer le pronostic des patients atteints de gliomes. Trois types de spectroscopie optique seront étudiés ici, soit la diffusion inélastique ou spectroscopie Raman, la fluorescence et la réflectance diffuse.

## 1.2 Diffusion inélastique

Lors d’une illumination avec une source monochromatique (une seule longueur d’onde d’excitation), quand le photon excité ne retourne pas au même niveau d’énergie vibrationnel il est question de diffusion inélastique. C’est le cas pour les diffusions Stokes-Raman ou anti-Stokes-Raman (souvent abrégé anti-Stokes), soit les troisième et quatrième cas représentés sur les diagrammes de niveaux quantiques à la Figure 1.3.

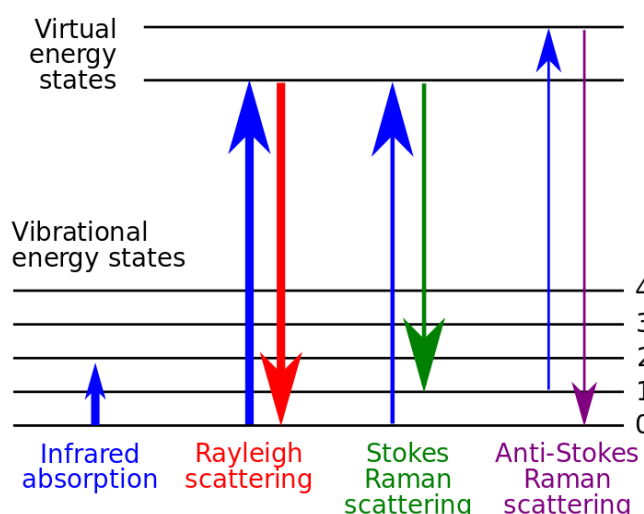


Figure 1.3 : Quatre types de spectroscopie (a) absorption infra-rouge, (b) diffusion de Rayleigh, (c) diffusion de Stokes-Raman et (d) diffusion anti-Stokes-Raman. Reproduite avec permission.

Pour la diffusion Raman, le photon qui est émis sera décalé à une fréquence plus basse ou plus élevée afin de conserver l’énergie totale du système. Ainsi, en spectroscopie Raman, la longueur d’onde émise sera soit plus petite, soit plus grande que celle avec laquelle la molécule a



été excitée. De nombreuses applications biomédicales utilisent le principe de la spectroscopie Raman. En effet, le phénomène vibrationnel expliqué permet d'identifier précisément différentes molécules ou liaisons moléculaires. L'illustration à la Figure 1.4 schématise l'effet Raman dans un tissu, où la lumière d'excitation diffusée (en rouge) crée une vibration spécifique aux molécules excitées.

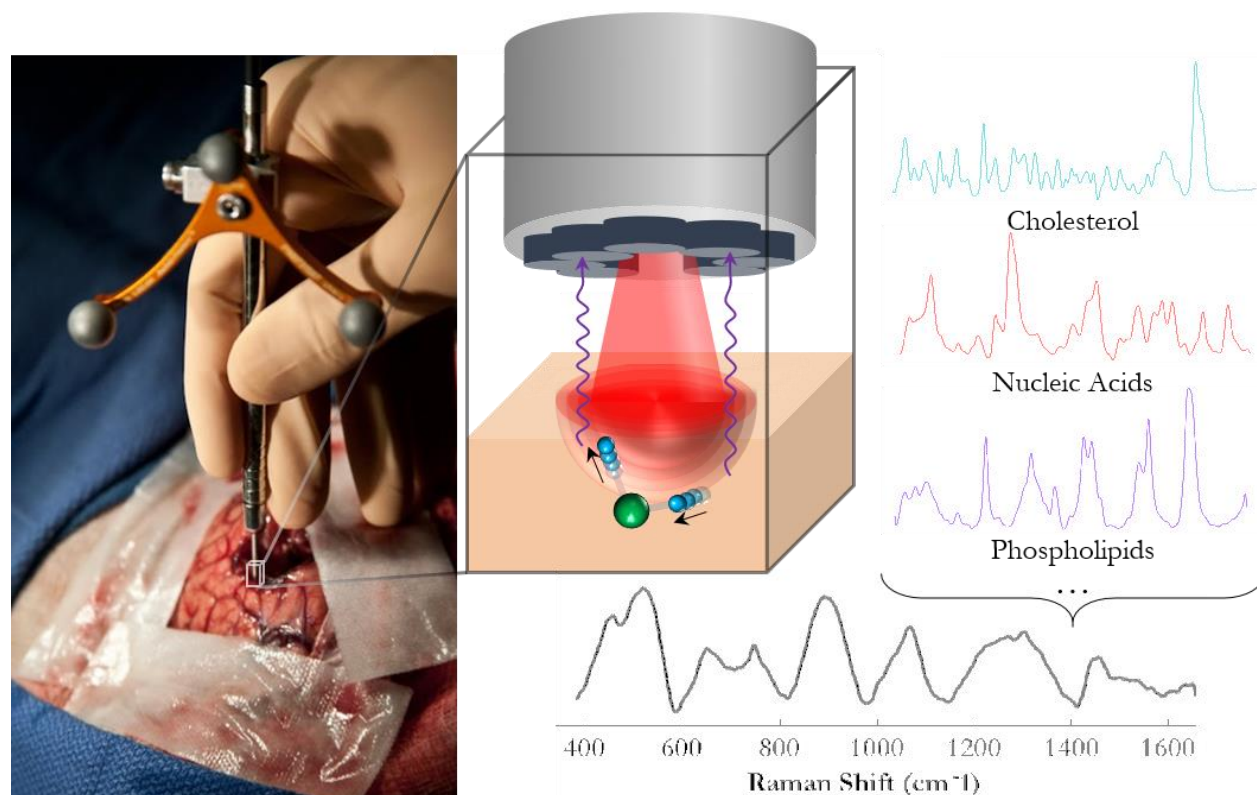


Figure 1.4 : Schématisation de l'utilisation de la diffusion inélastique pour l'étude des tissus biologiques.

La lumière qui sera collectée après cette stimulation (représentée sur la Figure 1.4 par une onde en mauve) sera décalée en fréquence. Ce décalage vibrationnel peut être perçu par un détecteur spectroscopique et, de cette manière, le spectre Raman résultant (spectre en noir), spécifique au tissu, peut être étudié. Il s'agit en quelque sorte d'une empreinte optique qui est spécifique à la surface étudiée. Puisque chaque composant moléculaire possède son propre spectre spécifique, le spectre d'un tissu complexe comme celui du cerveau peut être vu comme la somme pondérée des molécules et liaisons qui le constituent. Avec une lumière non-ionisante, il est donc possible d'étudier les mécanismes d'interaction entre le tissu et la lumière en détectant la

diffusion inélastique. Cela a pour effet d'informer sur la composition du tissu interrogé en terme d'espèces moléculaires (par exemple : cholestérol, acides gras, protéines, acides nucléiques) [21], [22].

Ainsi, plusieurs études ont été effectuées dans le but de décrire le plus adéquatement possible les composants de tissus biologiques à l'aide de la spectroscopie vibrationnelle. Dans ce présent document, les articles visités porteront principalement sur l'analyse du cerveau et sur les tumeurs associées.

### 1.2.1 Technologies

Une étude pionnière utilisant la spectroscopie Raman a été faite en 2010 [23] et décrit en détails la technique utilisée pour la détection des métastases cérébrales. Comme dans le cadre de cette maîtrise, le groupe de recherche emploie une sonde utilisant des fibres optiques et filtres interférentiels pour l'acquisition. La grosseur du focus d'excitation est réduite puisque, lorsque cela est combiné à un espacement restreint entre les points d'acquisition, une résolution latérale élevée est obtenue. Il est d'ailleurs mentionné qu'avec un focus de 120  $\mu\text{m}$  de diamètre, aucun dommage n'était causé au tissu. Ainsi, des intensités plus élevées (par exemple 200 mW) peuvent être utilisées pour l'excitation sans engendrer des dommages thermiques. Les spectres sont normalisés par une simple correction multiplicative et une segmentation des spectres est obtenue avec la technique *k-means cluster* dans la plage allant de 900 à 1 700  $\text{cm}^{-1}$  (plus de détails dans [24]). Dans cette étude, différentes bandes associées à des composants du cerveau sont notées. Cela sera décrit dans la section suivante.

Afin de calibrer les spectres Raman provenant de divers échantillons, plusieurs études utilisent une substance chimique de référence avec un spectre bien connu. Souvent, il est question de 4-aétamodophénol (ou plus communément appelé *Tylenol*), avec un des pics entre 200 et 1 700  $\text{cm}^{-1}$  et une section entre 3 000 et 3 300  $\text{cm}^{-1}$  [24]. Cette étude de 2008 dans la revue scientifique *Vibrational Spectroscopy* décrit des étapes importantes à la préparation des spectres, par exemple le fait de soustraire le signal d'arrière-plan pour chaque spectre afin de compenser pour les signaux provenant des éléments optiques présents dans le parcours de la lumière d'excitation. Dans cette étude, l'analyse par k-moyennes (*k-means clustering*) est utilisée avec une distance euclidienne. Cette analyse est précédée par une normalisation des spectres à l'aide d'une fonction multiplicative de correction pour séparer les informations chimiques. Cette

fonction est très stable puisqu'elle se base sur l'acquisition d'un spectre de référence. Cette technique est particulièrement utile puisque les échantillons étudiés possèdent des épaisseurs diverses, un aspect physique qui peut normalement modifier le signal.

Certains articles couvrent un aspect précis de l'étude par spectroscopie Raman, comme il est question dans une étude publiée dans *Applied Spectroscopy* en 2007 [25]. On y présente ici l'autofluorescence intrinsèque qui couvre le signal Raman, puisque ce signal d'arrière-plan est souvent de quelques ordres de grandeur plus élevé. Des méthodes de régression multipolynomiale simple ou modifiée sont efficaces pour retirer ce signal d'arrière-plan des spectres Raman. Cependant, cela peut parfois se révéler sous-optimal dans des applications en temps réel ou avec un très faible signal-sur-bruit. Pour des applications biomédicales, des polynômes de degrés 4 à 6 sont optimum selon l'expérience empirique du groupe de recherche, sauf lorsqu'il est question de lésion hautement pigmentée, où un polynôme d'ordre 2 se révèle idéal. D'autres techniques sont étudiées, telles que la soustraction simple d'un référentiel, la correction Savitzky-Golay ou la correction par le minima de la courbe, mais les résultats sont moins probants. Un autre point de vue stipule que le fait d'appliquer un pré-traitement au signal Raman tel que la soustraction de l'autofluorescence pose un risque de perdre des informations importantes et n'est donc pas recommandable. Ce point de vue ne semble toutefois pas généralisé dans les nombreux articles scientifiques. Dans l'étude qui suggère cela [26], l'autofluorescence est tout de même diminuée en exposant le tissu à la source lumineuse pendant les 4 secondes précédant l'acquisition.

Un aspect plus technique de la spectroscopie Raman est étudié dans un autre article, celui-ci portant sur les fibres de Bragg [27]. Il y est mentionné que le laser utilisé pour l'excitation des tissus peut générer un signal Raman intense spécifique à la fibre de cœur qui surpasse le signal provenant de l'échantillon. Ainsi, un filtre et une fibre optique spécifique doivent être utilisés dans la sonde spectroscopique. En outre, le signal de Rayleigh peut aussi interférer, nécessitant un filtre passe-haut ou passe-bande dans la sonde. Finalement, pour améliorer le ratio signal-sur-bruit, il suffit d'augmenter le nombre de fibres de collection du signal lumineux.

L'utilisation de sondes optiques de petite taille permet non seulement de surmonter la pénétration limitée de la lumière d'excitation, mais aussi d'obtenir un usage minimalement invasif (par exemple lorsque lié à un endoscope) [4]. D'autres groupes utilisent aussi des

microsondes optiques qui permettent un usage rapide et simple dans des échantillons biologiques ou non, avec des modèles murins [28] ou encore chez l'humain.

Pour ce qui est de l'application qui concerne ce projet de maîtrise, nombre d'études se sont penchées sur le diagnostic des tissus cancéreux avec la spectroscopie Raman. En utilisant une sonde de fibres optiques, il est possible de détecter des changements moléculaires qui se produisent durant la carcinogénèse grâce aux spectres qui peuvent être vus comme des marqueurs phénotypiques du cancer [4]. Cela a été fait dans plusieurs tissus cancéreux humains tels que ceux de la prostate et de la vessie, et, grâce à l'étude des spectres, la carcinogénèse et la croissance des tumeurs sont un peu plus documentées [29]. Dans ce document, les détails seront réservés pour l'organe étudié, le cerveau.

### 1.2.2 Lien avec la problématique

L'étude du groupe de C. Krafft (2010) a dénoté plusieurs bandes associées à des composants importants du cerveau humain. Par exemple, l'intensité de vibration des liens OH près de  $3\,245\text{ cm}^{-1}$  et  $3\,425\text{ cm}^{-1}$  est principalement associée à l'eau présente dans le tissu [23]. Une différence dans la quantité d'eau présente peut donc mener à une différente classification de tissu selon l'étude des spectres seule. Il est ainsi important d'étudier les caractéristiques spectrales de différentes molécules communes. Des molécules importantes sont présentées au Tableau 1.1, alors qu'une répartition plus complète se trouve à l'annexe B.

Tableau 1.1 : Pics Raman associés à différentes molécules ou composants des tissus

<b>Bande Raman (<math>\text{cm}^{-1}</math>)</b>	<b>Liaisons ou molécules</b>
427, 544, 608, 700, 1 439, 1 672	Système aromatique du cholestérol
430, 546, 608, 701, 1 440	Contenu élevé en CH (matière blanche)
606, 1 439, 1 669	Cholestérol
500-850	Nucléotides et acides aminés
960	Hydroxyapatite de l'os
1 004	Acide aminé aromatique phénylalanine
1 267 et 1 661	Acides gras insaturés
1 267 et 1 661	Groupe amine de squelettes protéiques
1 301 et 1 445	Vibrations des déformations $\text{CH}_2$ et $\text{CH}_3$
Près de 1 640	Bande Raman faible de l'eau
750, 1 002, 1 212, 1 546, 1 605 et 1 619	Hémoglobine oxygénée (oxyhémoglobine)
Au-dessus de 3 100	Eau

Par exemple, une concentration d'eau sera plus importante dans la matière blanche que dans la matière grise [21]. Le tout peut se résumer en une très haute absorption soit par l'hémoglobine entre 350 et 700 nm, soit par les lipides, les protéines et l'eau au-dessus de 900 nm, et en une faible absorption entre 700 et 900 nm par les biomolécules [4]. Toutefois, la diffusion inélastique associée au lien OH est relativement faible et, ainsi, sa contribution dans le spectre global des tissus biologiques peut être négligée [30].

Tel que vu précédemment, il y a présence de différences dans la composition des diverses structures du cerveau, ce qui a pour effet que l'empreinte spectrale sera aussi différente. Par exemple, la *dura mater* et les leptoméniges, qui forment les couches cérébrales encapsulant les méninges, possèdent des propriétés optiques semblables à celles de la peau. On y retrouve d'ailleurs une forte contribution spectrale provenant du collagène [9]. Le glycogène, quant à lui, n'est pas en quantité importante ni dans les tissus normaux, ni dans les métastases cérébrales.

Plusieurs applications sont directement en lien avec le cancer cérébral. Une étude par le groupe de C. Krafft (2009) est particulièrement pertinente lorsqu'il est question de la spectroscopie Raman des tumeurs au cerveau [31]. En effet, une analyse par spectroscopie de masse et Raman a été effectuée sur des échantillons de lipides provenant du cerveau et de tumeurs associées. Il a été découvert que les gliomes sont caractérisés par un contenu aqueux plus important, ainsi qu'une concentration moindre de lipides. Cependant, la détection des changements de la composition lipidique des tissus est complexifiée par la contribution dominante de la vibration spectroscopique des protéines. Quelques études utilisent des pics spécifiques à certains composants du cerveau seulement afin de détecter les anomalies tumorales. Par exemple, en prenant comme indicateur moléculaire le ratio entre la bande correspondant aux lipides ( $2850\text{ cm}^{-1}$ ) et celle associée aux protéines ( $1655\text{ cm}^{-1}$ ), il est possible de distinguer les tissus normaux, de bas grades, de grades intermédiaires, de grades élevés, hémorragiques ainsi que d'autres types de tissus [9].

Une autre étude par le groupe de recherche de C. Krafft (2012) utilise des images microscopiques de tissus plutôt que des spectres ponctuels et a démontré qu'une contribution spectrale plus intense des acides nucléiques se produit dans des cellules tumorales de haut grade, contrairement à celles de bas grade [26]. Ils ont aussi établi que l'intervalle spectral allant de  $576$  à  $1773\text{ cm}^{-1}$  était adéquat pour leur étude avec une source à  $785\text{ nm}$ , puisque les résultats

n'étaient pas améliorés avec les gammes du dessus ou du dessous. Un autre groupe mentionne que la bande Raman à  $1\,080\text{ cm}^{-1}$  peut en effet servir comme très bon marqueur des acides nucléiques avec une haute spécificité. Par contre, son intensité a été trouvée trop faible pour être utile lors d'acquisitions *in vivo* et ils utilisent plutôt des régions correspondant au CH telles que les bandes  $2\,930$  et  $2\,845\text{ cm}^{-1}$  [32].

L'utilisation de tissus *ex vivo* est répandue pour les études de microscopie Raman. Avec des tissus séchés, il y a cristallisation des lipides ou dénaturation des protéines et des acides nucléiques, ce qui n'est pas le cas lorsque les échantillons sont congelés. Or, puisque les changements dans la constitution des tissus en termes de proportion de lipides sont reconnus comme un indicateur précieux de nombreuses pathologies (athérosclérose, tumeurs cérébrales, etc.), il est préférable de conserver les échantillons biologiques dans de l'azote liquide et de les décongeler juste avant l'acquisition [33]. En plus des échantillons de tissus, des cellules *in vitro* peuvent être étudiées. En analysant les spectres Raman provenant d'astrocytomes et d'astrocytes, aucune différence majeure n'a été trouvée (probablement en raison de la composition semblable entre les cellules), si ce n'est que l'intensité Raman des cellules cancéreuses est beaucoup plus élevée [34].

Outre les échantillons *ex vivo*, la technologie Raman est parfois testée chez des modèles murins avant de pouvoir être utilisée chez des patients humains. En utilisant des cellules de gliome C6 (une lignée cellulaire expérimentale) chez des rats, celles-ci vont se transformer en tumeur intracérébrale comportant des caractéristiques pathologiques similaires à celles du glioblastome humain (GBM). Une équipe a étudié ce type de tissu avec une microsonde Raman (120 mW pendant 5 secondes de temps d'intégration) afin de caractériser ses composants [28]. Il est possible d'y retrouver les spectres représentatifs des types de tissus ou des composés moléculaires qui seront étudiés dans le présent projet (voir l'annexe A). On note des différences à l'œil nu entre quelques spectres, et on remarque même que les spectres des tissus semblent être constitués d'une somme pondérée de certains composés moléculaires. Ce sont ces différences en termes de composition qui permettront de discriminer entre différents tissus.

### 1.2.3 Obstacles notés dans les études antérieures

Différentes problématiques ont été soulevées dans les articles retenus et pourront donc être prévenues dans la présente étude. Par exemple, le fait que l'arrière-plan du signal chevauche

le signal de fluorescence intrinsèque du tissu nuit au signal Raman. Toutefois, cela est surtout le cas lorsque l'excitation se situe entre 400 et 700 nm [23]. D'autres études notent la présence de changements locaux des propriétés optiques dans le tissu, causés par la pression lorsqu'une sonde entre en contact physique avec le tissu [35], [13]. De plus, l'extrémité distale peut obscurcir la mesure optique prise à la surface du tissu. Pour les mesures de fluorescence et réflectance diffuse, les mesures sont davantage sensibles à la pression exercée sur un tissu biologique. Avec une sonde, une pression délicate est recommandée afin d'éviter de modifier la quantité de sang présente dans le tissu [36]. Avec des fantômes, l'effet de la pression ou même la position de la prise de mesure sont négligeables sur les spectres. Une étude recommande de tenir compte des propriétés optiques des tissus lorsque les spectres Raman sont utilisés pour discriminer des tissus cancéreux des tissus sains, principalement parce que la profondeur d'acquisition dépend de la diffusivité et de l'absorption des différents tissus interrogés [37]. Pour le traitement de signal, il arrive aussi parfois que des pics cosmiques soient présents sur les spectres Raman prélevés. Lorsqu'un pic cosmique est détecté, il est possible de conserver les spectres en le remplaçant simplement par une moyenne des trois points d'acquisition qui le précèdent [24].

Il été vu que la spectroscopie Raman peut être considérée comme une empreinte moléculaire optique de l'échantillon étudié. Ceci est particulièrement utile lors de l'étude de la composition de divers tissus biologiques, ou lorsqu'il est question de détecter des conditions qui se manifestent par des changements au niveau moléculaire, comme c'est le cas avec divers cancers. D'autres techniques optiques sont utilisées à cette fin, et ce depuis bien avant que la spectroscopie Raman soit étudiée à une échelle importante. C'est le cas de la fluorescence des tissus biologiques.

## **1.3 Réflectance diffuse et fluorescence**

### **1.3.1 Contraste endogène : théorie et applications**

Les signaux de réflectance diffuse sont obtenus en considérant une géométrie d'imagerie en épi-illumination d'un échantillon. Cette technique se définit par le fait que la lumière réémise suite à l'excitation est recueillie du même côté du spécimen que la source. Elle diffère de la transillumination qui, elle, correspond à la transmission de lumière à travers un échantillon. Ce mode de détection est utilisé par exemple en microscopie, mais n'est pas utilisable dans un

contexte intra-opératoire. Le rayon lumineux d'excitation peut être réfléchi directement à la surface en raison du changement d'indice de réfraction entre l'air et un matériau (liquide translucide sur le tissu par exemple) : c'est la réflexion spéculaire. Cette lumière peut être bloquée par un polarisateur étant donné que la réflexion spéculaire a pour effet de conserver l'état de polarisation de la lumière incidente. Une autre façon de réduire la réflexion spéculaire, qui ne contient qu'une information limitée sur le tissu, est de procéder à un contact direct avec l'échantillon, par exemple avec une sonde optique [38], et de réduire le plus possible la présence de liquide sur le tissu durant l'acquisition. Mis à part la réflexion spéculaire, la lumière se propage dans le tissu et divers événements surviennent (Figure 1.5).

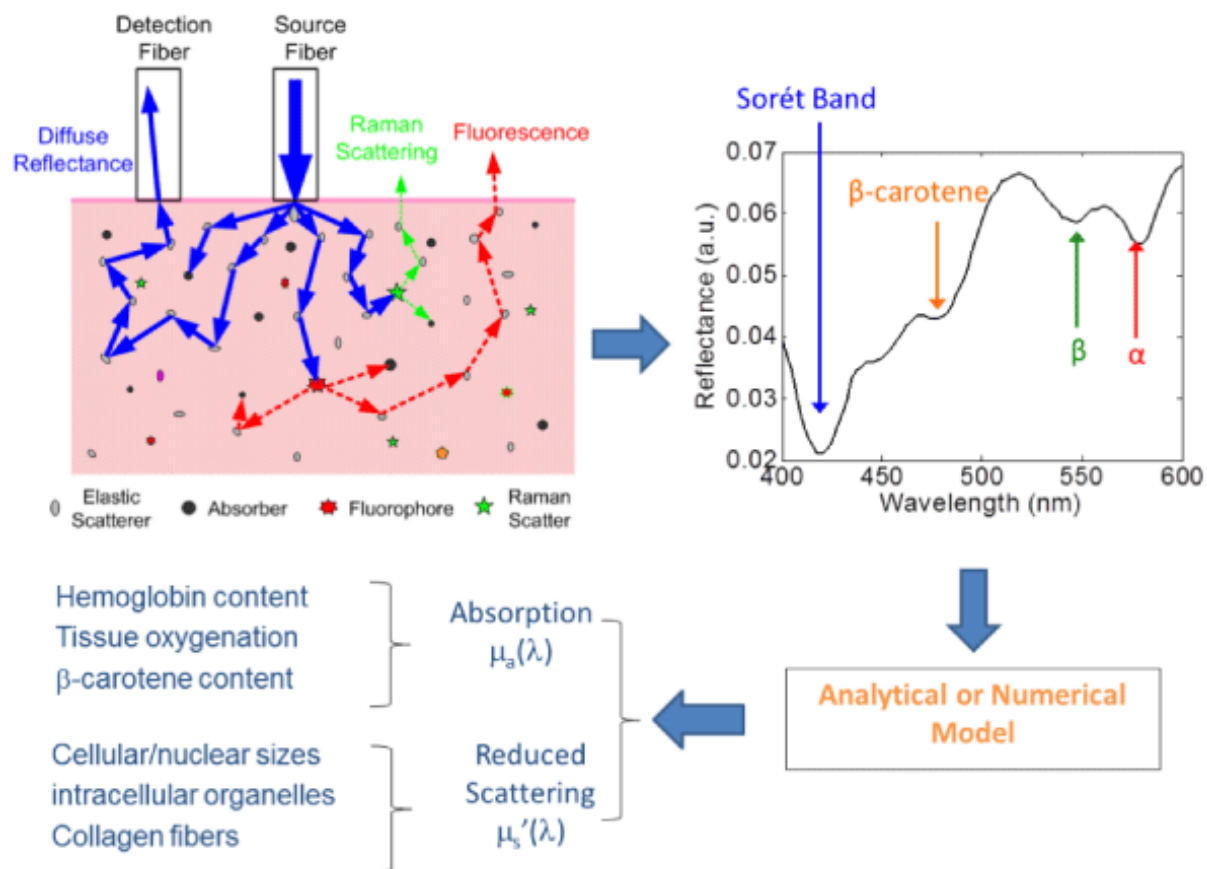


Figure 1.5 : Réflectance diffuse pour extraire les propriétés optiques du tissu. Tiré de [39].

Dans le cas de la réflectance diffuse, les photons se propagent dans le tissu par le phénomène appelé diffusion élastique. Ce phénomène est illustré à la Figure 1.5 par les flèches bleues. La majorité des photons sont absorbés par le tissu, mais une petite fraction s'échappe à sa surface après plusieurs changements de direction. La lumière diffusée peut donc être recueillie à



la surface du tissu par un détecteur optique et le spectre obtenu est appelé spectre de réflectance diffuse. Un spectre de réflectance diffuse dépend des propriétés optiques intrinsèques du matériau qui est illuminé et constitue donc une technique non invasive permettant de mesurer ces informations dans un milieu trouble tel qu'un tissu biologique. Il est donc possible, à l'aide de modèles mathématiques de transport de la lumière dans les tissus, de retirer les informations de diffusivité (*scattering* coefficient  $\mu_s$ ) et d'absorbance (coefficient d'absorbance  $\mu_a$ ) à partir d'une mesure de réflectance.

Premièrement, la propagation de la lumière dans le tissu est majoritairement dominée par la diffusion. Il s'agit d'un phénomène élastique puisqu'aucune variation d'énergie ne survient, contrairement à la diffusion Raman qui, elle, est inélastique (les niveaux d'énergie sont représentés à la Figure 1.3). Ainsi, les spectres de réflectance diffuse proviennent du retour des photons après qu'ils aient rencontré plusieurs diffuseurs (représentés par des ovales blancs sur la Figure 1.5), ce qui cause plusieurs changements de trajectoire. Cette diffusion est causée par le changement d'indice de réfraction entre les milieux, tel qu'il se produit lors du passage de la lumière à travers un milieu cellulaire. Les diffuseurs présents dans un tissu biologique comme le cerveau sont nombreux et diffèrent de nature. Par exemple, avec un tissu épithélial, la diffusion de la lumière provient majoritairement des noyaux cellulaires et des organelles présents dans l'épithélium et le stroma, mais aussi des fibres de collagène [39]. Un modèle mathématique basé sur la théorie de la diffusion de Rayleigh ou sur celle de la diffusion de Mie peut être utilisé pour modéliser les modifications de la direction de la lumière dans un milieu. La première théorie est utilisable lorsque la taille du diffuseur est négligeable par rapport à la longueur d'onde, alors que la deuxième fonctionne pour n'importe quelle taille d'une molécule sphérique. Les modèles utilisent le coefficient de diffusion  $\mu_s$  susmentionné et dépendent donc de la nature et du nombre de diffuseurs présents en plus de l'équation de marche aléatoire (mouvement brownien). En bref, ce coefficient  $\mu_s$  est une variable exprimée en  $\text{cm}^{-1}$  qui décrit la probabilité qu'un photon soit diffusé par unité de longueur [40].

Deuxièmement, puisque la diffusion est élastique, les changements entre le spectre qui est recueilli au détecteur et celui de la source d'excitation proviennent principalement du contraste optique créé par le phénomène d'absorption. L'absorbance peut être vue comme étant la portion de lumière absorbée par les chromophores d'un échantillon à une longueur d'onde donnée. L'énergie d'excitation est dissipée sous forme de chaleur (énergie cinétique par la collision entre

molécules). En connaissant le coefficient d'extinction molaire ( $\text{cm}^{-1}/(\text{mol/L})$ ) d'une molécule ou d'un tissu, l'absorbance  $A$  (sans unité) et le coefficient d'absorption  $\mu_a$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) peuvent être calculés avec la loi de Beer-Lambert. Il s'agit en fait d'une relation proportionnelle utilisant le poids moléculaire ( $\text{g/mol}$ ) et la longueur du trajet lumineux ( $\text{cm}$ ) ou la concentration molaire. Pour l'hémoglobine, par exemple, l'absorbance est donnée par :

$$A(\lambda) = \frac{e(\lambda) \left[ \frac{\text{cm}^{-1}}{\text{mol/L}} \right] * l[\text{cm}] * x \left[ \frac{\text{g}}{\text{L}} \right]}{G \left[ g \frac{\text{Hb}}{\text{mol}} \right]}$$

où

$e$  = coefficient d'extinction molaire de l'hémoglobine qui dépend de  $\lambda$

$x$  = nombre de grammes de la molécule par litre

$G$  = poids moléculaire de l'hémoglobine = 64,5 g/mol

$x/G$  = concentration molaire  $M$

Le coefficient d'absorption  $\mu_a$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) est décrit comme le rapport entre l'absorbance  $A$  et le chemin optique  $l$ . Une valeur typique de  $x$  est 150 g d'hémoglobine dans un échantillon pur de 1L de sang normal humain, selon [41]. Avec ceci, il est possible de connaître l'absorption de l'hémoglobine pour chaque longueur d'onde puisqu'il s'agit d'une relation proportionnelle à  $e(\lambda)$  qui est présenté graphiquement ci-dessous.

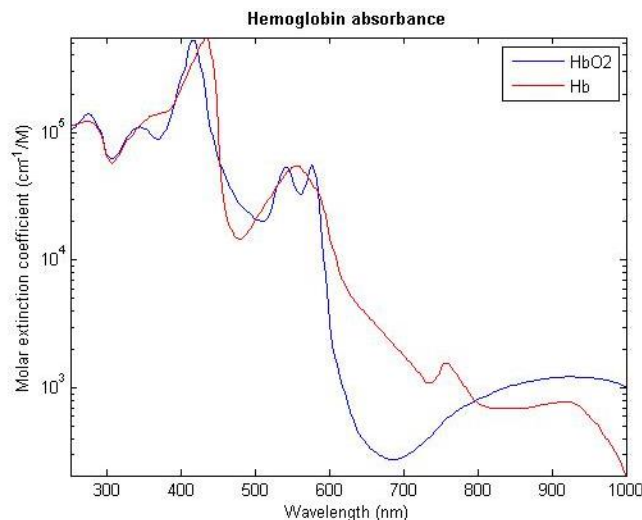


Figure 1.6 : Graphique présentant les pics d'absorption de l'oxy- et déoxyhémoglobine (bleu et rouge respectivement), principaux absorbeurs présents dans le sang et dans les tissus vivants. Les données utilisées sont tirées de [41].

Lorsque l'énergie d'excitation n'est pas dissipée en chaleur et rencontre un fluorophore (ou fluorochrome), il est question de fluorescence (flèches rouges à la Figure 1.5). Très brièvement, la fluorescence est décrite comme étant l'émission de lumière par une substance suite à l'absorption d'ondes lumineuses ou d'une autre source de radiation électromagnétique. De manière commune, la lumière émise par l'échantillon possède une énergie moindre que celle utilisée pour l'excitation, donc la longueur d'onde émise est en général plus grande (décalée vers le rouge). Les molécules fluorescentes sont caractérisées par un spectre d'excitation et d'émission, ce dernier étant typiquement indépendant de la longueur d'onde d'excitation [18]. Le spectre d'excitation à une longueur d'onde donnée correspond à un coefficient d'extinction de la molécule. D'un point de vue moléculaire, la fluorescence intrinsèque d'une molécule, aussi appelée autofluorescence, est l'émission naturelle de lumière par différentes structures biologiques telles que les mitochondries ou les lysosomes après qu'elles aient absorbé de l'énergie. Par exemple, des protéines contenant une quantité élevée d'acides aminés tryptophane, tyrosine ou phénylalanine vont présenter une certaine autofluorescence [42]. Les fluorophores contiennent typiquement plusieurs groupes aromatiques ou des molécules planes ou cycliques. Les longueurs d'onde d'absorption, l'efficacité du transfert de l'énergie reçue (rendement quantique, soit le ratio du nombre de photons émis par rapport au nombre de photons absorbés) ou encore le temps de latence avant l'émission de lumière dépendent à la fois de la structure du fluorophore et de son environnement chimique.

Dès 1987, une étude pionnière s'amorce et l'hypothèse que les porphyrines présentes dans les tissus biologiques émettent un signal intrinsèquement fluorescent est émise. Ces chercheurs sont intéressés par le fait que la production d'un contraste optique par l'autofluorescence des porphyrines ne nécessite pas l'administration d'agents externes, mais aussi par le fait que l'utilisation de sources laser proche ultraviolet nécessaire à leur excitation, bien qu'elle soit puissante, ne cause pas de dommage aux tissus sains [43]. Quelques groupes de recherche étudient la spectroscopie de fluorescence intrinsèque combinée ou non à la réflectance pour le diagnostic de tissus biologiques depuis des décennies [44]. C'est le cas entre autres pour l'oncologie des voies orales, où cette technique démontre un très bon potentiel diagnostique pour détecter les lésions [45]. Les effets de l'absorption du sang sont corrigés sur l'autofluorescence par le spectre de réflectance diffuse, tel qu'il sera décrit dans la sous-section suivante. Plusieurs fluorophores endogènes sont détectables avec une excitation à longueurs d'ondes multiples, par

exemple le collagène, l'élastine, la kératine et le NADH, tous présents dans les tissus des voies orales (et la plupart des tissus humains tels que la peau, voir la Figure 1.7). Un exemple d'application de cette théorie a été effectué en classifiant des tissus néoplasiques, hyperplasiques et normaux du côlon. Les changements majeurs dans le spectre de fluorescence des tissus normaux vs tumoraux se situent dans une diminution de la fluorescence associée au collagène et une croissance de l'absorption de l'hémoglobine [46]. De plus il a été démontré, avec une excitation à 377 nm, que les pics présents à 390 et 460 nm pouvaient provenir de la présence de collagène et de NADH dans le tissu. L'auto fluorescence est aussi utilisée pour étudier d'autres types de cancers tels que le cancer du sein, où une faible activité vers 630 nm a été associée aux tissus tumoraux seulement, et pourrait provenir de l'émission de protoporphyrines [47]. Ces protoporphyrines, ainsi que des lipo-pigments, du collagène, de l'élastine, du NADH et des flavines pourraient être détectés dans l'organe cérébral avec une technique d'imagerie hyperspectrale.

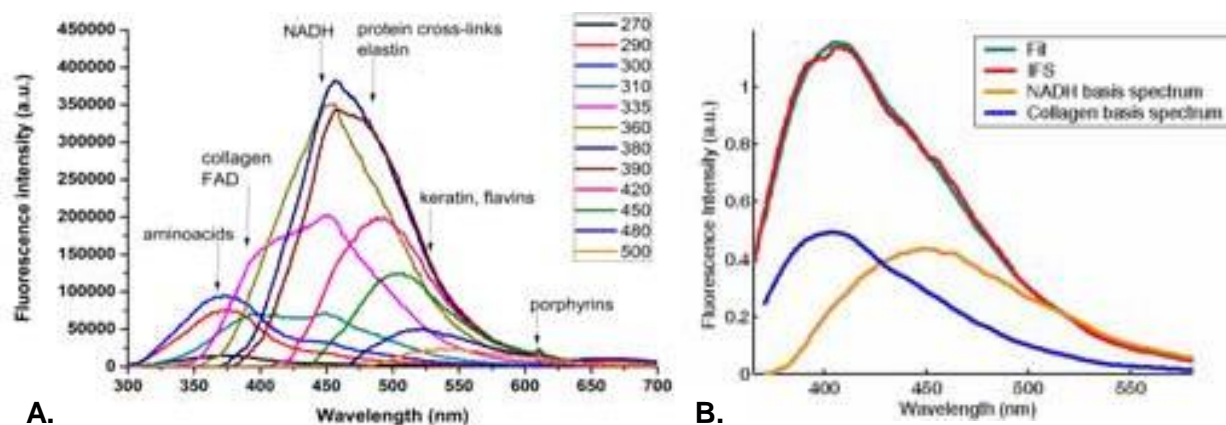


Figure 1.7 : Les spectres de fluorescence intrinsèque sont la somme des molécules à contraste endogène présentes dans les tissus humains. **A.** Fluorescence intrinsèque de la peau (tissus normaux) à différentes longueur d'onde d'excitation, allant de 270 nm à 500 nm. Les principales molécules endogènes liées à l'auto fluorescence sont identifiées selon leur maxima d'excitation et d'émission. Ces molécules incluent le collagène, le NADH, l'élastine et les porphyrines. Tiré de [48]. **B.** En rouge on retrouve un spectre de fluorescence intrinsèque (IFS) d'un tissu biologique lorsqu'excité avec une source à 340 nm. Le spectre peut être vu comme une combinaison linéaire des spectres des molécules fluorescentes qui le composent. En bleu et jaune, il s'agit des spectres

des deux molécules principales qui contribuent au spectre de fluorescence intrinsèque global, soit le collagène et le NADH. Tiré de [49].

