POLYPUBLIE

Développement d'une sonde portable d'imagerie Raman pour guider l'exérèse de tumeur

Karl St-Arnaud

Document en libre accès dans PolyPublie
Open Access document in PolyPublie

Date	2017
Type	Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis Mémoire de maîtrise/Master's thesis
URL de PolyPublie PolyPublie URL	https://publications.polymtl.ca/2710/
Conditions d'utilisation Terms of use	© Tous droits réservés / All rights reserved
Référence Citation	St-Arnaud, K. (2017). Développement d'une sonde portable d'imagerie Raman pour guider l'exérèse de tumeur [Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie. https://publications.polymtl.ca/2710/

Détails de la thèse
Thesis details

Directeurs de recherche Advisors	Frédéric Leblond
Programme Program	Génie biomédical

Ce fichier a été téléchargé à partir de PolyPublie, le dépôt institutionnel de Polytechnique Montréal
This file has been downloaded from PolyPublie, the institutional repository of Polytechnique Montréal
https://publications.polymtl.ca

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

DÉVELOPPEMENT D'UNE SONDE PORTABLE D'IMAGERIE RAMAN POUR GUIDER L'EXÉRÈSE DE TUMEUR

KARL ST-ARNAUD

INSTITUT DE GÉNIE BIOMÉDICAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION

DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES

(GÉNIE BIOMÉDICAL)

AOÛT 2017

© Karl St-Arnaud, 2017.

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé:

DÉVELOPPEMENT D'UNE SONDE PORTABLE D'IMAGERIE RAMAN POUR GUIDER L'EXÉRÈSE DE TUMEUR

présenté par : ST-ARNAUD Karl

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

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

Mme PÉRIÉ-CURNIER Delphine, Doctorat, présidente

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

M. CÔTÉ Daniel, Ph. D., membre

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, j'aimerais remercier mon directeur de recherche Frédéric Leblond qui m'a permis d'accomplir l'un de mes premiers stages dans son laboratoire où j'ai développé mon intérêt pour l'ingénierie biomédicale. Un grand merci pour m'avoir permis d'accomplir un projet de maîtrise formateur et m'avoir épaulé tout au long du projet. Mais surtout, un grand merci pour m'avoir donné l'opportunité de participer à de nombreux projets qui m'ont permis d'acquérir beaucoup d'expériences en ingénierie. J'aimerais aussi remercier mes collègues de laboratoire qui m'ont épaulé durant mon projet. Merci à ma voisine de bureau Audrey Laurence pour ces bons conseils et son support moral tout au long de mon projet et son aide pour les charges de laboratoire du cours d'optique. Merci à Kelly Aubertin qui m'a assisté pour toute manipulation impliquant des tissus biologiques et qui m'a donné plusieurs bonnes idées d'expériences à faire pour mon projet. Merci à Wendy-Julie Madore pour ces conseils sur la formulation du texte pour le second article et pour son aide plus technique en optique. Merci à Mathias Strupler qui m'a beaucoup aidé à développer des habiletés en conception optique en répondant à mes nombreuses questions. Finalement, j'aimerais remercier mes collègues du laboratoire de radiologie optique, dont Amélie St-Georges Joannie Desroches, Mike Jermyn Catherine St-Pierre, Guillaume Sheehy et Leticia Angulo qui m'ont tous aidé à progresser à un certain moment au courant de mon projet.

J'aimerais aussi remercier le technicien Jean-Paul Lévesque qui a toujours été disponible pour répondre à mes questions techniques et ce peu importe le moment où je passais. Je voudrais aussi remercier les techniciens Yves Leblanc et Evgueni Babian qui m'ont aidé dans l'assemblage du montage final.

Merci à mes collègues de bureau pour l'ambiance de travail super. Merci au groupe du midi pour les discussions enrichissantes, vos conseils et les moments permettant de décrocher du travail.

Finalement, j'aimerais remercier nos partenaires principalement Eric Marple de Emvision avec qui j'ai beaucoup parlé pour la conception de la sonde et qui m'a aidé avec plusieurs détails techniques du spectromètre. Merci aussi à l'équipe de ODS médical qui a répondu à plusieurs de mes questions sur la programmation de la caméra.

RÉSUMÉ

Suite au diagnostic d'un cancer, l'un des premiers traitements appliqués est la résection du tissu cancéreux par un chirurgien. Afin d'assurer le meilleur pronostic au patient, il est important que le chirurgien minimise la quantité de tissu et de cellules cancéreuses résiduels après la chirurgie puisque celles-ci augmentent la probabilité de récurrence du cancer. Dû au manque actuel d'outils permettant de guider le chirurgien, ce dernier doit bien souvent utiliser l'inspection visuelle et la palpation des tissus pour identifier la nature de ces derniers. Ces techniques sont très subjectives et elles ne sont généralement pas assez sensibles pour identifier les infiltrations de cellules cancéreuses ce qui mène souvent à une résection incomplète ou trop agressive des tissus. Il existe donc un réel besoin pour un instrument capable de guider le chirurgien afin de minimiser les risques associés à la résection et d'assurer une exérèse plus complète de la tumeur. Dans les dernières années, plusieurs sondes basées sur la spectroscopie Raman ont démontré leur potentiel pour guider le chirurgien dans la résection des tissus cancéreux en utilisant le contraste moléculaire des tissus. La plupart des implémentations actuelles se présentent sous la forme de sondes d'acquisition ponctuelle ou d'aiguilles dont le volume d'interrogation est restreint à moins de 500 µm de diamètre. D'autre part, le développement d'une sonde d'imagerie Raman ayant un plus grand champ de vue pourrait permettre une analyse moléculaire contextuelle du tissu atteint et ainsi améliorer la localisation des marges et des infiltrations de la tumeur. Dans ce mémoire, deux preuves de concepts de sondes d'imagerie Raman sont présentées. Ceux-ci ont démontré le potentiel futur de développer une sonde d'imagerie Raman capable d'imager un champ de vue de quelques millimètres de diamètre pour guider le chirurgien dans la résection de tumeur.

Une première preuve de concept de sonde d'imagerie Raman a été assemblée pour démontrer la possibilité d'utiliser une matrice cohérente de fibres optiques pour faire de l'imagerie Raman à travers un câble flexible. La reconstruction des images hyperspectrale s'est faite à partir d'un filtre accordable à base de cristaux liquides et d'une caméra EMCCD. Le système a démontré sa capacité à reconstruire des images Raman sur un champ de vue de 25 mm^2 avec une résolution spatiale de 55 µm. Un spectre Raman est associé à chaque pixel de l'image couvrant la plage spectrale de 453 à 1749 cm^{-1} avec une résolution moyenne de 95 cm^{-1}. Pour valider les performances de la nouvelle sonde d'imagerie, des spectres individuels acquis par celle-ci ont été comparés à des spectres acquis par une sonde ponctuelle ayant déjà fait ses preuves. Une forte

corrélation avec un coefficient de Pearson moyen R = 0.82 a été observée entre les spectres acquis avec les deux sondes sur des tissus adipeux et musculaires de viande porcine. La sonde d'imagerie a aussi démontré sa capacité à recréer des images moléculaires sur ces mêmes tissus en utilisant la classification par réseau de neurones. Toutefois, cette première implémentation s'est avérée très limitée par son très bas rapport signal sur bruit et sa faible résolution spectrale. De ce fait, plusieurs composants spectraux n'ont pas pu être imagés, limitant ainsi la possibilité du système à classifier des tissus dont le contraste moléculaire est plus faible telle que les tissus cancéreux et les tissus sains. De plus, cette première implémentation n'a pas permis de complètement refléter le concept d'une sonde facilement malléable avec des ports d'illumination et de détection séparés. Il demeure qu'il s'agit de la première utilisation dans la littérature d'une matrice cohérente de fibres pour faire de la spectroscopie Raman sur un champ de vue de quelques millimètres sur des échantillons biologiques.

Une deuxième preuve de concept a été assemblée dans le but de surmonter les limitations de la première implémentation et d'atteindre des spécifications plus près des requis pour l'incorporation en clinique. Le but principal de cette deuxième implémentation consistait à reproduire des spectres Raman similaires à ceux de la sonde ponctuelle sur un champ de vue de quelques millimètres. La nouvelle sonde a été construite en utilisant la même matrice de fibres optiques, mais en changent le système de détection pour un miroir rotatif combiné à un spectromètre d'imagerie afin d'accroître le rapport signal sur bruit et la résolution spectrale. La sonde a été redésignée de sorte à combiner l'illumination et la détection à l'intérieur d'un même port. Le système final a démontré sa capacité à recréer des spectres Raman avec une résolution spectrale de 6 cm^{-1} sur un champ de vue de 14 mm^2 et une résolution spatiale supérieure à 115 µm. La meilleure résolution spectrale a permis l'identification de plusieurs pics Raman déjà répertoriés dans la littérature associés au contenu en protéine et en lipides des tissus de viande porcine et du cerveau de veau. La comparaison des spectres individuels du nouveau système avec la sonde ponctuelle a démontré une meilleure corrélation avec un coefficient de Pearson R>0.85. En utilisant les ratios entre les pics de protéines et de lipides, il a été possible de mettre en contraste les tissus adipeux et musculaires sur la viande porcine et la matière blanche et grise sur le cerveau de veau. Le système présenté dans ce projet de maîtrise pourrait potentiellement être adapté et utilisé à titre de sonde ou d'endoscope pour guider les chirurgies et ainsi assurer une résection plus complète des tumeurs.