La fluorescence intrinsèque et la réflectance diffuse sont aussi étudiées dans le cerveau pour détecter les marges des gliomes. Par exemple, en effectuant un test T de Student pour discriminer les indicateurs de tumeurs, il est possible de détecter des tissus infiltrés avec une sensibilité très élevée (94 % pour les tissus infiltrés et 93 % de spécificité, contre 80 % et 89 % de sensibilité et spécificité pour les tumeurs brutes) [50]. La technique présentée dans la revue scientifique *Neurosurgery* est testée durant la chirurgie de résection de gliomes et utilise un outil spectroscopique sous forme de sonde optique manuelle. Cet article est la continuation d'une étude de 2001 du même groupe de recherche. Cette étude clinique comprenant 26 patients a démontré que la fluorescence intrinsèque (excitation à 460 et 625 nm) et la réflectance peuvent détecter les tissus infiltrés avec une excellente sensibilité (100 %) et une bonne spécificité (76 %), bien que l'absorption du sang soit un problème majeur [51]. Les propriétés optiques dans le visible des différents tissus du cerveau peuvent en effet être utilisées avec succès pour distinguer les tissus cérébraux normaux de ceux atteints d'une pathologie. C'est ce qu'a démontré une étude antérieure, cette fois-ci en utilisant des échantillons *in vitro* avec une excitation à 377 nm [52]. Même en utilisant seulement la réflectance diffuse, il a été prouvé que les tissus néoplasiques exprimaient des changements assez significatifs dans leurs caractéristiques physiologiques et morphologiques pour être en mesure d'être détectés [39].

### **1.3.2 Contraste exogène : théorie, applications et quantification**

Plusieurs études et applications utilisent cette caractéristique propre à quelques composés chimiques ou biologiques, soit leur fluorescence spécifique, afin de détecter des tissus ou structures qui ne fluorescent pas d'eux-mêmes [53], [54]. Par exemple, la protéine fluorescente verte GFP (*green fluorescent protein*) émettra dans les longueurs d'ondes correspondant au vert (509 nm) lorsque l'excitation de la protéine se fait dans ses longueurs d'ondes d'excitation. La GFP possède un pic majeur d'absorption à 395 nm et un mineur à 475 nm. En biomédical, la protoporphyrine-IX, induite par l'administration préalable d'acide aminolévulinique 5-ALA, est souvent utilisée puisqu'elle se lie favorablement à certaines régions tumorales [5]. Pour le cancer du cerveau, l'agent de contraste est rapidement ingéré par les cellules GBM où le 5-ALA sera

converti en porphyrines hautement fluorescentes. En effet, le biomarqueur endogène PpIX s'accumule préférentiellement dans les gliomes de hauts grades, son contraste de fluorescence peut ainsi être détecté afin de permettre la résection de la tumeur [6]. Comme illustré à la Figure 1.8, une excitation à 405 nm aura un effet maximal sur la fluorescence résultante, puisqu'un pic d'absorption de la molécule PpIX est présent dans cette région spectrale. La fluorescence émise par cette molécule comporte un pic majeur à 635 nm ainsi qu'un pic secondaire autour de 700 nm. Ainsi, avec une excitation des tissus imprégnés de protoporphyrine-IX avec une source bleue, les régions touchées réémettront une lumière rougeâtre.

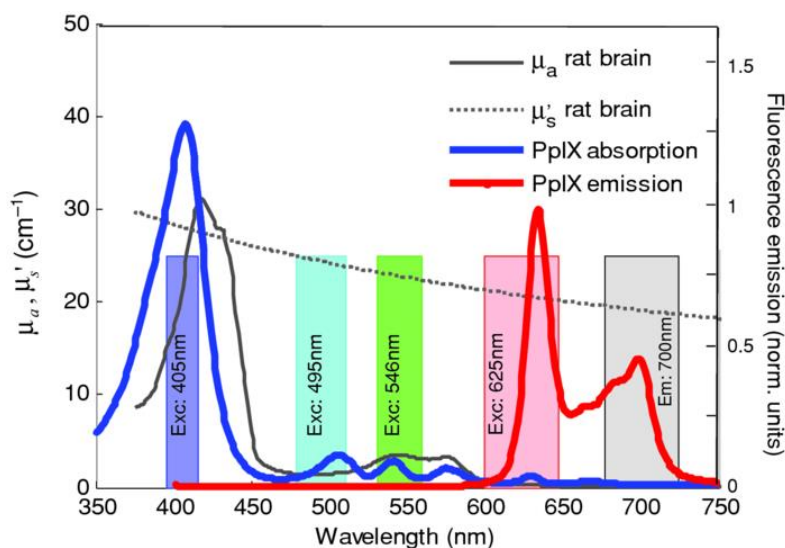


Figure 1.8 : Spectres d'absorption et d'émission de la protoporphyrine-IX. Tiré de [55].

Bien que les modèles murins ne soient pas en mesure de représenter entièrement le scénario clinique associé à la résection et à la récurrence de GBM, un groupe de Harvard a obtenu des résultats encourageants à la suite de l'utilisation de PpIX pour guider la chirurgie [56]. En implantant des cellules de gliomes humaines U87 exprimant la protéine fluorescente GFP conjointement avec l'administration de 5-ALA, la PpIX a pu être co-localisée de manière extensive avec la GFP. Cela a permis de définir des marges de tumeurs similaires avant l'opération. Dans la phase III de l'étude, il a été démontré que la PpIX augmente le taux de résection complète de GBM de 50 %, en plus de doubler la période sans progression du cancer, qui est en moyenne d'environ 6 mois. Pour la chirurgie d'ablation de tumeurs au cerveau chez les humains, le microscope utilisé est souvent équipé avec une source lumineuse à 405 nm afin d'exciter la région cancéreuse imprégnée de PpIX. Cette technique facilite la résection [57] en

permettant de faire ressortir les zones à enlever en rose flamboyant. Par contre, la sensibilité de la détection est faible avec les techniques d'aujourd'hui, en partie parce que ce type de fluorescence n'est utile qu'avec des concentrations importantes de PpIX. De plus, les décisions relatives à la résection de tissus dépendent entièrement de jugements subjectifs et d'observations qualitatives des images obtenues. Or, l'intensité perçue dépend aussi hautement de la distance et de l'angle relatifs à la surface du tissu. Pour ces raisons, des outils avec une précision élevée (sondes optiques, caméras EMCCD sensibles, etc.) sont étudiés. C'est le cas entre autres d'une technique de quantification de PpIX développée par un groupe de recherche de Darmouth College.

Afin de parvenir à quantifier adéquatement la concentration d'un fluorophore présent dans un tissu biologique, il faut connaître les propriétés optiques d'absorption et de diffusion de ce dernier à la longueur d'onde d'excitation. En effet, des effets de distorsions surviennent dépendamment de la nature du tissu ou de son état (plus ou moins irrigué par le sang, par exemple). Des mesures en réflectance diffuse peuvent donc permettre de corriger le signal de fluorescence et d'en retirer une concentration de fluorophore [58]. Il est possible de faire cela en considérant l'hypothèse que les photons réfléchis et fluorescents subissent les mêmes effets d'absorption et de diffusion lorsqu'ils traversent le tissu [45].

L'approche proposée convertit des données spectralement résolues en des images indiquant précisément la concentration de fluorophore à chaque pixel en couvrant tout le champ de vision chirurgical. Un algorithme permettant de corriger l'atténuation des tissus, due à l'absorption et à la diffusion, est nécessaire pour cette quantification [2], [59]. Avec les spectres de réflectance, la concentration totale d'hémoglobine, la saturation d'oxygène ainsi que les paramètres optiques peuvent être calculés [6]. Ainsi, avec ces informations et la concentration de PpIX, une exactitude de 94 % est atteinte dans la délimitation des tumeurs intracrâniennes. En plus de la correction par la réflectance diffuse, il a été démontré qu'un algorithme de normalisation utilisant un spectre d'autofluorescence peut grandement améliorer la détection par la PpIX administrée oralement [60].

En plus des utilisations en champ large, souvent jointes au microscope chirurgical utilisé pour la résection de tumeurs, des applications point par point sont possibles en salle d'opération grâce à des sondes de détection. Par exemple, une sonde de réflectance a été développée par un groupe de recherche afin d'étudier la possibilité de diagnostic *in vivo*. Pour les tissus biologiques,

la réflectance peut illustrer la physiologie vasculaire ainsi que l'ultrastructure des tissus, ce qui peut présenter un pouvoir diagnostique important [61], [62], [63]. Par exemple, en n'étudiant que la réflectance diffuse seule dans le cerveau, une différence marquée est notée entre les tissus cancéreux et normaux quant à l'intensité de leur spectre respectif, notamment dans la région d'absorption maximale de l'hémoglobine (entre 450 et 580 nm) [6]. Cependant, les sondes spectroscopiques sont souvent utilisées à la fois pour la fluorescence et pour la réflectance au lieu de pour une seule modalité [64]. Le groupe de Toronto a publié un article portant sur la validation d'un outil spectroscopique à fibres optiques avec des fantômes et des tissus murins *ex vivo*, ainsi qu'avec un modèle tumoral chez le lapin, le tout utilisant encore une fois la fluorescence induite par l'ALA-PpIX [36]. Cet outil est en mesure d'étudier à la fois la fluorescence et la réflectance diffuse. Dans cet article, il est mentionné que la majorité de l'absorption des fluorophores survient près de la fibre optique d'excitation, particulièrement lorsque la longueur d'onde se situe entre 380 et 450 nm (l'absorption de l'hémoglobine entre 450 et 650 nm ne pose donc pas de problème). Dans les modèles de tumeurs chez le lapin, le contraste moyen trouvé entre les tumeurs et les tissus normaux se situe autour de 35:1. Avec leur sonde, un seuil de détection de 5:1 a été mesuré, allouant ainsi une détection d'environ 14 % d'infiltration de tumeur. Chez l'humain, la détection de PpIX comme diagnostic de tumeurs se fait avec une exactitude de 87 %, ce qui constitue une nette amélioration par rapport au 66 % associé à la précision des techniques usuelles de détection en fluorescence [65]. De plus, comme plus de 81 % des mesures se trouvaient en deçà du seuil de détection du neurochirurgien, ces régions cancéreuses auraient donc normalement été omises durant la résection.

Il existe d'autres techniques efficaces telles que la spectroscopie utilisant la fluorescence dynamique dans le temps (*fluorescence lifetime*) [66]. L'efficacité de la spectroscopie par fluorescence résolue dans le temps a aussi été prouvée pour la détection de gliomes de bas et hauts grades sur des échantillons congelés [67]. L'aspect dynamique de l'étude améliore la spécificité de la fluorescence.

## 1.4 Classification des tissus

Plusieurs études utilisent une technique visant à discriminer différents types de tissus biologiques selon chaque spectre obtenu. Dans beaucoup de cas, il s'agit d'algorithmes de classification tels que l'apprentissage machine. Ceux-ci se spécialisent dans la répartition de



données en groupes distincts, d'abord en étudiant des données d'entraînement pour ensuite faire des prédictions. Par exemple, avec les algorithmes d'arbres de décision, les feuilles représentent les différentes classes et chaque branche est associée à une conjoncture de caractéristiques. Ces caractéristiques sont générées par la manipulation des données d'entraînement.

Avec la méthode *leave-one-out*, il est possible de déterminer facilement l'exactitude d'un algorithme. On laisse une donnée en dehors de la série d'entraînement, puis le résultat de sa classe est évalué avec cette série. On recommence en faisant la même chose avec tous les points de manière individuelle, et au final la précision est donnée par le nombre de bonnes réponses obtenues. Dans ce mémoire, les formules suivantes sont utilisées afin de caractériser les algorithmes testés :

$$\text{Exactitude} = \frac{\text{vrais positifs} + \text{vrais négatifs}}{\text{vrais positifs} + \text{vrais négatifs} + \text{faux positifs} + \text{faux négatifs}}$$

$$\text{Spécificité} = \frac{\text{vrais négatifs}}{\text{vrais négatifs} + \text{faux positifs}}$$

$$\text{Sensitivité} = \frac{\text{vrais positifs}}{\text{vrais positifs} + \text{faux négatifs}}$$

(éq. 1.1)

La technique de *bagging* (ou *bootstrap aggregation*) se montre particulièrement efficace lorsqu'il y a beaucoup de bruit de classification, alors que lorsqu'il est réduit la technique *Boosted Trees* démontre davantage d'exactitude [68]. Par exemple, l'algorithme est robuste au bruit dans les ensembles de données utilisées pour entraîner l'algorithme aussi bien que dans les données à trier. Ces méthodes sont reconnues pour obtenir une très bonne performance prédictive. En bref, *Boosted Trees* opère en construisant plusieurs arbres de décision à partir des données d'entraînement, où chaque arbre a une règle de classification et opère avec les restes de la classification des arbres de décision qui le précèdent.

L'algorithme machine à vecteur de support (SVM, soit *support vector machine*) est un modèle d'apprentissage supervisé qui classe de manière linéaire. En effet, en représentant la série de données en tant que points dans l'espace, le modèle SVM va tenter de séparer ces points en deux groupes distincts afin de maximiser l'espace entre ces deux groupes. D'un point de vue pratique, le SVM se fait de manière très rapide, surtout lorsque les données sont ponctuelles. En

comparaison, avec la technique du réseau de neurones, l'architecture est beaucoup plus lourde qu'avec le SVM, et elle nécessite plus de temps (environ 30 minutes pour une image). L'analyse par composantes principales (PCA) réduit la complexité en faisant ressortir les caractéristiques importantes de la série de données. En combinant PCA et SVM, il est possible de réduire le temps d'utilisation de l'analyse SVM seule [69]. On réduit alors le nombre de points à analyser pour chaque spectre en retirant les points les plus importants seulement. Ensuite, SVM classe les échantillons. Le SVM multimodal est envisagé pour étudier plusieurs techniques (fluorescence, réflectance et spectroscopie Raman) en concaténant les spectres obtenus.

L'exactitude du diagnostic avec SVM et PCA a été testée pour la détection non-invasive de différents tissus avec la spectroscopie Raman. Par exemple, pour la détection du cancer de l'œsophage, une efficacité de 77 % est obtenue par la technique PCA, alors que des valeurs de 83,6 % et 85,2 % sont obtenues avec les méthodes C-SVM et une combinaison de PCA et SVM respectivement [70]. De plus, il a été déterminé que la combinaison des méthodes PCA et SVM peut simplifier considérablement la complexité de calcul sans toutefois sacrifier les performances globales. Le modèle LDA (*linear discriminant analysis*), un algorithme d'analyse prédictive discriminante, est utilisé pour classer les images FTIR biologiques avec des résultats statistiquement valables [31]. Cette méthode est aussi utilisée pour la classification de tissus avec un nombre d'indicateurs moléculaires discriminants restreints, par exemple en utilisant un simple ratio d'intensité de deux bandes Raman. Par contre, d'autres algorithmes tels que SIMCA (*soft independent modeling of class analogies*), utilisés après une pré-analyse par PCA, donnent de meilleurs résultats de classification que la méthode LDA (preuves avec 3 spécimens contrôles et 17 tumeurs) [9].

Une autre technique de classification est l'analyse par k-moyennes (ou *k-means clustering* en anglais). Une des forces de cet algorithme est qu'il peut facilement supporter une quantité importante de données, comme il est question lors de l'étude d'images Raman et de FTIR [24]. L'analyse discrète d'ondelettes effectuée avec des spectres de fluorescence provenant de tissus de cancer du sein a révélé leur caractère aléatoire notoire, ce qui n'est pas détecté avec des spectres de tissus normaux [47]. Bien qu'il ne s'agisse pas à proprement parler d'une technique de classification, l'analyse par ondelettes pourrait être une avenue intéressante pour étudier les disparités entre les spectres obtenus.

## CHAPITRE 2 SYSTÈME RAMAN

Ce chapitre explore les premières étapes effectuées au cours de la maîtrise recherche, soit le développement du système de spectroscopie Raman en vue d'une utilisation en salle d'opération lors d'une étude clinique. Les détails de cette étude clinique récente seront vus au Chapitre 4. Le but premier de cette portion du projet de maîtrise est de procéder à la mise en place et à la validation clinique d'un système efficace de détection en salle d'opération à l'Institut et hôpital neurologiques de Montréal. Les tâches présentées aux sections 2.1 et 2.2 ont été effectuées avec la collaboration de deux stagiaires à l'été 2013 (L. Bernstein et K. St-Arnaud)

### 2.1 Montage du système Raman

Le système utilisé pour la spectroscopie Raman est composé d'un laser dans le proche infra-rouge, stabilisé à 785 nm (*Innovative Photonics*). La sonde (*EmVision LLC*) y est reliée par un câble optique multimode (connecteur FC/PC) et l'excitation des tissus se fait par l'entremise d'une fibre optique de 200 micromètres de diamètre de cœur placée au centre de la sonde, suivie par un filtre passe-bas à 785 nm afin d'éviter la contamination du spectre (voir la Figure 2.1). Les signaux lumineux déphasés (signal Raman) sont collectés par sept fibres encerclant la fibre d'excitation, après avoir traversé un filtre passe-haut en forme de disque troué. Ces signaux lumineux sont ensuite alignés verticalement pour être transmis à un spectrographe combiné à un détecteur CCD haute-résolution (*ANDOR Technology*).

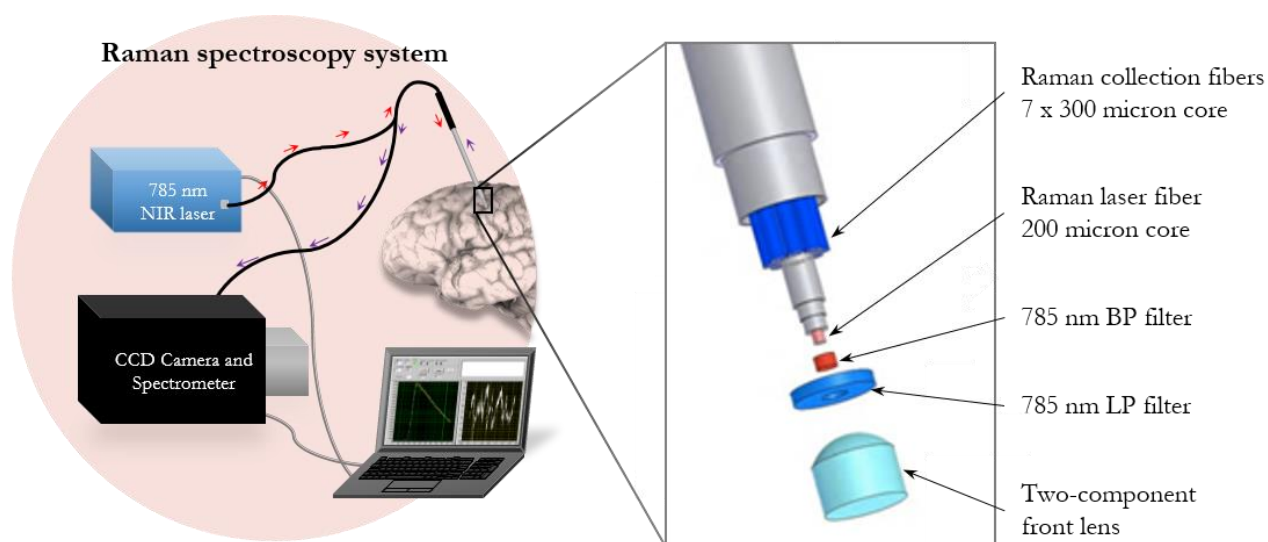


Figure 2.1 : Représentation schématique du montage et de la sonde pour la spectroscopie Raman.

Le tout est monté sur un chariot chirurgical stérilisé pour être admissible en salle d'opération (Figure 2.2). Les instruments sont testés, particulièrement l'effet de l'alignement des fibres de collection de la sonde avec la fente optique du détecteur CCD. Une méthode d'alignement est trouvée, et l'acquisition des spectres est programmée sur l'ordinateur.

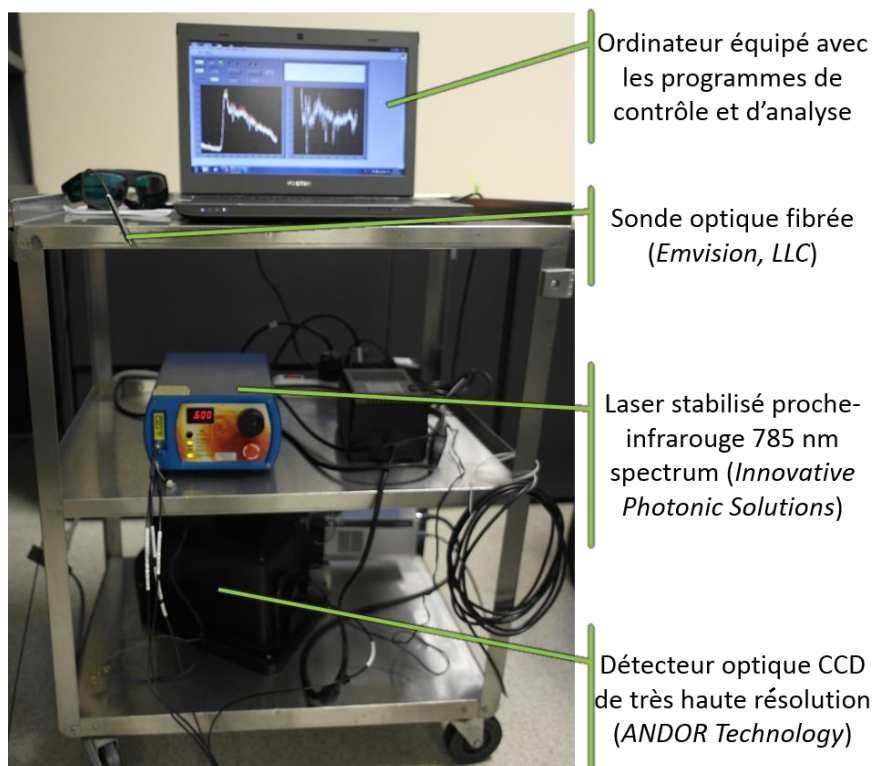


Figure 2.2 : Premier montage expérimental utilisable en salle d'opération. Le chariot de petite taille permet de ne pas encombrer l'espace restreint, alors que les câbles optiques liés à la sonde permettent de rester hors de la zone stérile de la salle d'opération et de ne pas entraver le travail du neurochirurgien.

## 2.2 Tests préliminaires

### 2.2.1 Calibration et choix des paramètres d'utilisation

Le système est d'abord et avant tout testé au Laboratoire de radiologie optique de l'École polytechnique de Montréal avec des échantillons de référence. Étant donné le caractère très spécifique et détaillé de la spectroscopie Raman, la plupart des études sur ce sujet utilisent un référentiel chimique pour caractériser le système optique. C'est ce qui a été fait ici, avec

l'utilisation de 4-acétamidophénol, ou *Tylenol*. La validité du montage est d'abord étudiée en observant les pics prononcés du spectre obtenu lorsque la sonde optique est placée sur une pastille de *Tylenol* et en les comparant avec le spectre théorique. Par la suite, le système est calibré en faisant s'agencer le spectre expérimental avec le théorique en termes de longueurs d'ondes. Ceci étant fait, le système est maintenant ajusté et les décalages Raman (*Raman shifts*) peuvent être comparés avec ceux de la littérature.

L'intensité laser du système nécessaire à l'obtention d'un bon signal Raman est très variable selon l'échantillon étudié. Par exemple, avec un échantillon de nature chimique n'ayant pas une absorption très élevée, la puissance du laser infra-rouge nécessaire pour exciter la surface sera très petite. Pour la *Tylenol*, une puissance au bout de la sonde autour de 30 mW produira un spectre à intensité maximale. L'intensité maximale souhaitée est celle qui couvrira la majorité de la plage dynamique de la CCD sans que le signal ne soit saturé (le signal sature autour de 66 000 u.a., valeur d'intensité du signal digital maximal qui correspond au moment où le flux de photons parvenant au détecteur spectroscopique est trop grand).

Des échantillons de tissus biologiques sont donc achetés pour permettre de tester l'effet du temps d'intégration et de la puissance sur les spectres Raman de différents types. Pour chaque tissu (foie, cerveau de veau, poulet, dinde et bœuf), neuf temps d'intégration du signal (entre 0,00376 s, le minimum permis, et 5 s) et neuf puissances du laser NIR (de 1,75 mW à 315 mW à la sortie) ont été testés. Le spectre idéal a été trouvé pour chaque tissu, c'est-à-dire celui avec une intensité élevée, le moins de bruit photonique visible et sans saturation. Avec celui-ci, il est facile de comparer les autres spectres obtenus avec différents paramètres et de trouver ceux qui s'en rapprochent, avec une puissance et un temps d'intégration les plus faibles possibles.

Afin de réduire le temps nécessaire à l'utilisation du système, les petites valeurs de temps d'intégration ont été valorisées. Ainsi, dès 0,05 s les spectres obtenus sont optimaux pour tous les types de tissus lorsqu'une puissance élevée est utilisée (140 à 280 mW). La puissance minimale à utiliser avec un temps de 0,05 s est fixée à 70 mW à la sortie, puisqu'en-dessous de cela les spectres sont trop bruités pour différencier les types de tissus. Dans le cas où la puissance devrait être réduite, il faut alors augmenter le temps d'intégration, par exemple une puissance de 35 mW offre des spectres adéquats avec un temps de 0,2 s.

### 2.2.2 Tests sur des souris xénogreffes

Les premières expériences *in vivo* sont prévues dans le laboratoire de recherche du Dr Kevin Petrecca sur des souris auxquelles ont été implantées des cellules tumorales humaines GBM (les tumeurs de bas grades ne fonctionnent pas avec les modèles murins). Un protocole complet est monté et testé avant d'arriver en laboratoire, mais, pour des raisons de concision, seules les grandes lignes seront présentées ici. Les cellules tumorales implantées croissent dans le cerveau des modèles pendant 3 à 6 jours, puis une craniotomie est effectuée pour permettre l'accès à la tumeur. Cette tumeur a été modifiée pour exprimer la protéine fluorescente GFP et ainsi émettre un signal dans le vert (maximum à 510 nm) lors d'une excitation à 405 nm. Théoriquement, en utilisant un système de fluorescence en champ large monté par un autre étudiant à la maîtrise, il serait possible de corrélérer directement la position de la tumeur avec la position de la sonde Raman (montage expérimental présenté à la Figure 2.3 A). En pratique, la tumeur est difficilement visible à l'œil nu, entre autres puisque la craniotomie effectuée ne permettait d'accéder qu'à quelques millimètres du cerveau pour respecter les normes d'utilisation du modèle murin (Figure 2.3 B). De plus, les plus grosses tumeurs ne font que 0,4 cm de diamètre. Ainsi, bien que des spectres aient été pris *in vivo*, les résultats ont été plus concluants en utilisant les cerveaux excisés (Figure 2.3 C), après le sacrifice des souris, puisqu'il était alors possible d'avoir une référence sur les spectres obtenus (les parties fluorescentes au système champ large étaient considérées comme tumorales).

Un premier script d'analyse permettant de discriminer entre les différents types de tissus est conçu (exemple de spectres obtenus à la Figure 2.4). Avec l'algorithme de classification SVM, 80 % de bonnes classifications (utilisant la formule d'exactitude) est obtenu avec les échantillons *ex vivo* contre 63 % *in vivo*. Cela est satisfaisant étant donné le nombre restreint de spectres disponibles pour l'analyse (peu de souris disponibles, petites tumeurs, difficulté d'imagerie, etc.). Les tests sur les modèles murins permettent donc de valider l'utilisation des spectres Raman pour distinguer des tissus tumoraux *in vivo*, mais cela est surtout utile pour tester le système en temps réel dans un environnement chirurgical. Ainsi, la prochaine étape fût de passer directement aux cas humains. Ceux-ci ont permis de démontrer que la sonde est capable de détecter les régions cancéreuses (incluant les infiltrations dans les tissus normaux) avec une exactitude, une sensibilité et une spécificité toutes supérieures à 90 %, dans le cadre d'une première étude clinique impliquant 17 patients atteints de gliomes de grades 2 à 4 [71].

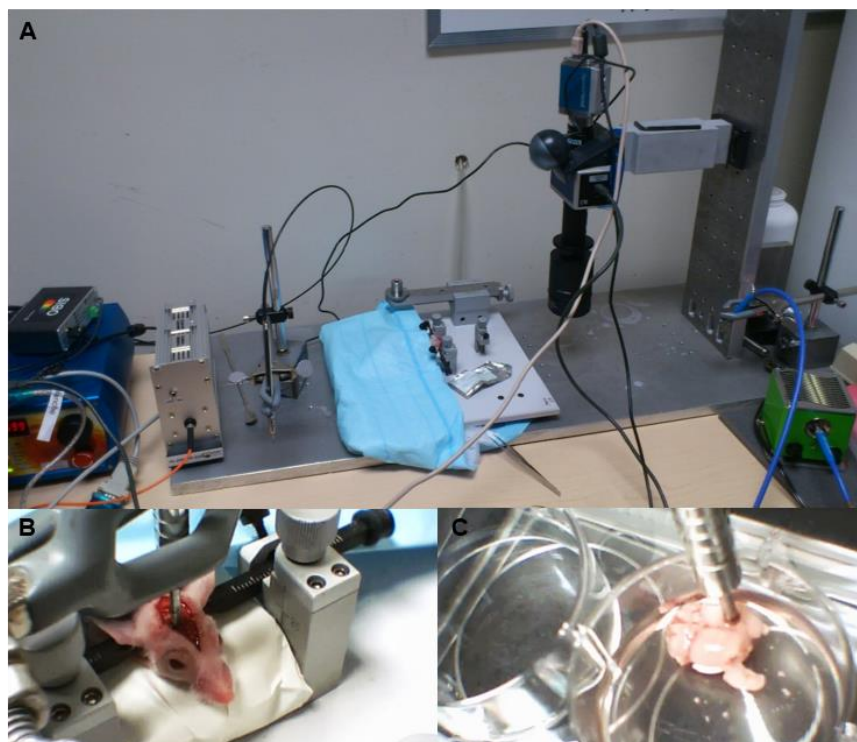


Figure 2.3 : Montage pour les tests sur modèles murins xénogreffes. **A.** Le système champ large est monté sur un bras métallique et le champ de vision est dirigé vers le bas sur l'échantillon. Une source de lumière bleue à 405 nm (boîtier vert et câble optique bleu sur l'image) est utilisée simultanément pour l'excitation de la GFP contenue dans la tumeur. La sonde est tenue par un support à gauche et est branchée au laser NIR pour l'excitation en spectroscopie Raman. **B.** Les artefacts dus aux mouvements pulsatiles et de respiration sont compensés par une fixation rigide des barres. Le modèle est sous anesthésie. **C.** L'analyse se poursuit avec les échantillons *ex vivo* afin d'obtenir un meilleur placement de la sonde, et surtout pour illuminer et détecter la GFP.

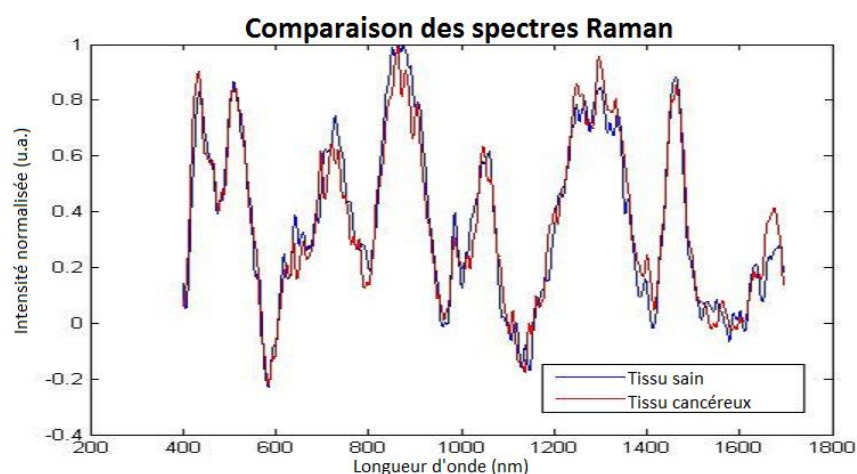


Figure 2.4 : Exemple de spectres Raman obtenus, tissu sain en bleu et tumeur en rouge.

## **CHAPITRE 3      CONCEPTION, FABRICATION, CARACTÉRISATION ET OPTIMISATION DU SYSTÈME CHIRURGICAL MULTIMODAL**

Plusieurs études précédentes ont confirmé l'utilité clinique de la fluorescence en neurochirurgie, particulièrement par la détection d'un agent fluorescent exogène tel que la protoporphyrine IX, la fluorescéine et l'indocyanine verte (ICG) à l'aide d'un microscope chirurgical en champ large [2], [5], [6], [18], [65], [71], [72]. D'autres études ont aussi démontré l'utilité de la détection du contraste optique associé à la fluorescence intrinsèque en oncologie [4], [58], [60], [63], [64], [73], [74]. Au chapitre précédent, il a été démontré que la sonde utilisant la spectroscopie Raman possède un très grand potentiel de détection des cellules tumorales pour le cancer du cerveau. Sans minimiser l'utilité de ce système novateur (rapidité d'exécution, simplicité et maniabilité), il sera maintenant question de voir si, en ajoutant un système spectroscopique complémentaire permettant la détection de la fluorescence intrinsèque et de la réflectance diffuse, il est possible d'améliorer la précision diagnostique associée à la détection de l'effet Raman.

Cette partie du projet a pour but principal de valider l'utilité clinique de jumeler un système de spectroscopie par fluorescence et par réflectance diffuse au système précédemment bâti. Pour ce faire, un système optique indépendant est construit à l'aide de différentes sources de lumières, fibres et lentilles, ainsi que d'une méthode de détection différente. Le jumelage des deux sous-systèmes en termes de logistique et de contrôle instrumental est aussi effectué à cette étape. Ce système est ensuite caractérisé afin de maximiser l'intensité du signal reçu, les données d'analyse disponibles et l'efficacité d'utilisation en salle d'opération (c'est-à-dire intégration au déroulement de la chirurgie, usage simple et rapidité d'acquisition). Suivant les résultats de ces tests, des modifications sont apportées et un système qui se veut optimal est ensuite présenté. À la suite de la vérification de la linéarité des signaux optiques en termes des temps d'acquisition et de l'intensité lumineuse des sources, les étapes de calibration sont présentées afin de minimiser la réponse du système dans les spectres. Le système est ensuite validé avec des tests sur échantillons biologiques et avec des dilutions d'agents fluorescents cliniquement utilisés en neurochirurgie. Toutes les étapes présentées dans ce chapitre ont été effectuées principalement de manière autonome. Seule la sous-section 3.6.2 est la combinaison d'un travail d'équipe avec une personne spécialisée en imagerie hyperspectrale (Yoann Gosselin), une autre en fluorescence et en



xénogreffes (Mira Sibai), et une autre pour l'analyse de données des images obtenues (Michael Jermyn).

### 3.1 Choix d'une géométrie optimale des fibres optiques pour la détection

Après la première conception d'une sonde optique pour la spectroscopie Raman seule, une nouvelle configuration de sonde doit être choisie pour permettre l'utilisation du second système de fluorescence et réflectance, rendant ainsi possible l'acquisition de signaux co-localisés pour tous les types de spectroscopie considérés. Un premier modèle de sonde est testé (**configuration 1**), où deux fibres côte à côte de 300  $\mu\text{m}$  de cœur sont affectées par la convergence de la lentille au bout de la sonde, les faisceaux étant donc dirigés vers le même endroit que pour la spectroscopie Raman (Figure 3.1 A). La seconde configuration (**configuration 2**) est identique à la première, mais ici les fibres sont plus petites, soit 200  $\mu\text{m}$  de diamètre au lieu de 300  $\mu\text{m}$  (Figure 3.1 A). Le dernier modèle de sonde étudié (**configuration 3**) nécessite de percer la lentille convergente à la sortie de la sonde. Ce dernier conserve la géométrie présentée précédemment pour la spectroscopie Raman, mais trois fibres optiques de 200  $\mu\text{m}$  de cœur sont ajoutées et traversent physiquement les autres composants optiques de la sonde par un trou (Figure 3.4 B). Pour chacune des configurations de sonde présentées, des mesures de puissance sont prises afin de voir si l'une ou l'autre d'entre elles est favorable.

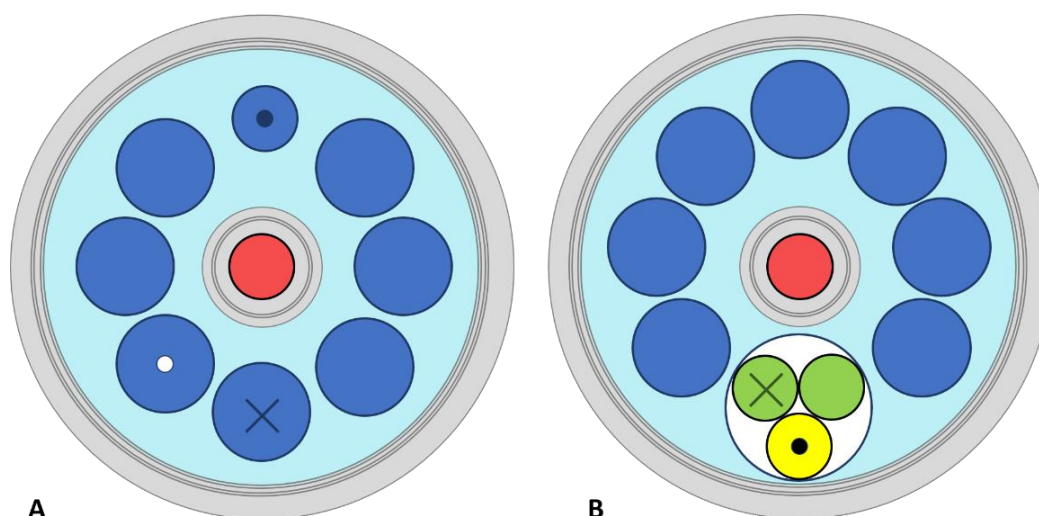


Figure 3.1 : Configuration interne des composants de la sonde pour deux modèles différents, vue selon une coupe transversale de la portion distale. **A.** Les deux premières configurations testées sont représentées ici, toutes deux utilisant la fibre bleu foncé indiquée par un « X » comme fibre

de collection (0,22 NA, 300  $\mu\text{m}$  de cœur). La **configuration 1** utilise la fibre d'excitation indiquée par un point blanc, qui possède un diamètre de cœur de 300  $\mu\text{m}$ , alors que la **configuration 2** utilise la fibre de 200  $\mu\text{m}$  de cœur indiquée par un point noir. Les faisceaux transportés par ces fibres traversent ensuite la même lentille convergente afin que la lumière sorte au même endroit au bout de la sonde (exemple de lentille à la Figure 2.1 ainsi qu'à la Figure 3.2, représentant la sonde dans sa totalité). De ce fait, les deux premières configurations peuvent être considérées comme identiques, avec comme seule différence la taille des fibres d'excitation (la position interne relative à la fibre de collection est négligeable si l'on considère les trajets lumineux à travers la lentille). **B. La configuration 3** nécessite de percer aussi bien le filtre en forme d'anneau (non représenté ici, mais à la Figure 2.1) que la lentille convergente à la partie distale de la sonde. Ainsi, les fibres en vert et en jaune ne sont pas affectées par la convergence. La fibre verte indiquée par un « X » est la fibre de collection et celle en jaune indiquée par un point noir est la fibre d'excitation, les deux ayant un diamètre de cœur de 200  $\mu\text{m}$ .

En mesurant la puissance à la sortie de la sonde, il est possible d'en tirer des conclusions pour les différentes configurations de la sonde. D'abord, une puissance optique transmise de 74 %, 66,8 % et 94,2 % est obtenue en moyenne pour les configurations 1, 2 et 3 respectivement (les mesures brutes de puissance sont rapportées au Tableau 3.1 et les ratios calculés au Tableau 3.2 pour lesquels des explications seront données plus loin). La lentille convergente semble induire une perte d'environ 20 % de transmission lorsque les configurations 1 et 3 sont comparées. De plus, plus la taille de la fibre d'excitation est élevée, plus la puissance finale sera grande, tel qu'attendu. Ainsi, en théorie, une fibre optique d'un diamètre le plus grand possible et passant à travers un trou percé dans la lentille convergente constituerait le choix optimal en termes de puissance lumineuse. Toutefois, en pratique, ce perçage de la lentille est peu souhaitable, puisqu'il s'agit d'un procédé hasardeux. Le design avec la lentille intacte et une large fibre d'excitation et de collection est donc privilégié. Grâce au passage de la lumière à travers la lentille, la même surface sur le tissu est ainsi étudiée, tant pour l'excitation que pour la collection du signal et ce, pour les deux systèmes (Raman et fluorescence et réflectance).

En outre, plusieurs fibres de petite taille peuvent être combinées afin d'obtenir une surface d'excitation lumineuse élevée. Une sonde combinant sept fibres d'excitation de 100  $\mu\text{m}$  de diamètre de cœur a été testée avec différents échantillons. Cependant, ces fibres sont très fragiles,

donc ce design n'est pas retenu pour l'étude. Dans le cadre de ce travail de maîtrise, la **configuration 1** est retenue et sera de ce fait considérée comme la configuration par défaut.

## 3.2 Fabrication du système

### 3.2.1 Choix de composants et montage

En se basant sur des études antérieures démontrant l'utilité clinique de la fluorescence [2], [6], il est d'abord question d'ajouter les éléments optiques nécessaires pour être en mesure de quantifier la concentration de PpIX. Puisque le spectre d'absorption de la PpIX est composé d'un pic d'absorption proéminent à 405 nm, une excitation à 405 nm aura un effet fluorescent maximal sur la molécule. Ainsi, une source lumineuse à cette longueur d'onde est ajoutée d'emblée au montage (item M405F1, *Thorlabs*), conjointement avec une source blanche pour l'étude de la réflectance diffuse (item MBB1F1, *Thorlabs*). Cette dernière est choisie afin d'obtenir le plus large spectre d'excitation possible (470-850 nm). Pour contrôler ces sources, un pilote informatique provenant de la même compagnie est nécessaire, afin de pouvoir le programmer via le logiciel *Labview* (DC4100 4-Channel LED Driver, 5V, *Thorlabs*). Avec ce pilote informatique, deux autres sources lumineuses peuvent être programmées de façon simple et rapide. Une source à 455 nm et une autre à 365 nm sont donc ajoutées au système, puisqu'il s'agit de longueurs d'ondes souvent utilisées pour l'étude de l'autofluorescence dans les tissus biologiques. Un schéma représentant le système complet est présenté à la Figure 3.2. Il est possible d'observer que le nouveau système ajouté est totalement indépendant du système Raman, tant pour les instruments utilisés que pour la conception de la sonde optique (fabriquée par la compagnie *EmVision*, un collaborateur important du Laboratoire de radiologie optique). En effet, des fibres optiques (en vert sur la figure) sont réservées pour la fluorescence et la réflectance et ne sont pas affectées par les filtres optiques nécessaires pour la spectroscopie Raman. Les différentes configurations de sonde sont testées dans les sections suivantes du présent document, avant d'arriver à une conception finale du système global, optimale en termes de simplicité et de sensibilité de détection lumineuse.

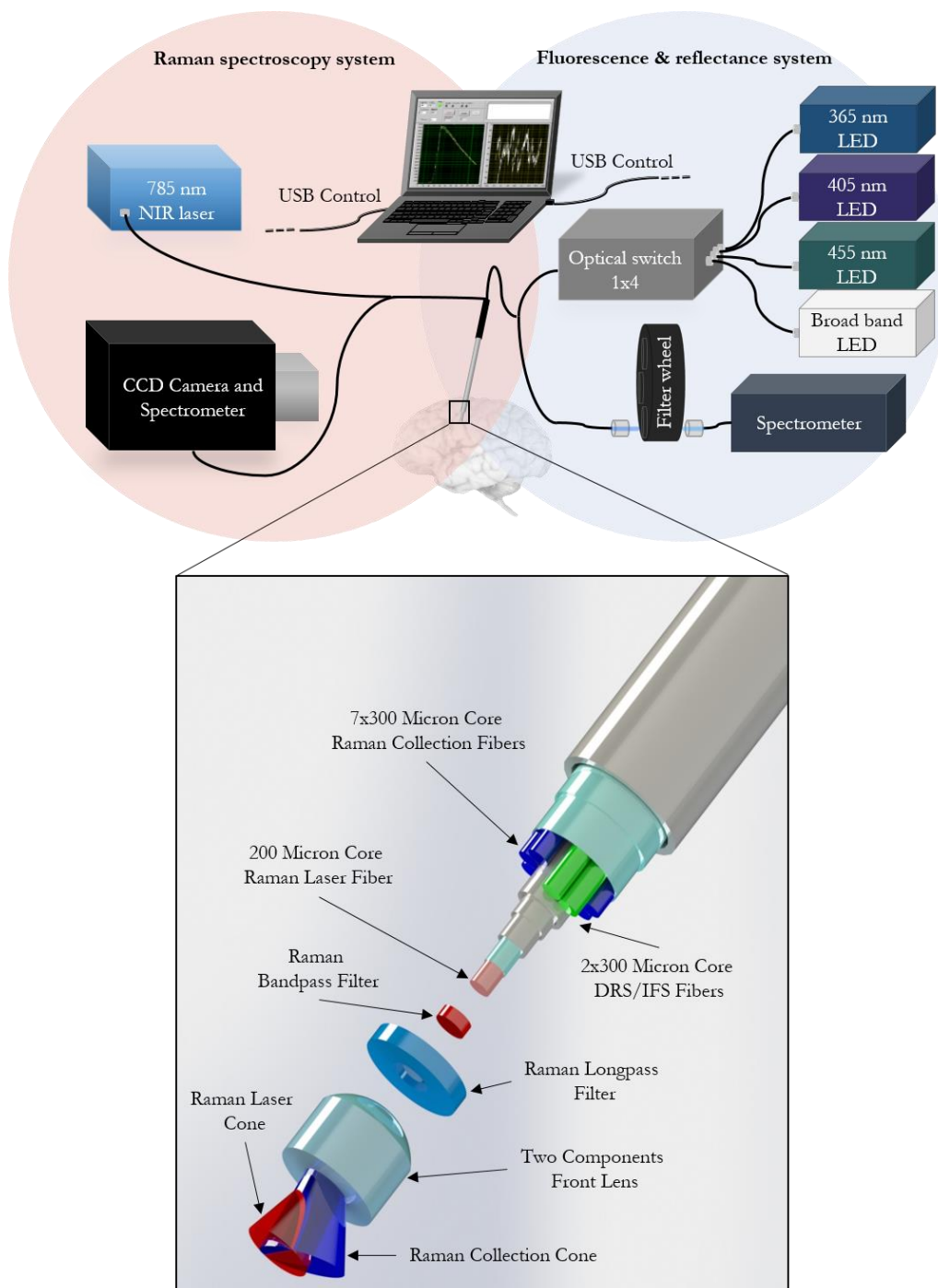


Figure 3.2 : Montage optique réalisé. Le système automatisé est composé de deux sous-systèmes indépendants. Dans le cercle rougeâtre (à gauche), le système Raman avec un laser proche infra-rouge (*Innovative Photonics*) et une caméra CCD spectrométrique (*ANDOR Technology*) haute résolution ( $\sim 2 \text{ cm}^{-1}$ ). Dans le cercle bleuté (à droite), le système de fluorescence et réflectance diffuse : quatre diodes électroluminescentes (*Thorlabs*), un commutateur optique (*DiCon*), une

roulette de filtres (*Thorlabs*), différents composants optiques et un spectromètre adapté (*Ocean Optics*). Un programme *Labview* est conçu afin de contrôler chaque instrument et permettre l'acquisition séquentielle de tous les spectres d'intérêt.

Pour chacune des trois DELs utilisées pour la portion fluorescence, un filtre est nécessaire à l'émission afin de réduire la plage d'excitation, de manière à ce qu'elle soit restreinte le plus possible autour de la longueur d'onde centrale d'excitation. Cette étape est essentielle afin de réduire la contribution de la lumière d'excitation au signal de fluorescence détecté (phénomène de *bleed-through* décrit plus en détails à la section 3.2.2). Un autre filtre est nécessaire pour la collection des rayons lumineux émis afin de couper autant que possible la part spectrale due à la source d'excitation et d'obtenir uniquement le spectre de fluorescence recherché. Pour conserver l'aspect câblé du système et ainsi éviter des transmissions optiques en espace libre, non souhaitables en salle d'opération, des collimateurs doivent être ajoutés autour de ces filtres. Ceux-ci permettent aussi de converger le faisceau lumineux dans les fibres, ce qui optimise sa transmission tout en minimisant les pertes. À la Figure 3.3, deux types de collimateurs sont visibles. Pour l'excitation, le filtre passe-bande ou passe-bas est contenu dans un tube optique et la jonction avec les fibres optiques se fait par un collimateur simple (F240SMA-A, *Thorlabs*).

Pour la collection de la lumière réémise à la suite de l'excitation du tissu, un filtre est donc nécessaire pour chaque longueur d'onde utilisée en fluorescence. Pour permettre la transmission de lumière entre la fibre de collection de la sonde (entrée) et le spectromètre (sortie), une roulette de filtre est utilisée (FW102C, *Thorlabs*). Cette roulette permet de choisir le filtre passe-haut associé à la bonne source durant l'acquisition. Le faisceau est collimé entre l'entrée et la sortie de la roulette de filtres par une paire de collimateurs conçus pour les fibres optiques multimodes (RC04SMA-P01, *Thorlabs*). Des pièces mécaniques de la même compagnie sont utilisées pour le montage, telles que des tringles filetées en acier, des montages cinématiques pour les collimateurs, des tubes optiques pour lentilles et divers adaptateurs.

Différentes options ont ensuite été étudiées pour permettre le passage d'une source d'excitation à une autre. Un *VX stepper motor* permet une connexion fibre à fibre en les alignant mécaniquement en environ 0,3 seconde, contrairement aux commutateurs MEMs qui fonctionnent de manière électrique. Ces derniers sont certes plus rapide (environ 30 ms), mais ils s'intègrent plus difficilement au montage utilisé. Les commutateurs MEMs sont envisagés pour

leur rapidité, mais leur prix très élevé et leur complexité (due au fait qu'ils soient conçus pour être montés sur un tableau électrique) font que cette option n'est pas choisie. Ainsi, un commutateur optique mécanique est sélectionné pour l'étude, puisqu'il allie rapidité (1/3 s pour passer d'une fibre à l'autre), perte de signal faible (1 dB en moyenne) et programmation TTL facile par connexion USB. Un commutateur personnalisé optimal est fabriqué par la compagnie *DiCon Fiberoptics, Inc.* (VX500 1X4). Toutes les connexions sont SMA, et les fibres optiques multimodes (*Ceram Optek*) sont identiques à celles contenues dans la sonde.

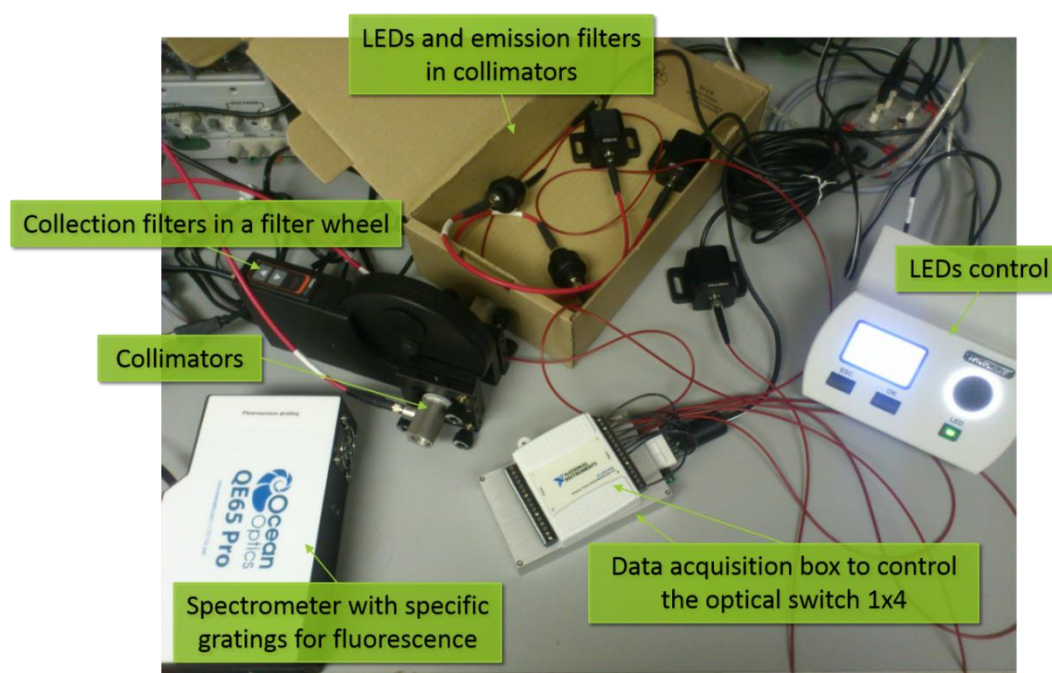


Figure 3.3 : Instruments connectés entre eux pour le test du premier montage. Le système est fonctionnel, mais encore au stade expérimental. Un support physique est requis pour permettre l'utilisation en salle d'opération et un programme LABVIEW est développé afin de contrôler toutes les composantes. (Traduction : *LEDs and emission filters in collimators* : DELs combinés avec leur filtre d'émission contenu entre collimateurs; *LEDs control* : boîte de contrôle pour les DELs, aussi appelée commutateur; *Data acquisition box to control the optical switch* : boîtier d'acquisition pour programmation TTL par câble USB afin de contrôler le commutateur optique; *Spectrometer with specific gratings for fluorescence* : spectromètre avec un réseau de diffraction adapté pour la fluorescence; *Collimators* : collimateurs; *Collection filters in a filter wheel* : filtres de collection (pour bloquer la lumière d'excitation) contenus dans la roulette de filtres).

### 3.2.2 Validation du montage par la vérification des pertes de puissance au long du trajet optique

Afin de mesurer les pertes survenant tout au long du trajet optique dans le système, la puissance a été mesurée à différents endroits sur le trajet optique correspondant à l'excitation pour chaque longueur d'onde. Un capteur photodiode standard jumelé à un puissance-mètre digital (S121C et PM100D, *Thorlabs*) sont utilisés et permettent la mesure à chaque jonction. Le Tableau 3.1 montre les résultats obtenus à des positions où des pertes de lumière peuvent se produire (pour favoriser la compréhension, ces positions sont numérotées sur la Figure 3.4). Les mesures prises à la connexion du point 7 au point 8, c'est-à-dire correspondant à la puissance dissipée dans la sonde, sont étudiées dans la section suivante.

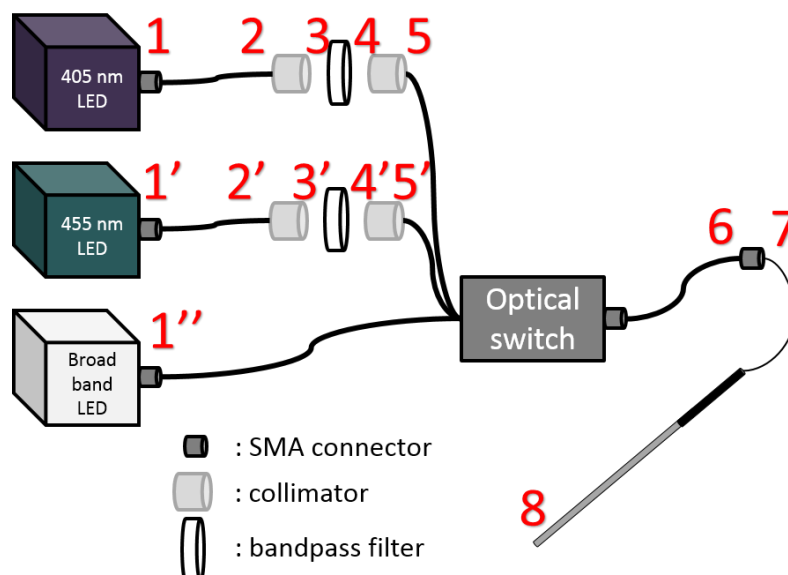


Figure 3.4 : Positions où les mesures de puissance sont effectuées afin de mesurer les pertes dans le système selon différentes configurations. La source à 365 nm n'est pas représentée ici, mais le système optique est identique à celui de la source blanche (aucun filtre d'excitation lors de ces premières mesures).

Tableau 3.1 : Puissance optique mesurée à différentes connexions dans le montage

		<b>405 nm (@500mA)</b>	<b>455 nm (@1000mA)</b>	<b>365 nm (@700mA)</b>	<b>DEL blanche (@500mA)</b>
	<b>1</b>	24,1 mW	51,5 mW	45,0 mW	12,0 mW
	<b>2</b>	1,6 mW	5,7 mW	-	-
	<b>3</b>	1,6 mW	5,4 mW	-	-
	<b>4</b>	53,0 $\mu$ W	134,7 $\mu$ W	-	-
	<b>5</b>	17,0 $\mu$ W	44,8 $\mu$ W	-	-
	<b>6</b>	4,0 $\mu$ W	7,3 $\mu$ W	1,6 mW	1,6 mW
	<b>7</b>	3,0 $\mu$ W	4,6 $\mu$ W	1,1 mW	97,0 $\mu$ W
<b>8</b>	<b>Configuration 1</b>	1,8 $\mu$ W	4,3 $\mu$ W	0,6 mW	81,0 $\mu$ W
	<b>Configuration 2</b>	1,7 $\mu$ W	3,9 $\mu$ W	0,5 mW	74,0 $\mu$ W
	<b>Configuration 3</b>	2,8 $\mu$ W	4,4 $\mu$ W	1,1 mW	85,0 $\mu$ W

Afin de mieux comprendre les pertes dues aux différentes connexions, le pourcentage de transmission est calculé entre la puissance optique à l'entrée et celle à la sortie (Tableau 3.2). Avec ceci, il est possible de constater qu'une grande perte de puissance s'opère entre la sortie directe d'une DEL et le bout opposé du câble fibré. Chaque câble dans le système est spécifiquement choisi pour avoir la même ouverture numérique que les fibres optiques utilisées dans la sonde (cœur : Ø200  $\mu$ m, 0,22 NA, connexion SMA-SMA) afin d'empêcher les pertes évitables. Toutefois, ces pertes pourraient être expliquées par les spécifications des DELs. La fiche technique spécifie que les DELs sont optimales lorsqu'utilisées avec une fibre optique de 400  $\mu$ m de diamètre et une ouverture numérique de 0,39. Or, en utilisant la surface utile  $S$  correspondant à l'aire dictée par le diamètre des fibres et le taux de transmission théorique de l'équation suivante (éq. 3.2), on remarque que la transmission à laquelle on peut s'attendre est basse, soit de 8 %. Avec une transmission de 6,7 à 11,1 % expérimentalement, il s'agit vraisemblablement du maximum pouvant être atteint avec cette configuration.

$$\text{Taux de transmission théorique} = \frac{G_2}{G_1} = \frac{\pi * S * NA^2_{\text{extrémité } 2}}{\pi * S * NA^2_{\text{extrémité } 1}} = 0,08 = 8 \% \quad (\text{éq. 3.2})$$



Tableau 3.2 : Ratio de puissance transmise entre l'entrée d'une connexion jusqu'à la sortie

		Pourcentage de transmission pour chaque source lumineuse (%)			
Connexion étudiée		405 nm (@ 500 mA)	455 nm (@ 1000 mA)	365 nm (@ 700 mA)	DEL blanche (@ 500 mA)
1 → 2		6,7	11,1	-	-
2 → 3		100,0	94,7	-	-
3 → 4		3,3	2,5	-	-
4 → 5		32,1	33,3	-	-
5 → 6		23,5	16,2	14,6	12,9
6 → 7		75,0	63,4	64,0	6,3
7 → 8	Configuration 1	60,0	93,5	59,1	83,5
	Configuration 2	56,7	83,7	50,5	76,3
	Configuration 3	93,3	95,7	100,0	87,6

La plus grande perte de puissance dans le système est due au branchement entre le premier collimateur et les filtres passe-bande utilisés pour les sources 405 nm et 455 nm. Ces filtres sont nécessaires pour éviter que le signal provenant des sources lumineuses soit visible sur les spectres étudiés. Ce phénomène, mentionné précédemment, est appelé *bleed-through* en anglais (similaire à diaphonie en français), et provient d'un chevauchement entre le signal d'excitation et le signal de fluorescence émis. Le signal de fluorescence est donc parasité par la queue du pic d'excitation, toutefois celui-ci peut être réduit en améliorant la coupure nette de la pente. Malgré que ces filtres soient donc nécessaires, des changements peuvent être apportés pour améliorer la transmission : ce cas est étudié à la section 3.2.3. De plus, la perte de puissance entre 4 et 5 est inévitable, probablement due au fait que la lumière passe d'un espace libre à travers le filtre optique pour ensuite entrer dans le collimateur de diamètre restreint (4 mm). Un collimateur de plus grande taille pourrait améliorer le résultat.

Une autre perte importante se produit à la connexion 5 → 6, soit dans le commutateur optique. Il faut d'abord noter que celui-ci utilise une jonction mécanique entre les fibres optiques, ce qui représente une perte possible à cet endroit. Selon la fiche de spécification fournie par la compagnie, la perte d'insertion se situerait entre 1,48 et 1,82 dB, alors qu'en pratique elle est entre 6,3 et 7,9 dB. Cette différence est de loin supérieure à la théorie. Pourtant, les fibres optiques dans le commutateur sont identiques à celles utilisées dans la sonde (*Ceram Optek*) et possèdent les mêmes propriétés que les câbles optiques achetés pour le système. Cette perte supplémentaire pourrait être due à un mauvais enlignement.

La perte de puissance est notable dans l'adaptateur SMA mâle-femelle (6  $\rightarrow$  7) pour la source de lumière blanche seulement. Par contre, la puissance résultante à la sortie reste très acceptable puisque, pour les mesures de réflectance diffuse avec le spectromètre, l'intensité de la source doit être réduite à moins de 2 % de son intensité maximale utilisée ici, dans le cadre des mesures de puissance.

### 3.2.3 Modifications apportées et limitations

Comme il est mentionné à la section 3.2.2, les filtres passe-bandes permettant de cerner la longueur d'onde d'excitation pour les sources 405 nm et 455 nm causent une perte importante de puissance optique transmise. En effet, les filtres 405.8NB2 et 455.4NB2 de chez *Omega Optical* possèdent une transmission maximale très basse (30-40 %, avec un OD de 4 minimum et de 5 en moyenne). Ces filtres sont donc changés pour d'autres ayant une largeur de bande à mi-hauteur un peu plus grande (environ 2 nm) et une transmission beaucoup plus élevée ( $\geq 75$  % avec un OD  $\geq 4$  en moyenne). Une commande personnalisée est alors passée chez *Omega Optical* pour obtenir ces filtres pouvant être adaptés au système existant. Grâce à cela, une amélioration est notée par rapport à l'intensité finale. Par exemple, avec la source à 455 nm, l'intensité finale à la sortie de la sonde passe d'environ 4  $\mu$ W (Tableau 3.1) à 14  $\mu$ W. Un filtre passe-bas pour la source 365 nm est aussi ajouté ultérieurement afin de limiter le *bleed-through* de la source. Un passe-bas à 380 nm est jugé optimal, puisqu'il est combiné avec un passe-haut à 400 nm pour la collection des spectres. Tous les filtres passe-haut contenus dans la roulette possèdent un haut pourcentage de transmission ( $\geq 90$  %, OD 6), donc ils ne nécessitent aucune modification.

Avec le taux de transmission théorique (éq. 3.2) entre les DELs et les fibres optiques du système calculé à la section précédente, il est logique de croire que la puissance à la sortie pourrait aussi être améliorée en changeant les sources lumineuses. Il faudrait obtenir des sources spécifiquement adaptées pour les fibres  $\varnothing$  200  $\mu$ m et 0,22 NA. De telles sources, avec une intensité la plus élevée possible et programmables avec le système, n'ont pas été trouvées malgré de nombreuses tentatives.

### 3.2.4 Intégration en salle d'opération

Le design d'un boîtier pouvant contenir le système complet de fluorescence et réflectance a été conçu selon la dimension des appareils et leur assemblage idéal, puis une tierce compagnie

(G.A. Wirth, elle-même faisant affaire avec 80/20) a été mandatée pour fabriquer les différents éléments du boîtier. Le montage de la boîte a été réalisé au laboratoire (Figure 3.5) et des trous d'aérations ont été ajoutés, placés aux endroits stratégiques pour favoriser l'évacuation de la chaleur créée par les multiples appareils.



Figure 3.5 : Différents étages dans le boîtier du système de fluorescence et réflectance diffuse. A. Au fond se trouvent le commutateur optique avec sa boîte de programmation associée (DAQ ou *Data Acquisition Box* de *National Instruments*), les quatre DELs (*Thorlabs*) avec leurs filtres correspondants, ainsi que l'appareil de contrôle des multiples DELs (modèle DC4100 de *Thorlabs*). B. Une grille permet de superposer les instruments sans bloquer l'évacuation de la chaleur, tout en permettant une connexion des fils optiques et électriques entre instruments à différents étages. C. À l'étage supérieur se trouvent la roulette de filtres optiques (*Thorlabs*) et les différentes boîtes électriques et fils USB des appareils, afin de permettre une connexion facile avec l'ordinateur et les instruments sur le chariot.

Avec le nouveau boîtier de transport et l'automatisation logicielle des instruments, qui sera présentée dans la section suivante, le système est maintenant prêt à être utilisé en salle d'opération lors d'interventions sur des humains pratiquées à l'Institut et hôpital neurologiques de Montréal par notre collaborateur, le Dr Kevin Petrecca, neurochirurgien. À cette fin, le système est préalablement monté sur un chariot chirurgical et n'a plus qu'à être transporté dans la salle au début de chaque cas, tous les branchements étant déjà effectués (Figure 3.6). La sonde, quant à elle, est stérilisée par le système de stérilisation par plasma de l'hôpital (*Sterrad 100*). Cet appareil utilise une technologie au gaz plasma peroxyde d'hydrogène à basse température et est sans danger pour les composantes de la sonde. La sonde est ensuite transportée dans la salle d'opération et reste près du chirurgien dans la zone stérile durant l'intervention, pour faciliter son utilisation (sur le drap stérile bleu dans l'image).



Figure 3.6 : Montage expérimental transporté et utilisé en salle d'opération. Il s'agit du même chariot que celui présenté à la Figure 2.2 (spectroscopie Raman seulement), mais le système de spectroscopie par fluorescence et réflectance est maintenant ajouté et placé dans la boîte noire de transport visible ici sur la deuxième tablette.

Entre autres de par les nombreuses stérilisations effectuées, plusieurs exemplaires de la sonde optique ont été endommagés plus ou moins gravement lors des manipulations répétées par l'équipe et le personnel de l'hôpital. Pour éviter les bris causés par de nombreux pliages et par la compression des fibres optiques dans les câbles, une gaine métallique est ajoutée au dernier modèle de la sonde après discussion avec *EmVision LLC*, et des renforts sont placés à des endroits stratégiques, tels qu'à la connexion entre le stylet de métal de la sonde et le câble, ou à chacun des connecteurs situés à l'autre extrémité (Figure 3.7 A). De plus, le chariot transportant les instruments est remplacé par un modèle beaucoup plus robuste, puisque les roues du précédent ne supportaient pas la charge des appareils accumulés depuis le début de l'étude (Figure 3.7 B). La surface en larges mailles est d'ailleurs très pratique pour le passage des fils d'un étage à un autre, par exemple pour faciliter la connexion des câbles de la sonde.



Figure 3.7 : Nouveau système amélioré en termes de robustesse pour la salle d'opération. **A.** La sonde est maintenant munie d'une gaine métallique résistante qui empêche toute déformation des fibres optiques à l'intérieur du câble et **B.** le nouveau chariot de transport est plus robuste, et l'augmentation de sa dimension totale laisse un espace de travail libre, et permet même l'ajout d'instruments supplémentaires dans le futur.

### 3.3 Développement de l'automatisation logicielle du système

Premièrement, chaque composant du sous-système de fluorescence et réflectance est programmé via une interface personnalisée *Labview*, créée pour le contrôle indépendant de ce système. En spécifiant le port USB où chaque instrument est connecté dans le programme *Labview* créé, la manipulation des instruments se fait maintenant de manière automatique. Pour la roulette de filtres et les différentes sources lumineuses, la programmation est aisée puisqu'elle nécessite des pilotes informatiques envoyés par les compagnies ayant conçu ces appareils. Pour le commutateur optique personnalisé 1X4, la programmation se fait via une boîte d'acquisition *National Instruments*. Cette dernière est à son tour programmée via *Labview*. Pour la boîte d'acquisition (USB-6008), huit entrées analogiques (12 bits, 10 k éch./s pour la fréquence d'échantillonnage du convertisseur analogique numérique) sont branchées par des fils électriques standards à différents ports du commutateur. Un signal binaire permet de choisir une sortie parmi les quatre existantes (les sorties 1 à 4 correspondent respectivement à la source d'excitation blanche, 405 nm, 455 nm et 365 nm). Pour faire fonctionner le tout, une connexion USB est aussi attribuée à la boîte d'acquisition de *National Instruments*. Le commutateur, quant à lui, est alimenté par un bloc de 12 volts (courant continu) pouvant lui transmettre 300 mA.

Ayant maintenant caractérisé et vérifié le bon fonctionnement de chaque composant de chaque système, il est logique de créer une interface utilisateur reliant les deux sous-systèmes, Raman et fluorescence et réflectance (Figure 3.8). Cette interface est simple d'utilisation et servira pour les tests présentés dans les sections suivantes. Tout au long du projet, diverses fonctions sont ajoutées à ce programme, par exemple une permettant d'ajuster la puissance du laser NIR utilisé pour la spectroscopie Raman. Celle-ci débute par l'acquisition d'un spectre, puis vérifie son intensité maximale. S'il s'agit du maximum pouvant être atteint par le spectromètre (saturation du signal), la puissance est réduite de 10 u.a., puis les étapes sont répétées jusqu'à l'obtention d'un signal optimal. Par la suite, des boutons simples sont ajoutés afin de permettre d'utiliser soit un système uniquement, soit les deux de manière subséquente. Cela facilite l'acquisition lors de tests simples (par exemple, durant la caractérisation d'un système isolé).

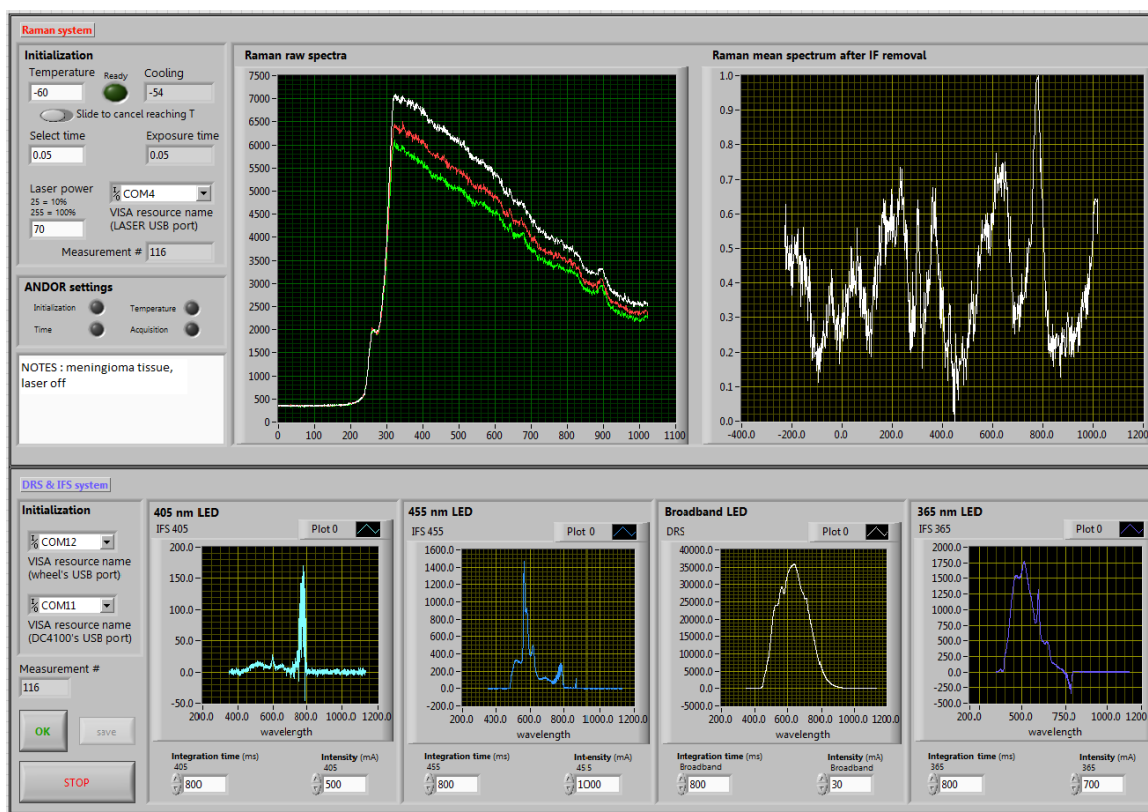


Figure 3.8 : Interface finale du programme *Labview*. La portion du haut correspond au contrôle du système Raman, alors que celle du bas est relative à la fluorescence et à la réflectance. Chaque spectre traité est visible instantanément durant l'acquisition en temps réel et un fichier texte contenant toutes les données est sauvegardé pour analyse future.

### 3.4 Étude de caractérisation complète du système

La caractérisation du système présentée dans cette section résume les tests qui ont été effectués avec le prototype final seulement, afin d'alléger le document. Par exemple, seule la configuration 1 de la sonde, présentée à la section 3.1, est considérée. Les résultats sont toutefois comparables avec ceux obtenus avant les toutes dernières modifications (nouveaux filtres, boîtier et différentes fonctions *Labview*), ce qui valide les changements apportés. Les mesures des pertes de puissance présentées à la section 3.2.2 servent aussi à caractériser le système, bien qu'elles aient été décrites précédemment afin d'expliquer le montage et les modifications apportées.

#### 3.4.1 Linéarité du système

D'abord, la puissance optique à la sortie de la sonde est corrélée avec la puissance théorique à l'entrée du système (puissance programmée sur chacune des DELs). Cette relation devrait être linéaire, ce qui est vérifié à la Figure 3.9 représentant les courbes de puissance lumineuse détectée en fonction de l'intensité programmée. Les coefficients de corrélation linéaire sont tous supérieurs à 0,97.

Par la suite, l'effet du temps d'intégration sur l'intensité du signal est mesuré en pointant la sonde sur un spectralon (*Labsphere Inc.*) et en analysant le signal lumineux capté par le spectromètre. Le spectralon est un standard optique chimiquement inerte qui offre un signal en réflectance diffuse de près de 100 % (plat sur la plage spectrale de UV à NIR, et théoriquement ne fluoresce pas). Tous les tests sont toujours effectués en boîte noire optique. En théorie, plus le temps d'intégration est élevé, donc plus longtemps le spectromètre collectera l'information lumineuse qu'il reçoit, plus l'intensité du signal devrait être élevée. Comme il est possible de remarquer à la Figure 3.10, une telle relation existe pour chacune des DELs et cette relation pourrait être qualifiée de linéaire. Pour la DEL de 405 nm, par contre, le signal résultant d'une illumination du spectralon est beaucoup trop bruité pour pouvoir émettre une conclusion à ce sujet. Il faudra plutôt analyser le signal collecté après l'illumination d'un tissu biologique.



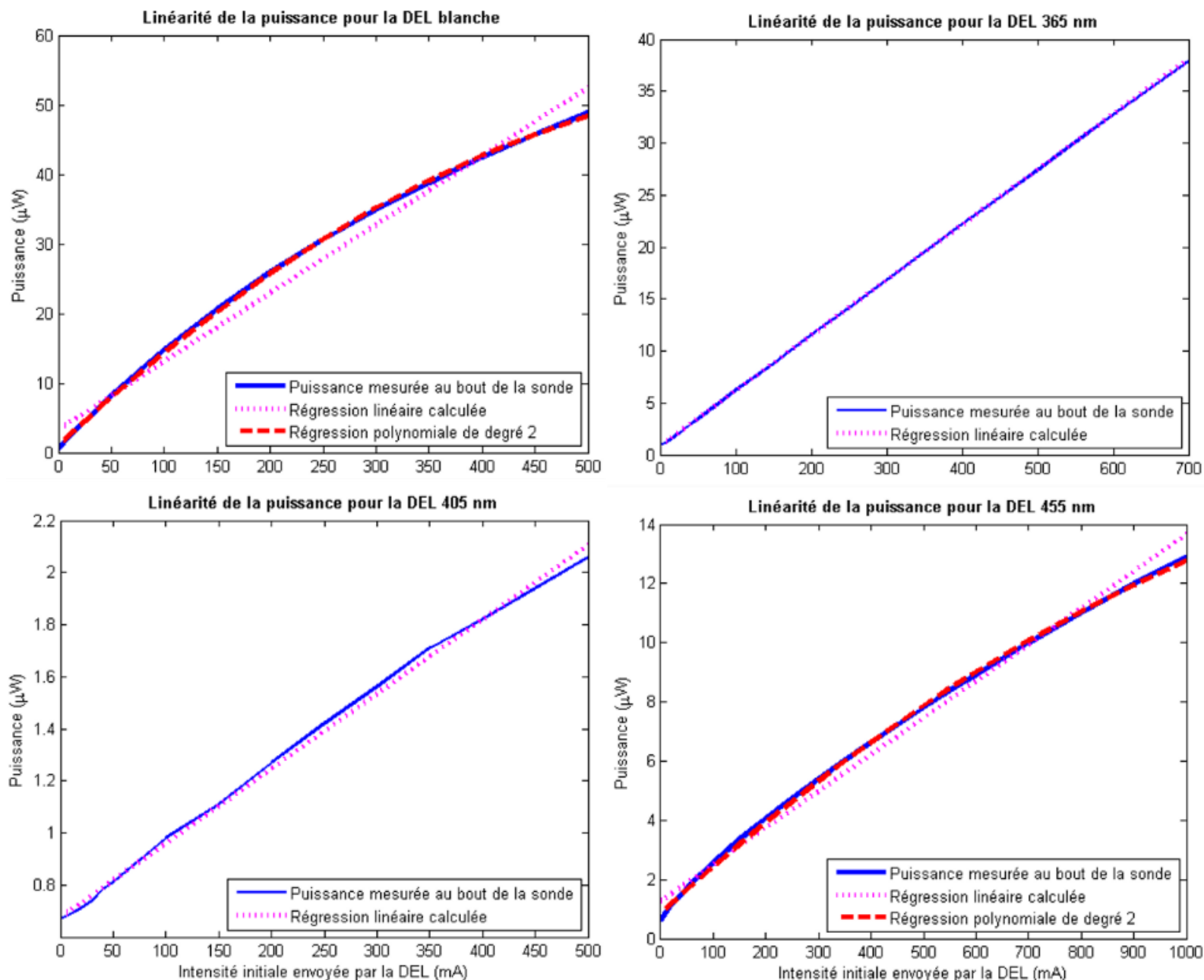


Figure 3.9 : Graphiques démontrant l'aspect linéaire de la puissance des sources lumineuses à la sortie de la sonde en fonction de l'intensité envoyée. La linéarité peut être supposée dans la majorité des cas.