ABSTRACT

One of the first line of defense against solid cancer is the surgical resection of all the cancerous tissue by a surgeon. Residual cancer tissue and cells left after the surgery directly impact patient outcome with a higher probability of recurrence, therefore complete resection is important to ensure the best patient prognosis. From the actual lack of surgical guidance instruments, most of the time the surgeon must rely on visual inspection and palpation of the tissue. Those techniques are highly subjective and their lack of sensibility for detecting cancerous cell infiltration often leads to incomplete or overly aggressive resection. There is currently a need for surgical guidance instruments that could help the surgeon perform a more complete cancer resection while improving the safety of the procedure. Raman spectroscopy has shown great promise in the development of fiber-optic probes that have the potential to help the surgeon differentiate between cancerous and normal tissue based on molecular contrast. Up to now, most development led to single point probe or needle with interrogation volumes of less than 500 µm diameter. However, spatial registration of multiple spectra through a mesoscopic wide-field Raman probe could provide clinicians with molecular contextual information to facilitate the localization of tumor margins and infiltration. Here we present two proofs of concepts towards the development of a wide-field Raman probe that could potentially help surgeons in tumor margin assessment.

A first proof-of-concept study shows that spontaneous Raman spectroscopy could be achieved on a large field-of-view through a flexible cable using a coherent bundle of fibers. Reconstruction of hyperspectral images was done using a liquid crystal tunable filter combined with an EMCCD camera. We demonstrated that the developed system is able to recreate a Raman image over a field of view of 25 mm^2 with a spatial resolution of 55.7 µm through a flexible cable. Each pixel of the Raman image formed a Raman spectrum covering the spectral range from 453 to 1749 cm^{-1} with an average spectral resolution of 95 cm^{-1}. Individual fat and adipose tissue of porcine meat spectra of the Raman image correlated well with spectra acquired with an established single point Raman probe with an average Pearson correlation factor of 0.82. Tissue maps were reconstructed based on the molecular contrast generated by Raman spectroscopy using neural network classification. However, this first implementation was limited by the very low signal to noise ratio and a poor spectral resolution. This does not allow the detection of important spectral

features required for classification of tissue with subtler molecular differences as cancerous tissue. In addition, the system implementation did not completely reflect the intention to develop a handheld probe with two separate systems to perform the illumination and detection. Nonetheless, this proof of concept was the first in the literature to show a wide-field Raman spectroscopy over a few millimeters through a coherent bundle of fibers on biological samples.

A second proof-of-concept was designed to overcome the limitations of the previous system and to reach suitable specifications for clinical translation. The principal goal of this second prototype was to collect spectra comparable to the established single point Raman probe over a large field of view of a few millimeters. The same coherent bundle fiber was used, with a new detection system involving a rotating mirror combined with an imaging spectrometer to increase spectral resolution and signal to noise ratio. The probe was redesigned to combine the illumination and detection through one end. The system provided Raman spectrum with spectral resolution of 6 cm^{-1} in each pixel of a $14mm^2$ image with a spatial resolution below 115 µm. The improved spectral resolution has led to the identification of several peaks of proteins and lipids already reported in the literature over samples of calf brain and swine tissue. Individual spectra from Raman images compared well with the single point Raman probe measurements with a Pearson correlation factor above 0.85. Calf brain and porcine meat tissue maps were reconstructed using peak ratios associated with protein and lipids. Those maps clearly depicted the contrast between adipose and muscle tissue of porcine tissue and contrast between gray and white matter of calf brain. The system presented here have the potential to be translated for clinical use as an intraoperative probe or endoscope to guide the surgeon to minimize the amount of residual pathological tissue after surgery.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS III

RÉSUMÉ IV

ABSTRACT VI

TABLE DES MATIÈRES VIII

LISTE DES TABLEAUX XI

LISTE DES FIGURES XII

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS XV

CHAPITRE 1 INTRODUCTION 1

CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE 4

2.1 Spectroscopie Raman : Théorie et méthodes 4

2.1.1 Diffusion Raman 4

2.1.2 Autofluorescence des tissus 10

2.1.3 Types et techniques de spectroscopie Raman 12

2.1.4 Traitement des données 15

2.2 Instruments d'imagerie Raman 17

2.2.1 Les spectromètres 17

2.2.2 Les caméras 19

2.2.3 Source de bruit des caméras 21

2.3 Imagerie Raman 23

2.3.1 Technique d'imagerie Raman 23

2.3.2 Les sondes d'imagerie 26

2.3.3 Imagerie hyperspectrale avec une matrice cohérente de fibres optiques 28

2.4 Spectroscopie Raman en oncologie 29

CHAPITRE 3 OBJECTIFS DU PROJET 33

CHAPITRE 4 ARTICLE 1: WIDE-FIELD SPONTANEOUS RAMAN SPECTROSCOPY IMAGING SYSTEM FOR BIOLOGICAL TISSUE INTERROGATION 35

4.1 Mise en contexte 35

4.2 Wide-field spontaneous Raman spectroscopy imaging system for biological tissue interrogation 36

4.2.1 Abstract 36

4.2.2 Introduction 37

4.2.3 Methods 39

4.2.4 Results and discussions 42

4.2.5 Conclusion 44

4.2.6 References 46

CHAPITRE 5 ARTICLE 2: DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF A HYPERSPECTRAL RAMAN IMAGING SYSTEM FOR MESOSCOPIC TISSUE MOLECULAR CHARACTERIZATION 47

5.1 Mise en contexte 47

5.2 Development and characterization of a hyperspectral Raman imaging system for mesoscopic tissue molecular characterization 48

5.2.1 Abstract 49

5.2.2 Introduction 50

5.2.3 Materials and methods 53

5.2.4 Results 60

5.2.5 Discussion and conclusion 65

5.2.6 Acknowledgement 68

5.2.7 Disclosure of conflicts of interest 69

5.2.8 References 69
CHAPITRE 6 DISCUSSION GÉNÉRALE 74
6.1 Système de détection 74
6.1.1 Méthode de détection 74
6.1.2 Choix de caméra 77
6.1.3 Choix du spectromètre 78
6.2 Autofluorescence 79
6.2.1 Détection 79
6.2.1 Traitement des données 81
6.3 Algorithmes de classification 83
6.4 Limite pratique du système intermédiaire 85
6.4.1 Filtre dichroïque 85
6.4.2 Champ de vue 86
6.5 Comparaison entre les systèmes préliminaire et intermédiaire 86
CHAPITRE 7 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS 89
RÉFÉRENCES 91

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1. Comparaison entre les méthodes de reconstruction d'images hyperspectrales. 26

Tableau 2.2. Revue de quelques implémentations pratiques de systèmes utilisant une matrice de fibres compressée linéairement [75]–[78]. 28

Tableau 2.3. Principales études faites in vivo qui montrent le potentiel de la spectroscopie Raman pour guider le chirurgien lors de la résection de tumeur. 30

Table 5.1. Main Raman peaks found in calf brain and porcine tissue along with the main vibrational bonds and organic molecules at the origin of the optical contrast. 59

Table 5.2. Experimental and theoretical resolution of the Raman imaging system for different spectrometer slit widths. 61

Table 5.3. Raman imaging system technical specifications selected for the ex vivo tissue experiments. 63

Tableau 6.1. Comparaison pratique entre les différentes méthodes de reconstruction d'images hyperspectrales. 75

Tableau 6.2. Spécifications principales des systèmes de spectroscopie d'imagerie considérés dans le cadre du développement du système intermédiaire. 76

Tableau 6.3.Comparaison des spécifications principales entre le système préliminaire et le système intermédiaire. 87

LISTE DES FIGURES

Figure 2.1 a) Diagramme de Jablonski montrant les transitions énergétiques pour les différents types de diffusion de la lumière. b) Reconstruction d'un spectre Raman théorique (bleu) à partir des signatures spectrales de chaque composé moléculaire qui compose un échantillon biologique ; en mauve la triglycéride qui se retrouve principalement dans les lipides, en orange le squelette des acides aminés qui forme les protéines et en jaune les radicaux qui définissent chacun des 20 acides aminés.....5

Figure 2.2. En trait plein un exemple de spectre Raman brute acquit sur une joue humaine. En trait pointillé, deux estimations du spectre d'autofluorescence en utilisant deux algorithmes similaires de régression polynomiale développé par J. Zhao et al 2007 [23]. Reproduite avec autorisation de Applied Spectroscopy.....9

Figure 2.3. Schéma optique d'un système de microscopie Raman standard. L'ajout du sténopé permet de rendre le système confocal et l'addition de deux miroirs permet de balayer l'échantillon afin de recréer des images. Un filtre dichroïque est souvent utilisé dans ces systèmes pour combiner spatialement l'illumination et la détection. 11

Figure 2.4. Schéma de la sonde développée par la compagnie EMvision avec un exemple typique de spectre qu'il est possible d'obtenir sur un comprimé d'Acétaminophène [42]. La sous-figure en bas à droite montre la superposition de l'illumination (rouge) et de la détection (bleu) grâce à une lentille de collection. 14

Figure 2.5. Schéma typique d'un spectromètre en transmission. La lumière qui entre par la fente (F) est d'abord collimée par la lentille ($\boldsymbol{L1}$) et dispersée spectralement par le réseau de diffraction (RD). Chaque longueur d'onde est ensuite retransmise par la lentille ($\boldsymbol{L2}$) vers chaque pixel du détecteur (D). 18