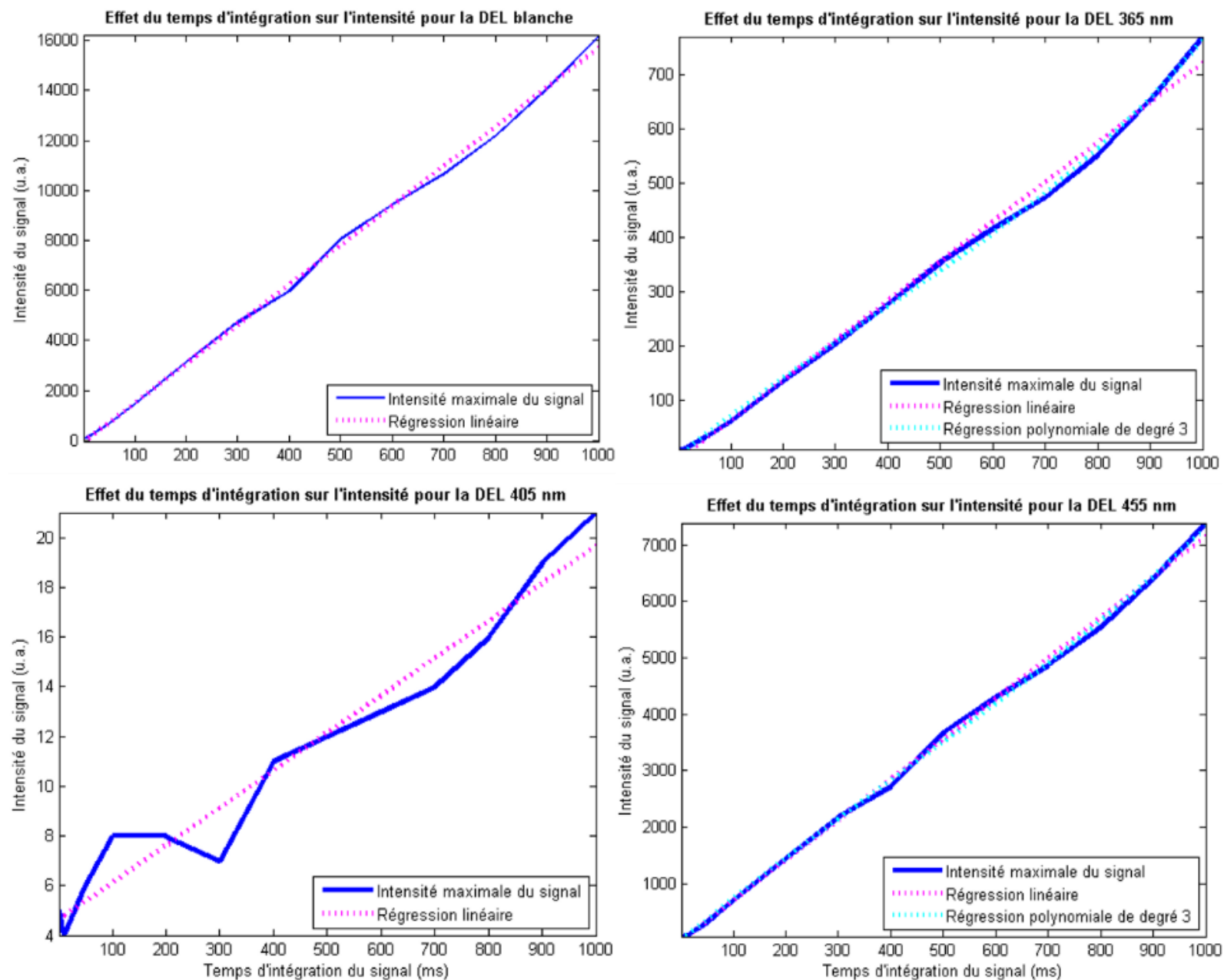


Figure 3.10 : Graphiques démontrant l'aspect linéaire de l'intensité du signal (spectralon) collecté par le spectromètre en fonction du temps d'intégration de celui-ci. La linéarité peut être une bonne approximation dans la majorité des cas.

Des signaux ont aussi été acquis sur la peau. Pour la source 405 nm (Figure 3.11), le coefficient de corrélation, calculé par la fonction MATLAB *corrcoeff*, s'améliore nettement en utilisant les signaux de fluorescence intrinsèque sur la peau au lieu du spectre sur le spectralon ( $R^2$  de 0,99 au lieu de 0,96). Pour les autres, ce coefficient reste comparable (pour les DELs blanche, 365 nm et 455 nm respectivement, on obtient un  $R^2$  de 0,99, 0,99 et 0,99 sur la peau, au lieu de 1, 0,99 et 1 sur le spectralon). Pour la source 405 nm, cette amélioration peut vraisemblablement provenir du fait que l'intensité du signal collecté est nettement plus élevée, donc le ratio signal-sur-bruit (qui est directement proportionnel à la racine carrée de l'intensité détectée) s'en voit logiquement amélioré.

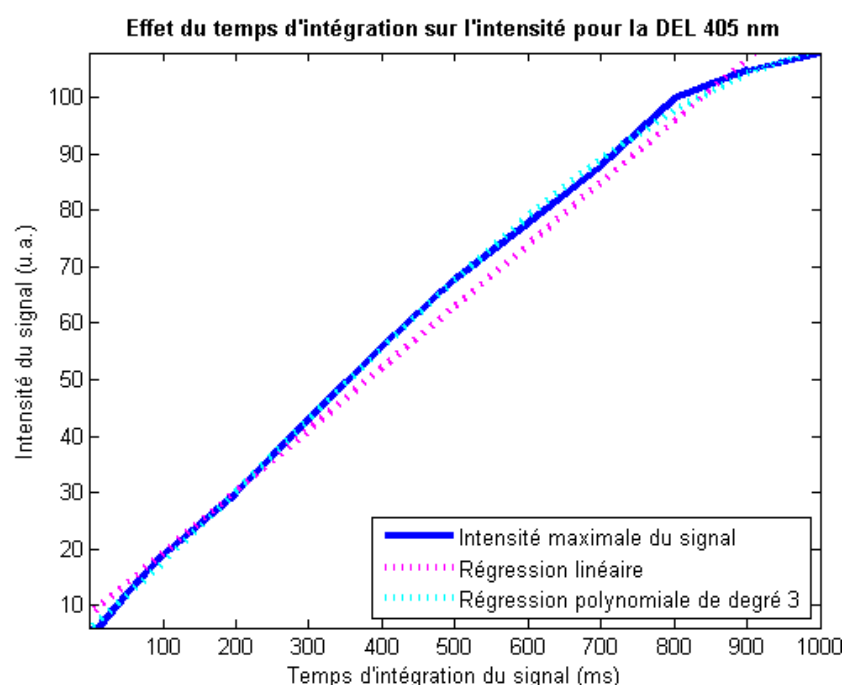


Figure 3.11 : Graphique démontrant le caractère linéaire de l'intensité maximale du signal (sur la peau) pour une excitation à 405 nm. Les graphiques des autres longueurs d'onde ne sont pas présentés puisqu'ils sont très semblables à ceux de la figure précédente (Figure 3.10).

Ici, l'intensité maximale est utilisée pour chacune des DELs, hormis pour la source blanche (intensité réduite à environ 10 mA à la source) dans toutes les expériences réalisées. Ainsi, la linéarité démontrée devient utile lorsqu'il est question de varier ces paramètres pour différents cas, puisque les signaux peuvent simplement être normalisés à l'aide de l'intensité de la source et du temps d'intégration avant d'être comparés les uns avec les autres. Grâce à cela, il

sera possible d'utiliser tous les spectres normalisés pour la classification de tissus, et ce même si les paramètres changent entre les différentes acquisitions.

### 3.4.2 Ratio signal sur bruit

Pour des signaux simples comme la fluorescence et la réflectance, la définition suivante du ratio signal-sur-bruit est utilisée (équ. 3.3) (avec la spectroscopie Raman, ceci est un peu plus complexe et fait l'objet d'une recherche connexe à celle de ce mémoire).

$$SNR = \frac{\mu_{signal}}{\sigma_{arrière-plan}} \quad (\text{équ. 3.3})$$

Comme il est mentionné ci-haut, le signal-sur-bruit devrait donc logiquement accroître lorsque le temps d'intégration du signal est augmenté. Le SNR est mesuré ici avec l'équation 3.3, en considérant le bruit comme étant la variation standard du signal où le signal à proprement parlé est très faible, soit de 950 à 1130 nm. On remarque à la Figure 3.12 que le SNR augmente en fonction du temps d'intégration, avec une relation qui semble proportionnelle à la racine carrée de l'intensité (qui elle est linéaire par rapport au temps d'intégration). Pour la source blanche, un seuil est atteint après 300 ms. Pour l'acquisition de données, il est nécessaire d'obtenir le ratio signal-sur-bruit le plus élevé possible, mais en considérant un temps d'intégration minimal pour chaque signal. Un temps d'intégration entre 800 et 900 ms semble raisonnable pour les tests en salle d'opération, puisque la valeur des SNRs est très élevée ou se trouve dans la zone asymptotique des graphiques ci-dessous (l'acquisition requerra donc entre 3,2 et 3,6 secondes au total, sans compter le temps d'action des instruments). Il serait logique de croire que le SNR serait supérieur avec des temps d'intégration nettement plus élevés que 1 seconde mais, pour des raisons pratiques, ces temps ne sont pas considérés pour des cas en salle d'opération, et 800 ms est choisi comme nouveau temps standard. De plus, ces SNRs ont été calculés avec un seul spectre par temps d'intégration : pour obtenir une valeur plus fiable, il faudrait moyenner les résultats de plusieurs itérations.

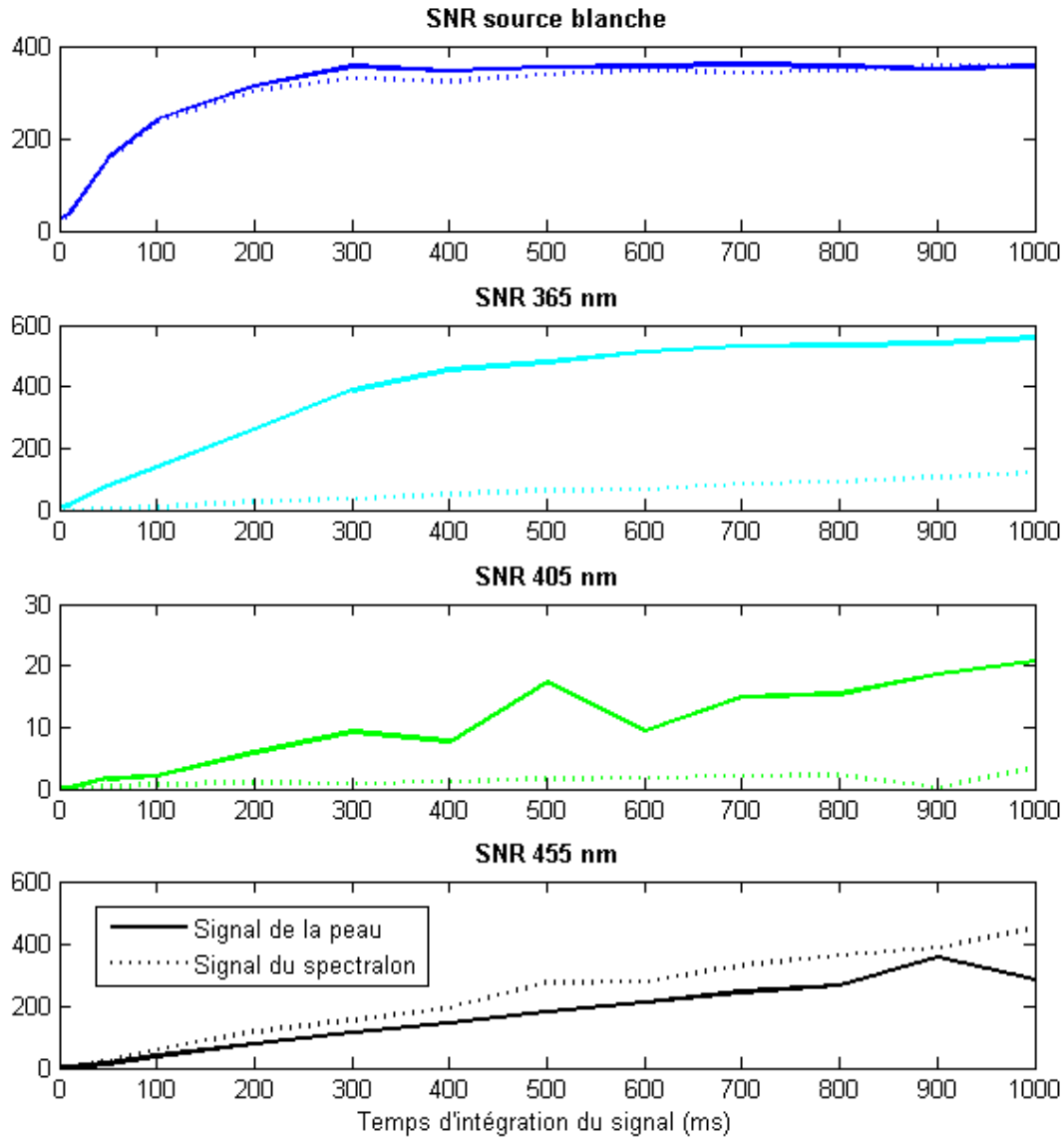


Figure 3.12 : SNR pour chaque source en fonction du temps d'intégration. Le SNR provenant du signal du spectralon (pointillé) et celui de la peau (ligne pleine) sont soit comparables, soit beaucoup plus élevés pour un signal biologique.

### 3.5 Calibration du système

D'abord, pour ce qui a trait à la réflectance du système, la lumière blanche dans le trajet optique est modélisée par :

$$S_m^w(\lambda) = S_{source}^w(\lambda) * R(\lambda) * T_{sonde}(\lambda) * T_{switch}(\lambda) * T_{fibres}(\lambda) * T_{détéc}(\lambda)$$

avec :

$S_m^w(\lambda)$  = spectre mesuré par le spectromètre lorsque l'échantillon est excité par la lumière blanche (intensité, u.a.)

$S_{source}^w$  = spectre de la source d'excitation

$R(\lambda)$  = spectre de réflectance réel de l'échantillon

$T_{sonde}(\lambda)$  = transmission de la sonde (fibres et filtres compris)

$T_{switch}(\lambda)$  = transmission du commutateur optique

$T_{fibres}(\lambda)$  = transmission des fibres optiques contenues dans le système

$T_{détéc}(\lambda)$  = réponse due au système de détection (spectromètre et branchement)

Lorsque l'échantillon interrogé par le système de réflectance est le spectralon, le spectre de réflectance  $R(\lambda)$  est spectralement plat pour toutes les longueurs d'ondes de 250 à 2 500 nm et 99 % du signal est réfléchi. Or, la division par la mesure du standard (spectralon) annule les termes provenant de la réponse du système et de la source, permettant d'isoler la contribution spécifique à l'échantillon. Ainsi, la formule suivante est utilisée pour la calibration des spectres de réflectance diffuse :

$$R(\lambda) = \frac{S_m^w(\lambda)}{S_{m,spectralon}^w(\lambda)}$$

avec :  $S_{m,spectralon}^w(\lambda)$  = spectre mesuré par le spectromètre lorsque le spectralon est imagé

Par exemple, à la Figure 3.13, lorsque l'on observe des spectres bruts de la peau (*raw spectra*) provenant du système de réflectance diffuse, il est difficile d'en tirer des conclusions. Avec la calibration, on note tout de suite que les pics d'absorption de l'hémoglobine (Hb et HbO tels que présentés dans le chapitre 1) correspondent aux baisses d'intensité dans la réflectance de l'échantillon. Un graphique représentant l'absorption de l'échantillon (réflectance<sup>-1</sup>) est aussi présenté en bas à droite de la Figure 3.13, afin de mieux comparer avec les spectres d'absorbance de l'hémoglobine, oxygénée ou non. Avec des algorithmes sophistiqués, il est possible de retirer des informations quantitatives sur la présence de ces composants dans le tissu. Ceci est présentement investigué par d'autres étudiants au Laboratoire de radiologie optique.

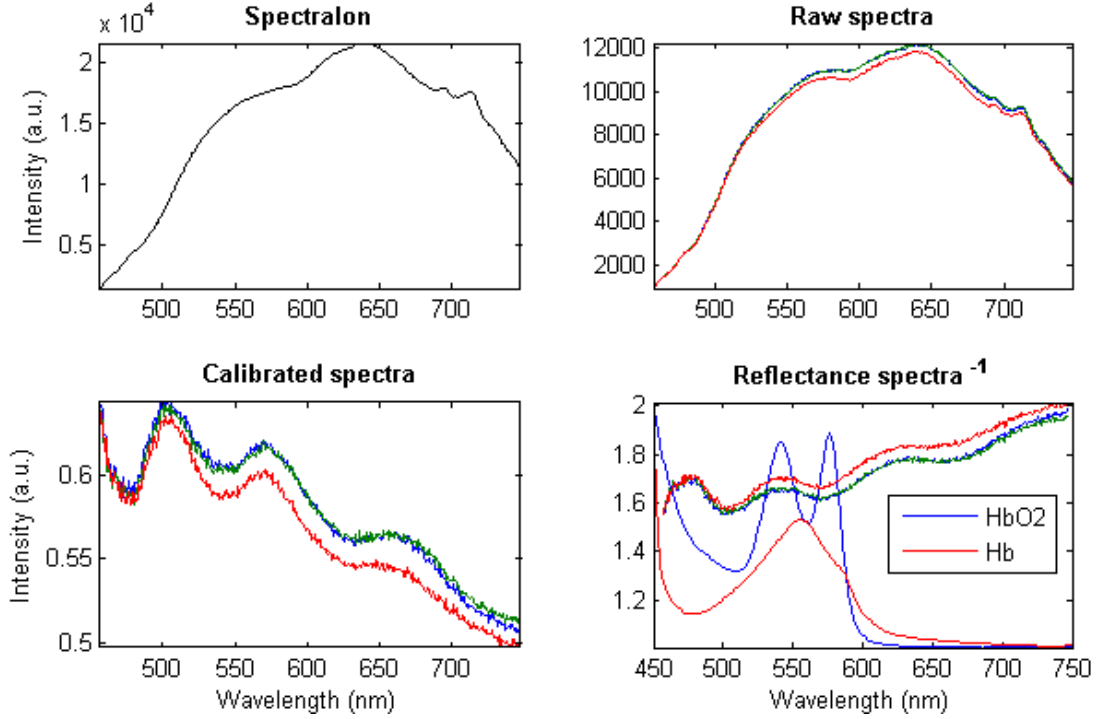


Figure 3.13 : Démonstration de la calibration de spectre de peau pour la source blanche.

Le même principe de calibration est appliqué pour le système en fluorescence, mais certains termes supplémentaires doivent être considérés :

$$S_m^{fluo}(\lambda) = S_{source}^{fluo}(\lambda) * F_b(\lambda) * T_{sonde}(\lambda) * T_{switch}(\lambda) * T_{fibres}(\lambda) * T_{détéc}(\lambda) * AF_{in}(\lambda) * AF_{out}(\lambda)$$

avec :

$S_m^{fluo}(\lambda)$  = spectre mesuré par le spectromètre lorsque l'échantillon est excité par une source de fluorescence (intensité, u.a.)

$F_b(\lambda)$  = spectre de fluorescence brut de l'échantillon (inclut l'information sur l'absorbance et diffusivité de l'échantillon [72])

$AF_{in}(\lambda)$  = spectre de fluorescence intrinsèque du système d'excitation (fibres, filtres, sonde et switch combinés)

$AF_{out}(\lambda)$  = spectre de fluorescence intrinsèque du système de collection (fibres, filtres, sonde, roulette de filtres et détecteur combinés)

Toutefois, la réponse du spectralon en fluorescence, soit sa fluorescence intrinsèque, n'est pas connue. Ainsi, un matériel de référence pour la fluorescence doit être utilisé. Lorsque l'échantillon interrogé par le système de fluorescence est le miroir, on suppose que le spectre

étudié  $F_b(\lambda)$  est constant et égal à 1, puisque l'on considère qu'aucune fluorescence intrinsèque n'est due au miroir, et théoriquement tout ce qui est émis sera réfléchi parfaitement. Ainsi :

$$F_b(\lambda) = \frac{S_m^{fluo}(\lambda)}{S_{m,miroir}^{fluo}(\lambda)}$$

avec :  $S_{m,miroir}^{fluo}(\lambda)$  = spectre mesuré par le spectromètre lorsque le miroir est imagé (même source d'excitation et donc même système utilisé).

Cette calibration est illustrée pour les trois sources, ici avec des spectres pris sur la peau (Figure 3.14). Le miroir utilisé est presque parfait (99 % réfléchissant) de 400 à 750 nm (BB05-E02, Thorlabs).

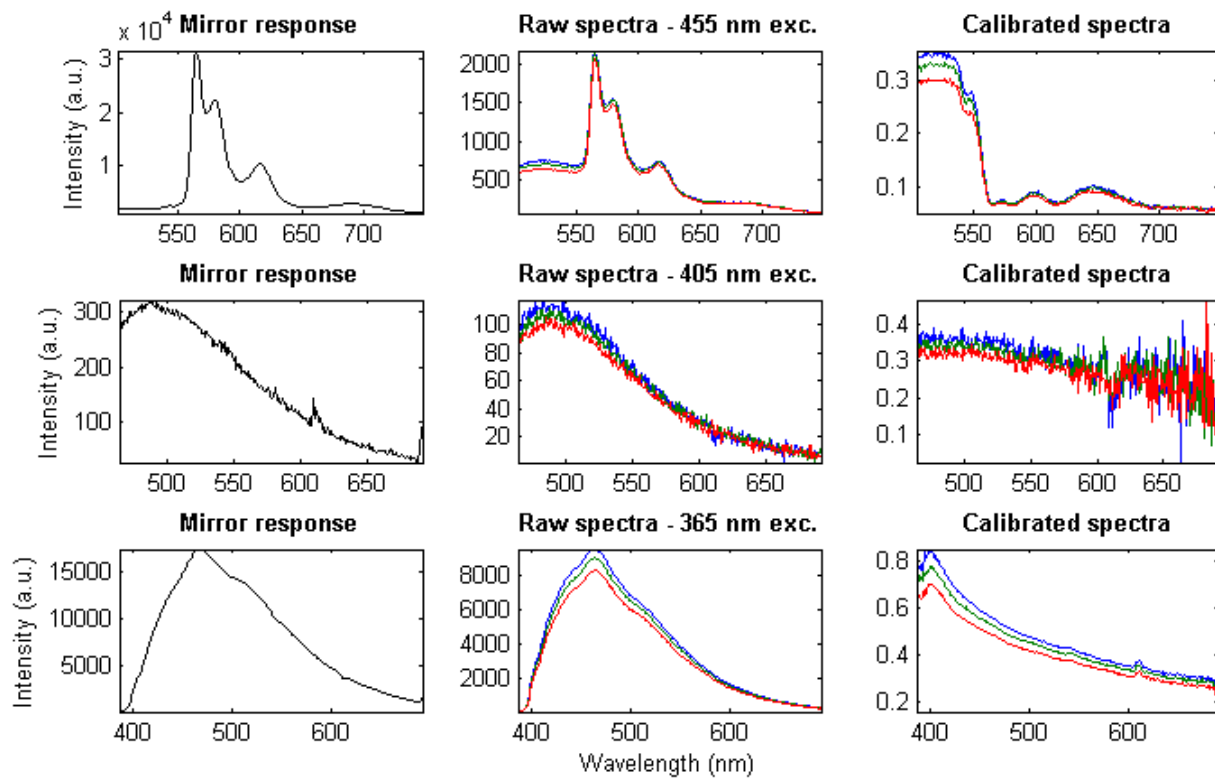


Figure 3.14 : Calibration pour les sources de fluorescence, exemples avec des spectres de peau. La première ligne correspond aux spectres associés avec la source à 455 nm, la deuxième avec la source à 405 nm et la troisième avec la source à 365 nm. La première colonne représente la réponse spectrale du miroir (*mirror response*), la deuxième, le spectre brut (*raw spectra*) et la troisième, le spectre calibré (*calibrated spectra*). Les spectres de couleur différente représentent trois itérations subséquentes.

### 3.5.1 Normalisation des spectres de fluorescence pour l'atténuation

Les spectres de fluorescence doivent aussi être corrigés par rapport à la réflectance diffuse de l'échantillon, à cause de l'atténuation due à l'absorption et à la diffusion des tissus. Par exemple, les concentrations relatives de Hb et HbO modifient l'allure du spectre, surtout entre 510 et 690 nm (voir le graphique calibré de l'excitation à 455 nm à la Figure 3.13). Il est important que l'impact de l'absorption sélective et de la diffusion élastique sur les spectres de fluorescence soit minimisé [45]. Les spectres utilisés pour classifier les tissus ne doivent effectivement que refléter la fluorescence spécifique des fluorophores présents dans les tissus. Autrement, il serait possible d'interpréter de façon erronée un tissu hautement vascularisé (mais ayant une faible concentration de molécules fluorescentes) comme ayant le même contenu en fluorophores qu'un tissu faiblement vascularisé (celui-ci ayant une grande concentration de molécules fluorescentes).

Trois types de normalisation sont testés afin de corriger les spectres de fluorescence par la réflectance diffuse. Premièrement, une méthode (**normalisation # 1**) utilisant l'intensité du spectre de réflectance moyennée sur les longueurs d'onde d'excitation ( $\Phi_X^{Ref}$ ) est testée. La source de lumière blanche allant de 470 à 850 nm, l'intervalle utilisé est de 470 à 490 nm pour les trois sources de fluorescence.

$$F_{corr,1}(\lambda) = F_b(\lambda) / \Phi_X^{Ref} \quad \text{où } \Phi_X^{Ref} = \overline{R(\lambda_{[470-490 \text{ nm}]})}$$

Deuxièmement, une méthode (**normalisation # 2**) utilisant la moyenne d'intensité des spectres de réflectance sur toute la longueur d'onde ( $\Phi_M^{Ref}$ ) est testée. Ceci corrige donc les données pour les différences d'intensité globale des spectres de fluorescence, mais non pour la présence de pics d'absorption, par exemple.

$$F_{corr,2}(\lambda) = F_b(\lambda) / \Phi_M^{Ref} \quad \text{où } \Phi_M^{Ref} = \overline{R(\lambda)}$$

Troisièmement, la normalisation (**normalisation # 3**) par la réflectance dépendante des longueurs d'onde est testée ( $R(\lambda)$ ). Il s'agit donc de diviser les spectres de fluorescence par les spectres de réflectance, point par point (où chaque point correspond à une longueur d'onde).

$$F_{corr,3}(\lambda) = F_b(\lambda) / R(\lambda)$$



Cette méthode est efficace lorsque des creux dans les spectres de fluorescence correspondent directement avec ceux de l'hémoglobine. Par contre, lorsque ceux-ci ne sont pas visibles, cette normalisation entraîne des modifications notables aux spectres, qui ne sont pas souhaitables. Toutefois, cela pourrait permettre de jumeler l'information de la réflectance diffuse directement à la fluorescence, sans avoir besoin d'utiliser deux spectres distincts dans la classification. L'effet de cette normalisation sur la classification des tissus sera vu au chapitre 4. Les différences entre les méthodes sont illustrées ci-dessous avec des spectres de peau, alors que les effets de cette normalisation sur la classification sont présentés au chapitre 4. C'est d'ailleurs avec les résultats de la classification que la meilleure méthode de normalisation sera officiellement choisie dans le cadre de ce projet.

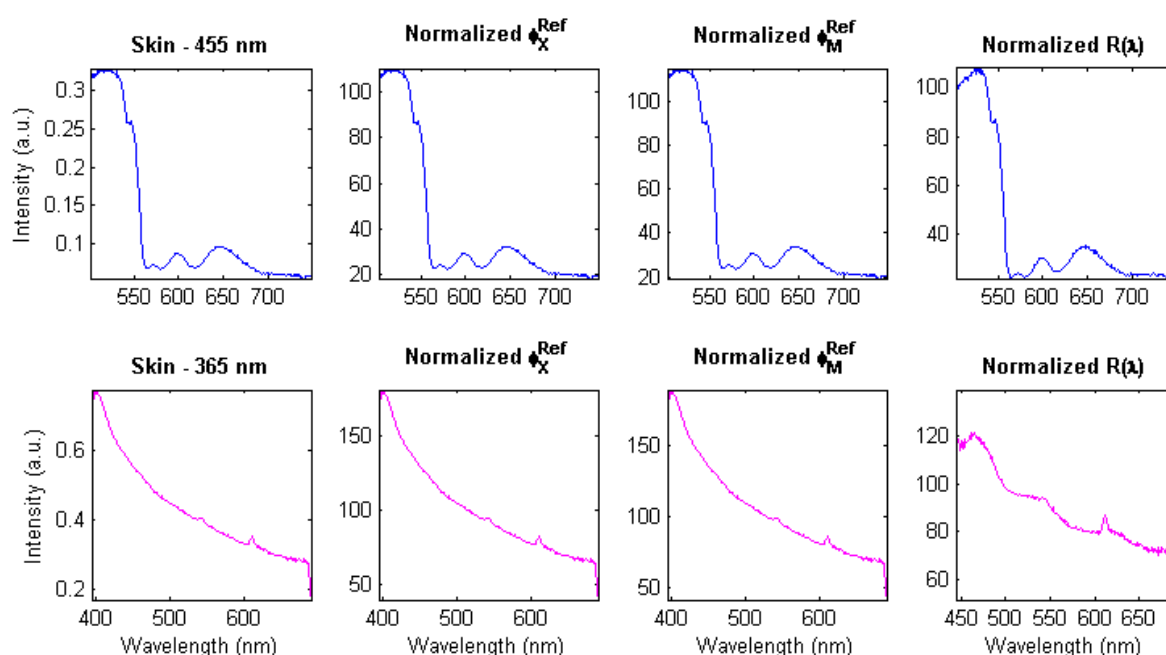


Figure 3.15 : Comparaison de trois méthodes de normalisation des spectres de fluorescence de la peau par la réflectance diffuse. La source à 405 nm n'est pas représentée ici puisque le signal recueilli sur la peau est faible, et donc très bruité.

Les méthodes de normalisation # 1 à 3 sont sommairement testées avec deux solutions, nommées C et F, contenant la même concentration du fluorophore PpIX (5  $\mu\text{g/mL}$ ), mais avec des valeurs d'absorbance différentes (la méthodologie est présentée à la section 3.6). Qualitativement, la méthode de normalisation # 2 sur la Figure 3.16 semble réduire davantage l'écart qui se trouve entre les valeurs du pic maximal d'émission (quantitativement, il s'agit d'une

différence de 744 u.a. à 635 nm au lieu de 1 316 u.a. pour la normalisation # 1 et 1 172 u.a. pour la # 3). La méthode # 2 semble donc optimale, mais cela sera vérifié au chapitre 4 tel que mentionné. D'autres méthodes sont utilisées dans diverses études, par exemple en considérant un pourcentage  $k(\lambda)$  du trajet de la lumière en fluorescence qui est identique à celui de la lumière en réflectance [45]. Cependant, il est jugé qu'une normalisation sommaire des spectres de fluorescence est suffisante pour l'utilisation dans des algorithmes de classification. En effet, dans le cadre de ce projet, la normalisation sert d'abord et avant tout à corriger l'atténuation des tissus biologiques, donc à minimiser l'absorption sélective et la diffusion élastique sur les spectres de fluorescence. De cette façon, le fait de simplement normaliser par une valeur moyenne d'intensité de la réflectance ajuste l'intensité moyenne des spectres de fluorescence. Toutefois, advenant qu'il faille quantifier un quelconque fluorophore ou encore étudier de manière qualitative les pics des spectres de fluorescence, il serait préférable de conduire une étude spécifique pour trouver la formule gagnante. Par exemple, afin de quantifier la PpIX dans le cerveau, une série de fantômes optiques avec  $\mu_s$  et  $\mu_a$  changeants peut être imagée et tous les facteurs d'une formule d'atténuation peuvent être trouvés [2].

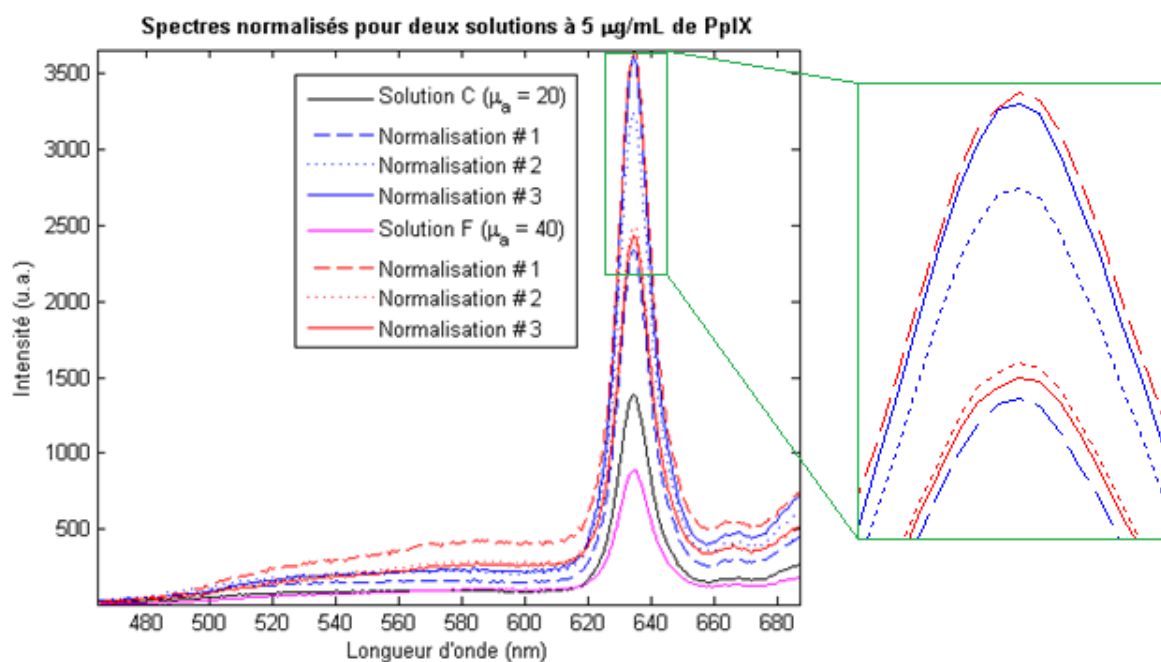


Figure 3.16 : Visualisation de l'effet des méthodes de normalisation sur un spectre de fluorescence de PpIX, à différentes valeurs d'absorbance (excitation à 405 nm). Les spectres bruts des solutions C et F sont représentés en noir et magenta respectivement, alors que les différentes méthodes de normalisation sont illustrées par les différentes courbes bleues et rouges.

## 3.6 Exemple d'utilisation : détection de PpIX

### 3.6.1 Dilutions

La validation de la précision du système de fluorescence est effectuée en utilisant un fluorophore parfois employé durant la résection de tumeurs cérébrales, la protoporphyrine IX (PpIX). Les concentrations allant de 0,02 à 5  $\mu\text{g/mL}$  correspondent au niveau de PpIX présent dans les tissus normaux ou pathologiques suivant l'administration de 5-ALA. Ainsi, deux séries de dilutions sont faites avec différentes concentrations de PpIX (5, 1,25, 0,313, 0,078, 0,02 et 0  $\mu\text{g/mL}$ ), chaque série ayant un coefficient d'absorption  $\mu_a$  différent mais le même coefficient de diffusion  $\mu_s' = 25 \text{ cm}^{-1}$  à la longueur d'onde d'excitation. Le fantôme optique appelé C est caractérisé par un  $\mu_a$  de 20  $\text{cm}^{-1}$  alors que le fantôme appelé F possède un  $\mu_a$  de 40  $\text{cm}^{-1}$ . Les coefficients d'absorption sont respectés en utilisant différents volumes d'eau et d'intralipide, dont les coefficients optiques sont connus. Une petite quantité d'éthanol est nécessaire afin de créer une solution mère fluorescente, puisque la PpIX s'y dissout beaucoup mieux que dans l'eau. La concentration finale reste cependant minime par rapport aux autres constituants. Puisque la PpIX possède un pic majeur d'excitation à 405 nm, seule cette source est utilisée pour cette expérience. Les spectres bruts de fluorescence sont présentés à la Figure 3.17, où il est possible de remarquer les pics d'émission. Au chapitre 1, le spectre théorique a été vu, avec un pic de fluorescence majeur à 635 nm, avec un second, moins intense, à 700 nm. L'intensité de ces pics semble proportionnelle à la concentration, telle qu'indiquée dans la légende de la Figure 3.17.

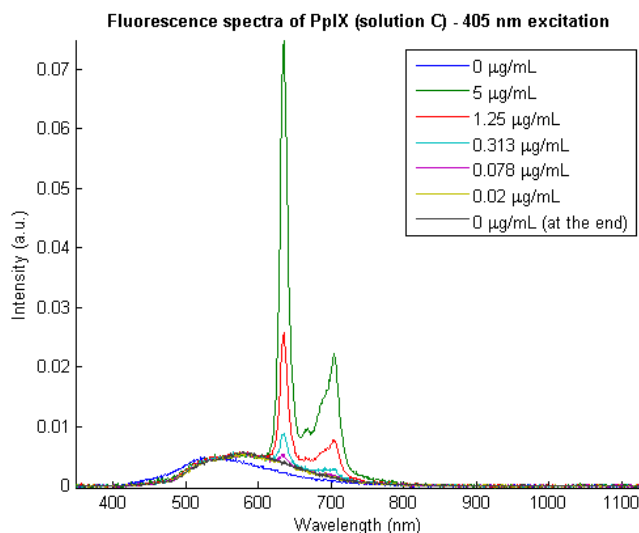
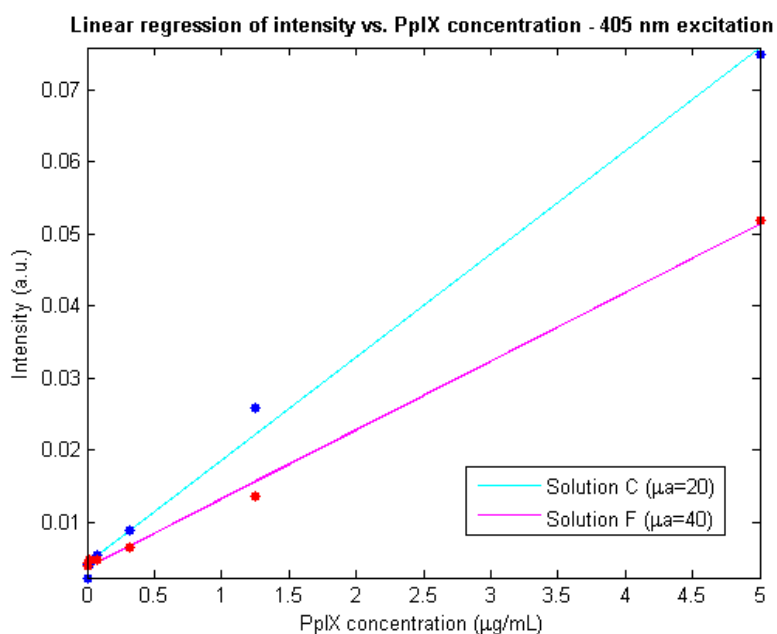


Figure 3.17 : Spectres bruts de fluorescence de la protoporphyrine IX en solution.