Figure 2.6. a) Mode de lecture conventionnel, b) Mode de lecture "Fast Frame Transfer (FFT)" 20

Figure 2.7. Illustration des méthodes de reconstruction d'images hyperspectrales.....24

Figure 2.8. A) Comparaison d'une image prise en photographie standard et d'une image reconstruite en spectroscopie Raman sur un cerveau de rat ayant reçu des xénogreffes de cellules gliales associées à un glioblastome multiforme humain (B-D) Les images montrent respectivement des régions élargies de l'image A : sur la région tumorale (B), sur la jonction

entre les deux types de tissus (C) et le tissu sain (D) [96]. Reproduction avec autorisation de l'American association for the advancement of science (AAAS).....32

Figure 4.1. Schematic depiction of the wide-field spontaneous Raman spectroscopy system 39

Figure 4.2. Measurements made with a standard 1951 USAF resolution target to evaluate the FOV and the spatial resolution of the system. 40

Figure 4.3. Direct comparison of the measurements made with the single-point probe and the wide-field Raman spectroscopy system. The larger square in the photograph is the FOV of the imager; the circles are associated with the two tissue areas imagined with the single-point probe that were co-registered with average wide-field spectra acquired within the smaller squares. The spectra for both systems are shown with dotted and plain vertical lines drawn to highlight the characteristics of fatty acid and protein bands, respectively. 41

Figure 4.4. (a) Image on the left shows a white light photograph of the region imaged with the wide-field system. The image on the right is a false color rendering of the classification result. (b) Representative normalized spectra acquired with the wide-field system for adipose and muscle tissue. 45

Figure 5.1. (a) Image of the handheld probe showing the position of the detection lens and the ports associated with light excitation and detection; (b) Schematic depiction of the wide-field spontaneous Raman imaging system; (c) Representation of a hyperspectral image consisting of multiple concatenated spectrally-resolved line acquisitions.....53

Figure 5.2. Signal to background ratio (SBR) and spatial resolution for three different entrance spectrometers slit width: (a) SBR as a function of integration time; (b) spatial resolution as a function of the number of motor steps along the X and Y axes of the image. 62

Figure 5.3. (a) White-light image of a calf brain showing the area where a Raman image was acquired: the circles and rectangles represent the region where SPP and WFP are compared: (b) gray matter, (c) white matter. (d) White-light image of porcine meat sample showing the area where a Raman image was acquired: the circles and rectangles represent the region where SPP and WFP are compared: (e) adipose tissue, (f) muscle tissue. 63

Figure 5.4. Raman spectra acquired with the imaging system on ex vivo samples for: (a) white and gray matter in a calf brain, (b) adipose and muscle tissue in porcine meat. The main

tissue peaks are identified according to whether they are mostly associated with proteins (circles) or lipids (triangles). 64

Figure 5.5. Representative Raman spectra showing the peaks and spectral regions used to compute ratios associated with lipids and proteins for: (a) white and gray matter in calf brain, (b) adipose and muscle tissue in swine specimens. Reconstructed molecular images for: (c) calf brain and (d) swine muscle. For visualization purposes the frontier between different tissue types is depicted by a dash line. Green and blue color shows a high content in protein and lipid, respectively. 66

Figure 6.1. Comparaison du rapport signal sur bruit entre une caméra EMCCD et CCD pour un flux photonique similaire 78

Figure 6.2. Comparaison des spectres bruts d'Acétaminophène acquis avec le réseau de Wasatch et celui de Kaiser 79

Figure 6.3. Évolution du rapport signal sur bruit Raman en fonction du temps d'intégration pour un signal d'autofluorescence 100 fois supérieur à la partie Raman du signal correspondant à 1 photon/ms. 81

Figure 6.4. Exemples de spectres d'autofluorescence pour des tissus adipeux et musculaires de viande porcine. Deux spectres sont présentés pour chaque tissu pour montrer la similarité entre les spectres d'un même tissu et la différence entre deux types de tissus. 83

Figure 6.5. Schéma montrant le fonctionnement simplifié de la classification par réseau de neurones. L'algorithme construit un réseau à plusieurs étages où chaque neurone de chaque étage applique une opération mathématique sur les neurones ou les composantes spectrales de l'étage précédent. Ce réseau permet de classifier les spectres Raman selon la catégorie de tissu à laquelle ils sont susceptibles d'appartenir. Reproduction avec autorisation de l'auteur (Dr. Michael Jermyn). 84

Figure 6.6. Variation de la réponse spectrale du système en fonction du champ de vue dans l'image. 86

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ANN	Réseaux de neurones artificiel (*Artificial neural network*)
CARS	Spectroscopie Raman cohérente Anti-Stoke (*Coherent Anti-Stoke Raman spectroscopy*)
CCD	Dispositif à couplage de charges (*Charge-Coupled Device*)
CRS	Spectroscopie Raman cohérente (Coherent Raman spectroscopy)
EMCCD	Dispositif à couplage de charges à multiplication d'électrons (*Electron Multiplying Charge-Coupled Device*)
FFT	*Fast Frame Transfer*
FOV	Champs de vue (*Field of view*)
GFP	Protéine fluorescente verte (*green fluorescente protein*)
H&E	Hématoxyline et Éosine
IRM	Imagerie par résonnance magnétique
MCF	Matrice cohérente de fibres
NA	Ouverture numérique (*Numerical Aperture*)
OD	Densité optique (*Optical density*)
PCA	Analyse par composants principaux (*Principal components analysis*)
PET	Tomographie par émissions de positrons (*Positron emission tomography*)
PIR	Proche infrarouge
SNR	Ratio signal sur bruit (*Signal to noise ratio*)
SpRS	Spectroscopie Raman spontanée (Spontaneous Raman spectroscopy)
SRS	Spectrocopie Raman stimulée (*Stimulated Raman spectroscopy*)
SVM	Machine à vecteur de support (*Support vector machine*)
VPH	Réseau holographique de phase volumique (*Volume phase holographic grating*)

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

Suite au diagnostic d'un cancer, l'un des traitements les plus communs est la résection de la masse tumorale par un chirurgien. Il a été démontré à travers plusieurs études que la proportion de tissus cancéreux retirés avait un impact direct sur la probabilité de récurrence du cancer chez le patient [1]–[4]. C'est pourquoi lorsqu'il est possible une marge externe à la tumeur est retirée afin d'assurer qu'il n'y ait aucun tissu pathologique résiduel après la chirurgie. Cependant, pour certains types de cancers comme pour le cancer du cerveau et du pancréas, il n'est pas toujours possible de retirer une marge externe sécuritaire à cause de la nature vitale des tissus avoisinants [5], [6]. Dans d'autres situations comme pour le cancer du sein, une résection plus conservatrice peut être demandée pour des raisons cosmétiques [7]. Dans ces situations le chirurgien doit alors retirer la masse tumorale en découpant celle-ci selon ses marges en conservant le plus de tissus non touchés par la tumeur.

Les systèmes d'imagerie standard pour détecter et déterminer le volume occupé par une tumeur sont l'imagerie par résonnance magnétique (IRM), l'imagerie nucléaire, l'imagerie par ultrasons ou la tomographie par émissions de positrons (PET). Toutefois, l'utilisation de ces instruments durant la chirurgie est complexe et souvent impraticable puisque ceux-ci nécessitent généralement l'immersion du patient dans l'instrument. Les méthodes de guidance durant la chirurgie varient pour différents types de cancer. Pour le cancer du cerveau, la co-registration des images acquises avant la chirurgie à travers le microscope chirurgical est généralement utilisée pour guider le chirurgien. Cependant, la précision de cette méthode est limitée à quelques millimètres près des marges de la tumeur à cause du mouvement des organes durant la chirurgie [8]–[10]. De plus, cette technique est très coûteuse, ainsi pour plusieurs types de cancer l'inspection visuelle et la palpation des tissus demeurent les techniques les plus couramment utilisées pour guider le chirurgien. Toutefois, ces deux techniques sont très subjectives et ne permettent pas de localiser les infiltrations qui se trouvent en marge de la masse tumorale principale ce qui mène souvent à une résection incomplète ou trop agressive des tissus. Il existe donc un réel besoin pour un instrument capable de guider le chirurgien afin de minimiser les risques associés à la résection et d'assurer une exérèse plus complète de la tumeur.

Pour répondre à cette problématique, il y a eu dans les dernières années plusieurs grandes avancées dans le développement de méthodes d'imagerie optiques pour guider le chirurgien. Ces

techniques peuvent être utilisées dans le contexte intra-opératoire et ainsi guider le chirurgien en temps réel contrairement aux systèmes d'imagerie standard tels que l'imagerie par ultrasons, le PET scan et l'IRM [11]. Parmi ces technologies, plusieurs ont démontré leurs potentiels dont l'imagerie par fluorescence [12], la tomographie par cohérence optique, l'imagerie par réflectance diffuse [13] et la spectroscopie Raman [14]. L'imagerie par fluorescence permet de faire ressortir le contraste de certains biomarqueurs par l'injection d'agents de contraste qui se concentrent principalement au niveau de la tumeur. La tomographie par cohérence optique permet quant à elle d'augmenter le contraste entre les tissus ayant des organisations cellulaires et des compositions distinctes alors que la réflectance diffuse permet de discriminer les tissus basés sur la concentration de diffuseurs et d'absorbeurs à l'intérieur de ceux-ci. La spectroscopie Raman est une technique prometteuse dans le domaine de l'oncologie. Elle se base sur la diffusion inélastique de la lumière pour faire ressortir le contraste moléculaire des tissus. Contrairement à l'imagerie par fluorescence, aucun agent de contraste ne doit être administré et elle permet d'obtenir des spectres contenant typiquement plus d'informations sur le contenu moléculaire des tissus que les autres modalités [15].

Basée sur le contraste moléculaire préexistant entre les différents types de cellules, la spectroscopie Raman a le potentiel de discriminer les tissus cancéreux des tissus normaux [16]. Cependant, le signal provenant de la diffusion Raman est très faible et nécessite souvent un appareillage d'illumination et de détection complexe et volumineux. Avec le développement de ces technologies et la miniaturisation des composants optiques dans les dernières années, plusieurs instruments de spectroscopie Raman appliqués au domaine de l'oncologie ont vu le jour. Parmi les récents développements, il y a des implémentations destinées à guider le chirurgien lors de la résection et d'autres applications qui visent à accélérer l'analyse histopathologique en utilisant le contraste moléculaire intrinsèque des tissus au lieu (ou en complément) de la coloration à l'éosine et l'hématoxyline (H&E) actuellement utilisée en pathologie. Les instruments développés pour guider le chirurgien se présentent généralement sous la forme de sonde ponctuelle qui collecte le signal Raman en un seul point faisant moins de quelques centaines de microns de diamètre [17]. Le signal obtenu est ensuite comparé (souvent à l'aide d'algorithmes d'apprentissage machine) à une banque de données permettant de classifier le tissu comme normal ou cancéreux. Les instruments destinés au pathologiste quant à eux se présentent souvent sous la forme de microscopes volumineux qui permettent de recréer des

images Raman. Pour le moment, les sondes intra-opératoires sont souvent restreintes à l'analyse ponctuelle alors que les systèmes d'imagerie sont très volumineux et leur champ de vue d'analyse se restreint à quelques centaines de microns.

L'objectif de ce projet est d'aller au-delà des sondes ponctuelles en créant une sonde d'imagerie Raman capable de récréer des images moléculaires de tissus sur un champ de vue de quelques millimètres. Cette sonde pourrait être utilisée pour guider le chirurgien durant la chirurgie en délimitant de manière précise les marges de la tumeur et ainsi minimiser les risques associés à la résection de tissus toute en minimisant la quantité de tissus pathologiques résiduels après la chirurgie.

Organisation générale du mémoire

Le mémoire se divise en sept sections incluant cette introduction. Tout d'abord, la revue de littérature abordera les aspects théoriques essentiels à la compréhension du mémoire incluant une description de la diffusion Raman et des méthodes qui permettent d'acquérir des images. Deux sous-sections présenteront les instruments essentiels à la reconstruction d'images hyperspectrales et les méthodes permettant d'acquérir ces données. Cette même section présentera aussi une revue des études pertinentes du domaine pour mieux comprendre les décisions conceptuelles prises tout au long du mémoire. Après avoir revu les notions théoriques essentielles, une section présentera les objectifs principaux du projet dans le contexte de la recherche actuelle en spectroscopie Raman appliquée au domaine de l'oncologie. Deux sections aborderont ensuite le travail accompli durant la maîtrise sous la forme de deux articles qui relatent chacun l'implémentation et les résultats obtenus à partir des deux systèmes d'imagerie Raman développés au courant du projet de maîtrise. Ensuite, la discussion abordera des aspects qui n'ont pas été traités dans les deux articles tels que les détails techniques du choix du système de détection, les limitations occasionnées par le signal d'autofluorescence et les limites pratiques du système intermédiaire. La discussion se terminera par une brève comparaison des deux systèmes développés dans le cadre du projet de maîtrise. En conclusion, une revue des résultats importants qui découlent de ce projet sera présentée et le mémoire se terminera avec les avenues potentielles pour le futur du projet.

CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE

Pour bien placer le projet dans son contexte et introduire les aspects théoriques importants, nous présenterons ici une revue de littérature qui se divisera en quatre sous-sections. La première sous-section abordera les aspects théoriques de la diffusion Raman et donnera un aperçu du concept d'autofluorescence des tissus. Cette même sous-section présentera aussi les différentes techniques et les traitements de données couramment utilisés dans le domaine de l'oncologie pour isoler le signal Raman. La deuxième sous-section traitera du fonctionnement des principaux instruments de détection utilisés pour faire l'acquisition d'images Raman tel que les spectromètres et les caméras. Ensuite, les principales méthodes pour faire de l'imagerie hyperspectrale seront présentées. L'utilisation des matrices cohérentes de fibres optiques en spectroscopie Raman et dans des domaines connexes sera aussi abordée. Finalement, la dernière sous-section présentera les études qui ont démontré le potentiel de la spectroscopie Raman en contexte *in vivo* pour différencier les tissus sains des tissus cancéreux.

2.1 Spectroscopie Raman : Théorie et méthodes

2.1.1 Diffusion Raman

La diffusion Raman porte le nom du scientifique indien C. V. Raman qui a découvert cet effet en 1928 [18]. D'un point de vue quantique, le phénomène s'explique par la diffusion inélastique des photons lors de leur interaction avec la matière. Lorsqu'un photon de fréquence ω_0 interagit avec une molécule dont le mode propre de résonnance des charges ω_p n'est pas égale ω_0, il y a alors une interaction non résonnante à travers laquelle la molécule se retrouve temporairement dans un état dit « virtuel » ayant un temps de vie très cours avant de revenir vers son niveau d'énergie initial en réémettant un photon de même énergie; c'est le phénomène de diffusion élastique ou diffusion Rayleigh illustré à la Figure 2.1a. Cependant, dans les tissus biologiques pour approximativement 1 photon sur 10^8, il y a interaction entre la molécule et le photon causant la diffusion inélastique de ce dernier [19]. Les autres photons interagissent avec la matière suivant l'un des autres phénomènes d'interaction lumière-matière tels que la diffusion élastique, la fluorescence et l'absorption qui feront compétition au faible signal d'intérêt. La diffusion inélastique implique qu'une partie de l'énergie du photon est transférée sous forme d'énergie

vibrationnelle à la molécule, dont la désexcitation se fait vers un niveau d'énergie vibrationnelle plus élevé en réémettant un photon d'énergie légèrement plus faible; ce phénomène est appelé diffusion Raman Stoke. La différence d'énergie ω_{vib} entre le photon incident et celui réémis est directement proportionnelle à l'énergie d'un mode vibrationnel de la molécule. L'addition de tous les photons réémis par les différents modes vibrationnels permis d'une molécule forme un spectre Raman constitué de plusieurs raies spectrales qui représentent une signature propre à la molécule comme le montre la Figure 2.1b. Il est alors possible à partir du spectre Raman d'un échantillon de retrouver sa composition moléculaire à partir de la signature moléculaire connue des différents constituants. Il existe aussi un autre type de diffusion Raman – la diffusion Raman anti-Stoke – où la molécule se trouve initialement dans un état vibrationnel plus élevé et l'interaction lumière matière ramène la molécule vers l'état fondamental après excitation par un photon. Cependant, la probabilité associée à ce type de diffusion est beaucoup plus faible que la diffusion Raman Stoke et ne sera pas abordée dans le cadre de ce mémoire.

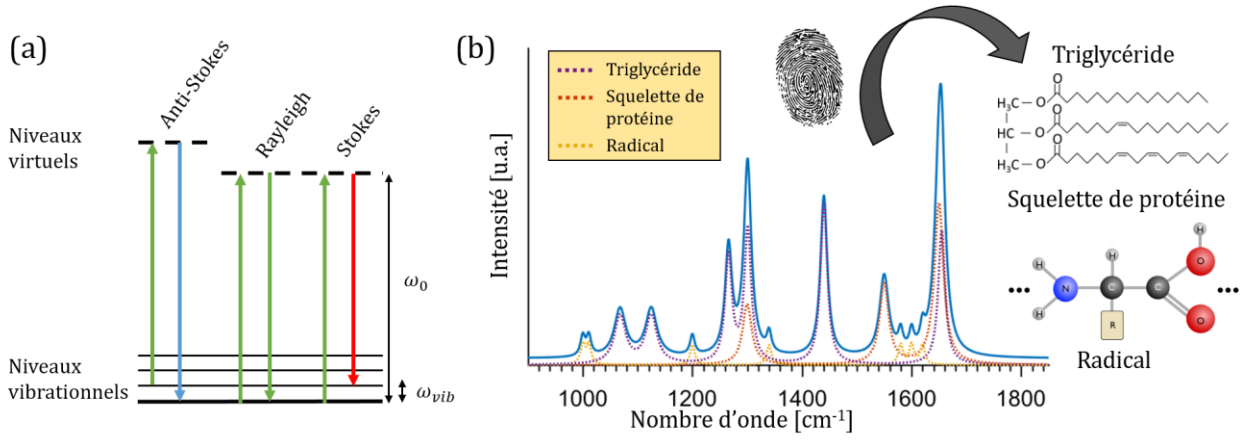

Figure 2.1 a) Diagramme de Jablonski montrant les transitions énergétiques pour les différents types de diffusion de la lumière. b) Reconstruction d'un spectre Raman théorique (bleu) à partir des signatures spectrales de chaque composé moléculaire qui compose un échantillon biologique ; en mauve la triglycéride qui se retrouve principalement dans les lipides, en orange le squelette des acides aminés qui forme les protéines et en jaune les radicaux qui définissent chacun des 20 acides aminés.