Afin d'étudier l'efficacité de détection du système en fluorescence, l'intensité du pic majeur à 635 nm est mesurée pour les dilutions C et F. Sur le premier graphique de la Figure 3.18, l'intensité semble être linéaire par rapport à la concentration de PpIX présente dans la solution, et ce pour les deux séries. Avec une concentration de 0,02  $\mu\text{g/mL}$ , l'intensité des pics est difficilement visible sur les spectres à la figure précédente. Avec le graphique représentant la relation entre l'intensité et la concentration, on remarque une très légère différence, mais avec une échelle logarithmique en  $x$  (deuxième graphique) cette différence n'est pas notable. On pourrait donc conclure que le seuil de détection se trouve entre 0,078 et 0,02  $\mu\text{g/mL}$ . Il faudrait cependant effectuer les mêmes tests avec davantage de dilutions avant de tirer des conclusions. Il serait logique de penser que la limite de détection serait grandement améliorée avec une source lumineuse davantage puissante, puisque l'intensité de celle-ci à la sortie de la sonde est minime. Toutefois, un seuil de détection autour de 0,1  $\mu\text{g/mL}$  permet un diagnostic positif à plus de 90 % [65], [73], donc le système pourrait être utilisé tel quel en salle d'opération pour détecter la PpIX avec succès.

Une relation quantitative pourrait être déduite de ces graphiques, notamment en se basant sur les nombreux travaux du groupe de recherche [2], [6], [59], [65], [74]. Cependant, ce projet se concentre davantage sur la fluorescence intrinsèque et la classification de tissus en comparant des spectres que sur la quantification de fluorophores : c'est pourquoi cet aspect est omis dans le présent document.



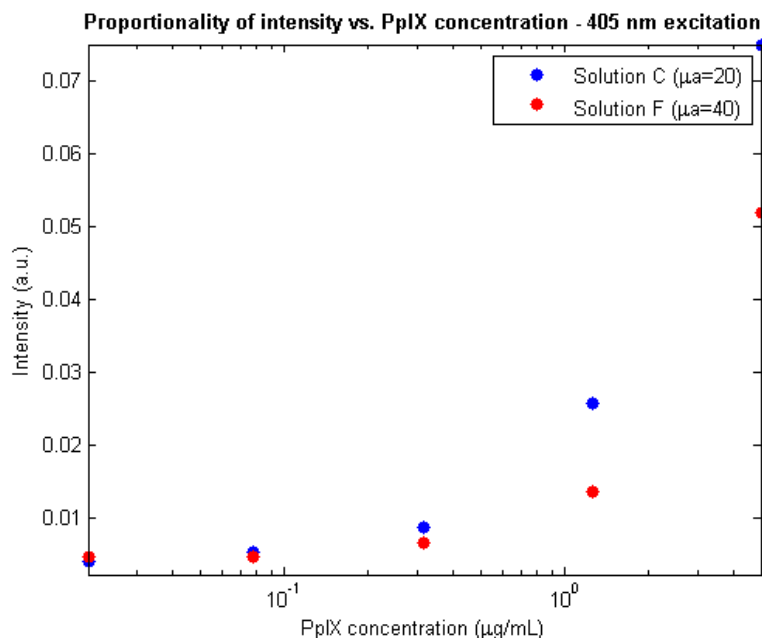


Figure 3.18 : Proportionnalité de l'intensité du pic de fluorescence à 635 nm par rapport à la concentration de PpIX pour les dilutions C et F. Les points correspondent aux différentes concentrations (de 0 à 5  $\mu\text{g/mL}$ ). En haut : la mesure de l'intensité du pic de fluorescence est linéaire par rapport à la [PpIX]. En bas : visualisation avec une échelle semilogarithmique.

### 3.6.2 Étude combinée à large champ et échantillons *ex vivo*

Dans le cadre d'une autre étude portant sur l'exactitude de la détection augmentée en fluorescence d'une caméra hyperspectrale EMCCD (*Nüvi Caméras*) lorsque comparée au microscope chirurgical usuel (microscope *Pentero* de *Zeiss*), des mesures sont prises avec des échantillons *ex vivo* (article soumis [75]). Deux rats affectés d'un GBM exogène ont été sacrifiés après l'administration de 5-ALA, utilisée dans le but de rendre les tumeurs positives au PpIX. Un total de huit tranches de cerveau provenant des deux animaux est imagé en fluorescence et en réflectance (excitation par la source 405 nm et la source blanche du microscope, respectivement), à la fois par le système hyperspectral et par le microscope chirurgical. Une mesure est prise avec le système de sonde optique sur chaque tranche à l'endroit où l'intensité maximale de fluorescence était visible suivant l'imagerie grand champ. Le pic de fluorescence caractéristique de la PpIX est clairement visible lors de chaque acquisition sur la tumeur, comme le montre l'exemple ci-dessous (Figure 3.19).

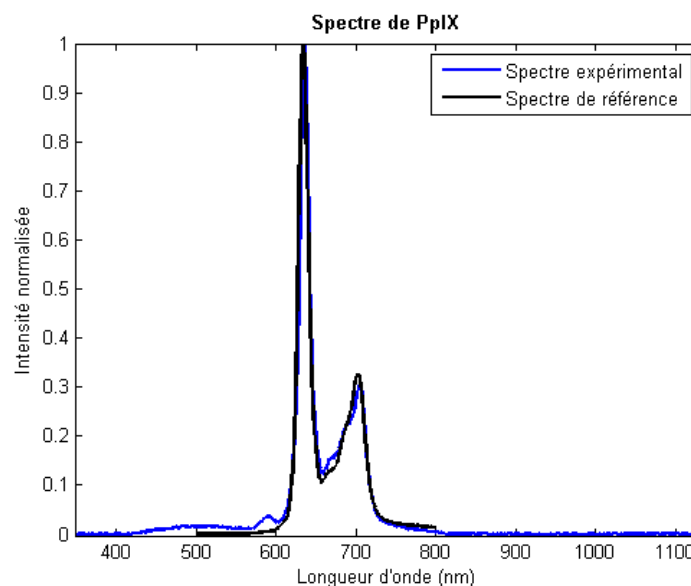


Figure 3.19 : Spectre expérimental normalisé du signal de fluorescence de la molécule PpIX dont la production a été induite dans une tumeur chez un rat. Ce spectre est comparé à un spectre théorique, ce qui confirme la détection par la sonde ainsi que la validité des échantillons biologiques.

À partir des images de fluorescence obtenues (voir exemple à la Figure 3.20), il est possible d'extraire un chiffre indiquant le niveau de fluorescence. Ceci donne une indication de la concentration de PpIX contenue à cet endroit précis. Puisque la caméra EMCCD possède un niveau de précision supérieur au microscope chirurgical, ses données seront comparées à celles obtenues avec la sonde.

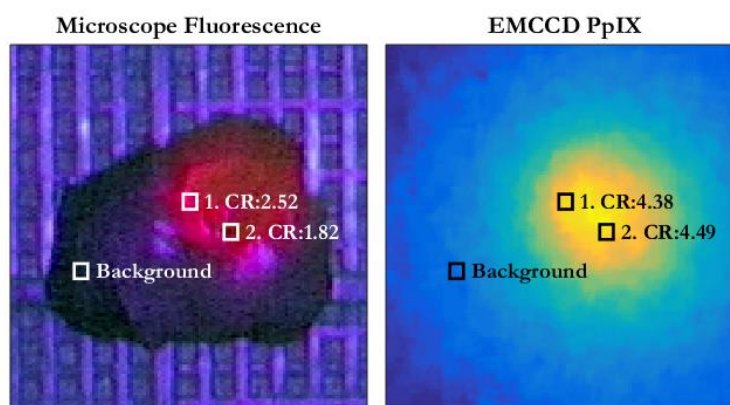


Figure 3.20 : À gauche, la fluorescence visible grâce au microscope chirurgical. À droite, la fluorescence telle qu'elle est visible avec le système hyperspectral. Les valeurs indiquées

représentent un ratio de l'intensité lumineuse sur la luminosité définie par la visibilité de chaque couleur. Le *background* est l'arrière-plan sur le tissu considéré comme n'ayant aucune concentration de PpIX.

La valeur d'intensité du pic de fluorescence maximal provenant du spectre obtenu avec la sonde est comparée à une valeur représentant l'intensité de la fluorescence de la caméra EMCCD, le tout lorsque l'excitation se fait à 405 nm. La relation entre les deux est illustrée à la Figure 3.21. Celle-ci s'explique bien par une régression linéaire (ligne pleine sur la figure), ce qui valide l'utilisation de la sonde sur des échantillons biologiques fluorescents.

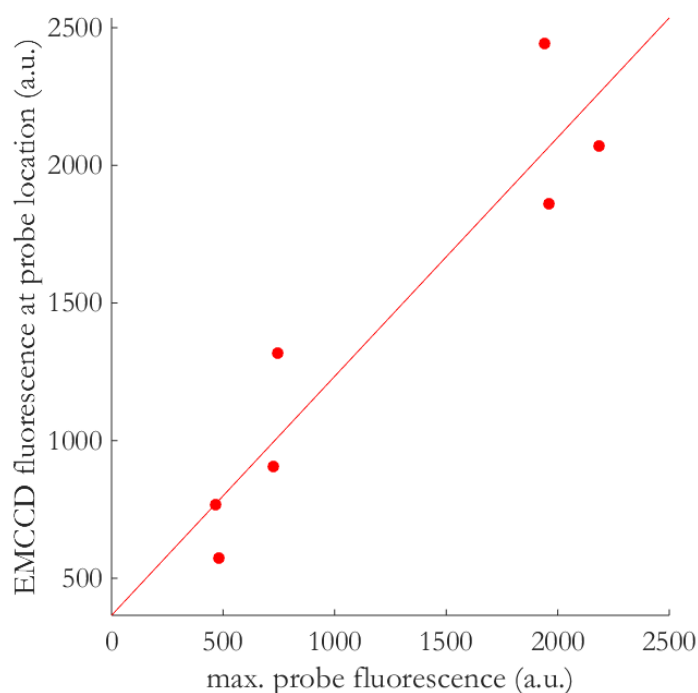


Figure 3.21 : Corrélation entre la fluorescence telle que décrite par l'imagerie avec caméra EMCCD et celle obtenue avec les spectres donnés par la sonde (points). La relation est linéairement proportionnelle (ligne pleine). Tiré de [75].

## **CHAPITRE 4    ÉTUDE DES CAS HUMAINS EN SALLE D'OPÉRATION ET CLASSIFICATION DES TISSUS**

Après sa mise en opération, le système multimodal présenté dans les chapitres précédents est testé en salle d'opération, afin de déterminer sa capacité à distinguer les régions normales du cerveau de celles contenant des cellules cancéreuses lors de la chirurgie à crâne ouvert. L'objectif est alors de vérifier l'hypothèse selon laquelle non seulement le système rend possible le diagnostic *in vivo*, mais il permet en plus d'améliorer les mesures de sensibilité, de spécificité et d'exactitude lorsqu'il est comparé aux techniques de l'état de l'art, incluant la spectroscopie Raman utilisée comme unique source de contraste optique.

Les analyses des spectres Raman (non détaillées ici) ont été faites par le chercheur post-doctoral Michael Jermyn, et ont mené à la classification des tissus pour l'étude clinique (présentée brièvement à la section 4.3.1). Les fonctions statistiques par apprentissage machine qui sont utilisées à la section 4.3 proviennent de ces codes MATLAB, produits par Michael Jermyn. Les résultats obtenus grâce à ces analyses seront comparés à ceux obtenus avec le système multimodal combinant les mesures de fluorescence intrinsèque et de réflectance diffuse à celles de spectroscopie Raman (voir la section 4.4.4).

### **4.1 Approbations menant à l'utilisation du système en salle d'opération**

#### **4.1.1 Aspect éthique et sécurité**

Notre système, afin d'être dûment approuvé par le comité d'éthique de l'Université McGill (à laquelle est affilié l'Institut et hôpital neurologiques de Montréal), doit répondre à certains critères. D'abord, il faut démontrer le caractère inoffensif de l'utilisation du laser infrarouge pour la spectroscopie Raman des tissus cérébraux. En effet, comme les globules rouges du sang absorbent énormément de radiation dans le proche infrarouge, l'intensité du laser doit être conservée en-dessous d'un certain seuil de dommage thermique irréversible à l'acquisition [24].

Afin de mettre en contexte les quantités d'énergie utilisées dans le cadre de notre étude, une revue de la littérature est effectuée. Au chapitre 1, il a été mentionné que de hautes intensités



pouvaient être utilisées dans la mesure où la zone d'excitation des tissus est restreinte : par exemple, un focus de 120  $\mu\text{m}$  du laser 785 nm avec une intensité de 200 mW pour 4 s d'excitation n'entraîne pas de dommages irréversibles au tissu chez des souris [23]. En outre, dans une étude *in vivo* conduite avec 20 patients et collectant plus de 400 échantillons de tissus pendant l'endoscopie gastro-intestinale, un laser à 785 nm était utilisé afin de produire et de détecter des spectres Raman. La puissance incidente de ce laser était de 100 mW et le temps d'acquisition de 5 s pour chacune des trois acquisitions effectuées au même endroit [76]. Ceci correspond à une quantité d'énergie déposée de 0,5 J. Dans le cadre de notre étude, la puissance incidente est limitée à 75,8 mW (mesurée avec un puissance-mètre placé directement au bout de la sonde) et le temps d'acquisition utilisé est de 0,05 s pour chacune des trois acquisitions faites au même endroit. Ceci correspond à 7,58 mJ, soit seulement 1,52 % de l'énergie utilisée dans l'étude en lien avec l'application gastro-intestinale. Une autre étude intraopératoire sur le cerveau utilise une sonde de 12 mm de diamètre avec une puissance de 15 à 16,5 mW pour un laser à 789 nm, avec des temps d'intégration allant de 60 à 180 s (0,9 à 2,97 J) [77]. Ainsi, lorsque comparée avec les études antérieures, la puissance au bout de la sonde, dans le cadre de notre étude, est minime. Puisqu'aucun dommage n'a été noté avec des énergies plus élevées, le système utilisé ici ne causera logiquement pas de dommage aux tissus.

De plus, des normes gouvernementales sont applicables et doivent être respectées avant d'entrer en salle d'opération [78]. Celles-ci ont été étudiées et tous les points sont respectés lors de l'utilisation en salle d'opération. Par exemple, le document de normes CSA Z386-08 stipule qu'un système entièrement fibré requiert différentes procédures de sécurité : il n'est pas nécessaire de contrôler la salle entière comme s'il y avait présence d'un laser en champ libre, mais l'interrupteur qui contrôle l'exposition au patient doit être gardé. Ceci est fait dans le système à l'aide d'une clef. Par la suite, le protocole et l'instrumentation sont présentés au Chef des opérations du département de santé, sécurité et environnement de l'Université McGill (et de l'Institut et hôpital neurologiques) afin d'obtenir son approbation pour l'utilisation en salle d'opération. Le protocole (voir l'Annexe C) et la procédure d'utilisation de l'instrument utilisé en salle opératoire sont expliqués aux personnes impliquées, selon les normes de l'hôpital.

Ce qui est présenté dans cette sous-section 4.1.1 a été accompli de manière individuelle. Un dossier beaucoup plus élaboré a été monté, en grande partie, par un collaborateur ingénieur de

l'Institut et hôpital neurologiques. Avec tout ceci et à la suite de recommandations, l'utilisation de l'instrument est validée par un comité.

#### 4.1.2 Protocole d'utilisation en salle d'opération

En plus de l'aspect éthique, un protocole d'utilisation en salle d'opération doit être planifié afin de permettre une utilisation durant la chirurgie. D'abord, des tests de lumières sont effectués pour vérifier l'effet sur les spectres Raman de chaque appareil présent dans la salle d'opération, incluant les lumières principales au plafond, les lampes chirurgicales, la source de lumière blanche du microscope chirurgical et l'appareil de neuronavigation. Quelques-unes des différentes combinaisons de luminosité testées sont décrites au Tableau 4.1. Un spectre Raman est prélevé sur un échantillon de biopsie dans chacune des situations décrites et il est comparé au spectre de référence, soit un spectre sur le même échantillon acquis dans le noir total. La distance entre ce spectre de référence et les autres est rapportée dans le tableau : chaque distance est calculée par la somme des différences absolues, au carré, entre l'intensité du spectre étudié et celle du spectre de référence.

Tableau 4.1 : Effet de l'éclairage en salle opératoire sur les signaux d'échantillon de biopsie

Lumière(s) utilisée(s) [intensité]	Distance calculée par la méthode des moindres carrés (u.a.)
Aucune	0
Bleue du microscope chirurgical [5 %] + 1 lampe chirurgicale [intensité 3/7]	680,5
Bleue du microscope chirurgical [20 %] + 1 lampe chirurgicale [intensité 3/7]	800,3
Blanche du microscope chirurgical [5 %]	167,5
<b>2 lampes chirurgicales [intensité 4/7]</b>	<b>11,1</b>
Bleue du microscope chirurgical [20 %] + 2 lampes chirurgicales [intensité 4/7]	722,5
Blanche du microscope chirurgical [5 %] + 2 lampes chirurgicales [intensité 4/7]	564,0
Blanche du microscope chirurgical [20 %] + 2 lampes chirurgicales [intensité 4/7]	792,4

La plus basse distance (11,1 u.a.) est associée avec l'illumination de la pièce par deux lampes chirurgicales seulement, ce qui signifie que le spectre associé à cet éclairage est celui qui se rapproche le plus du spectre associé au noir total. Il est donc décidé que les lumières principales et celles du microscope chirurgical devaient être éteintes pour éviter de contaminer ou de saturer

les spectres étudiés. De plus, l'appareil de neuronavigation tridimensionnelle recalcule la position des outils chirurgicaux avec les IRMs préopératoires en utilisant deux sources infra-rouge. Ces sources interfèrent avec le signal Raman. Ainsi, après consultation avec l'ingénieur biomédical en charge, ces sources pourront simplement être dirigées ailleurs que sur la cavité chirurgicale durant l'opération [79].

Ensuite, la prise d'un échantillon de biopsie suivant chaque acquisition Raman est discutée et une méthode d'identification, de conservation et d'analyse est définie : les échantillons seront identifiés par un code spécifique à l'étude et conservés dans la paraffine pour une analyse pathologique standard. Finalement, le protocole d'utilisation en salle d'opération final est rédigé et approuvé par les parties impliquées. Un protocole simplifié est aussi rédigé afin de répondre aux normes de l'Institut et hôpital neurologiques de Montréal et de l'Université McGill : celui-ci doit être lu et compris par chaque membre du personnel et est donc affiché sur la porte de la salle d'opération avant chaque cas. Ce protocole est présenté en annexe (voir l'Annexe C).

La neuronavigation est utile lors de l'utilisation de la sonde afin de faire correspondre chaque mesure à une position tridimensionnelle sur les IRMs préopératoires. Pour ce faire, l'instrument *SureTrack* de la compagnie Medtronic doit être attaché à la sonde comme le montre la Figure 1.4 (l'instrument de couleur orange avec des boules réfléchissantes). Étant donné le diamètre interne spécifique du port d'attache du *SureTrack*, il a fallu modifier les dimensions de la sonde afin qu'elle puisse s'y insérer. Le diamètre externe de cette dernière a donc été augmenté par l'ajout d'une canule supplémentaire.

Enfin, il est nécessaire avant chaque opération de stériliser la sonde, puisque celle-ci doit être dans la zone stérile (une région autour du patient à l'intérieure de laquelle aucun élément non-stérilisé ne peut entrer) durant toute la procédure chirurgicale, en plus d'être en contact direct avec le patient. L'étude des différentes options de stérilisation (par chaleur, vapeur ou divers produits chimiques) est réalisée et le choix s'est porté sur la machine de stérilisation *Sterrad*, car elle convient le mieux aux instruments fibrés. En effet, grâce à son procédé à base de plasma au peroxyde d'hydrogène à basse température, la colle optique ou les composants de la sonde ne sont pas affectés. Un protocole de stérilisation est donc conçu et planifié avec le personnel de l'hôpital.

## 4.2 Méthodologie finale en salle d'opération

Une fois franchies les étapes d'approbation du système Raman présentées à la section précédente, et une fois le montage complètement terminé et automatisé, le système multimodal est prêt pour une utilisation en salle d'opération.

### 4.2.1 Sélection des patients et procédure chirurgicale

Le projet se concentre sur les gliomes de grades 2 à 4 principalement, car il s'agit du type de cancer cérébral le plus commun, mais surtout parce que les infiltrations sont un problème majeur dans ces situations. Ainsi, le système est testé chez des adultes atteints de gliomes qui sont traités à l'Institut et hôpital neurologiques de Montréal par le Dr Kevin Petrecca, neurochirurgien. À quelques reprises, des cas de méningiomes ou autres types de cancer ont été étudiés à des fins de validation du système seulement, ou encore pour obtenir des données de tissus sains. Un consentement éclairé est obtenu de chaque patient selon les normes de l'hôpital, suivant les recommandations du Comité d'éthique de l'Institut et hôpital neurologiques de Montréal. Avant l'opération, chaque patient subit la procédure normale, qui consiste en une inspection neurologique complète, ainsi qu'en une prise d'images cliniques standard (IRM). L'opération de résection de la tumeur cérébrale suit ensuite son cours normal. La sonde, préalablement stérilisée avec le système *Sterrad*, est apportée en salle d'opération et est placée dans la zone stérile. Dans cette zone, où se tiennent le neurochirurgien et son assistant, se trouvent aussi le microscope chirurgical et la table chirurgicale. Le chariot chirurgical avec le système optique est apporté par l'étudiant en charge de l'acquisition des données et demeure en dehors de cette zone stérile durant la chirurgie (Figure 4.1).



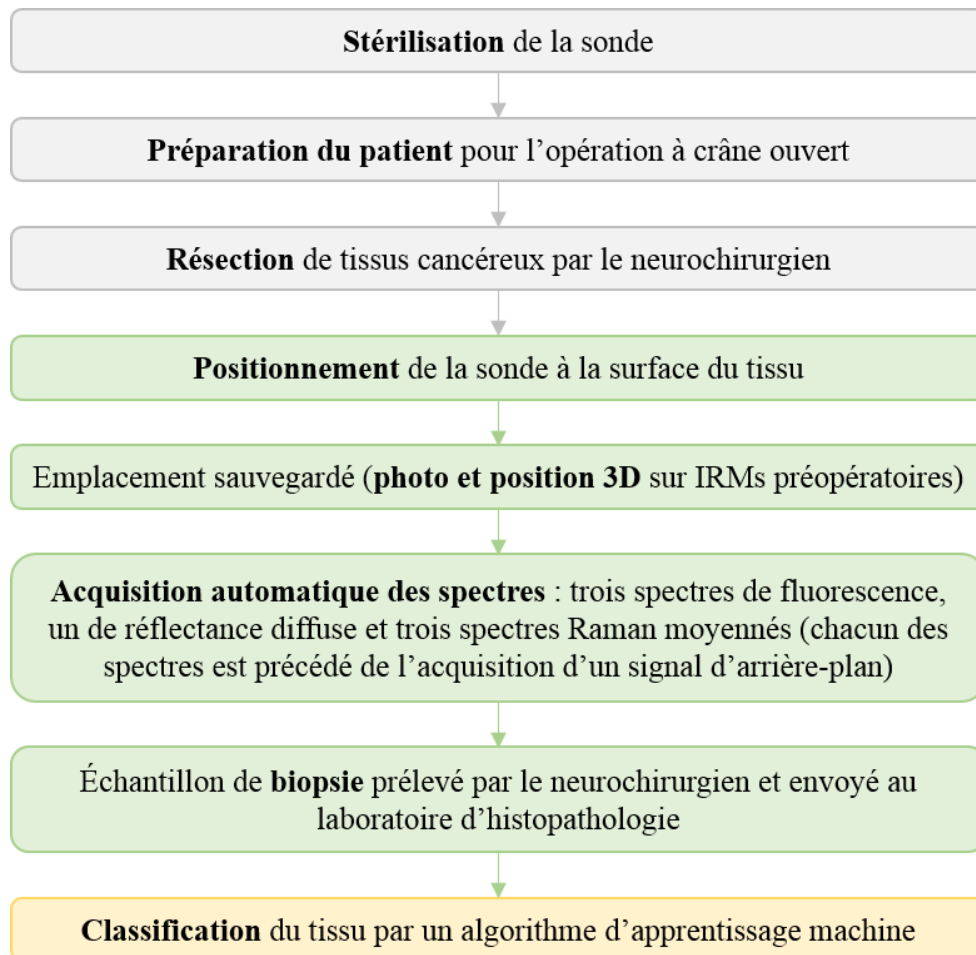
Figure 4.1 : Installation du système en salle d'opération durant la chirurgie. Le chariot est en retrait de la zone stérile, tandis que la sonde y est placée afin d'être manipulée aisément par le chirurgien. L'écran situé au fond sur l'image permet de localiser le bout de la sonde (où est faite l'acquisition) avec les images RM préopératoires et la neuronavigation.

### 4.2.2 Acquisitions

Le programme *LabView* est lancé et les paramètres d'acquisition sont spécifiés. Par exemple, il faut attendre (environ 5 minutes) que la CCD soit refroidie à  $-80^{\circ}\text{C}$ , afin de réduire le courant d'obscurité et ainsi améliorer les performances de détection de la caméra. Pendant ce temps, la sonde est connectée aux spectromètres et aux sources d'excitation. Le neurochirurgien procède alors à l'attachement du système *SureTrack* de la compagnie *Medtronic* sur la sonde, afin de permettre la localisation tridimensionnelle durant l'opération à l'aide de la neuronavigation.

Lorsqu'un tissu est interrogé avec la sonde, le neurochirurgien positionne cette dernière à la surface du tissu et cette position est recalée avec les images RM préopératoires, comme le

montre la croix rouge sur l'écran (désignée pas une flèche) à la Figure 4.1. Ensuite, la lampe blanche du microscope chirurgical est éteinte et l'orientation de la source IR du système *Medtronic* est modifiée afin de ne pas pointer dans la direction de la cavité chirurgicale (dans la salle d'opération, les lumières sont éteintes, hormis les lampes chirurgicales). L'acquisition des spectres se fait de manière automatique. Pour chacun des spectres, le signal d'arrière-plan est soustrait. Ensuite, avec la lumière du microscope allumée de nouveau, le neurochirurgien prend un échantillon de biopsie à l'endroit marqué par la pression de la sonde sur le tissu. Cet échantillon est envoyé au laboratoire d'histopathologie pour analyse (avec colorant H&E), afin de servir de référence quant à la composition du tissu imagé dans les algorithmes de classification (les résultats sont disponibles après quelques jours). Le système est alors prêt à prendre d'autres mesures. Dans le cadre de ce projet, le but est de faire l'acquisition de plusieurs types de tissu différents, afin d'obtenir une banque de données variées pour les tissus sains, les tissus cancéreux (multiples grades) et les infiltrations cancéreuses. Les étapes sont résumées ci-dessous :



## 4.3 Étude des algorithmes de classification

Une fois en main les fichiers contenant tous les spectres et la véritable nature des échantillons de biopsie (obtenue ultérieurement par analyse histopathologique), il est possible de classifier les spectres à l'aide des méthodes par apprentissage machine. En effet, le verdict en pathologie constitue le verdict absolu, la mesure de référence. Toutes les analyses sont effectuées avec le logiciel MATLAB.

### 4.3.1 Spectroscopie Raman seule

Pour la spectroscopie Raman, un seul spectre est utilisé par région d'intérêt correspondant à la moyenne de trois spectres acquis de manière séquentielle. Le signal d'arrière-plan est soustrait de chaque spectre, puis la fluorescence intrinsèque est retirée en effectuant une régression polynomiale. La région d'intérêt du spectre final se limite à 690 points par spectre. Pour la classification, plusieurs algorithmes ont été testés et la méthode *Boosted Trees* est retenue, puisqu'elle possède la meilleure performance globale (voir la section 1.4 pour la description de la méthode). La classification est effectuée à l'aide de l'approche par validation croisée, c'est-à-dire que chaque spectre est à son tour considéré comme étant le spectre de tissu à classifier; tous les autres spectres font alors partie de l'ensemble de données d'entraînement. L'utilisation de huit arbres de décision a été jugée optimale, permettant ainsi d'éviter de sur-ajuster les données (la classification prend alors en compte le bruit ou des erreurs aléatoires au lieu du vrai signal), tout en conservant une complexité suffisante propre à la classification.

Après avoir acquis 161 spectres Raman chez 17 patients, la plupart atteint de gliomes de grades 2 à 4, une étude préliminaire est effectuée [71]. En utilisant la classification *Boosted Trees*, les tissus de cancer dense et d'infiltrations rares de cellules cancéreuses sont fidèlement discriminés par rapport aux tissus sains avec une exactitude de 92 %, une sensibilité de 93 % et une spécificité de 91 %, avec une aire sous la courbe ROC de 0,96. À des fins de comparaison, l'exactitude du neurochirurgien, lorsqu'il utilise les techniques usuelles (microscope chirurgical et guidage IRM), est de 73 % avec les mêmes échantillons (sensibilité de 67 % et spécificité de 86 %). Cette étude, à laquelle j'ai contribué, est distincte de l'étude finale présentée dans le cadre de ce mémoire (section 4.4), cette dernière impliquant 12 patients différents et ne se limitant pas à la spectroscopie Raman comme unique source de contraste optique.

### 4.3.2 Système multimodal : échantillons biologiques *ex vivo*

Avec le système multimodal, quatre spectres s'ajoutent au spectre Raman pour chaque acquisition : trois spectres de fluorescence (excitation à 365, 405 et 455 nm) et un de réflectance diffuse. Dans le but de jumeler ces cinq spectres, une première approche consiste à les concaténer pour créer un seul signal à utiliser dans la classification (voir la Figure 4.2, qui exclut cependant la réflectance diffuse). Pour tester le système multimodal après sa fabrication, une première expérience est effectuée avec différents types de tissus biologiques. Cinq types de tissus sont évalués : un cerveau de veau (matière blanche et matière grise, comme le montre la Figure 4.2), ainsi que de la chair de poulet, de dinde et de bœuf. Le cerveau de veau est choisi à cause de sa ressemblance avec le cerveau humain et la facilité de distinguer visuellement matière blanche et matière grise. Les autres types de tissus sont quant à eux utilisés afin de faire varier la nature du contraste de spectroscopie vibrationnelle donné en entrée aux algorithmes de classification.

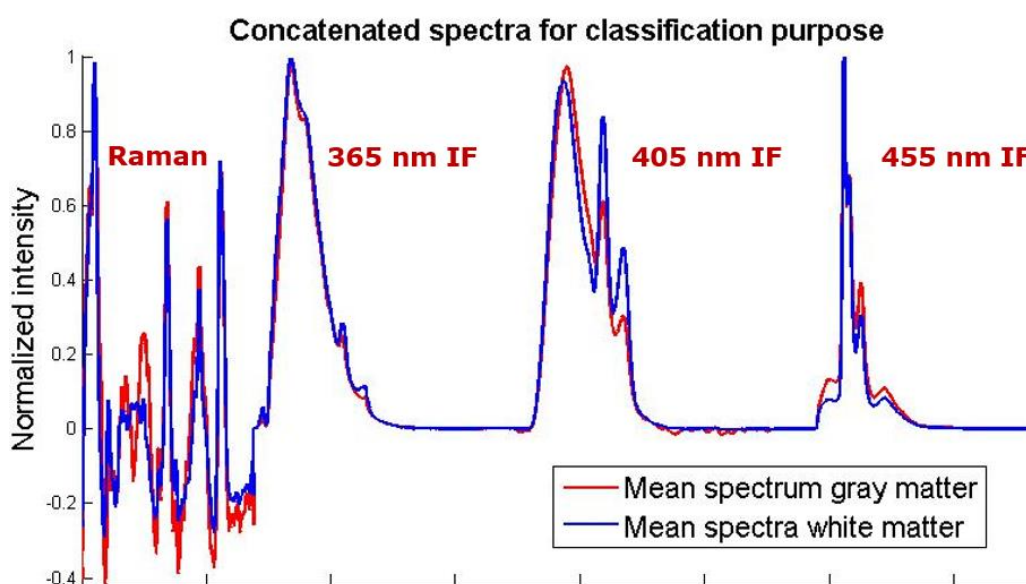


Figure 4.2 : Les spectres bruts normalisés sont concaténés à des fins de classification. Quelques différences sont décelables par simple inspection, mais la classification permet une évaluation robuste des variations fines entre les différents types de tissus biologiques.

Différents algorithmes (PCA+SVM, PCA+KNN, *Boosted Trees* (BT), *Random Forest* (RF) et *bootstrap aggregating*, aussi appelé *bagging* (BAG)) sont testés avec différentes combinaisons de spectres concaténés (provenant de divers types de spectroscopie). Les résultats



sont présentés au Tableau 4.2 en termes d'exactitude, d'abord pour la différenciation entre matière blanche (25 points d'acquisition) et matière grise (26 points d'acquisition) du cerveau de veau, puis pour les cinq types de tissus combinés (129 points d'acquisition au total). On remarque une amélioration de la classification lorsque tous les signaux sont concaténés par rapport à la spectroscopie Raman seule (92 % vs 84 % et 94 % vs 89 %), ce qui laisse croire que le système multimodal améliorerait la classification de tissus biologiques. Il reste cependant à vérifier cette hypothèse sur des tissus cérébraux de cas cliniques pour lesquels la nature du contraste attendu est différente.

Tableau 4.2 : Résultats de classification pour divers tissus biologiques *ex vivo*

Spectres concaténés	Matière blanche vs matière grise		5 types de tissus biologiques	
	Exactitude (%)	Meilleure méthode	Exactitude (%)	Meilleure méthode
Raman (R)	84,3	BT et RF	89,1	BAG
IFS @ 405 nm	92,2	KNN, BT et BAG	84,5	PCA+KNN
IFS @ 455 nm	96,1	SVM	79,1	PCA+KNN et BAG
IFS @ 365 nm	96,1	SVM	83,7	BAG
DRS	96,1	KNN	75,2	RF
R + IFS + DRS	92,0	BT	93,8	BAG

### 4.3.3 Système multimodal : classification des tissus humains *ex vivo*

Étant donné que les cas cliniques *in vivo* pertinents sont relativement peu fréquents (un cas par semaine en moyenne), il est envisagé pour la prise de mesures d'utiliser des échantillons de biopsie *ex vivo* qui sont conservés à l'Institut et hôpital neurologiques de Montréal.

D'ordinaire, ces échantillons sont conservés dans la paraffine. Toutefois, celle-ci est trop épaisse pour permettre la prise de signaux lorsque l'échantillon est encore emprisonné dans le bloc de cire. De plus, la paraffine pénètre dans le tissu, ce qui fausse les signaux Raman obtenus. Il faut alors éliminer cette paraffine par un processus qui nécessite de baigner l'échantillon dans du xylène à plusieurs reprises pendant un laps de temps de quelques jours, puis ensuite de l'immerger dans de l'éthanol afin d'enlever le xylène. Comme on peut le remarquer sur la Figure 4.3, les courbes des signaux Raman typiques (échantillon 1 en bleu et échantillon 2 en noir) sont parasitées par les divers composants associés à la préservation du tissu (par exemple, les pics vers

800, 1000 et 1400  $\text{cm}^{-1}$ , surtout associés à l'éthanol). Il est donc impossible d'utiliser ces échantillons de biopsies pour une étude de classification avec le système, ce qui est confirmé par plusieurs études qui suggèrent d'autres méthodes [80], [81] et [82].

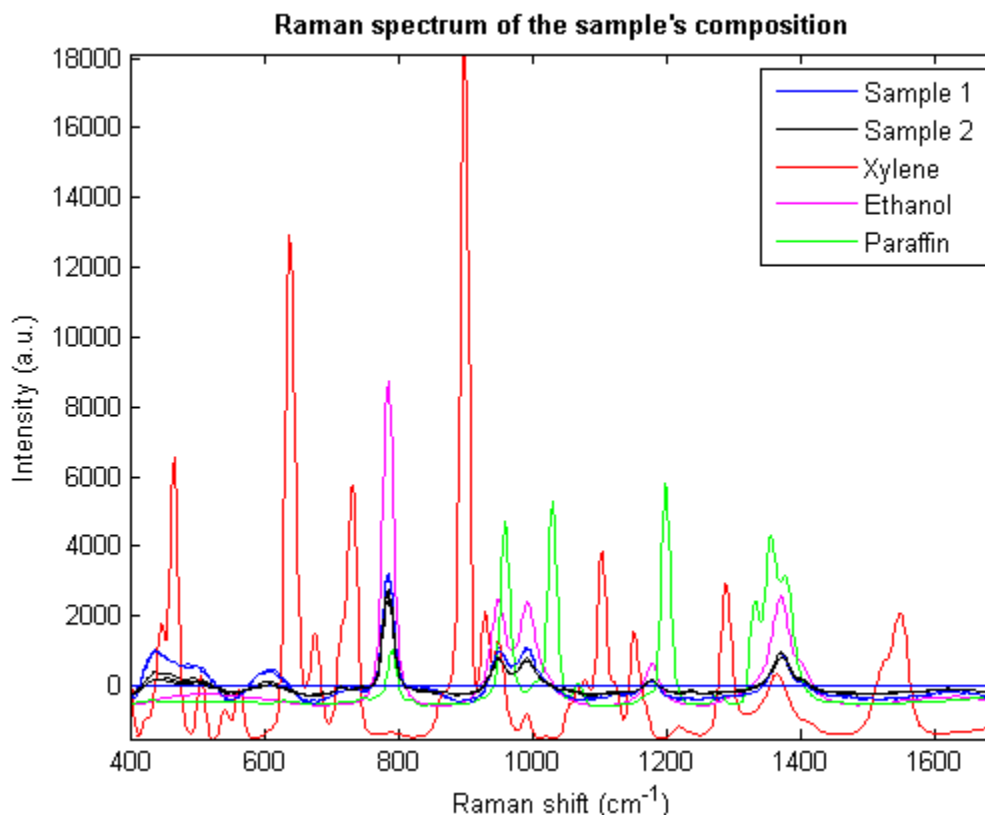


Figure 4.3 : Graphique représentant les divers composants de l'échantillon de biopsie ex vivo préservé à l'hôpital.

Par exemple, l'option suivante qui est envisagée est d'utiliser des échantillons congelés dans l'azote liquide. Ceci est une technique de conservation parfois utilisée dans les études Raman, et les spectres obtenus ne semblent pas présenter de pics alarmants pouvant laisser croire à une contamination quelconque (voir la Figure 4.4). Toutefois, la disponibilité d'échantillons ainsi conservés est minime à l'hôpital neurologique, surtout pour les tissus sains. De plus, l'histopathologiste mentionne le fait que les tissus congelés ne sont pas tous préalablement analysés et qu'il est impossible d'en faire une analyse complète après congélation. Enfin, il y a réticence de la part du neurochirurgien à utiliser des tissus congelés : les cellules, sans aucune forme de protection préalable, sont lysées lorsque congelées, ce qui entraîne une fragmentation

des protéines, du noyau et de l'ADN. C'est pourquoi il est jugé préférable d'abandonner cette option et de se concentrer sur les cas *in vivo*, qui sont de toute manière plus appropriés dans la poursuite de ce projet.

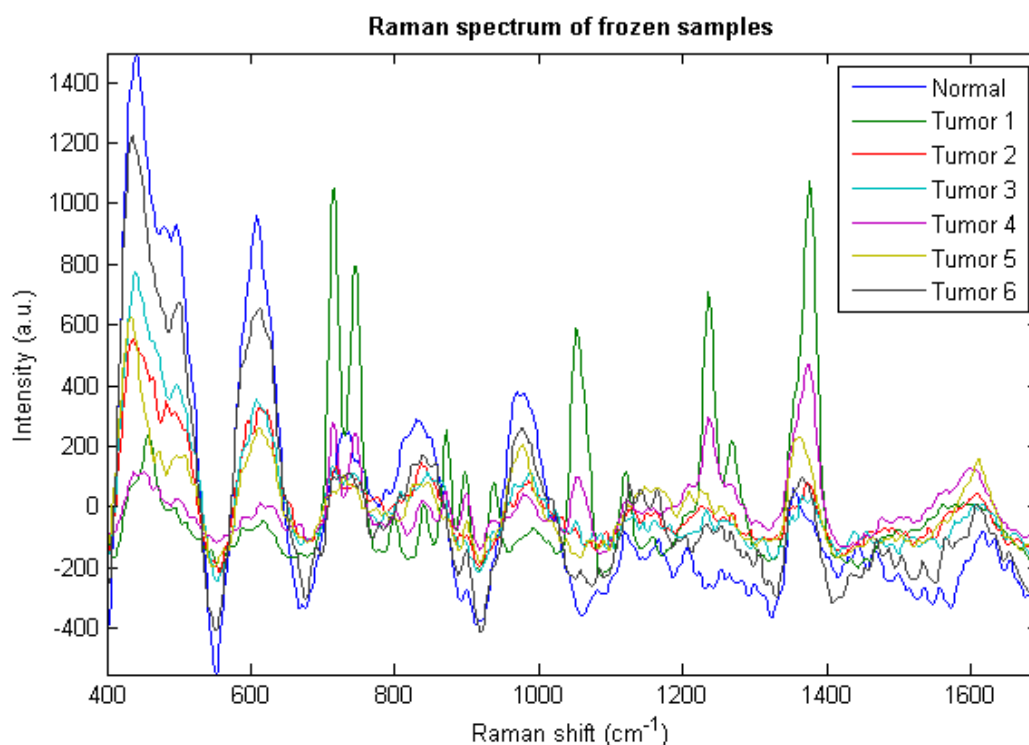


Figure 4.4 : Spectres Raman d'échantillons de biopsie préalablement congelés par azote liquide.

#### 4.3.4 Système multimodal : étude de classification préliminaire de tissus *in vivo* durant les premiers cas chirurgicaux

Afin de parvenir à établir une preuve de concept avant la poursuite d'une étude à plus grande échelle, le système multimodal est testé chez des patients subissant une chirurgie à crâne ouvert et ce, avant l'obtention de la version finale de la sonde optique (avec la gaine métallique, la lentille convergente non-trouée et des filtres différents, présentée à la section 3.2.4). Par conséquent, les résultats présentés ici ne pourront pas être jumelés aux résultats plus récents qui utilisent le dernier prototype de la sonde. Ils ne sont présentés ici que pour démontrer la validité du système multimodal en salle d'opération.

Un cas de méningiome (10 acquisitions de tumeurs et 3 de tissus normaux) et un de glioblastome (6 acquisitions de tumeurs franches, 2 de tissus infiltrés et 4 de tissus normaux) sont combinés dans une étude préliminaire. Les cinq spectres sont concaténés, pour un total de 18 spectres concaténés pour les tissus tumoraux et 7 pour les tissus normaux. Bien que ce ne soit pas suffisant pour obtenir des résultats statistiquement significatifs, ces spectres sont traités par les algorithmes de classification présentés précédemment, soit PCA+KNN, PCA+SVM, *Random Forest*, *Boosted Trees* et *bagging*. De plus, un diagramme PCA simple (avec 3 composants, voir la Figure 4.5) laisse croire à une séparation claire des classes que l'on souhaite séparer avec les algorithmes de classification. En testant chacun des algorithmes de classification, les meilleurs résultats sont obtenus avec la méthode *bootstrap aggregating* (ou *bagging*), avec une exactitude, une spécificité et une sensibilité de 92 %, 86 % et 94 % respectivement pour le système multimodal, contre 88 %, 75 % et 94 % respectivement pour la spectroscopie Raman seule. Ainsi, ces résultats laissent croire que le système multimodal serait plus performant lorsque comparé à la spectroscopie Raman seule (exactitude + 4 %, spécificité + 11 % et sensibilité équivalente) afin de détecter les tissus tumoraux et infiltrés.

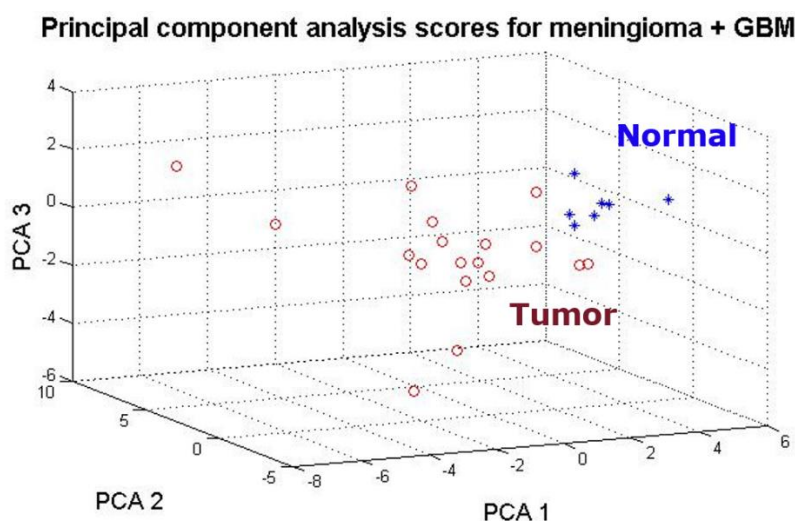


Figure 4.5 : Discrimination visible de deux classes de tissus, normaux (croix bleues) et cancéreux (cercles rouges), pour les analyses préliminaires des cas humains *in vivo*. Cette démarcation visible suggère que les deux types de tissus pourront être classifiés adéquatement avec des méthodes statistiques.

## 4.4 Analyse des cas humains

Avec la sonde finale présentée à la section 3.2.4, une étude clinique sur 12 patients est amorcée, pour laquelle des données spectroscopiques *in vivo* sont acquises en salle opératoire.

### 4.4.1 Base de données finale

Les patients sont recrutés selon leur type de cancer. Comme il est mentionné précédemment, les gliomes de grades 2 à 4 sont préférentiellement sélectionnés pour cette étude. Cependant, des cas de méningiomes ou de carcinomes métastatiques sont aussi considérés afin d'obtenir des données de tissus normaux dans la portion saine du cerveau, ce qui est nécessaire pour l'entraînement des algorithmes de classification. C'est la nature très localisée de ces types de tumeurs (contrairement aux gliomes qui sont de nature invasive) qui permet la collecte de mesures à des endroits du cerveau dans lesquels il n'y a aucune cellule cancéreuse. Douze cas (5 femmes et 7 hommes, dont l'âge moyen est de 51 ans) sont analysés avec le système multimodal (voir le Tableau 4.3).

Tableau 4.3 : Répartition des cas humains étudiés selon leur type de cancer

Types			<i>N</i> patients	<i>n</i> acquisitions	<i>Nb normal / tumeur (inf.)</i>
<b>Grade WHO</b>	<b>Grade 2</b>	Oligodendrogliome	<b>1</b>	<b>14</b>	<b>1 / 13 (2)</b>
	<b>Grade 3</b>		<b>3</b>	<b>44</b>	<b>8 / 17 (4)</b>
		Oligodendrogliome	1	8	8 / 0 (0)
		Astrocytome anaplasique	2	36	0 / 36 (4)
	<b>Grade 4</b>	Glioblastome	<b>3</b>	<b>22</b>	<b>2 / 20 (13)</b>
<b>Autres</b>			<b>5</b>	<b>62</b>	<b>60 / 2 (1)</b>
		Carcinome métastatique	2	25	23 / 2 (1)
		Adénocarcinome métastatique	1	12	12 / 0 (0)
		Méningiome	1	10	10 / 0 (0)
		Aucune tumeur identifiée	1	15	15 / 0 (0)
<b>TOTAL</b>			<b><i>N</i> = 12</b>	<b><i>n</i> = 142</b>	<b>71 / 71 (20)</b>

Ainsi, pour l'étude de classification avec le système optimisé, il y a 142 acquisitions, soit 142 séries de cinq spectres (fluorescence, réflectance et Raman). Il est à noter que les cas de tumeurs (grades 2 à 4) comportent quelques acquisitions de tissus normaux. Ainsi, sur ce total de 142 acquisitions, 71 proviennent d'une région de tissu normal et 71 de régions de tissus

cancéreux (20 tissus infiltrés, désignés inf. dans le tableau, et 51 tissus cancéreux francs). Les tissus infiltrés sont définis comme ayant 90 % ou moins de cellules cancéreuses dans l'échantillon coloré H&E (ratio du nombre de cellules tumorales sur le nombre total de cellules présentes sur la surface de l'échantillon analysé). Ces données diagnostiques sont obtenues suite à une analyse histopathologique standard effectuée par notre collègue, la Dre Marie-Christine Guiot, neuropathologiste. Le nombre exact de cellules cancéreuses par section peut être obtenu ultérieurement afin de quantifier l'infiltration, mais cela ne fait pas partie de l'analyse standard : ici, infiltration correspond à une population visible très faible de cellules cancéreuses.

#### 4.4.2 Aspect des spectres finaux

En salle d'opération, la méthodologie présentée à la section 4.2 est suivie. Par conséquent, pour chaque point d'acquisition, la position 3D de la sonde est enregistrée et un échantillon de biopsie est obtenu. Une fois en main le résultat de l'analyse pathologique, une valeur de référence est attribuée au tissu interrogé en vue de la classification (1 = tissu normal, 2 = tissu cancéreux franc et 3 = tissu infiltré, bien que les classes 2 et 3 soient combinées dans le cadre de cette étude). Ces classes sont illustrées avec un exemple d'analyse pathologique à la Figure 4.6.

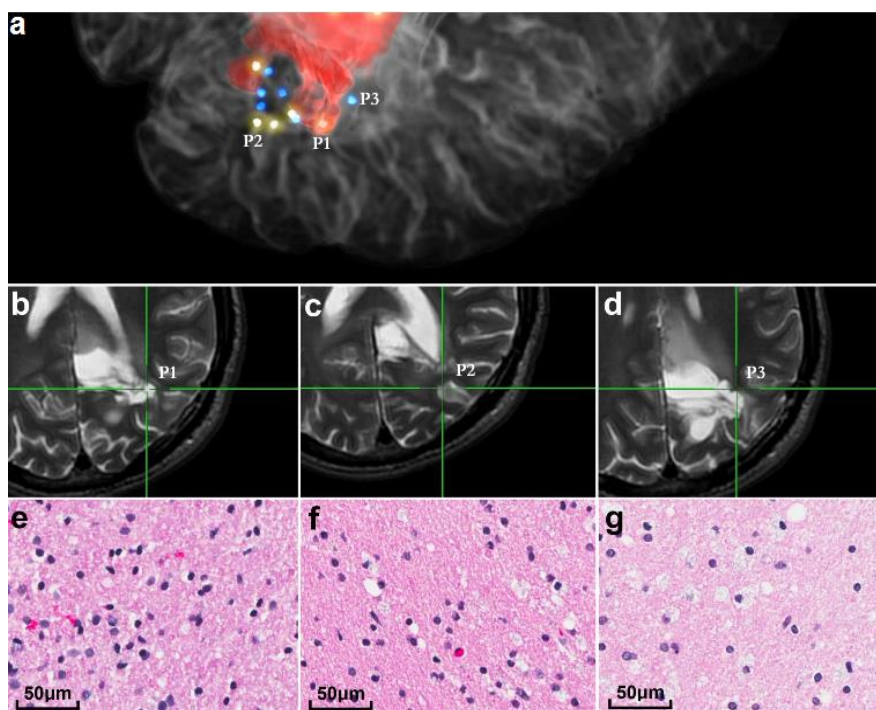


Figure 4.6 : Tissus cérébraux classés selon l'analyse pathologique. **a.** Rendu tridimensionnel d'une IRM T2 et d'un astrocytome de grade 2 (rouge). Les points correspondent aux positions

d'acquisition de la sonde. **b. c. d.** Position de l'acquisition sur les IRMs telle qu'enregistrée avec le système *Medtronic* pour des tissus correspondant respectivement à une tumeur dense, à une infiltration peu dense de cancer et à une zone saine. **e. f. g.** Image pathologique (colorant H&E) du tissu prélevé aux positions P1, P2 et P3 respectivement. L'attribution à une classe de tissu cancéreux ou de tissu infiltré dépend du pourcentage de cellules cancéreuses présent dans l'échantillon, tel qu'évalué par la pathologiste. Image extraite de [71].

Le spectre moyen associé à chacune de ces classes est calculé à des fins de visualisations (Figure 4.7) pour les 12 cas étudiés, de même que pour chacune des méthodes de spectroscopie. Des différences sont déjà visibles entre les spectres moyens, par exemple pour ce qui est de l'intensité des spectres normaux beaucoup plus élevée en fluorescence et en réflectance diffuse, lorsqu'elle est comparée à celle des spectres cancéreux. Ces différences seront revues selon les méthodes de normalisation à la section 4.4.4.

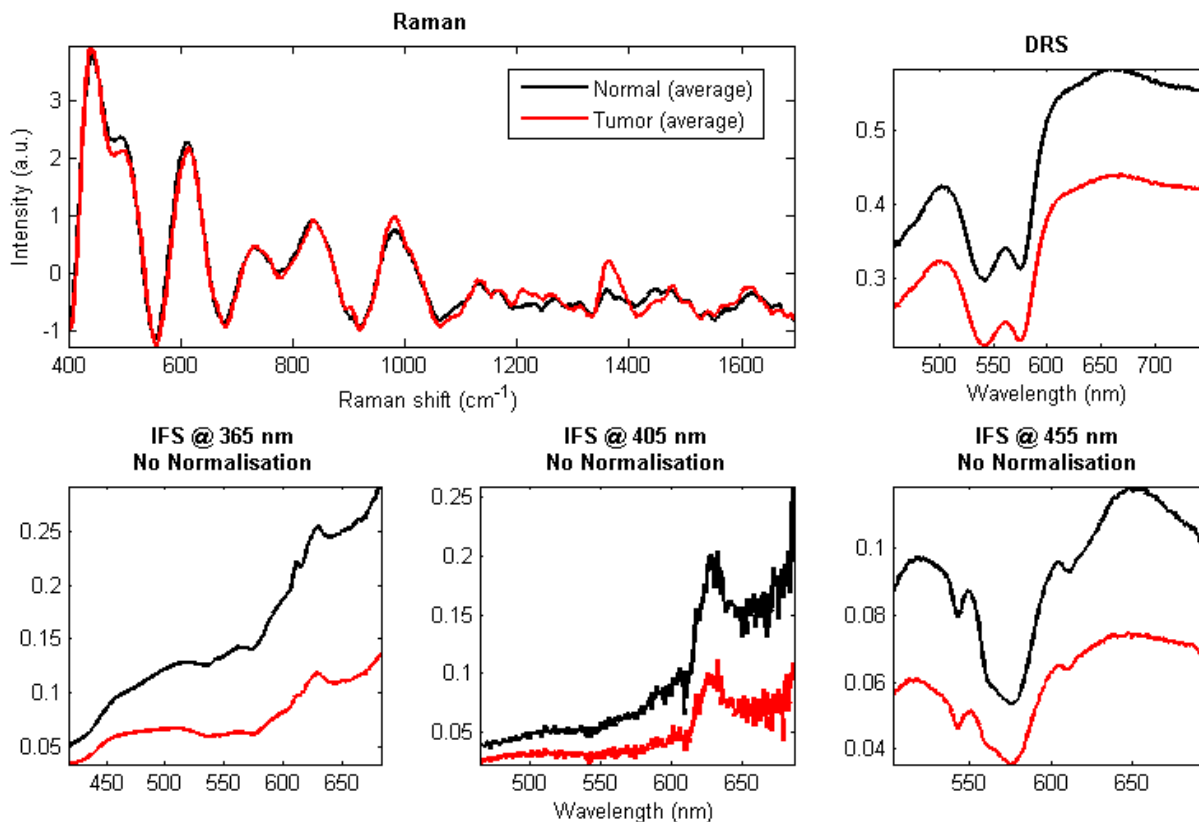


Figure 4.7 : Représentation moyennée des spectres calibrés (mais non normalisés) de tissus sains en noir (*normal*) et cancéreux en rouge (*tumor*) pour les différentes modalités utilisées.

### 4.4.3 Méthode de classification améliorée

Bien que des résultats préliminaires satisfaisants soient obtenus à la section 4.3, une méthode est développée, permettant d'améliorer la classification en combinant des classificateurs [83], [84]. Chaque type de spectroscopie (soit cinq au total) produit un spectre pour chaque point d'acquisition. Au lieu d'être concaténés, ces spectres sont utilisés individuellement dans une étude de classification isolée. Les résultats respectifs sont ensuite soumis à une autre ronde de classification, dans le but d'obtenir un seul résultat final tenant compte des différents spectres.

En effet, en concaténant les spectres, des artefacts peuvent se créer à la liaison entre les différents spectres et ainsi engendrer des pics non représentatifs. En outre, les algorithmes utilisent des généralisations, par exemple en séparant le signal étudié en quatre portions. Cette généralisation est de beaucoup plus efficace et logique si elle est faite pour chacun des spectres individuellement. Sinon, il risque d'y avoir des portions qui ne seront pas représentatives des spectres (par exemple : jonctions entre deux modalités ou coupe d'un pic important en deux). De plus, les paramètres tels que le nombre de composants à étudier ou le choix des embranchements (arbres de décisions, *trees*) ne sont possiblement pas les mêmes pour chacune des modalités. Ainsi, avec la méthode qui combine les classificateurs, il est possible de tirer parti de chacune des méthodes de spectroscopie individuellement, avec moins de risque d'erreur puisque le résultat final dépend des meilleures classifications. En bref, le but est de classifier adéquatement de manière globale en se basant sur les résultats des sous-classificateurs (voir la Figure 4.8 comme exemple). Les méthodes  $C[1:5]$  et  $Cf$  peuvent varier ou non entre elles. Les mêmes algorithmes sont encore testés à tour de rôle afin de trouver celui qui produit la meilleure exactitude de classification. Enfin, les méthodes de normalisation ( $M$ ) des spectres de fluorescence, discutées à la section 3.5.1, sont aussi testées ici en les variant et en observant l'effet obtenu sur les résultats de classification. Ces résultats sont présentés à la section suivante.



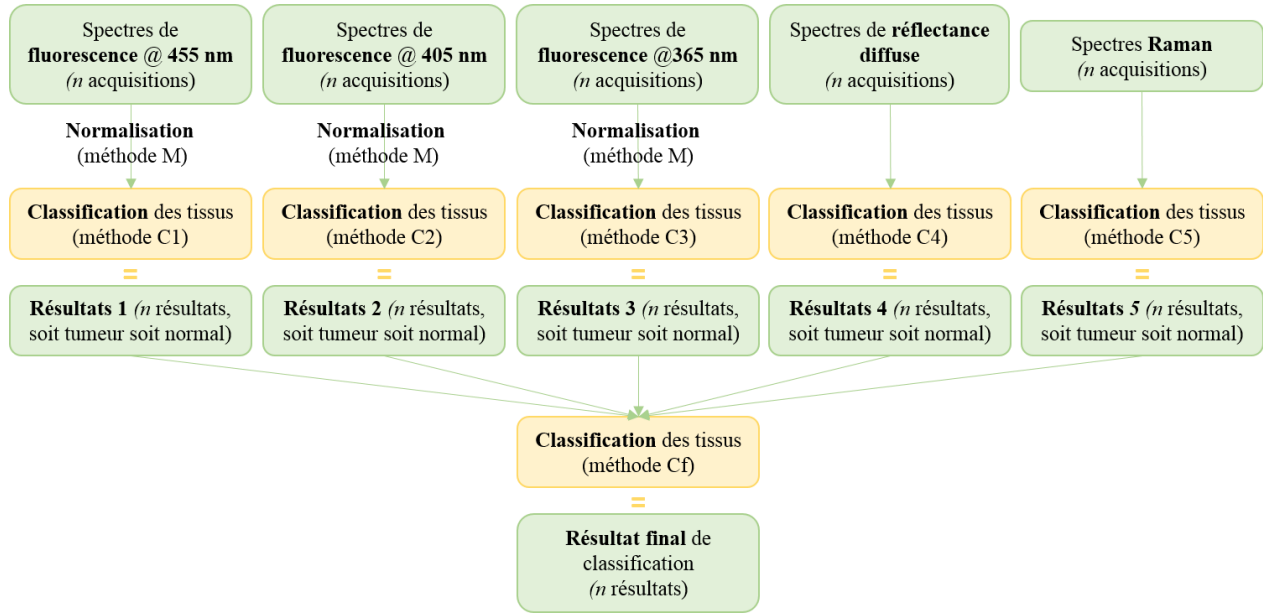


Figure 4.8 : Schématisation de la classification multiple utilisée.

#### 4.4.4 Résultats de l'étude de classification finale

En utilisant la totalité de ces spectres pour une étude de classification multiple, il est possible de comparer les résultats obtenus pour chacune des méthodes de normalisation présentées précédemment (seulement appliquées aux spectres de fluorescence) :

$\Phi_X^{Ref}$  = division des spectres de fluorescence par la moyenne d'intensité des spectres de réflectance, seulement pour les longueurs d'onde d'excitation (**normalisation # 1**);

$\Phi_M^{Ref}$  = division des spectres de fluorescence par la moyenne d'intensité des spectres de réflectance (toutes longueurs d'onde) (**normalisation # 2**);

$R(\lambda)$  = division point par point des spectres de fluorescence par les spectres de réflectance correspondants (**normalisation # 3**).

Afin de procéder à une classification détaillée telle que présentée à la Figure 4.8, la méthode de normalisation optimale doit être déterminée. Pour la trouver, les aires sous la courbe (AUCs) sont d'abord étudiées pour les spectres de fluorescence (voir l'annexe E pour les distributions, et aussi pour la représentation des spectres moyens pour chaque méthode de normalisation). L'hypothèse nulle selon laquelle les AUCs provenant des classes 1 (tissu normal) et 2 (tissu cancéreux) possèdent la même valeur moyenne est testée avec le test T de Student. L'hypothèse nulle est rejetée pour chacune des modalités (autofluorescence aux trois longueurs

d'ondes et réflectance diffuse) à 5 % de confiance. De plus, toutes les *p-values* trouvées sont telles que  $p < 0,00001$ . Cette constatation n'est pas utile dans le cadre de la sélection de la meilleure méthode de normalisation (toutes les méthodes ayant une valeur très faible de *p*), mais cela permet de percevoir une différence notable quant à l'intensité des spectres de fluorescence et réflectance. La différence observée nous permet d'établir que les différents spectres peuvent potentiellement être utilisés afin de discriminer entre les tissus sains et les tissus cancéreux. Maintenant, en étudiant de manière qualitative les spectres moyens présentés à l'annexe E (avec et sans normalisation), diverses caractéristiques sont visibles entre chacune des méthodes de normalisation. Par exemple, la méthode de normalisation # 3 semble préférable pour les spectres de fluorescence à 455 nm puisqu'elle permet de corriger le creux d'absorption visible autour de 560 nm : cette absorption, attribuable à l'hémoglobine, est aussi visible sur le spectre de réflectance. Par contre, pour les autres longueurs d'onde, cela ne semble pas bénéfique puisque la normalisation # 3 corrige trop pour ce creux, créant ainsi des pics non désirables pour l'étude. Enfin, la normalisation # 2 semble préférable à la # 1 puisque les différences entre les classes 1 et 2 (tissu normal et tumeur) ressortent davantage. Ceci est aussi visible sur les diagrammes boîte à moustache, où l'écart s'agrandit entre les valeurs médianes des groupes et où il y a d'ailleurs moins de données aberrantes.

Donc, ni l'analyse statistique préliminaire (test T de Student), ni une analyse davantage qualitative ne nous permet de choisir une méthode de normalisation. Afin de la trouver de manière quantitative, la classification statistique est testée pour chacune des longueurs d'ondes d'excitation pour la fluorescence et chacune de méthodes de normalisation (voir l'annexe F). Pour chaque longueur d'onde d'excitation, le maximum d'exactitude obtenu est le suivant lorsqu'aucune normalisation n'est utilisée : 80,3 % pour 365 nm, 74,6 % pour 405 nm et 72,5 % pour 455 nm. Pour la normalisation # 1, les exactitudes correspondent respectivement à - 0,7 %, - 2,8 % et - 9,1 % des maxima précédents, ce qui donne une moyenne de - 4,2 %. Pour la normalisation # 2, les exactitudes correspondent respectivement à - 4,2 %, - 5,6 % et - 2,1 % des maxima, pour une moyenne de - 3,9 %. Finalement, pour la normalisation # 3, les exactitudes de chaque source correspondent à - 15,5 %, - 4,2 % et - 2,1 % des maxima, ce qui fait une moyenne de - 7,2 %. À la lumière de ces résultats, la méthode de normalisation # 2 semble donc légèrement supérieure à la méthode # 1 et de loin supérieure à la méthode # 3. Ne pas normaliser les spectres de fluorescence reste toutefois une meilleure option. Ceci mène à conclure que la

normalisation des spectres de fluorescence n'est pas utile lorsque les spectres sont utilisés dans un algorithme par apprentissage machine pour la classification. Les résultats finaux pour la classification combinant toutes les modalités, sans normalisation des spectres de fluorescence, seront comparés plus loin dans cette section à ceux obtenus avec la méthode de normalisation optimale, soit la # 2 ( $\Phi_M^{Ref}$ ).

Maintenant qu'il a été déterminé que la normalisation des spectres de fluorescence ne sera pas utilisée pour la classification, l'étape suivante est d'utiliser chacun des cinq spectres (fluorescence, réflectance et Raman) dans l'étude statistique. Les résultats 1, 2, 3, 4, 5 et finaux (provenant de chaque étape de classification avec les différentes modalités) sont notés, et ce pour toutes les méthodes de normalisation. Ces résultats sont rapportés à l'annexe G, d'abord en utilisant les mêmes classificateurs  $C1 = C2 = C3 = C4 = C5 = Cf$ , puis en prenant le meilleur algorithme de classification pour chaque source (donc  $C1$ ,  $C2$ ,  $C3$ ,  $C4$ ,  $C5$  et  $Cf$  ne sont pas nécessairement identiques). Les pourcentages d'exactitude supérieurs à 90 % sont colorés en vert. L'exactitude, la sensibilité et la spécificité les plus élevées sont obtenues sans normalisation ainsi qu'avec un même algorithme de classification utilisé pour chaque modalité, *Random Forests* (voir le Tableau 4.4).

Tableau 4.4 : Exactitude de la classification multiple finale sans normalisation

	Boosted trees			Random Forests			Bagging		
	Exa. (%)	Sens. (%)	Spec. (%)	Exa. (%)	Sens. (%)	Spec. (%)	Exa. (%)	Sens. (%)	Spec. (%)
365 nm	80,3	84,5	76,1	78,9	80,3	77,5	79,6	78,9	80,3
405 nm	74,6	76,1	73,2	68,3	73,2	63,4	67,6	70,4	64,8
455 nm	72,5	70,4	74,6	69,7	70,4	69,0	67,6	71,8	63,4
Refl.	46,5	38,0	54,9	62,0	60,6	63,4	59,2	57,7	60,6
Raman	81,7	83,1	80,3	87,3	83,1	91,5	80,3	80,3	80,3
<b>IFS + DRS + R</b>	81,7	78,9	84,5	90,8	90,1	91,5	82,4	83,1	81,7
<b>IFS + R</b>	87,3	83,1	91,5	94,4	94,4	94,4	87,3	87,3	87,3
<b>DRS + R</b>	85,9	84,5	87,3	92,3	88,7	95,8	86,6	87,3	85,9
<b>IFS + DRS</b>	83,8	84,5	83,1	83,8	76,1	91,5	80,3	77,5	83,1

Comme il est possible de remarquer au Tableau 4.4, la combinaison des spectres Raman avec les spectres de fluorescence intrinsèque (IFS + R) permet d'atteindre une exactitude maximale de 94,4 %, une sensibilité de 94,4 % et une spécificité de 94,4 %. Lorsque les spectres de réflectance diffuse sont utilisés avec Raman, cela offre aussi de bons résultats, quoique légèrement moindres (exactitude de 92,3 %, sensibilité de 88,7 % et spécificité de 95,8 %).

En utilisant l'algorithme le plus efficace pour chaque modalité (trouvé avec les résultats individuels), les résultats ne sont pas supérieurs (voir l'annexe G pour les détails). En effet, le choix optimal des algorithmes pour chaque modalité ne semble pas apporter d'amélioration notable aux résultats obtenus. Cela pourrait être dû au fait que, lorsque le même algorithme est utilisé pendant toute la classification (c.-à-d.  $C1 = C2 = C3 = C4 = C5 = Cf$ ), il y a une uniformité dans les paramètres utilisés dans chaque décision prise, ce qui renforce la logique de la classification.

Une dernière étape consiste à optimiser les paramètres utilisés pour la classification. Ceci est effectué avec les méthodes *Boosted Trees* et *bagging* puisqu'elles dépendent beaucoup du nombre d'arbres de décisions spécifié à l'entrée. Avec cette optimisation, les résultats de classification sont encore améliorés (voir le Tableau 4.5). Une exactitude de 98,6 %, une sensibilité de 100 % et une spécificité de 97,2 % (AUC de la courbe ROC de 0,97) sont obtenues lorsque les spectres Raman et de fluorescence sont combinés (IFS + R) avec la méthode de classification *Boosted Trees*. Il est à noter que cette optimisation augmente aussi l'exactitude de chaque modalité individuellement, avec + 5,6 % pour la source à 405 nm, + 2,1 % pour la source à 455 nm, + 27,5 % pour la réflectance et + 7,7 % pour Raman. L'ajout du spectre de réflectance à l'étude combinée (IFS + DRS + R) ne procure toutefois encore aucun avantage d'un point de vue statistique (AUC de la courbe ROC aussi de 0,97). Les aires sous la courbe ROC, qui sont représentatives de la performance des classifications, sont présentées à l'annexe H, où il est possible de confirmer la supériorité de la classification pour la combinaison de la fluorescence et de la spectroscopie Raman, qui a une AUC ROC égale à celle obtenue lorsque toutes les modalités sont combinées. Un test idéal sera en effet caractérisé par une courbe ROC passant par le point (0,1), alors qu'un test complètement aléatoire verra sa courbe passer par (0,5; 0,5).

En conclusion, l'exactitude de la classification pour les cas humains avec la méthode des classificateurs multiples est toujours supérieure à celle de chaque modalité prise

individuellement. En effet, la plus haute exactitude individuelle est associée à la spectroscopie Raman seule (89,4 % avec *Boosted Trees*), alors que 98,6 % de classification est obtenu en combinant les modalités. Les résultats finaux démontrent aussi que la normalisation n'est pas nécessaire lorsqu'il est question de classifier les différents groupes de tissus : les résultats obtenus sans normalisation des spectres de fluorescence sont effectivement supérieurs à ceux obtenus avec la normalisation # 2.

Tableau 4.5 : Résultats de classification avec l'algorithme *Boosted Trees* optimisé

	Sans normalisation				Normalisation # 2			
	Exac. (%)	Sens. (%)	Spec. (%)	AUC des courbes ROC	Exac. (%)	Sens. (%)	Spec. (%)	AUC des courbes ROC
365 nm	80,3	84,5	76,1	0,74	74,6	70,4	78,9	0,80
405 nm	80,3	77,5	83,1	0,79	72,5	69,0	76,1	0,53
455 nm	74,6	70,4	78,9	0,57	73,9	78,9	69,0	0,75
Refl.	73,9	59,2	88,7	0,67	73,9	59,2	88,7	0,67
Raman	89,4	97,2	81,7	0,92	89,4	97,2	81,7	0,92
<b>IFS + DRS + R</b>	<b>98,6</b>	100,0	97,2	0,97	<b>97,2</b>	98,6	95,8	0,96
<b>IFS + R</b>	<b>98,6</b>	100,0	97,2	0,97	<b>97,2</b>	98,6	95,8	0,97
<b>DRS + R</b>	<b>93,0</b>	97,2	88,7	0,86	<b>93,0</b>	97,2	88,7	0,86
<b>IFS + DRS</b>	<b>89,4</b>	83,1	95,8	0,96	<b>89,4</b>	87,3	91,5	0,93

## CHAPITRE 5 DISCUSSION GÉNÉRALE

Chaque section de chapitre a été discutée à la suite des résultats présentés à des fins de clarté. Dans ce chapitre, le projet de maîtrise est revisité dans son entièreté en termes d'atteinte des objectifs principaux, des limitations et des recommandations du projet.

### 5.1 Retour sur les objectifs

Le premier objectif de ce projet consistait à concevoir, fabriquer et caractériser un système optique multimodal versatile pouvant s'intégrer aux techniques présentement utilisées en neurochirurgie. Tout d'abord, tel que vu aux chapitres 2 et 3, le système Raman a été amené en salle d'opération après plusieurs ajustements et tests. L'ajout d'instruments permettant la spectroscopie par fluorescence et réflectance diffuse a ensuite mené à la création du système multimodal. Ce dernier a par la suite été caractérisé : la linéarité de la puissance et de l'intensité des sources d'excitation a été démontrée, en plus de la vérification de la qualité du signal reçu par la mesure du ratio signal-sur-bruit. La calibration des spectres de réflectance et de fluorescence par les spectres perçus sur un matériel de référence, le spectralon ou le miroir optique, s'est avérée optimale. Une fois tout cela réalisé, et après qu'un programme *Labview* ait été adapté pour contrôler automatiquement l'acquisition de tous les spectres de manière successive, le premier objectif est atteint. En effet, les trois modalités ont été jumelées et intégrées dans un système clinique, et la méthodologie présentée dans ce document permet une utilisation simple en salle d'opération et ne gêne pas le cours normal de l'opération, mis à part le temps d'exécution élevé (~12 secondes).

Le second objectif était de vérifier que la fluorescence et la réflectance diffuse, lorsque combinées à la spectroscopie Raman, augmentent l'exactitude de détection des tumeurs *in vivo*. Au chapitre 4, des cas de patients subissant une chirurgie à crâne ouvert ont été analysés avec le système multimodal et différentes méthodes de classification ont été testées. Le résultat final est que le système multimodal permet une classification juste des tissus dans 98,6 % des cas (sensibilité de 100 %; spécificité de 97,2 %; AUC ROC de 0,97) avec la méthode *Boosted Trees*, comparé à 89,4 % (97,2 %; 81,7 %; 0,92) pour la spectroscopie Raman seule et 83,1 % (84,3 %; 81,9 %) lorsque le neurochirurgien utilise les techniques usuelles. Bien que le système de spectroscopie Raman procure déjà en soit une amélioration notable de la détection des tissus

cancéreux bruts et infiltrés, le système multimodal pousse encore plus loin la limite de détection avec une exactitude, spécificité et sensibilité chacune supérieure à 97 %. Ainsi, puisqu'une exactitude de plus de 90 % sur la classification était considérée comme une réussite, cet objectif est atteint.

## 5.2 Retour sur les résultats et perspectives

Dans cette étude, la sensibilité est un gage de la capacité du système à détecter les cellules tumorales dans le tissu, alors que la spécificité témoigne de l'efficacité du système à ne détecter que des portions du cerveau atteintes du cancer et non des tissus sains. En neurochirurgie, il est primordial d'optimiser le volume de tumeur à retirer du cerveau, donc il faut miser sur une sensibilité très élevée. Par contre, il est aussi important de ne pas enlever des portions saines du cerveau, alors un compromis sur la spécificité n'est pas permis. Le système multimodal constitue en ce sens un atout majeur lorsque comparé à la spectroscopie Raman seule puisqu'une augmentation de la spécificité considérable est mesurée ici, en plus de l'amélioration de l'AUC ROC (0,97 au lieu de 0,92). De plus, des 71 tissus cancéreux imagés avec le système, 20 sont caractérisés par une faible infiltration de cellules cancéreuses. En considérant l'exactitude très élevée de la classification avec le système, il est donc possible d'affirmer que ce dernier est apte à détecter de faibles concentrations de cellules cancéreuses dans le tissu. Cette affirmation pourrait être confirmée par le compte des cellules cancéreuses dans chaque échantillon de biopsie prélevé durant l'étude.