Les spectres Raman sont généralement présentés avec en abscisse une échelle en nombre d'onde (cm^{-1}) qui représente la différence d'énergie ω_{vib} du photon réémis par rapport au photon

incident. Les nombres d'ondes peuvent être convertis en longueur d'onde λ à partir de la longueur d'excitation λ_0 en utilisant l'équation (2.1) :

$$\omega_{vib}\,[cm^{-1}] = 10^7\left(\frac{1}{\lambda_0[nm]} - \frac{1}{\lambda[nm]}\right) \tag{2.1}$$

L'échelle de longueurs d'onde sera utilisée dans les sections sur les instruments de détection et l'imagerie hyperspectrale puisqu'elle se prête mieux aux explications en lien avec les technologies dans ces domaines.

Ce ne sont pas tous les modes vibrationnels d'une molécule qui sont actifs en spectroscopie Raman. Pour en faire la démonstration, nous pouvons traiter physiquement la diffusion de la lumière en utilisant une approche classique. Un champ électrique d'amplitude $\overrightarrow{E_0}$ et de fréquence ω_0, génère un moment dipolaire $\vec{\mu}$ lorsqu'il interagit avec la molécule :

$$\vec{\mu} = \tilde{\alpha}\overrightarrow{E_0}\cos(\omega_0 t) \tag{2.2}$$

Le moment dipolaire est proportionnel au champ électrique incident $\overrightarrow{E_0}$ et au tenseur de polarisabilité électronique $\tilde{\alpha}$ qui quantifie la facilité à déplacer le nuage électronique de la molécule et induire un moment dipolaire. Le champ électrique incident induit le mouvement des noyaux et des électrons à l'intérieur de la molécule. Pour une molécule constituée de N atomes, il y a 3N degré de liberté (trois degrés de liberté pour chaque atome). Cependant en spectroscopie vibrationnelle, il est préférable de travailler avec les 3N-6 (3N-5 si la molécule est linéaire) degrés de liberté vibrationnels Q qui représentent les modes de vibrations propres à la molécule (oscillation, cisaillement, etc.). Lorsque le gradient du moment dipolaire $\vec{\mu}$ selon l'un des modes propres Q_i de la molécule est non nul à la position d'équilibre de la molécule $\left(\frac{\partial\vec{\mu}}{\partial Q_i}\right)_0 \neq 0$, celle-ci est active en infrarouge.

Pour qu'une molécule soit active en spectroscopie Raman, c'est le gradient du tenseur de polarisabilité $\tilde{\alpha}$ qui doit être non nul selon l'un de ses modes propres $\left(\frac{\partial\tilde{\alpha}}{\partial Q_i}\right)_0 \neq 0$. La polarisabilité $\tilde{\alpha}$ dépend des degrés de liberté vibrationnels puisque la facilité à déplacer le nuage électronique varie en fonction de la position des atomes dans la molécule. Ainsi, en considérant de faibles vibrations d'amplitude dQ_i selon un mode de vibration Q_i, le tenseur de polarisabilité $\tilde{\alpha}$ pour ce

mode de vibration peut s'exprimer comme un développement de Taylor autour de l'état de repos vibrationnel de la molécule :

$$\tilde{\alpha}(Q_i) = \tilde{\alpha}_0 + \left(\frac{d\tilde{\alpha}}{dQ_i}\right)_0 dQ_i \tag{2.3}$$

Pour un mouvement oscillatoire des atomes à une fréquence ω_{vib}, l'oscillation d'un mode dQ_i prends la forme $dQ_i = Q_0 \cos(\omega_{vib} t)$ où Q_0 est l'amplitude du mode de vibration. Ainsi en exprimant l'équation (2.2) avec la nouvelle valeur de $\tilde{\alpha}(Q_i)$ formulée à l'équation (2.3), le moment dipolaire prend maintenant la forme de l'équation (2.4) :

$$\vec{\mu}(t) = \left[[\tilde{\alpha}_0 + \left(\frac{d\tilde{\alpha}}{dQ_i}\right)_0 Q_0 \cos(\omega_{vib} t)\right] \overrightarrow{E_0} \cos(\omega_0 t) \tag{2.4}$$

En utilisant l'identité trigonométrique $\cos(a * b) = \frac{1}{2}(\cos(a+b) + \cos(a-b))$, il est possible de réécrire l'équation du moment dipolaire de sorte à faire ressortir trois termes oscillants à trois fréquences différentes:

$$\begin{aligned} \vec{\mu}(t) = \tilde{\alpha}_0 \overrightarrow{E_0} cos(\omega_0 t) \\ + \frac{1}{2} Q_0 \left(\frac{d\tilde{\alpha}}{dQ_i}\right)_0 \overrightarrow{E_0} \cos([\omega_0 - \omega_{vib}]t) \\ + \frac{1}{2} Q_0 \left(\frac{d\tilde{\alpha}}{dQ_i}\right)_0 \overrightarrow{E_0} \cos([\omega_0 + \omega_{vib}]t) \end{aligned} \tag{2.5}$$

La première oscillation à la fréquence ω_0 est responsable de la diffusion Rayleigh réémise à la même fréquence que l'onde incidente (diffusion élastique). Les deux autres termes présentent des oscillations à des fréquences $\omega_0 - \omega_{vib}$ et $\omega_0 + \omega_{vib}$ qui représentent respectivement la diffusion Raman Stoke et anti-Stoke (diffusion inélastique). Comme le démontre l'équation (2.5), la molécule est active en spectroscopie Raman pour un mode de vibration Q_i seulement si le gradient de polarisabilité autour de la position d'équilibre de la molécule est non-nul. Plusieurs molécules telles que les molécules homodiatomiques sont inactives en spectroscopie infrarouge et actives en spectroscopie Raman puisque les règles de sélection sont différentes pour chaque processus. À l'inverse, d'autres molécules sont actives en infrarouge et inactives en Raman. Ceci

est particulièrement avantageux dans le cas de l'eau dont la section efficace en spectroscopie Raman est beaucoup plus faible qu'en infrarouge. La spectroscopie Raman permet ainsi de caractériser la composition moléculaire des tissus biologiques majoritairement composés d'eau alors qu'en spectroscopie infrarouge cela s'avère plus difficile à cause de la forte absorption de l'eau qui cache la contribution du signal associé aux molécules d'intérêt tel que les lipides et protéines [20]. Pour cette raison, la spectroscopie Raman se prête beaucoup mieux à des applications *in vivo* que la spectroscopie infrarouge souvent restreinte à des applications *ex vivo* où les échantillons doivent d'abord être asséchés et fixés [20].

Chaque mode d'oscillation associée à l'équation (2.5) agit comme un dipôle responsable de l'émission d'une oscillation secondaire dont l'intensité dépend du carré de la dérivée seconde du moment dipolaire induit $\vec{\mu}(t)$ [21] :

$$I_{\mu} = \frac{\left|\ddot{\vec{\mu}}(t)\right|^2}{6\pi\epsilon_0} \tag{2.6}$$

En développant l'équation (2.6) et en gardant seulement les termes associés à l'intensité de la diffusion Raman Stoke I_S qui oscille à la fréquence $\omega_0 - \omega_{vib}$; il est possible de constater que l'intensité du signal Raman d'intérêt est proportionnelle au carré du gradient de polarisabilité, à l'intensité de la source de lumière incidente E_0^2 et de la fréquence incidente de celui-ci ω_0 :

$$I_S \propto \left(\frac{d\alpha}{dQ_i}\right)_0^2 E_0^2(\omega_0 - \omega_{vib})^4 \tag{2.7}$$

Pour une illumination à plus courte longueur d'onde (plus haute fréquence), l'intensité Raman est plus grande, mais le signal d'autofluorescence dans les tissus est plus élevé. De plus, les tissus biologiques présentent plus d'absorption à basse longueur d'onde ce qui limite le signal détecté en rétrodiffusion et peut potentiellement être dommageable pour les tissus. Dans la littérature, la longueur d'onde de 785 nm est souvent privilégiée puisqu'elle offre un bon compromis sur le rapport d'intensité entre le signal Raman et celui d'autofluorescence [22]. De plus, cette longueur d'onde se trouve dans l'une des fenêtres optiques des tissus biologiques, ce qui limite la compétition entre le processus d'absorption et de diffusion inélastique. Une illumination à 785 nm permet aussi de travailler avec des détecteurs à base de silicium qui possèdent une efficacité

quantique très grande et permettent ainsi de détecter un maximum du signal optique réémis. Pour obtenir une plus forte réponse Raman, l'intensité de la source E_0^2 peut aussi être augmentée, cependant le « American National Standard for safe use of lasers » (ANSI Z136.1) régit les puissances lasers maximales qui peuvent être utilisées sur les tissus. Dans tous les cas, la spectroscopie Raman présente une section efficace beaucoup moins grande que d'autres méthodes d'imagerie comme la fluorescence qui possède une section efficace d'interaction de 8 à 10 ordres de grandeur plus élevée [23]. Toutefois, la spectroscopie Raman permet de faire ressortir le contraste moléculaire intrinsèque des tissus sans l'administration d'agents de contraste. De plus, le signal Raman est intrinsèquement de 100 à 1000 fois plus résolu spectralement qu'en fluorescence ce qui permet de faire une analyse plus précise pour des échantillons composés de plusieurs groupements moléculaires différents tels que les tissus biologiques [23].