L'utilisation du nouveau système multimodal en salle d'opération a en outre permis d'explorer de nouvelles avenues. Par exemple, au Tableau 4.2, en comparant les résultats de discrimination entre la matière blanche et la matière grise du cerveau de veau *ex vivo*, il est possible de noter une amélioration de la classification lorsque les spectres de fluorescence et réflectance sont utilisés, par rapport aux spectres Raman seuls. Ceci pourrait être expliqué par le fait que les matières grise et blanche ne sont pas différentes seulement au niveau de la composition du tissu, mais aussi au niveau physiologique ou par leur couleur. En effet, la nature du contraste étudié varie d'un type de spectroscopie à l'autre. Ainsi, l'ajout de spectres en fluorescence et/ou réflectance peut constituer un atout supplémentaire pour la spectroscopie Raman en détectant des différences qui ne sont pas notables autrement. Cela peut être utile pour détecter d'autres types de tissus qui n'ont pas été étudiés dans le présent document, par exemple

les nécroses. Dans le cas de la spectroscopie Raman, il est question de l'interaction intermoléculaire (telle que les liens chimiques) qui permet de détecter la composition du tissu interrogé en termes d'espèces moléculaires (par exemple : cholestérol, acides gras, protéines, acides nucléiques). Pour la spectroscopie par fluorescence, il s'agit de détecter l'effet sommatif des molécules autofluorescentes présentes dans le tissu, telles que le NADH ou le collagène. La réflectance diffuse dans le visible est sensible aux propriétés d'absorption et de diffusion des tissus. Ces paramètres reflètent les propriétés physiologiques et morphologiques sous-jacentes, telles que la présence des absorbeurs dominant dans le visible, soit l'hémoglobine oxy- et déoxygénée. De cette façon, bien qu'il semble que l'ajout des spectres de réflectance diffuse lors de l'analyse par classification combinée n'augmente pas les résultats statistiques, il pourrait y avoir d'autres avantages à conserver cette modalité dans le système. Par exemple, la normalisation #2, bien que présentant une exactitude, une sensibilité et une spécificité légèrement inférieures à celles constatées lorsqu'aucune normalisation n'est utilisée, ne présente pas une AUC ROC inférieure (0,97 dans les deux cas présentés au Tableau 4.5). Ainsi, la normalisation #2 pourrait permettre d'atteindre des résultats satisfaisants. Outre cela, la normalisation des spectres de fluorescence pourrait permettre de les analyser de manière quantitative, selon la méthode qui est présentée à la section 3.6. La réflectance diffuse dans le visible est aussi étudiée dans plusieurs applications, par exemple pour les cancers de la peau ou des voies orales.

La diffusion provient principalement des noyaux cellulaires et des organelles, mais aussi des fibres de collagène. Or, les tissus néoplasiques démontrent des changements physiologiques et morphologiques importants. Des études montrent que l'absorption augmente avec l'angiogenèse, alors que la diffusion diminue avec la progression du cancer puisque le réseau de collagène se dégrade [39]. La diffusion des couches épithéliales s'accroît avec l'augmentation de la taille du noyau cellulaire ou avec l'augmentation de la quantité d'ADN, ou encore avec une pigmentation exagérée. Grâce à cela, la réflectance diffuse seule présente un intérêt considérable en tant qu'outil sensible pour le diagnostic de cancer de la peau ou des voies orales. Il serait intéressant de voir les implications de ceci pour le cancer du cerveau. Par exemple, en n'étudiant que la réflectance diffuse dans le cerveau, une différence marquée est notée entre les tissus cancéreux ou normaux quant à l'intensité de leur spectre respectif, notamment dans les régions d'absorption maximale de l'hémoglobine (entre 450 et 580 nm et entre 610 et 680 nm) [6]. Avec



les mesures prises durant le projet, pour les mêmes patients dont il est question au chapitre 4, cette observation est confirmée. L'intensité moyennée entre 450 et 580 nm des spectres de tumeur est de 0,26 u.a., alors qu'elle est de 0,36 u.a. pour les spectres de tissu sain. Entre 610 et 680 nm, ces différences sont encore plus marquées avec 0,43 u.a. pour les tissus cancéreux et 0,57 u.a. pour les tissus sains. Des analyses plus approfondies pourraient être amorcées avec les spectres obtenus afin de retirer des informations sur les différences spécifiques entre les tumeurs invasives et les tissus sains, ou encore pour utiliser les paramètres d'intensité seulement (par exemple, AUC des spectres DRS et IFS) dans une analyse statistique.

Sur cette même note, la spectroscopie par fluorescence et par réflectance diffuse peut présenter plusieurs autres avantages. Par exemple, les spectres de réflectance diffuse ont été sommairement expliqués en les comparant avec les spectres d'absorption de l'hémoglobine oxygénée (HbO) et désoxygénée (Hb). Avec un code utilisant des estimations du volume sanguin, de la saturation de l'hémoglobine et du coefficient de diffusion réduit, un modèle de réflectance peut être utilisé avec les spectres obtenus par l'étude et des concentrations de Hb et HbO pourront en être tirées. De plus, les spectres de réflectance diffuse peuvent être utilisés avec un modèle de propagation de la lumière dans les tissus pour extraire le coefficient d'absorption et le coefficient de diffusion réduit. Ce modèle se base sur l'équation de diffusion et des simulations Monte Carlo. Ainsi, les concentrations d'autres absorbeurs tels que le bêta-carotène ou la mélanine peuvent alors être calculées de la même façon que pour l'oxy- ou déoxyhémoglobine en utilisant la loi de Beer-Lambert [39].

Il a été démontré que le système dans son état actuel pouvait aider au diagnostic des tissus cérébraux durant la chirurgie à crâne ouvert. Il a aussi été question de la versatilité du système multimodal. En plus de l'utilité des spectres de réflectance, différents fluorophores ont la possibilité d'être détectés avec le système. À la section 3.6, des dilutions et une étude avec des échantillons murins *ex vivo* imprégnés de PpIX ont permis de valider l'utilisation du système avec cette protoporphyrine. Des tests avec la fluorescéine ont aussi été effectués et, bien qu'ils n'aient pas été présentés ici par souci de concision, ce fluorophore peut aussi être détecté avec le présent système. Des algorithmes de quantification de fluorophores perfectionnés par le Laboratoire de radiologie optique de l'École polytechnique peuvent être utilisés dans le but de mesurer la concentration de fluorophore présent et ainsi mettre un chiffre sur l'état du cancer imagé.

### 5.3 Limitations et recommandations

Avec un temps d'intégration de 800 ms pour chaque acquisition de spectre et la durée de toutes les étapes nécessaires au bon fonctionnement du système (par exemple : le temps de rotation de la roulette de filtres, le temps nécessaire pour le commutateur optique pour passer d'une fibre à l'autre, etc.), le temps total pour une acquisition se situe autour de 12 secondes. Ceci est trop élevé pour une utilisation pratique en salle d'opération. Il serait possible de réduire ce temps d'acquisition en limitant le nombre de spectres utilisés pour l'étude ou en utilisant des instruments plus performants : roulette de filtres et commutateur optique plus rapides et/ou contrôle automatique utilisant un programme plus performant que *LabView*. Il est logique de croire que la source à 455 nm pourrait être retirée de l'étude par apprentissage machine puisque l'aire sous la courbe ROC utilisant cette seule source pour la classification est la plus basse de toutes, soit 0,57, ce qui est très près de la condition limite 0,5 (voir l'annexe G pour la courbe ROC). Dans le futur, l'option de retirer une ou deux sources de fluorescence intrinsèque pourrait être envisagée : il faudrait d'abord mesurer l'effet qu'aurait le changement du nombre de sources sur les résultats finaux de classification.

En général, la source d'excitation à 405 nm s'est avérée efficace pour la détection de PpIX dans les tissus biologiques. Cependant, lorsqu'il vient d'étudier la fluorescence intrinsèque des tissus, le signal perçu est très faible (le plus faible SNR des trois sources de fluorescence). Il pourrait être utile de remplacer cette source par une autre plus puissante. Ceci a été envisagé durant le projet, mais il aurait fallu modifier tout le système d'acquisition des autres sources puisque le même commutateur est utilisé pour les quatre, ou encore ajouter une étape au contrôle des instruments. Pour éviter de perturber le déroulement de l'acquisition et de la rendre trop longue pour la salle d'opération, cette option a été rejetée. D'autres options pourraient toutefois être étudiées dans la suite du projet. Cependant, à la lumière des résultats finaux, la fluorescence à 405 nm semble offrir une classification comparable aux autres modalités : l'augmentation de sa puissance serait donc utile pour hausser le seuil de détection de PpIX, ou encore pour faire une analyse qualitative des spectres. Finalement, la source blanche utilisée pour la réflectance diffuse possède un spectre d'excitation restreint qui débute à 470 nm. Cette source a été choisie puisqu'il s'agit de celle qui correspondait aux longueurs d'onde étudiées. Il pourrait toutefois être préférable d'utiliser une source blanche illuminant plus loin dans le bleu (près de 400 nm). Cela

pourrait permettre d'obtenir une calibration et une normalisation des spectres plus optimales, et ainsi peut-être améliorer les résultats de classification et de quantification.

Pour revenir sur les méthodes de normalisation, on obtient aussi des résultats supérieurs à 90 % pour l'exactitude, la sensibilité et la spécificité avec la normalisation # 1 ( $\Phi_X^{Ref}$ ). Avec une optimisation des paramètres dans l'analyse, il serait probablement possible d'améliorer encore ces résultats, comme avec la normalisation # 2 ( $\Phi_M^{Ref}$ ) qui offre des résultats optimisés (exactitude, sensibilité et spécificité) de plus de 95 %. Aussi, en prenant par exemple la normalisation # 2, les AUC ROC sont plus près de 1 pour les sources à 365 nm et à 455 nm que lorsqu'aucune normalisation n'est utilisée (voir le Tableau 4.5). Une autre avenue à considérer serait alors d'utiliser différentes méthodes de normalisation pour chacune des sources de fluorescence (par exemple la # 2 pour les sources à 365 nm et à 455 nm, et aucune normalisation pour celle à 405 nm), puis de comparer les résultats obtenus avec ceux provenant de l'analyse sans normalisation. Des expériences et analyses supplémentaires pourraient être faites à ce sujet.

Pour la réflectance diffuse, un autre point à noter est que la position de la sonde par rapport au tissu ainsi que la pression exercée font qu'il est difficile de reproduire les résultats parfaitement. Les changements sont dus à la compression des vaisseaux sanguins, ce qui peut réduire le flot de sang ou entraîner des modifications en termes de densité de diffuseurs et de métabolisme [39]. Dans notre cas, l'utilisateur étant le neurochirurgien, il est donc reconnu pour être minutieux et pour posséder une excellente dextérité. Ainsi, la pression est supposée la même entre chaque acquisition durant la chirurgie. Toutefois, advenant que plusieurs opérateurs de la sonde soient impliqués dans une même étude ou qu'un utilisateur moins chevronné utilise le système, il faudrait mesurer cette variation inter-utilisateurs ou contrôler la pression exercée par la sonde afin d'obtenir des résultats reproductibles, de même que les véritables paramètres physiologiques.

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Des chercheurs ont noté que, lorsqu'une tumeur se développe, la quantité d'eau dans le tissu augmente, la quantité de lipides diminue, les noyaux cellulaires grossissent et les cellules atteintes augmentent leur consommation d'oxygène et se désorganisent. Ces changements modifient l'interaction de la lumière avec les tissus. Ainsi, la réflectance diffuse sera sensible au changement dans l'absorption des protéines telles que l'hémoglobine, alors que la spectroscopie Raman détectera les modifications des modes de vibration des liens chimiques dans les divers composants tissulaires tels que les lipides. De plus, l'ajout de la spectroscopie par fluorescence permet de récolter des informations supplémentaires quant à la présence de fluorophores intrinsèques au tissu, améliorant ainsi davantage la détection de tumeurs *in vivo*.

Ce projet consistait en la combinaison de trois modalités d'imagerie ponctuelle dans un système chirurgical, soit la spectroscopie Raman, la spectroscopie par fluorescence intrinsèque et la réflectance diffuse. Il a été démontré que la combinaison de ces techniques est optimale pour détecter les tissus cancéreux en salle d'opération.

Les deux objectifs du projet ayant été atteints, le système de spectroscopie multimodal est maintenant optimisé pour l'utilisation en salle opératoire durant la résection de tumeurs cérébrales. La poursuite de ce projet a été grandement justifiée par son originalité à plusieurs niveaux. En effet, la nouvelle technologie proposée, qui est contenue dans la sonde en tant que telle, procure déjà plusieurs avantages : elle est à la fois maniable, peu encombrante, simple d'utilisation et n'utilise que des marqueurs intrinsèques au tissu. De plus, le fait de combiner la fluorescence intrinsèque et la spectroscopie Raman dans un même système utilisable en salle d'opération constitue un aspect totalement nouveau, jamais réalisé à ce jour. En outre, c'est également la première fois qu'une étude clinique sur patients de cette envergure est réalisée avec une sonde spectroscopique de ce type. Des études préliminaires utilisant la spectroscopie Raman sur des échantillons de tumeurs cérébrales sont présentement en cours dans plusieurs pays [85], mais aucun cas *in vivo* n'a encore été réalisé à ma connaissance. Ce projet constitue donc une innovation en soit. De plus, la précision du diagnostic est nettement améliorée par rapport aux méthodes en usage présentement. En effet, le neurochirurgien, lorsqu'il est guidé seulement par les techniques d'IRM et de neuronavigation, n'est pas en mesure d'identifier les tissus cancéreux dans leur totalité, particulièrement quand il est question de faible infiltration de tumeur dans les

tissus sains. Par contre, avec le système multimodal et des algorithmes avec classificateurs multiples, une exactitude de 98,6 % dans l'identification des zones tumorales est atteinte (sensibilité de 100 %, spécificité de 97,2 %), ce qui constitue une amélioration de 15,5 % par rapport au diagnostic usuel. Ce projet permet donc véritablement d'améliorer les résections de tumeurs cérébrales et, par le fait même, d'améliorer de manière significative le pronostic de patients atteints de cancer au cerveau.

Dans le futur, la spectroscopie Raman ou multimodale à travers une sonde optique simple pourrait aussi permettre de remplacer des biopsies aléatoires de tissus suspects par des biopsies ciblées, ce qui aurait pour résultat de réduire les coûts et les risques associés à cette procédure [4]. De plus, il a aussi été vu que ce système permettrait également la quantification de l'hémoglobine. Les codes devraient alors être testés avec plusieurs acquisitions *in vivo* et avec différentes plages de longueurs d'onde, ou même avec d'autres chromophores. Des algorithmes de quantification pourraient aussi permettre de détecter des concentrations de divers fluorophores dans les tumeurs. Comme le système multimodal utilise plusieurs longueurs d'ondes différentes, il serait intéressant de tester la détection de plusieurs fluorophores *in vivo* combinée avec la spectroscopie Raman. Il y aurait aussi la possibilité d'ajouter ou de remplacer des sources d'excitation afin de détecter d'autres fluorophores marquant divers tissus cérébraux à différentes longueurs d'ondes. Finalement, le système pourrait être utile pour détecter d'autres affections, telles que le cancer de la prostate ou de la peau. Des tests sur ces types de tissus pourraient être menés afin d'en valider l'utilisation, tests semblables à ceux qui ont été présentés ici et qui ont permis d'établir la pertinence clinique et diagnostique du système de spectroscopie multimodal en neurochirurgie.

## RÉFÉRENCES

- [1] M. Lacroix, D. Abi-Said, D. R. Fourney, Z. L. Gokaslan, W. Shi, F. DeMonte, F. F. Lang, I. E. McCutcheon, S. J. Hassenbusch, E. Holland, K. Hess, C. Michael, D. Miller, and R. Sawaya, "A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival.," *J. Neurosurg.*, vol. 95, no. 2, pp. 190–8, Aug. 2001.
- [2] P. A. Valdés, F. Leblond, V. L. Jacobs, B. C. Wilson, K. D. Paulsen, and D. W. Roberts, "Quantitative, spectrally-resolved intraoperative fluorescence imaging," *Sci. Rep.*, vol. 2, p. 798, Jan. 2012.
- [3] K. Petrecca, M.-C. Guiot, V. Panet-Raymond, and L. Souhami, "Failure pattern following complete resection plus radiotherapy and temozolomide is at the resection margin in patients with glioblastoma.," *J. Neurooncol.*, vol. 111, no. 1, pp. 19–23, Jan. 2013.
- [4] C. Krafft, S. Dochow, I. Latka, B. Dietzek, and J. Popp, "Diagnosis and screening of cancer tissues by fiber-optic probe Raman spectroscopy," *Biomed. Spectrosc. Imaging*, vol. 1, pp. 39–55, 2012.
- [5] W. Stummer, J.-C. Tonn, C. Goetz, W. Ullrich, H. Stepp, A. Bink, T. Pietsch, and U. Pichlmeier, "5-Aminolevulinic acid-derived tumor fluorescence: the diagnostic accuracy of visible fluorescence qualities as corroborated by spectrometry and histology and postoperative imaging," *Neurosurgery*, vol. 74, no. 3, pp. 310–9; discussion 319–20, Mar-2014.
- [6] P. A. Valdés, A. Kim, F. Leblond, O. M. Conde, B. T. Harris, K. D. Paulsen, B. C. Wilson, and D. W. Roberts, "Combined fluorescence and reflectance spectroscopy for in vivo quantification of cancer biomarkers in low- and high-grade glioma surgery," *J. Biomed. Opt.*, vol. 16, no. 11, p. 116007, Nov. 2011.
- [7] C. Pernet, "Neurovascular system," *Edinburgh Brain Research Imaging Centre*, 2005. [Online]. Available: <http://www.sbirc.ed.ac.uk/cyril/MEEG4.html>. [Accessed: 04-Jul-2015].
- [8] H. Nonaka, M. Akima, T. Nagayama, T. Hatori, Z. Zhang, and F. Ihara, "Microvasculature of the human cerebral meninges," *Neuropathology*, vol. 23, no. 2, pp. 129–135, Jun. 2003.
- [9] R. Salzer and H. W. Siesler, *Infrared and Raman Spectroscopic Imaging*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2009.
- [10] F. A. C. Azevedo, L. R. B. Carvalho, L. T. Grinberg, J. M. Farfel, R. E. L. Ferretti, R. E. P. Leite, W. Jacob Filho, R. Lent, and S. Herculano-Houzel, "Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain.," *J. Comp. Neurol.*, vol. 513, no. 5, pp. 532–41, Apr. 2009.

- [11] F. E. Dudek and M. A. Rogawski, "Regulation of brain water: is there a role for aquaporins in epilepsy?," *Epilepsy Curr.*, vol. 5, no. 3, pp. 104–106, Jan. .
- [12] M. A. O'Leary, "Imaging With Diffuse Photon Density Waves," University of Pennsylvania, 1996.
- [13] S. C. Kanick, C. van der Leest, J. G. J. V Aerts, H. C. Hoogsteden, S. Kascáková, H. J. C. M. Sterenborg, and A. Amelink, "Integration of single-fiber reflectance spectroscopy into ultrasound-guided endoscopic lung cancer staging of mediastinal lymph nodes.," *J. Biomed. Opt.*, vol. 15, no. 1, p. 017004, 2014.
- [14] A. D. Rezaee and F. D. Gaillard, "CNS tumours (classification and grading)." [Online]. Available: <http://radiopaedia.org/articles/cns-tumours-classification-and-grading-who>. [Accessed: 10-Aug-2015].
- [15] D. N. Louis, H. Ohgaki, O. D. Wiestler, W. K. Cavenee, P. C. Burger, A. Jouvet, B. W. Scheithauer, and P. Kleihues, "The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system.," *Acta Neuropathol.*, vol. 114, no. 2, pp. 97–109, Aug. 2007.
- [16] H. D. Knipe and A. D. Rezaee, "WHO grading of CNS tumours." [Online]. Available: <http://radiopaedia.org/articles/who-grading-of-cns-tumours>. [Accessed: 10-Aug-2015].
- [17] M. K. Bucci, A. Maity, A. J. Janss, J. B. Belasco, M. J. Fisher, Z. A. Tochner, L. Rorke, L. N. Sutton, P. C. Phillips, and H.-K. G. Shu, "Near complete surgical resection predicts a favorable outcome in pediatric patients with nonbrainstem, malignant gliomas: results from a single center in the magnetic resonance imaging era.," *Cancer*, vol. 101, no. 4, pp. 817–24, Aug. 2004.
- [18] P. A. Valdés, F. Leblond, V. L. Jacobs, K. D. Paulsen, W. David, and N. Cotton, "In vivo Fluorescence Detection in Surgery : A Review of Principles, Methods, and Clinical Applications," *Curr. Med. Imaging Rev.*, vol. 8, no. 3, pp. 1–21, 2012.
- [19] M. Jermyn, J. Desroches, J. Mercier, K. Saint-Arnaud, M.-C. Guiot, F. Leblond, and K. Petrecca, "Raman spectroscopy detects invasive brain cancer cells in humans," *Submitt. to Sci. Transl. Med.*
- [20] A. Lobera, B. D. Coombs, and G. L. Naul, "Imaging in Glioblastoma Multiforme," *Medscape*, 2013. [Online]. Available: <http://emedicine.medscape.com/article/340870-overview>. [Accessed: 07-Jul-2015].
- [21] C. Krafft, L. Neudert, T. Simat, and R. Salzer, "Near infrared Raman spectra of human brain lipids.," *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 61, no. 7, pp. 1529–35, May 2005.
- [22] D. Rohle, J. Popovici-Muller, N. Palaskas, S. Turcan, C. Grommes, C. Campos, J. Tsoi, O. Clark, B. Oldrini, E. Komisopoulou, K. Kunii, A. Pedraza, S. Schalm, L. Silverman, A.

- Miller, F. Wang, H. Yang, Y. Chen, A. Kernysky, M. K. Rosenblum, W. Liu, S. a Biller, S. M. Su, C. W. Brennan, T. a Chan, T. G. Graeber, K. E. Yen, and I. K. Mellinghoff, "An inhibitor of mutant IDH1 delays growth and promotes differentiation of glioma cells.," *Science*, vol. 340, no. 6132, pp. 626–30, May 2013.
- [23] M. Kirsch, G. Schackert, R. Salzer, and C. Krafft, "Raman spectroscopic imaging for in vivo detection of cerebral brain metastases," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 398, no. 4, pp. 1707–1713, Aug. 2010.
- [24] C. Krafft, D. Codrich, G. Pelizzo, and V. Sergo, "Raman and FTIR imaging of lung tissue: Methodology for control samples," *Vib. Spectrosc.*, vol. 46, no. 2, pp. 141–149, Mar. 2008.
- [25] J. Zhao, H. Lui, D. I. M. C. Lean, and H. Zeng, "Automated Autofluorescence Background Subtraction Algorithm for Biomedical Raman Spectroscopy," *Appl. Spectrosc.*, vol. 61, no. 11, pp. 1225–1232, 2007.
- [26] C. Krafft, B. Belay, N. Bergner, B. F. M. Romeike, R. Reichart, R. Kalff, and J. Popp, "Advances in optical biopsy--correlation of malignancy and cell density of primary brain tumors using Raman microspectroscopic imaging.," *Analyst*, vol. 137, no. 23, pp. 5533–7, Dec. 2012.
- [27] C. Krafft, S. Dochow, I. Latka, M. Becker, R. Spittel, J. Kobelke, K. Schuster, M. Rothardt, and J. Popp, "Multi-core fiber with integrated fiber Bragg grating for background free Raman sensing," *Proc. SPIE*, vol. 8577, p. 85770J, Mar. 2013.
- [28] A. Beljebbar, S. Dukic, N. Amharref, and M. Manfait, "Ex vivo and in vivo diagnosis of C6 glioblastoma development by Raman spectroscopy coupled to a microprobe," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 398, no. 1, pp. 477–87, Sep. 2010.
- [29] N. Stone, M. C. Hart Prieto, P. Crow, J. Uff, and A. W. Ritchie, "The use of Raman spectroscopy to provide an estimation of the gross biochemistry associated with urological pathologies," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 387, no. 5, pp. 1657–68, Mar. 2007.
- [30] C. Krafft, B. Dietzek, M. Schmitt, and J. Popp, "Raman and coherent anti-Stokes Raman scattering microspectroscopy for biomedical applications," *J. Biomed. Opt.*, vol. 17, no. 4, p. 040801, Apr. 2012.
- [31] M. Köhler, S. Machill, R. Salzer, and C. Krafft, "Characterization of lipid extracts from brain tissue and tumors using Raman spectroscopy and mass spectrometry.," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 393, no. 5, pp. 1513–20, Mar. 2009.
- [32] M. Ji, D. a Orringer, C. W. Freudiger, S. Ramkisson, X. Liu, D. Lau, A. J. Golby, I. Norton, M. Hayashi, N. Y. R. Agar, G. S. Young, C. Spino, S. Santagata, S. Camelo-Piragua, K. L. Ligon, O. Sagher, and X. S. Xie, "Rapid, label-free detection of brain



- tumors with stimulated Raman scattering microscopy.,” *Sci. Transl. Med.*, vol. 5, no. 201, p. 201ra119, Sep. 2013.
- [33] N. Bergner, C. Krafft, K. D. Geiger, M. Kirsch, G. Schackert, and J. Popp, “Unsupervised unmixing of Raman microspectroscopic images for morphochemical analysis of non-dried brain tumor specimens.,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 403, no. 3, pp. 719–25, May 2012.
  - [34] H. N. Banerjee and L. Zhang, “Deciphering the finger prints of brain cancer astrocytoma in comparison to astrocytes by using near infrared Raman spectroscopy,” *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 295, no. 1–2, pp. 237–40, Jan. 2007.
  - [35] S. F. Bish, N. Rajaram, B. Nichols, and J. W. Tunnell, “Development of a noncontact diffuse optical spectroscopy probe for measuring tissue optical properties,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 16, no. 12, p. 120505, Dec. 2011.
  - [36] A. Kim, M. Khurana, Y. Moriyama, and B. C. Wilson, “Quantification of in vivo fluorescence decoupled from the effects of tissue optical properties using fiber-optic spectroscopy measurements,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 15, no. 6, p. 067006, 2010.
  - [37] C. Reble, I. Gersonde, C. a Lieber, and J. Helfmann, “Influence of tissue absorption and scattering on the depth dependent sensitivity of Raman fiber probes investigated by Monte Carlo simulations,” *Biomed. Opt. Express*, vol. 2, no. 3, pp. 520–33, Jan. 2011.
  - [38] S. C. Kanick, H. J. C. M. Sterenborg, and a. Amelink, “Empirical model of the photon path length for a single fiber reflectance spectroscopy device,” *Opt. Express*, vol. 17, no. 2, p. 860, Jan. 2009.
  - [39] B. Yu, D. G. Ferris, Y. Liu, and V. Krishna Nagarajan, “Emerging Optical Techniques for Detection of Oral, Cervical and Anal Cancer in Low-Resource Settings,” *J. Biomed. Eng.*, vol. 1, no. 2, p. 1007, 2014.
  - [40] I. Nissilä, T. Nojonen, J. Heino, T. Kajava, and T. Katila, “Diffuse optical imaging,” in *Advances in Electromagnetic Fields in Living Systems*, no. 4, J. C. Lin, Ed. Springer Science and Business Media, 2005, pp. 77–129.
  - [41] S. Prahl, “Optical Absorption of Hemoglobin,” 1999. [Online]. Available: <http://omlc.org/spectra/hemoglobin/>.
  - [42] J. M. Menter, “Temperature dependence of collagen fluorescence.,” *Photochem. Photobiol. Sci.*, vol. 5, no. 4, pp. 403–10, Apr. 2006.
  - [43] Y. Yuanlong, Y. Yanming, L. Fuming, L. Yufen, and M. Paozhong, “Characteristic Autofluorescence for Cancer Diagnosis and Its Origin,” *Lasers Surg. Med.*, vol. 7, pp. 528–532, 1987.

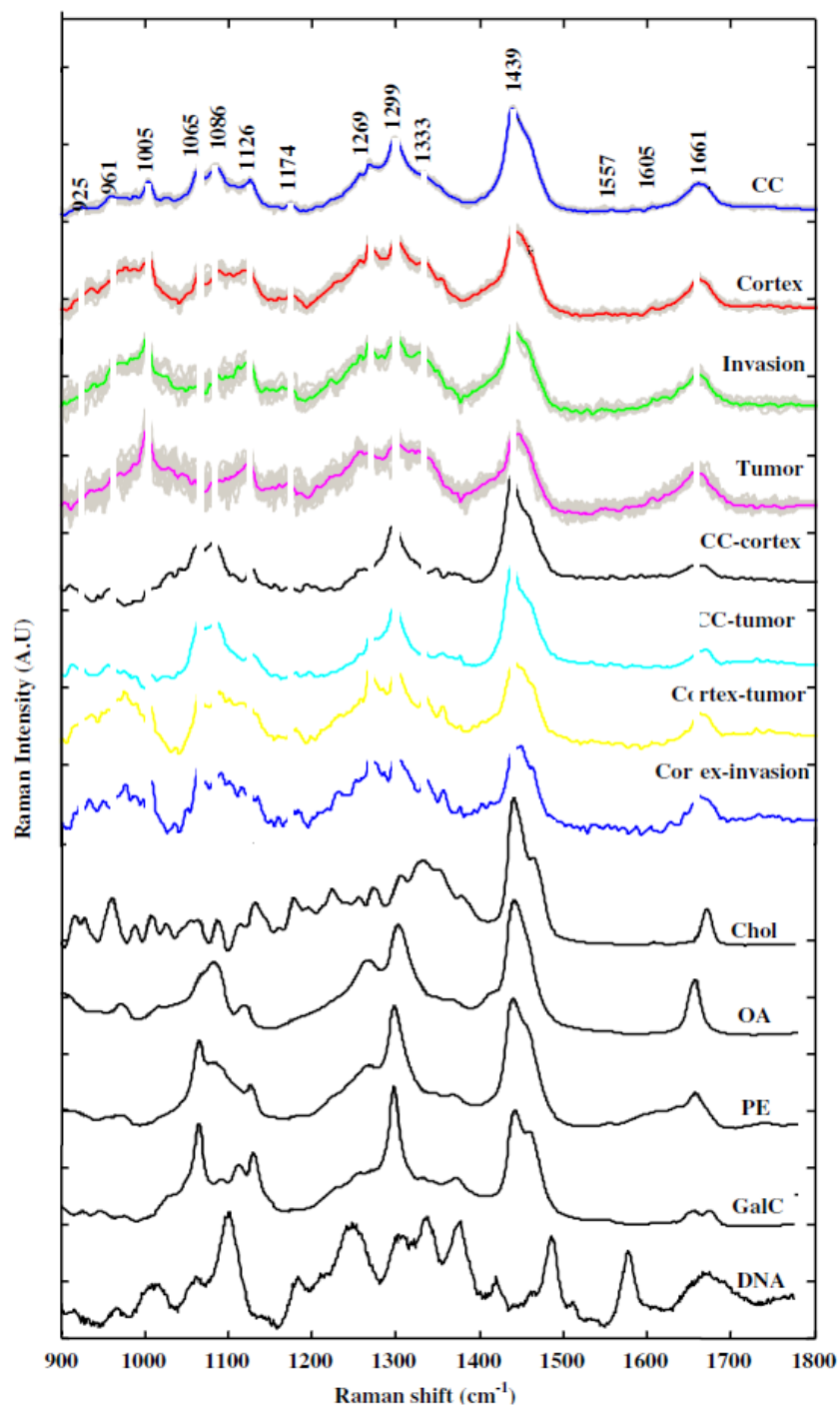
- [44] S. Andersson-Engels, J. Johansson, K. Svanberg, and S. Svanberg, "Fluorescence imaging and point measurements of tissue: applications to the demarcation of malignant tumors and atherosclerotic lesions from normal tissue," *Photochem. Photobiol.*, vol. 53, no. 6, pp. 807–814, 1991.
- [45] D. C. G. de Veld, M. Skurichina, M. J. H. Witjes, R. P. W. Duin, H. J. C. M. Sterenborg, and J. L. N. Roodenburg, "Autofluorescence and diffuse reflectance spectroscopy for oral oncology," *Lasers Surg. Med.*, vol. 36, no. 5, pp. 356–64, Jun. 2005.
- [46] K. T. Schomacker, J. K. Frisoli, C. C. Compton, T. J. Flotte, J. M. Richter, N. S. Nishioka, and T. F. Deutsch, "Ultraviolet laser-induced fluorescence of colonic tissue: Basic biology and diagnostic potential," *Lasers Surg. Med.*, vol. 12, no. 1, pp. 63–78, 1992.
- [47] A. H. Gharekhan, N. C. Biswal, S. Gupta, A. Pradhan, M. B. Sureshkumar, and P. K. Panigrahi, "Characterization of cancer and normal tissue fluorescence through wavelet transform and singular value decomposition," in *SPIE Proceedings Vol. 6853 - Biomedical Optical Spectroscopy*, 2008.
- [48] Laboratory of biophotonics BAS, "Laser medical and biomedical research and development of new diagnostic and therapeutic methods and equipment." [Online]. Available: <http://www.ie-bas.dir.bg/Departments/Condensed.htm>. [Accessed: 07-Jun-2015].
- [49] MIT, "Intrinsic Fluorescence Spectroscopy." [Online]. Available: <http://web.mit.edu/spectroscopy/research/biomedresearch/A1-23.html>. [Accessed: 07-Aug-2015].
- [50] S. A. Toms, W.-C. Lin, R. J. Weil, M. D. Johnson, E. D. Jansen, and A. Mahadevan-Jansen, "Intraoperative Optical Spectroscopy Identifies Infiltrating Glioma Margins with High Sensitivity," *Neurosurgery*, vol. 57, no. Supplement 4, pp. 382–391, Oct. 2005.
- [51] W. C. Lin, S. a Toms, M. Johnson, E. D. Jansen, and a Mahadevan-Jansen, "In vivo brain tumor demarcation using optical spectroscopy.," *Photochem. Photobiol.*, vol. 73, no. 4, pp. 396–402, Apr. 2001.
- [52] W. C. Lin, S. A. Toms, M. Motamedi, E. D. Jansen, and A. Mahadevan-Jansen, "Brain tumor demarcation using optical spectroscopy; an in vitro study.," *J. Biomed. Opt.*, vol. 5, no. 2, pp. 214–20, Apr. 2000.
- [53] G. A. Wagnières, W. M. Star, and B. C. Wilson, "In Vivo Fluorescence Spectroscopy and Imaging for Oncological Applications," *Photochem. Photobiol.*, vol. 68, no. 5, pp. 603–632, 1998.
- [54] D. J. Robinson, M. B. Karakullukc, B. Kruijt, S. C. Kanick, R. P. L. Van Veen, A. Amelink, H. J. C. M. Sterenborg, M. J. H. Witjes, and I. B. Tan, "Optical Spectroscopy to

- Guide Photodynamic Therapy of Head and Neck Tumors,” *IEEE J. Sel. Top. QUANTUM Electron.*, vol. 16, no. 4, pp. 854–862, 2010.
- [55] A. Kim, M. Roy, F. N. Dadani, and B. C. Wilson, “Topographic mapping of subsurface fluorescent structures in tissue using multiwavelength excitation,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 15, no. 6, p. 066026, Jan. 2010.
  - [56] S. Hingtgen, J.-L. Figueiredo, C. Farrar, M. Duebgen, J. Martinez-Quintanilla, D. Bhare, and K. Shah, “Real-time multi-modality imaging of glioblastoma tumor resection and recurrence,” *J. Neurooncol.*, vol. 111, no. 2, pp. 153–61, Jan. 2013.
  - [57] W. Stummer, A. Novotny, H. Stepp, C. Goetz, K. Bise, and H. Jürgen Reulen, “Fluorescence-guided resection of glioblastoma multiforme by using 5-aminolevulinic acid-induced porphyrins: a prospective study in 52 consecutive patients,” *J. Neurosurg.*, vol. 93, no. December 1995, pp. 1003–1013, 2000.
  - [58] B. P. Flynn, A. V DSouza, S. C. Kanick, S. C. Davis, and B. W. Pogue, “White light-informed optical properties improve ultrasound-guided fluorescence tomography of photoactive protoporphyrin IX,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 18, no. 4, p. 046008, Apr. 2013.
  - [59] P. A. Valdés, F. Leblond, A. Kim, B. C. Wilson, K. D. Paulsen, and D. W. Roberts, “A spectrally constrained dual-band normalization technique for protoporphyrin IX quantification in fluorescence-guided surgery,” *Opt. Lett.*, vol. 37, no. 11, pp. 1817–9, Jun. 2012.
  - [60] N. Van der Beek, J. de Leeuw, C. Demmendal, P. Bjerring, and H. A. M. Neumann, “PpIX fluorescence combined with auto-fluorescence is more accurate than PpIX fluorescence alone in fluorescence detection of non-melanoma skin cancer: an intra-patient direct comparison study,” *Lasers Surg. Med.*, vol. 44, no. 4, pp. 271–6, Apr. 2012.
  - [61] U. A. Gamm, S. C. Kanick, H. J. C. M. Sterenborg, D. J. Robinson, and A. Amelink, “Measurement of tissue scattering properties using multi-diameter single fiber reflectance spectroscopy: in silico sensitivity analysis,” *Biomed. Opt. Express*, vol. 2, no. 11, pp. 3150–66, Nov. 2011.
  - [62] A. Kim, M. Roy, F. Dadani, and B. C. Wilson, “A fiberoptic reflectance probe with multiple source-collector separations to increase the dynamic range of derived tissue optical absorption and scattering coefficients,” *Opt. Express*, vol. 18, no. 6, pp. 5580–94, Mar. 2010.
  - [63] S. C. Kanick, J. L. Eiseman, E. Joseph, J. Guo, and R. S. Parker, “Noninvasive and nondestructive optical spectroscopic measurement of motexafin gadolinium in mouse tissues: comparison to high-performance liquid chromatography,” *J. Photochem. Photobiol. B.*, vol. 88, no. 2–3, pp. 90–104, Sep. 2007.

- [64] U. Utzinger and R. R. Richards-Kortum, "Fiber optic probes for biomedical optical spectroscopy," *J. Biomed. Opt.*, vol. 8, no. 1, pp. 121–47, Jan. 2003.
- [65] P. A. Valdés, F. Leblond, A. Kim, B. T. Harris, B. C. Wilson, X. Fan, T. D. Tosteson, A. Hartov, S. Ji, K. Erkmen, N. E. Simmons, K. D. Paulsen, and D. W. Roberts, "Quantitative fluorescence in intracranial tumor: implications for ALA-induced PpIX as an intraoperative biomarker," *J. Neurosurg.*, vol. 115, no. 1, pp. 11–17, 2011.
- [66] L. Marcu, J. A. Jo, P. V Butte, W. H. Yong, B. K. Pikul, K. L. Black, and R. C. Thompson, "Fluorescence Lifetime Spectroscopy of Glioblastoma Multiforme," *Photochem. Photobiol.*, vol. 80, pp. 98–103, 2004.
- [67] W. H. Yong, "Distinction of brain tissue, low grade and high grade glioma with time-resolved fluorescence spectroscopy," *Front. Biosci.*, vol. 11, no. 1, p. 1255, 2006.
- [68] T. G. Dietterich, "An Experimental Comparison of Three Methods for Constructing Ensembles of Decision Trees : Bagging, Boosting, and Randomization," pp. 139–157, 2000.
- [69] W. S. Noble and P. Street, "What is a support vector machine ?," *Nat. Biotechnol.*, vol. 24, no. 12, pp. 1565–1567, 2006.
- [70] S. Li, Q. Zeng, L. Li, Y. Zhang, M. Wan, Z. Liu, H. Xiong, Z. Guo, and S. Liu, "Study of support vector machine and serum surface-enhanced Raman spectroscopy for noninvasive esophageal cancer detection," *J. Biomed. Opt.*, vol. 18, no. 2, 2013.
- [71] M. Jermyn, K. Mok, J. Mercier, J. Desroches, J. Pichette, K. Saint-Arnaud, L. Bernstein, M.-C. Guiot, K. Petrecca, and F. Leblond, "Intraoperative brain cancer detection with Raman spectroscopy in humans," *Sci. Transl. Med.*, vol. 7, no. 274, p. 274ra19, Feb. 2015.
- [72] M. G. Müller, I. Georgakoudi, Q. Zhang, J. Wu, and M. S. Feld, "Intrinsic fluorescence spectroscopy in turbid media: disentangling effects of scattering and absorption," *Appl. Opt.*, vol. 40, no. 25, pp. 4633–4646, 2001.
- [73] P. A. Valdés, A. Kim, M. Brantsch, C. Niu, Z. B. Moses, T. D. Tosteson, B. C. Wilson, K. D. Paulsen, D. W. Roberts, and B. T. Harris, "δ-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX concentration correlates with histopathologic markers of malignancy in human gliomas: the need for quantitative fluorescence-guided resection to identify regions of increasing malignancy," *Neuro. Oncol.*, vol. 13, no. 8, pp. 846–56, Aug. 2011.
- [74] P. A. Valdés, V. Jacobs, B. T. Harris, B. C. Wilson, F. Leblond, K. D. Paulsen, and D. W. Roberts, "Quantitative fluorescence using 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX biomarker as a surgical adjunct in low-grade glioma surgery," Jul. 2015.