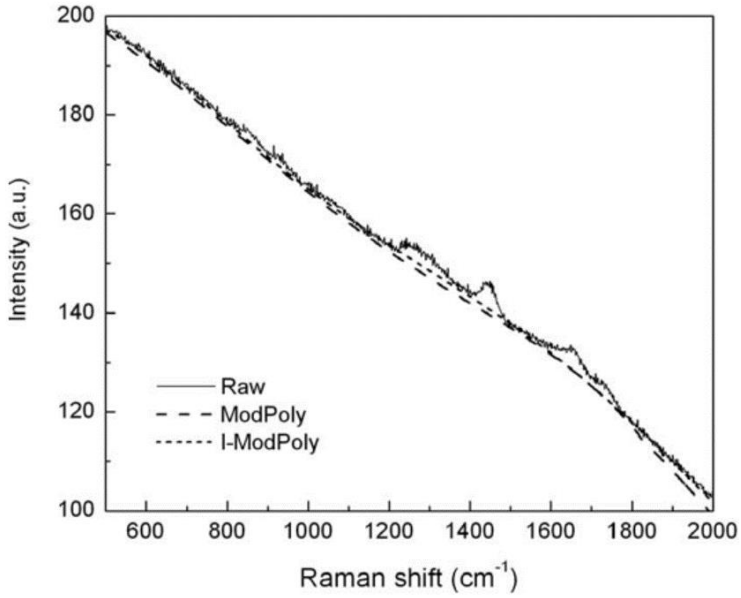

Figure 2.2. En trait plein un exemple de spectre Raman brute acquit sur une joue humaine. En trait pointillé, deux estimations du spectre d'autofluorescence en utilisant deux algorithmes similaires de régression polynomiale développé par J. Zhao *et al* 2007 [24]. Reproduite avec autorisation de Applied Spectroscopy

2.1.2 Autofluorescence des tissus

La fluorescence est l'une des interactions lumière-matière qui fait compétition à la diffusion inélastique. Lorsqu'un photon possède l'énergie nécessaire, il peut être absorbé par la molécule et réémis à une plus grande longueur d'onde suite à une perte d'énergie sous la forme d'une vibration ou d'une rotation de la molécule. L'absorption d'un photon est caractérisée par la transition d'un électron vers un état plus élevé (phénomène résonnant) contrairement à la diffusion où la transition se fait vers un état virtuel (phénomène non résonnant). Les molécules responsables de la fluorescence sont appelées fluorophores et sont caractérisées par une courbe d'efficacité quantique d'excitation et d'émission. En imagerie par fluorescence, des molécules comme la protéine fluorescente verte (GFP) ou des fluorophores à base de porphyrine ayant de fortes efficacités quantiques sont administrés comme agent de contraste. Toutefois, même sans l'administration d'agents de contraste, les tissus présentent de la fluorescence intrinsèque nommée autofluorescence provenant des fluorophores biologiques qui composent les tissus. Différents fluorophores tels que le tryptophane, la pyrimidine et la flavine sont principalement présents dans les cellules alors que d'autres comme l'élastine et le collagène se retrouvent dans la matrice extracellulaire des tissus [25].

Puisque la fluorescence est un processus beaucoup plus efficace que la diffusion Raman, le signal de fluorescence généré par ces fluorophores peut être jusqu'à 10 ordres de grandeur plus élevé que le signal Raman [23]. Pour minimiser le signal provenant de l'autofluorescence - dont l'efficacité atteint son maximum dans la région ultraviolet/visible du spectre - une longueur d'onde d'excitation plus grande dans le proche infrarouge (PIR) peut être utilisée. Toutefois, cela ne permet pas de s'affranchir totalement du signal d'autofluorescence dont l'amplitude est généralement plus élevée que le signal Raman et ce même dans la région PIR [26]. Pour soustraire le signal parasite d'autofluorescence, plusieurs solutions ont été proposées dans la littérature. Le signal Raman peut être isolé en utilisant une source accordable pour exciter subséquemment l'échantillon à deux fréquences très proches qui présenteront un signal d'autofluorescence similaire, mais un déplacement spectral du signal Raman [27], [28]. Une autre technique consiste à profiter du délai temporel entre l'émission Raman et l'émission en fluorescence en faisant une détection résolue temporellement [29]. Toutefois, ces techniques nécessitent de modifier le système optique par l'ajout de systèmes dispendieux comme des lasers à deux longueurs d'onde ou un détecteur et un laser ultrarapide. D'autres techniques s'appliquent

directement sur le traitement des données en utilisant une analyse par composants principaux [30], une régression des moindres carrée [31], une décomposition en ondelettes [32] ou une régression polynomiale [24] pour estimer et soustraire le signal d'autofluorescence. La régression polynomiale est l'une des méthodes les plus utilisées dans la littérature. Elle consiste à évaluer le signal d'autofluorescence à partir d'une régression polynomiale de degré entre 4 et 6 appliquée sur le spectre brut. L'évaluation se fait de manière itérative en retirant à chaque itération la contribution des pics susceptible d'appartenir au signal Raman avant d'appliquer une nouvelle régression polynomiale. Après l'atteinte d'un certain critère défini par l'utilisateur (*ex.* plus aucun pic n'est associé au spectre Raman) l'algorithme converge vers l'évaluation d'un signal d'autofluorescence qui est soustrait au spectre original pour obtenir le signal Raman estimé. La Figure 2.2 présente en ligne plaine un spectre typique collecté en spectroscopie Raman et en ligne pointillée deux spectres estimés à partir de deux algorithmes légèrement différents de régression polynomiale [24].

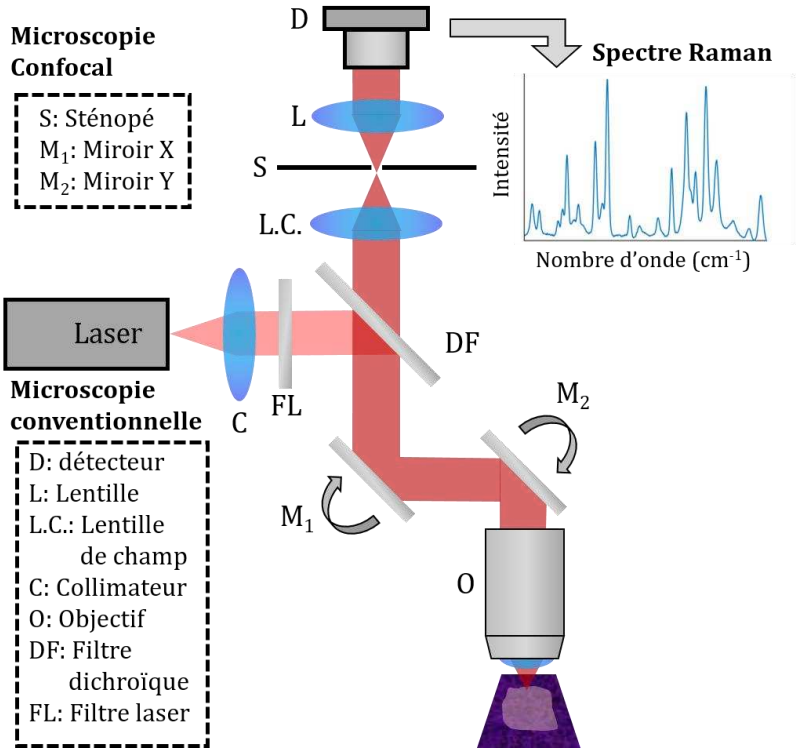

Figure 2.3. Schéma optique d'un système de microscopie Raman standard. L'ajout du sténopé permet de rendre le système confocal et l'addition de deux miroirs permet de balayer l'échantillon afin de recréer des images. Un filtre dichroïque est souvent utilisé dans ces systèmes pour combiner spatialement l'illumination et la détection.

2.1.3 Types et techniques de spectroscopie Raman

Ce mémoire traite principalement de la spectroscopie Raman spontanée (SpRS). Une brève revue de la spectroscopie Raman cohérente (CRS) sera aussi présentée pour mieux comprendre les choix de design qui ont été faits dans le cadre du projet.

Microscopie Raman

Un système de spectroscopie Raman sous sa forme la plus simple est constitué d'un laser qui illumine un échantillon à une fréquence ω_0 et un détecteur qui collecte le signal aux fréquences $\omega < \omega_0$. Cependant, puisque le signal Raman ($\omega < \omega_0$) est environ 8 ordres de grandeur plus faible que la diffusion Rayleigh ($\omega = \omega_0$), il est impératif de placer un filtre de densité optique (OD) au moins supérieure à 5 entre l'échantillon et le détecteur pour s'assurer que la diffusion élastique ne sature pas le senseur de la caméra. De plus, il est important de placer un filtre assurant une illumination la plus monochromatique possible puisque la largeur des raies spectrales du spectre Raman est proportionnelle à la largeur spectrale du laser d'illumination. Une implémentation simplifiée d'un montage de microscopie Raman est présentée à la Figure 2.3. Le laser est d'abord collimé et filtré par le filtre laser (passe-bande) de sorte à obtenir l'illumination la plus monochromatique possible. Il est ensuite redirigé vers l'échantillon par le filtre dichroïque et focalisé par un objectif sur l'échantillon. Le signal Raman est collecté à travers le même objectif et le filtre dichroïque permet au retour de soustraire la diffusion Rayleigh de sorte à n'avoir que le signal Raman qui se rend au spectromètre où se fait la décomposition spectrale du signal. Un filtre passe-haut peut être ajouté avant la détection pour diminuer la quantité de diffusion élastique résiduelle au niveau de la détection. Un sténopé peut être placé sur le chemin du retour au conjugué du plan objet afin d'assurer la confocalité du microscope et augmenter la résolution axiale [33]. La microscopie confocale est particulièrement intéressante pour imager des tissus biologiques puisqu'elle permet d'analyser un point axial précis sans collecter le signal parasite provenant de la diffusion des tissus situés de part et d'autre du plan focal. En insérant ensuite deux miroirs rotatifs dans le montage, il est possible de balayer l'échantillon pour recréer des images Raman. Puisqu'il est généralement difficile de placer des échantillons volumineux sous le champ de vue du microscope, les appareils de microscopies sont souvent restreints à des applications *ex vivo* ou *in vitro*. Quelques applications *in vivo* ont été proposées, mais elles se restreignent à l'analyse de modèles animaux. De plus, le temps

d'acquisition de ces instruments est généralement supérieur à 5 s par pixel ce qui rend l'imagerie d'échantillons pourvu de mouvement difficile [14]. La reconstruction d'images avec de tels systèmes se traduit par des temps d'acquisition pouvant atteindre entre 5-20h/mm^2 [34].