- [75] M. Jermyn, Y. Gosselin, P. A. Valdés, M. Sibai, K. Kolste, L. Angulo, D. W. Roberts, K. D. Paulsen, K. Petrecca, B. C. Wilson, and F. Leblond, "Improved sensitivity to fluorescence for cancer detection in wide field image guided neurosurgery," *Submitt. to Med. Phys.*
- [76] M. G. Shim, L. W. K. Song, N. E. Marcon, and B. C. Wilson, "Rapid Communication In vivo Near-infrared Raman Spectroscopy : Demonstration of Feasibility During Clinical Gastrointestinal Endoscopy," *Photochem. Photobiol.*, vol. 72, no. 1, pp. 146–150, 2000.
- [77] U. Utzinger, D. L. Heintzelman, A. Mahadevan-Jansen, A. Malpica, M. Follen, and R. Richards-Kortum, "Near-Infrared Raman Spectroscopy for in Vivo Detection of Cervical Precancers," *Appl. Spectrosc.*, vol. 55, no. 8, pp. 955–959, 2001.
- [78] K. Murland, J. Latreille, M. Cervenán, J. Chahal, A. de Richemond, and Y. Deslauriers, "Safe use of lasers in health care facilities - Canadian Standards Association Z386-08," no. reaffirmed. 2008.
- [79] J. Desroches, M. Jermyn, K. Mok, C. Lemieux-Leduc, J. Mercier, K. St-Arnaud, K. Urmeý, M.-C. Guiot, E. Marple, K. Petrecca, and F. Leblond, "Characterization of a Raman spectroscopy probe system for intraoperative brain tissue classification.," *Biomed. Opt. Express*, vol. 6, no. 7, pp. 2380–97, Jul. 2015.
- [80] L. M. Fullwood, D. Griffiths, K. Ashton, T. Dawson, R. W. Lea, C. Davis, F. Bonnier, H. J. Byrne, and M. J. Baker, "Effect of substrate choice and tissue type on tissue preparation for spectral histopathology by Raman microspectroscopy ," *Analyst*, vol. 139, no. 2, pp. 446–454, 2014.
- [81] F. Lyng, E. Gazi, and P. Gardner, "Preparation of Tissues and Cells for Infrared and Raman Spectroscopy and Imaging," in *Biomedical Applications of Synchrotron Infrared Microspectroscopy*, 2011, pp. 145–189.
- [82] E. Ó Faoláin, M. B. Hunter, J. M. Byrne, P. Kelehan, M. McNamara, H. J. Byrne, and F. M. Lyng, "A study examining the effects of tissue processing on human tissue sections using vibrational spectroscopy," *Vib. Spectrosc.*, vol. 38, no. 1–2, pp. 121–127, 2005.
- [83] S. K. Majumder, M. D. Keller, F. I. Boulos, M. C. Kelley, and A. Mahadevan-Jansen, "Comparison of autofluorescence, diffuse reflectance, and Raman spectroscopy for breast tissue discrimination," *J. Biomed. Opt.*, vol. 13, no. 5, p. 054009, 2008.
- [84] "On Combining Classifiers." [Online]. Available: file:///C:/Users/Jeanne M/Downloads/1998-On-combining-classifiers (1).pdf. [Accessed: 28-Aug-2015].
- [85] M. Shenoy, A. R. Hole, E. Shridhar, A. V. Moiyadi, and C. M. Krishna, "Raman spectroscopy of gliomas: an exploratory study," in *SPIE BiOS*, 2014, p. 892808.

**ANNEXE A – SPECTRES RAMAN DE TISSUS CÉRÉBRAUX *EX VIVO* DE  
SOURIS INJECTÉES AVEC DES CELLULES DE RAT (CELLULES DE  
GLIOME C6)**



Tiré de [28].

## ANNEXE B – LISTE DES BANDES RAMAN CARACTÉRISTIQUES PROVENANT DE LA LITTÉRATURE

<b>Bands (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Component, molecule, chemical bond</b>
427, 544, 608, 700, 1439, 1672	aromatic system of cholesterol
430, 546, 608, 701, 1440	higher CH content (in WM)
499	guanine (nucleotides)
508, 550	S-S vibrations of the disulfide bridges
606	cholesterol
621	Phe (amino acid)
621	protein bands assigned to aromatic amino acids
643	Tyr (amino acid)
642	protein bands assigned to aromatic amino acids
675, 747, 965, 1003, 1124, 1250, 1342, 1370, 1561, 1576 and 1620	hemoglobin in red blood cells (enhanced upon excitation at 785 nm due to the heme group)
667	nucleotides
682	guanine (nucleotides)
701	cholesterol
716	phospholipid phosphatidylcholine
717	choline groups of hydrophilic head groups
720	prominent lipid-specific bands (choline group of PC (720) and sphingomyelin (SM))
730	adenine (nucleotides)
728	nucleotides
751	thymine (nucleotides)
751	nucleotides
759	Trp (amino acid)
783	nucleotides
789	cytosine (nucleotides)
829	Tyr (amino acid)
828	protein bands assigned to aromatic amino acids
836	phosphodiester group (of the backbone)
853	Tyr (amino acid)
852	protein bands assigned to aromatic amino acids
873	phospholipid phosphatidylcholine
878	prominent lipid-specific bands (choline group of PC (720) and sphingomyelin (SM))
935	peptide backbone
939	C-C vibrations of the alpha-helices
1003, 1004, 1031	phenylalanine (Phe (amino acid)) symmetric

	stretching vibration
1003, 1032	protein bands assigned to aromatic amino acids
1063	phospholipid phosphatidylcholine
1064, 1065	stretching vibrations of C-C (fatty acids lipid chains)
1085	PO2
1087	phosphodioxy groups (in phospholipids and in SM)
1093, 1098	phosphodioxy groups (of the backbone) (nucleic acid bands)
1126	CH2/CH3 for aliphatic amino acids
1130	deformation vibrations of C-H2 (fatty acids lipid chains)
1175	protein bands assigned to aromatic amino acids
1208	Phe (amino acid)
1207	protein bands assigned to aromatic amino acids
1230 to 1330	amide-III vibration (C-N stretching)
1238	amide III (peptide backbone with beta-sheet secondary structures)
1255	peptide backbone
1230	cytosine (nucleotides)
1267	C=C groups in unsaturated fatty acid side chains
1267	CN stretching and NH bending mode of amide III (human skin)
1268	stretching vibrations of C=C (unsaturated fatty acids)
1298	phospholipid phosphatidylcholine
1299	deformation vibrations of C-H2 (fatty acids lipid chains)
1304	adenine (nucleotides)
1317, 1340	CH2/CH3 for aliphatic amino acids
1338	adenine (nucleotides)
1337	nucleotides
1377	thymine (nucleotides)
1398	COO- (amino acid side chains)
1421	CH2 group (of the backbone)
1422	nucleotides
1437	phospholipid phosphatidylcholine
1439	cholesterol
1439, 1440	deformation vibrations of C-H2 (fatty acids lipid chains)
1449	CH3 (amino acid side chains)



1489	guanine (nucleotides)
1555	Trp (amino acid)
1555	protein bands assigned to aromatic amino acids
1576	nucleotides
1579	guanine (nucleotides)
1614	protein bands assigned to aromatic amino acids
1620 to 1710	amide-I vibration (C=O vib. Of the peptide group making up the protein backbone)
1672	amide I (peptide backbone with betâ-sheet secondary structures)
1655	C=O stretching mode of amide I bonds (collagen and elastin in dermis, human skin)
1655	protein band (to compare with 2850 cm <sup>-1</sup> )
1656	unsaturated fatty acids
1657	C=C groups in unsaturated fatty acid side chains
1660	stretching vibrations of C=C (unsaturated fatty acids)
1660	peptide backbone
1669	C=O vibrations of steroid ring of cholesterol
1671	thymine (nucleotides)
1735, 1739	C=O vibrations of ester groups
2850	lipid band (ratio of this and the protein band at 1655 = decreases with increasing malignancy)
2800-3100	valence vibrations of C-H <sub>2</sub> groups
above 3100	bands assigned to water

## ANNEXE C – PROCÉDURE D'UTILISATION DU LASER NIR - SÉCURITÉ MCGILL



### STANDARD OPERATING PROCEDURE RAMAN SPECTROSCOPY DEVICE (NIR LASER)

#### 1. PURPOSE

This Standard Operating Procedure (SOP) describes procedures for the experimental Raman spectroscopy device.

#### 2. RESPONSIBILITY

Principal investigator (PI) and their research staff, or any individual assisting the use of the Raman spectroscopy device.

#### 3. MATERIALS

- 3.1 Hand-held probe equipped with the Medtronic SureTrak® II navigation tracker instrument
- 3.2 Specialized device on a cart (NIR laser (I0785MM0350MF 785nm Spectrum Stabilized Laser Module), spectrometer, CCD camera, and computer)

#### 4. PROCEDURES

- 4.1 Insure that all reflective material in the OR is covered with sheets or at a minimal distance of 2 meters from the operating space.
- 4.2 Pre-operative setup
  - 4.2.1 Sterilize the probe with the STERRAD procedure (taking special care not to damage the tip).
  - 4.2.2 Secure every wire connection, plug in the power bar and turn on the devices.
  - 4.2.3 Set the NIR laser at a power of 0.6 (75.8mW).
- 4.3 Taking measurements during the surgery:
  - 4.3.1 Make sure never to lift the tip of the probe at eye level.
  - 4.3.2 Surgeon's procedure:
    - 4.3.2.1 When the probe is at the right position to take a measurement, say "Ready" and describe briefly the tissue measured. If another measurement can be done **without laying down the probe**, inform the person in charge of the device and repeat the present step.
    - 4.3.2.2 Before putting the probe aside, say "Done", and wait for the approval of the person in charge of the device
  - 4.3.3 For the person in charge of the device:
    - 4.3.3.1 Inform all the clinical staff within the OR to take necessary precautions (i.e. keep away at a distance of 2m, do not change room lighting conditions, secure and/or cover reflective surfaces).
    - 4.3.3.2 Be sure to keep track of the direction of the laser beam at any time.
    - 4.3.3.3 Only turn on the laser when the surgeon says "Ready" and after visual confirmation, and turn it off when each measurement is done.
    - 4.3.3.4 Never change the output power of the laser.
- 4.4 Post-operative procedure:
  - 4.4.1 Shut down the equipment and turn the master power key switch on the back panel counter of the laser clockwise from the horizontal "On" position to the vertical "Off" position before disconnecting any cable.

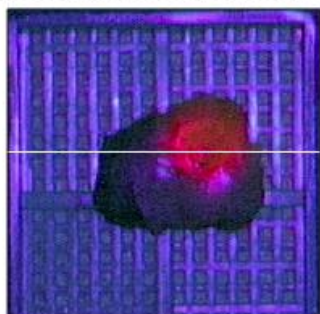
#### 5 REFERENCES

- 5.1 Innovative Photonic Solutions. "Operation Manual 785 nm Spectrum Stabilized Laser Module Model Number I0785MM0350MF". 15p.
- 5.2 Canadian Standards Association. "Z386-08 Safe use of lasers in health care facilities", CSA, February 2008 (reaffirmed 2013), 102p.

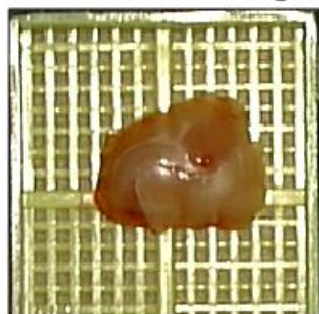
## ANNEXE D – EXPÉRIENCE TISSUS BIOLOGIQUES AVEC TUMEURS ET PPIX FLUORESCENT

Acquisition de données expérimentales sur des tranches de cerveau de rat (illumination de la PpIX spécifique aux tumeurs).

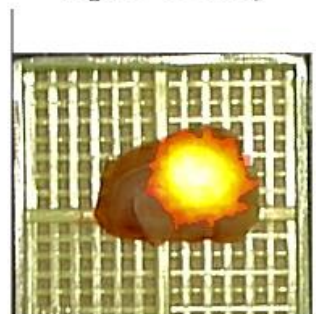
Pentero Fluorescence



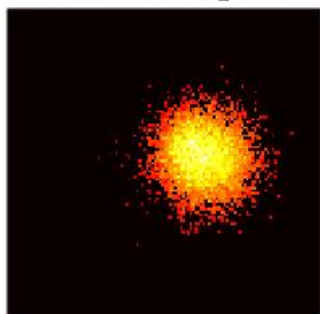
Pentero White Light



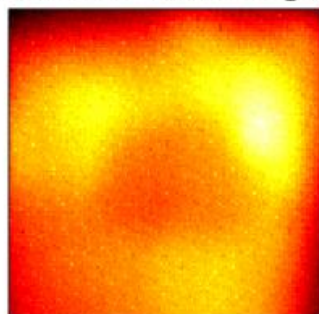
PpIX overlay



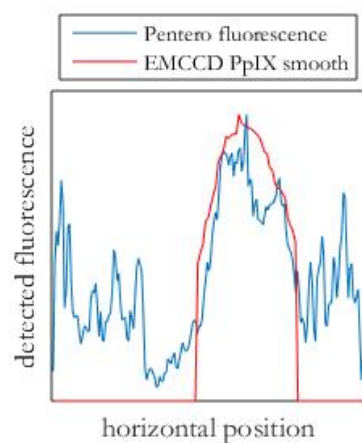
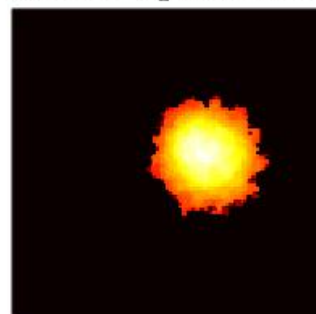
EMCCD PpIX



EMCCD White Light

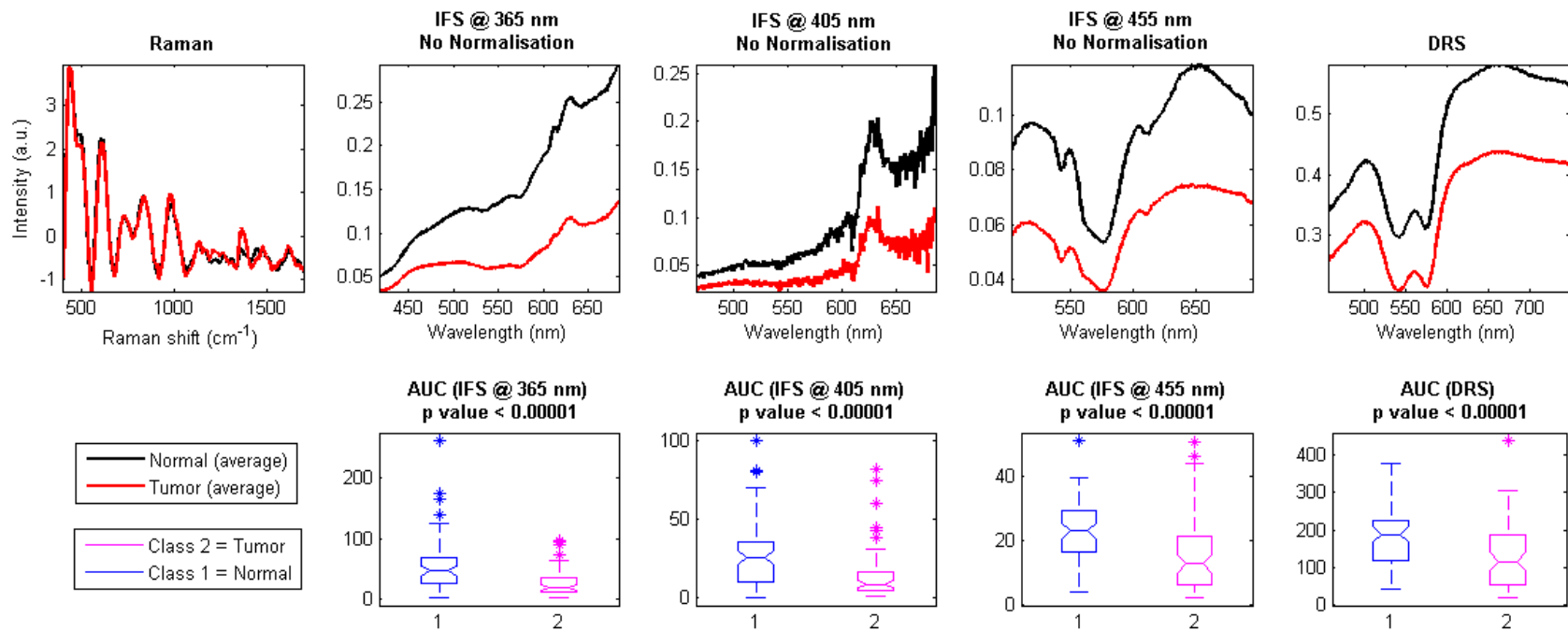


EMCCD PpIX Smooth

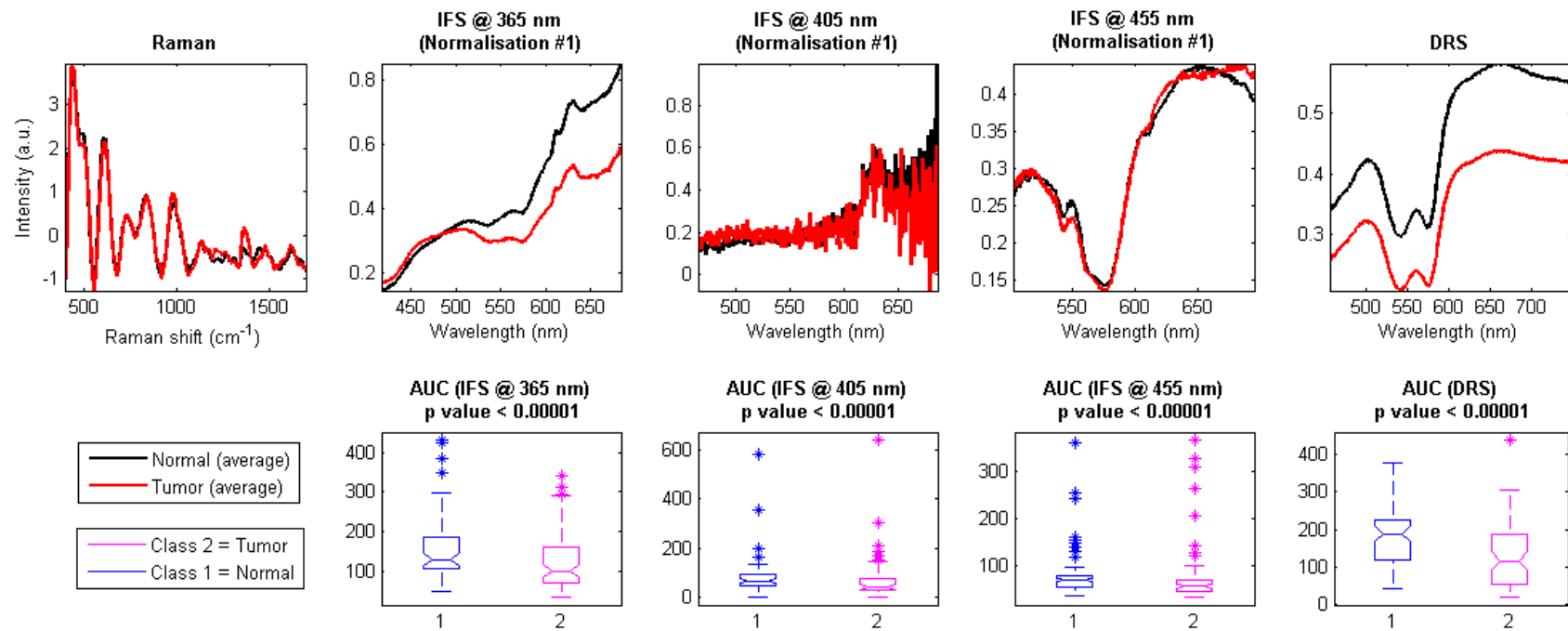


## ANNEXE E – SPECTRES MOYENS ET RÉPARTITION DES AIRES SOUS LA COURBE (AUC)

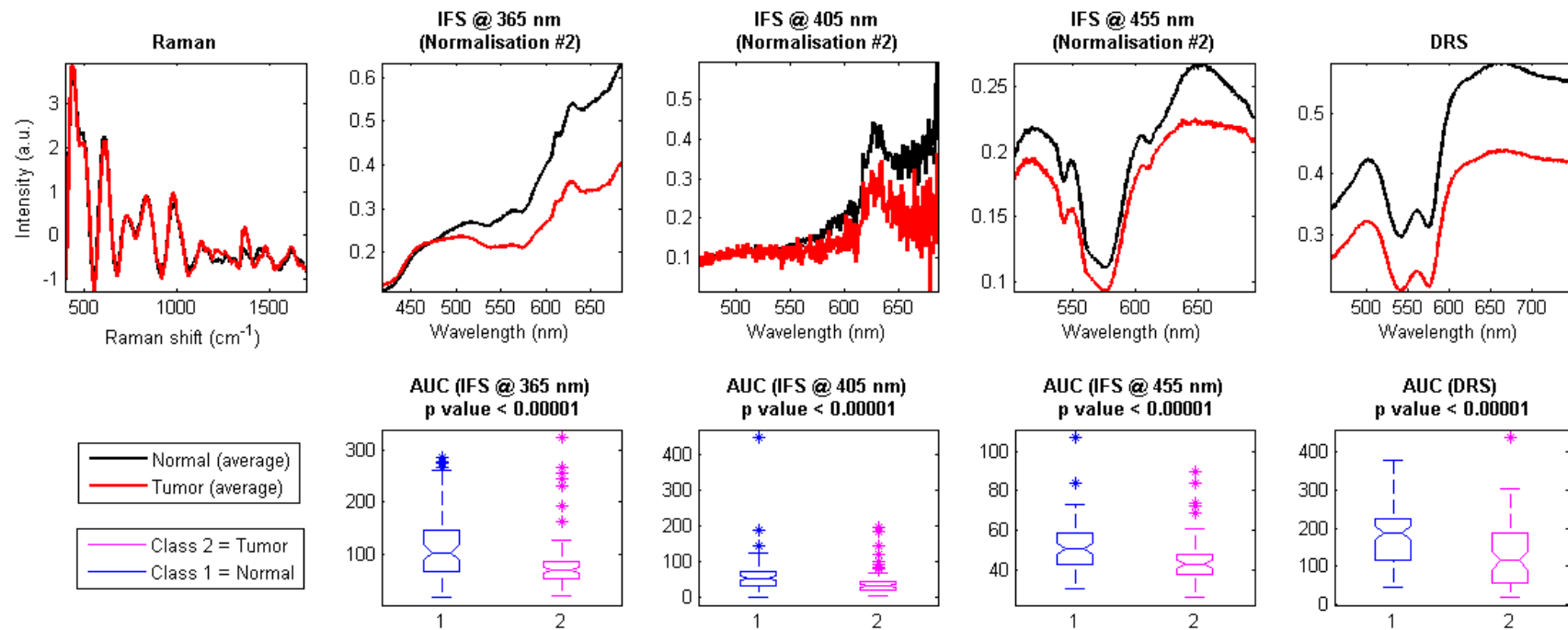
Lorsqu'il n'y a aucune normalisation :



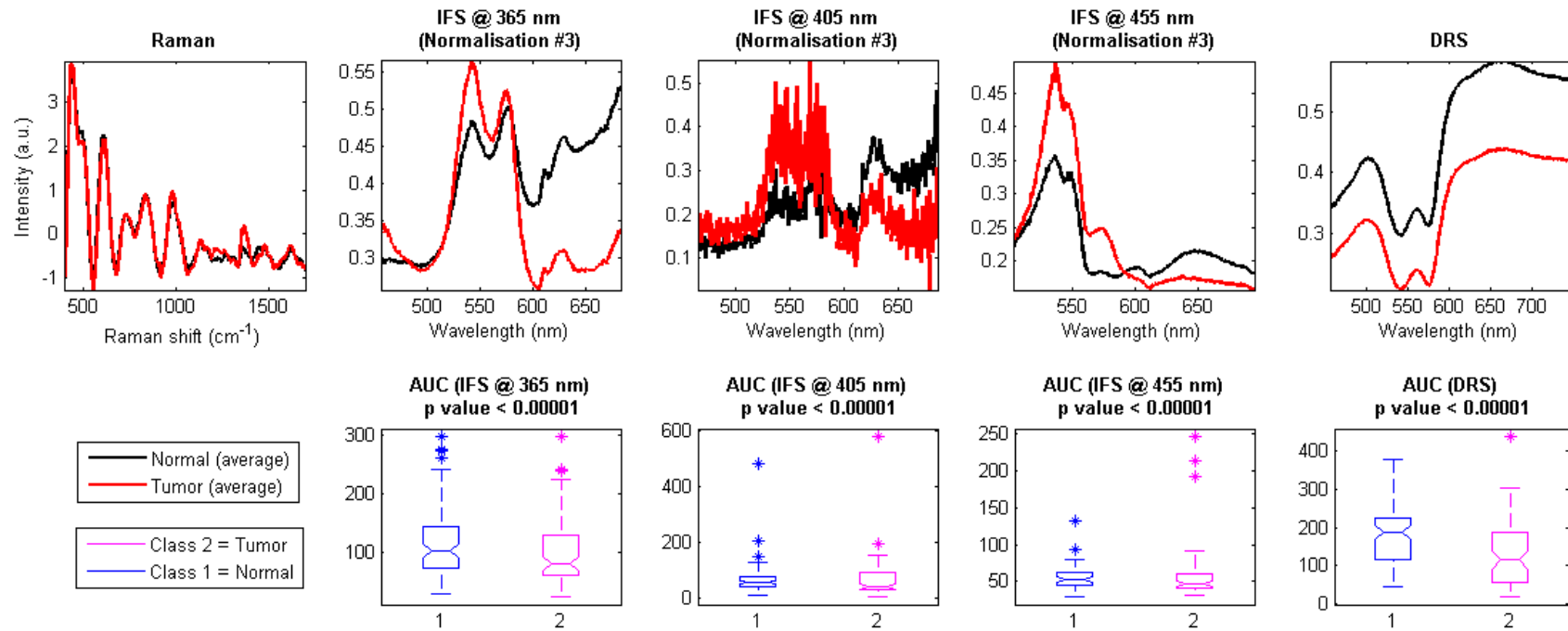
Avec la méthode de normalisation # 1 :



Avec la méthode de normalisation # 2 :



Avec la méthode de normalisation # 3 :



## ANNEXE F – RÉSULTATS DE LA CLASSIFICATION POUR COMPARER LES MÉTHODES DE NORMALISATION

NORMALISATION		PCA + Knn			Boosted Trees			Random Forests			Bagging		
		Acc.	Sens.	Spec.	Acc.	Sens.	Spec.	Acc.	Sens.	Spec.	Acc.	Sens.	Spec.
# 1	365 nm	69,0	66,2	71,8	74,6	71,8	77,5	79,6	76,1	83,1	72,5	73,2	71,8
	405 nm	47,2	39,4	54,9	57,7	57,7	57,7	71,8	78,9	64,8	64,8	69,0	60,6
	455 nm	62,7	59,2	66,2	56,3	46,5	66,2	63,4	63,4	63,4	59,9	57,7	62,0
# 2	365 nm	76,1	76,1	76,1	73,9	63,4	84,5	74,6	71,8	77,5	75,4	73,2	77,5
	405 nm	54,2	39,4	69,0	63,4	63,4	63,4	65,5	69,0	62,0	69,0	66,2	71,8
	455 nm	62,7	62,0	63,4	67,6	63,4	71,8	70,4	67,6	73,2	64,8	62,0	67,6
# 3	365 nm	62,0	63,4	60,6	62,7	74,6	50,7	64,8	66,2	63,4	64,1	60,6	67,6
	405 nm	55,6	38,0	73,2	62,7	49,3	76,1	70,4	71,8	69,0	67,6	73,2	62,0
	455 nm	65,5	66,2	64,8	69,7	60,6	78,9	70,4	66,2	74,6	69,7	67,6	71,8
Sans normalisation	365 nm	73,2	76,1	70,4	80,3	84,5	76,1	78,9	80,3	77,5	79,6	78,9	80,3
	405 nm	59,9	54,9	64,8	74,6	76,1	73,2	68,3	73,2	63,4	67,6	70,4	64,8
	455 nm	68,3	71,8	64,8	72,5	70,4	74,6	69,7	70,4	69,0	67,6	71,8	63,4



## ANNEXE G – RÉSULTATS DÉTAILLÉS ET COMPLETS DE LA CLASSIFICATION

SANS NORMALISATION		PCA + Knn			Boosted Trees			Random Forests			Bagging		
		Exa. (%)	Sens. (%)	Spec. (%)	Exa. (%)	Sens. (%)	Spec. (%)	Exa. (%)	Sens. (%)	Spec. (%)	Exa. (%)	Sens. (%)	Spec. (%)
Chaque modalité séparément	365 nm	73,2	76,1	70,4	80,3	84,5	76,1	78,9	80,3	77,5	79,6	78,9	80,3
	405 nm	59,9	54,9	64,8	74,6	76,1	73,2	68,3	73,2	63,4	67,6	70,4	64,8
	455 nm	68,3	71,8	64,8	72,5	70,4	74,6	69,7	70,4	69,0	67,6	71,8	63,4
	Refl.	64,8	70,4	59,2	46,5	38,0	54,9	62,0	60,6	63,4	59,2	57,7	60,6
	Raman	81,0	73,2	88,7	81,7	83,1	80,3	87,3	83,1	91,5	80,3	80,3	80,3
Utilisant les mêmes classificateurs C1=C2=C3=C4=C5=Cf	IFS + DRS + R	71,1	57,7	84,5	81,7	78,9	84,5	90,8	90,1	91,5	82,4	83,1	81,7
	IFS + R	73,9	54,9	93,0	87,3	83,1	91,5	94,4	94,4	94,4	87,3	87,3	87,3
	DRS + R	48,6	0,0	97,2	85,9	84,5	87,3	92,3	88,7	95,8	86,6	87,3	85,9
	IFS + DRS	66,9	50,7	83,1	83,8	84,5	83,1	83,8	76,1	91,5	80,3	77,5	83,1
Utilisant le meilleur classificateur pour chaque modalité	IFS + DRS + R	86,6	84,5	88,7	83,1	83,1	83,1	88,0	85,9	90,1	89,4	90,1	88,7
	IFS + R	86,6	77,5	95,8	84,5	78,9	90,1	88,0	84,5	91,5	89,4	84,5	94,4
	DRS + R	49,3	0,0	98,6	88,0	87,3	88,7	88,0	87,3	88,7	88,0	87,3	88,7
	IFS + DRS	63,4	32,4	94,4	85,2	84,5	85,9	85,2	81,7	88,7	84,5	80,3	88,7

NORMALISATION # 1		PCA + Knn			Boosted Trees			Random Forests			Bagging		
		Exa. (%)	Sens. (%)	Spec. (%)	Exa. (%)	Sens. (%)	Spec. (%)	Exa. (%)	Sens. (%)	Spec. (%)	Exa. (%)	Sens. (%)	Spec. (%)
Chaque modalité séparément	365 nm	69,0	66,2	71,8	74,6	71,8	77,5	79,6	76,1	83,1	72,5	73,2	71,8
	405 nm	47,2	39,4	54,9	57,7	57,7	57,7	71,8	78,9	64,8	64,8	69,0	60,6
	455 nm	62,7	59,2	66,2	56,3	46,5	66,2	63,4	63,4	63,4	59,9	57,7	62,0
	Refl.	64,8	70,4	59,2	46,5	38,0	54,9	61,3	64,8	57,7	59,2	56,3	62,0
	Raman	81,0	73,2	88,7	81,7	83,1	80,3	83,8	81,7	85,9	83,8	81,7	85,9
Utilisant les mêmes classificateurs C1=C2=C3=C4=C5=Cf	IFS + DRS + R	85,2	78,9	91,5	85,9	83,1	88,7	86,6	87,3	85,9	86,6	83,1	90,1
	IFS + R	81,0	66,2	95,8	83,1	83,1	83,1	90,8	90,1	91,5	90,8	91,5	90,1
	DRS + R	48,6	0,0	97,2	85,9	84,5	87,3	88,7	84,5	93,0	88,7	85,9	91,5
	IFS + DRS	64,8	33,8	95,8	81,7	77,5	85,9	83,8	85,9	81,7	75,4	76,1	74,6
Utilisant le meilleur classificateur pour chaque modalité	IFS + DRS + R	69,0	47,9	90,1	91,5	88,7	94,4	90,1	88,7	91,5	89,4	84,5	94,4
	IFS + R	73,2	52,1	94,4	91,5	88,7	94,4	90,8	88,7	93,0	92,3	90,1	94,4
	DRS + R	56,3	19,7	93,0	87,3	83,1	91,5	87,3	83,1	91,5	87,3	83,1	91,5
	IFS + DRS	62,7	32,4	93,0	81,7	81,7	81,7	80,3	81,7	78,9	83,8	84,5	83,1

NORMALISATION # 2		PCA + Knn			Boosted Trees			Random Forests			Bagging		
		Exa. (%)	Sens. (%)	Spec. (%)	Exa. (%)	Sens. (%)	Spec. (%)	Exa. (%)	Sens. (%)	Spec. (%)	Exa. (%)	Sens. (%)	Spec. (%)
Chaque modalité séparément	365 nm	76,1	76,1	76,1	73,9	63,4	84,5	74,6	71,8	77,5	75,4	73,2	77,5
	405 nm	54,2	39,4	69,0	63,4	63,4	63,4	65,5	69,0	62,0	69,0	66,2	71,8
	455 nm	62,7	62,0	63,4	67,6	63,4	71,8	70,4	67,6	73,2	64,8	62,0	67,6
	Refl.	64,8	70,4	59,2	46,5	38,0	54,9	57,7	56,3	59,2	54,9	52,1	57,7
	Raman	81,0	73,2	88,7	81,7	83,1	80,3	82,4	81,7	83,1	81,7	83,1	80,3
Utilisant les mêmes classificateurs C1=C2=C3=C4=C5=Cf	IFS + DRS + R	85,2	87,3	83,1	84,5	84,5	84,5	90,1	87,3	93,0	88,7	87,3	90,1
	IFS + R	87,3	87,3	87,3	84,5	84,5	84,5	93,7	91,5	95,8	89,4	91,5	87,3
	DRS + R	48,6	0,0	97,2	85,9	84,5	87,3	85,9	85,9	85,9	89,4	88,7	90,1
	IFS + DRS	73,9	60,6	87,3	84,5	81,7	87,3	81,7	77,5	85,9	84,5	78,9	90,1
Utilisant le meilleur classificateur pour chaque modalité	IFS + DRS + R	81,0	80,3	81,7	90,1	85,9	94,4	83,8	83,1	84,5	86,6	84,5	88,7
	IFS + R	78,9	73,2	84,5	85,9	81,7	90,1	86,6	84,5	88,7	85,9	83,1	88,7
	DRS + R	50,0	0,0	100,0	84,5	80,3	88,7	84,5	80,3	88,7	84,5	80,3	88,7
	IFS + DRS	68,3	52,1	84,5	90,1	88,7	91,5	90,1	88,7	91,5	89,4	88,7	90,1

NORMALISATION # 3		PCA + Knn			Boosted Trees			Random Forests			Bagging		
		Exa. (%)	Sens. (%)	Spec. (%)	Exa. (%)	Sens. (%)	Spec. (%)	Exa. (%)	Sens. (%)	Spec. (%)	Exa. (%)	Sens. (%)	Spec. (%)
Chaque modalité séparément	365 nm	62,0	63,4	60,6	62,7	74,6	50,7	64,8	66,2	63,4	64,1	60,6	67,6
	405 nm	55,6	38,0	73,2	62,7	49,3	76,1	70,4	71,8	69,0	67,6	73,2	62,0
	455 nm	65,5	66,2	64,8	69,7	60,6	78,9	70,4	66,2	74,6	69,7	67,6	71,8
	Refl.	64,8	70,4	59,2	46,5	38,0	54,9	62,7	64,8	60,6	54,9	52,1	57,7
	Raman	81,0	73,2	88,7	81,7	83,1	80,3	83,1	80,3	85,9	82,4	84,5	80,3
Utilisant les mêmes classificateurs C1=C2=C3=C4=C5=Cf	IFS + DRS + R	83,8	74,6	93,0	87,3	84,5	90,1	88,0	83,1	93,0	87,3	85,9	88,7
	IFS + R	85,9	76,1	95,8	85,2	84,5	85,9	87,3	84,5	90,1	87,3	84,5	90,1
	DRS + R	48,6	0,0	97,2	85,9	84,5	87,3	87,3	84,5	90,1	88,7	87,3	90,1
	IFS + DRS	66,9	39,4	94,4	76,8	76,1	77,5	81,0	74,6	87,3	75,4	77,5	73,2
Utilisant le meilleur classificateur pour chaque modalité	IFS + DRS + R	73,9	63,4	84,5	87,3	84,5	90,1	85,9	85,9	85,9	84,5	84,5	84,5
	IFS + R	47,2	7,0	87,3	88,7	87,3	90,1	86,6	85,9	87,3	88,0	87,3	88,7
	DRS + R	49,3	0,0	98,6	89,4	88,7	90,1	89,4	88,7	90,1	89,4	88,7	90,1
	IFS + DRS	59,2	28,2	90,1	76,1	77,5	74,6	75,4	78,9	71,8	75,4	78,9	71,8

**ANNEXE H – COURBES ROC DÉCRIVANT LA PERFORMANCE DE LA CLASSIFICATION  
COMBINÉE OPTIMISÉE POUR *BOOSTED TREES*, SANS NORMALISATION POUR IFS**