Sonde Raman

Depuis la fin du 20^e siècle, la miniaturisation des composants optiques a permis la conception de sondes d'acquisition ponctuelles mieux adaptées pour les applications *in vivo*. Celles-ci sont composées de plusieurs fibres optiques qui permettent de faire le relais entre le système d'illumination et de détection et l'échantillon à analyser. Contrairement à la microscopie Raman, ces sondes offrent un temps d'acquisition bien meilleur <1 s, mais leurs résolutions spatiales est limitée au diamètre d'illumination de la sonde qui fait généralement de 100 à 500 µm [14]. Ces sondes sont généralement composées d'une fibre d'illumination connectée directement à la source laser et d'une à dix fibres pour faire la collection du signal Raman alignée linéairement le long de la fente du spectromètre. Pour assurer la collection maximale de signal Raman, les fibres de collections doivent se trouver le plus près possible de la fibre d'illumination à l'embout de la sonde. Pour améliorer l'efficacité de la sonde, une surface de réfraction ou de réflexion peut être ajoutée à l'embout des fibres [35], [36]. L'une des difficultés majeures dans la conception de sondes est de filtrer le signal Raman non spécifique au tissu généré par le verre des fibres lors de l'illumination et de la collection [37]. Ce signal parasite augmente avec l'ouverture numérique de la fibre, mais il peut être minimisé en utilisant une fibre de silice dont la gaine possède une basse concentration en hydroxyle [38]. Différentes méthodes ont été proposées pour s'affranchir du signal des fibres telles que l'utilisation de fibres creuses [39] ou l'utilisation de réseaux de Bragg [40]. Cependant, l'utilisation de filtres interférentiels placés dans le chemin optique ou directement déposés à l'embout des fibres demeure la technique la plus répandue. Un filtre passe-bande placé au bout de la fibre d'illumination permet de rejeter tout signal Raman généré le long de la fibre. Un deuxième filtre coupe-bande ou passe-haut placé au bout des fibres de collection transmet le signal Raman, mais rejette la forte diffusion Rayleigh susceptible de généré un signal Raman à l'intérieur des fibres. Plusieurs concepts de sonde ont été proposés dans les dernières années; une revue complète du sujet fait état des avantages et désavantages de chacun de ces concepts [22]. La Figure 2.4 présente un exemple de sonde de 2.1 mm de diamètre développée par la compagnie EMvision LLC en Floride [41], une fibre centrale permet l'illumination à travers un filtre passe-bande sur une surface de 0.2 mm^2 alors que sept fibres assurent la

collection du signal à travers un filtre passe-haut. Cette sonde est maintenant utilisée par la compagnie ODS Medical qui commercialise une sonde Raman d'acquisition ponctuelle pour guider la résection de cancers du cerveau [42].

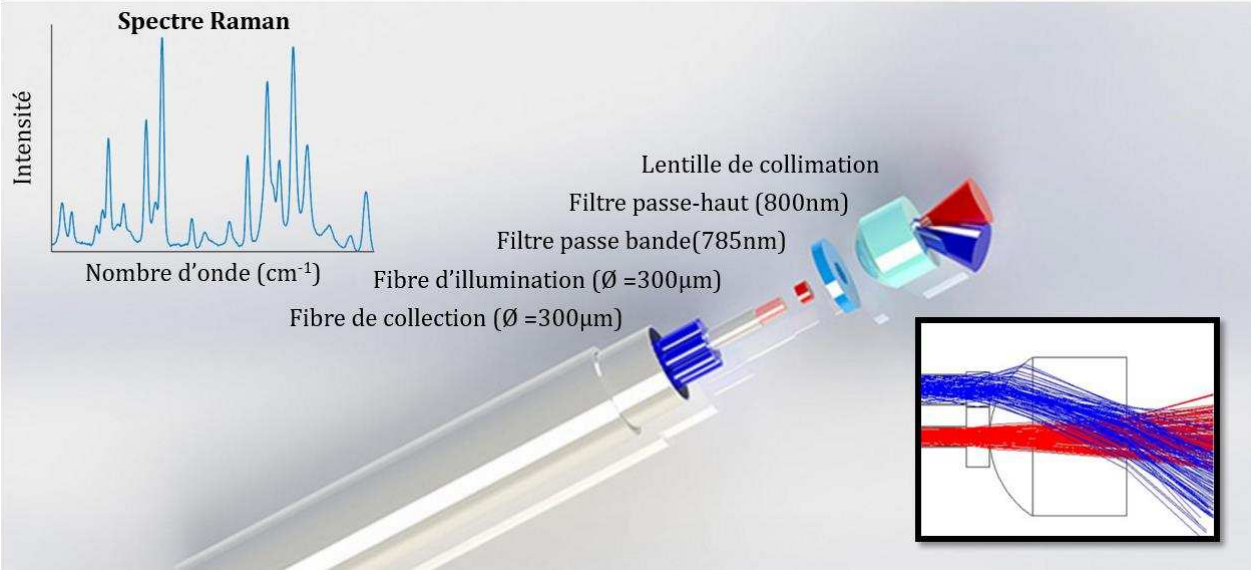

Figure 2.4. Schéma de la sonde développée par la compagnie EMvision avec un exemple typique de spectre qu'il est possible d'obtenir sur un comprimé d'Acétaminophène [43]. La sous-figure en bas à droite montre la superposition de l'illumination (rouge) et de la détection (bleu) grâce à une lentille de collection.

Spectroscopie Raman cohérente

La spectroscopie Raman cohérente (CRS) est une technique populaire pour faire de l'imagerie moléculaire puisqu'elle permet de reconstruire des images beaucoup plus rapidement que la SpRS [44]. Avec la CRS, le signal Raman émis par les différentes molécules est en phase ce qui permet d'obtenir un signal amplifié par rapport à la SpRS. Pour faire de la CRS, deux sources lasers pulsées de forte intensité avec des impulsions d'au plus quelques centaines de picosecondes doivent être focalisées avec un accord de phase sur l'échantillon. La différence de fréquence entre le laser de pompe ω_p et le laser Stoke ω_s doit correspondre à la fréquence de la vibration moléculaire à analyser ($\omega_p - \omega_s = \omega_{vib}$). Plusieurs techniques permettent de faire varier l'écart entre ω_p et ω_s de sorte à reconstruire un spectre Raman, mais la plus courante, consiste à utiliser une source ω_s accordable et de faire varier celle-ci par rapport à ω_p [44]. Puisque l'émission Raman n'a lieu que si l'accord de phase est respecté entre les deux sources, le

signal Raman est seulement émis du point où l'illumination est focalisée ce qui assure la confocalité. De plus, les méthodes de détection utilisées en CRS permettent de s'affranchir du signal d'autofluorescence des tissus [45]. Il existe principalement deux types d'implémentation de systèmes CRS soit la spectroscopie Raman cohérente Anti-Stokes (CARS) et la spectroscopie Raman stimulée (SRS). Ces deux méthodes ont respectivement démontré leur potentiel à reproduire des images moléculaires en temps réel en contexte *in vivo* sur des rats [46]–[48]. Il est important de spécifier que les images acquises en temps réel ont été obtenues en échantillonnant seulement quelques composantes spectrales associées aux protéines et aux lipides. La reconstruction d'images Raman complètes résolues spectralement nécessite de prendre plusieurs acquisitions en faisant varier ω_s, ce qui peut prendre plus de 60 s selon la résolution spectrale désirée [49]. Les systèmes de CRS sont généralement plus complexes puisqu'ils nécessitent deux sources d'illuminations qui doivent être alignées très précisément pour assurer l'accord de phase à l'échantillon. Leurs implémentations se présentent généralement sous la forme de microscope d'imagerie permettant d'imager de petites surfaces de moins de 1 mm^2 avec une résolution spatiale de quelques microns [45]. Quelques preuves de concept de sondes ont été proposées utilisant la spectroscopie CARS [50], mais leur implémentation est souvent limitée par différents facteurs tels que la difficulté à acheminer les deux sources lasers à travers la fibre en conservant l'accord de phase et la largeur d'impulsion temporelle des lasers. Il y a aussi des complications à la détection pour isoler le signal Raman des autres signaux non linéaire générés à travers la fibre [22].

2.1.4 Traitement des données

En spectroscopie Raman spontanée, le signal brut collecté dépend essentiellement de l'intensité du laser I, du temps d'intégration t et du nombre d'onde ω comme le montre l'équation (2.8) où R, B et D représente respectivement le signal Raman, le background et le signal de fond. Suite à l'acquisition du signal brut I_{raw}, plusieurs traitements de données doivent être appliqués dans le but d'isoler le signal Raman R.

$$I_{raw}(I,t,\omega) = E_v(v)[R(I,t,\omega) + B(I,t,\omega) + D(t,\omega)] \tag{2.8}$$

La première étape consiste à calibrer l'axe spectral de sorte à associer à chaque pixel de la caméra une valeur spectrale en nombre d'onde. Pour se faire, un échantillon qui présente des pics connus

tels que l'acétaminophène est utilisé pour trouver une fonction quadratique permettant de convertir la position des pixels en nombre d'onde [51]. Ensuite, une correction est effectuée pour corriger la réponse spectrale du système $E_\nu(\nu)$ qui dépend de la variation d'efficacité des différents composants optiques en fonction de la fréquence. La réponse spectrale du système peut être évaluée à partir d'un standard Raman développé par le National institute of Standards and Technology (NIST) qui possède une réponse de photoluminescence théorique connue [52]. Dans le cas où les spectres Raman sont acquis sur une image entière, une correction de l'efficacité spatiale peut être requise, pour corriger la variation de transmission du signal sur l'ensemble du champ de vue.

Suite à ces calibrations, les composantes du signal qui ne sont pas associées au spectre Raman peuvent être soustraites au spectre brut. D'abord, le signal provenant des sources d'illumination externes au système $D(t, \omega)$ est soustrait. Pour se faire, une mesure est prise avec la source laser éteinte pour estimer $D(t, \omega)$ et celle-ci est ensuite soustraite aux mesures subséquentes faites avec le même temps d'intégration. Ensuite, le background $B(I, t, \omega)$ associé à l'autofluorescence des tissus et au signal résiduel de diffusion élastique est soustrait en utilisant la méthode de régression polynomiale. Finalement, les sources de bruit telles que le bruit de lecture de la caméra et le bruit de grenaille qui affectent le signal sont généralement filtrées à partir d'un filtre de Savitsky-Golay [53].

Après avoir isolé le signal Raman $R(I, t, \omega)$, d'autres traitements peuvent être appliqués pour comparer différents spectres entre eux. Les spectres peuvent être normalisés en utilisant la normalisation par le maximum, la normalisation par rapport à la moyenne et à la variance ou la normalisation par rapport à un pic. Ensuite, une analyse par composants principaux (PCA) est généralement effectuée dans le but de réduire la taille des spectres en exprimant les spectres sous une nouvelle base spectrale où chaque observation spectrale est maintenant non corrélée linéairement aux autres. Cela permet d'exprimer les centaines de composantes spectrales en une trentaine de composants principaux qui exprime plus de 99% de la variabilité entre les différents spectres [54]. Ensuite en utilisant des algorithmes de classification tels que les réseaux de neurones (ANN) ou les machines à vecteur de support (SVM), les spectres peuvent être associés à un type de tissus (cancéreux ou normal).

2.2 Instruments d'imagerie Raman

Les spectromètres et les caméras sont deux instruments essentiels de détection utilisés en spectroscopie Raman. Ces instruments ont été beaucoup étudiés dans le cadre de ce projet. C'est pourquoi plusieurs concepts théoriques sur le fonctionnement de ceux-ci doivent être introduits pour bien comprendre les discussions qui suivront.

2.2.1 Les spectromètres

Un spectromètre standard est composé de cinq composants principaux : une fente d'entrée, un collimateur d'entrée, un réseau de diffraction, un collimateur de sortie et un détecteur. La lumière qui entre par la fente d'entrée est collimée avant d'être dispersée par le réseau de diffraction et renvoyée vers le deuxième collimateur qui forme l'image de la fente d'entrée dispersée spectralement sur le capteur. Chaque position spatiale du senseur sur l'axe perpendiculaire à la fente d'entrée est associée à une longueur d'onde λ. Il existe deux catégories de spectromètres optiques utilisés pour faire de la spectroscopie Raman qui se différencient par le fait que la lumière soit réfléchie ou transmise au niveau du réseau de diffraction et des collimateurs. Les spectromètres réflectifs sont constitués de deux miroirs concaves et d'un réseau de réfraction réflectif sur lequel sont gravées des structures périodiques qui réfléchissent la lumière à différents angles θ selon la longueur d'onde λ. Ce type de spectromètre permet d'imager une très grande plage spectrale et le réseau peut être tourné pour étendre la plage spectrale. Cependant, l'efficacité en fonction de la longueur d'onde de ces réseaux n'est pas régulière et présente parfois des artéfacts qui rendent la calibration spectrale plus difficile en plus de dépendre de la polarisation [55]. Les spectromètres réflectifs sont aussi très sensibles aux perturbations angulaires du réseau. D'autre part, les spectromètres en transmission sont constitués de deux groupes de lentilles pour la collimation et d'un réseau holographique de phase volumique (VPH) qui est essentiellement un matériau dont l'indice de réfraction varie en fonction de l'épaisseur. Ce type de réseau produit moins de lumière parasite que les réseaux réflectifs, leur efficacité est beaucoup plus uniforme et la dépendance en polarisation est beaucoup moins grande [55]. Même si ces réseaux ne permettent pas d'imager une aussi grande plage spectrale que les réseaux réflectifs, ils sont adaptés pour la plupart des applications de spectroscopie Raman et sont beaucoup moins sensibles aux variations de position angulaire. De plus, les spectromètres en transmission présentent souvent moins de vignettage puisque les lentilles de collimation peuvent

être placées plus près du réseau. L'une des limites majeures de ce type de spectromètre provient des lentilles qui produisent plus d'aberrations chromatiques et d'astigmatisme que les miroirs. De plus, les collimateurs sont souvent composés d'un groupe de plusieurs lentilles pour minimiser les aberrations ce qui diminue la transmission et augmente la proportion de lumière parasite par rapport à l'utilisation de miroirs. Les deux catégories de spectromètres sont utilisées en oncologie avec une tendance pour les spectromètres en transmission pour les applications *in vivo* puisque ceux-ci sont généralement plus efficaces et leur alignement optique est moins sensible aux petites perturbations qui peuvent survenir lors du déplacement des appareils. La Figure 2.5 présente un schéma typique de spectromètre en transmission.

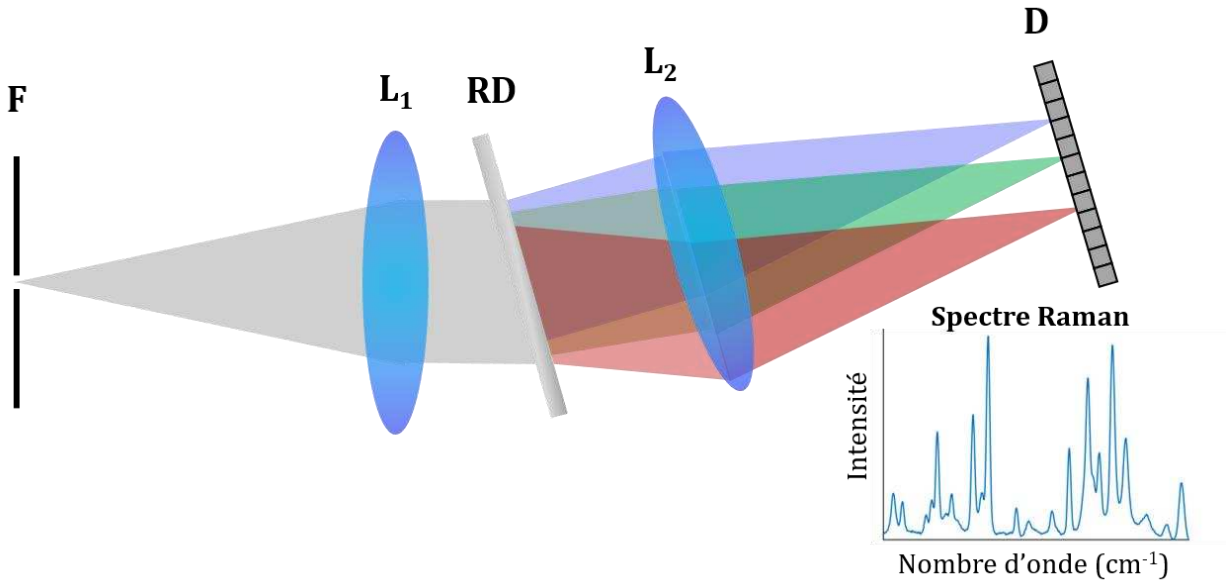

Figure 2.5. Schéma typique d'un spectromètre en transmission. La lumière qui entre par la fente (**F**) est d'abord collimée par la lentille ($\boldsymbol{L_1}$) et dispersée spectralement par le réseau de diffraction (**RD**). Chaque longueur d'onde est ensuite retransmise par la lentille ($\boldsymbol{L_2}$) vers chaque pixel du détecteur (**D**).

La résolution spectrale d'un spectromètre est affectée par la fente d'entrée, le réseau de diffraction ainsi que par la taille et le nombre de pixels sur une ligne de la caméra. L'équation (2.9) définit la bande passante du spectromètre $\delta\lambda\ [nm]$ qui représente la plus petite composante spectrale théorique que le spectromètre peut résoudre. L'expression $\Delta\lambda/n \times W_p$ représente la dispersion spectrale du réseau où $\Delta\lambda\ [nm]$ correspond à la plage spectrale imagée sur les n pixels de largeur $W_p\ [\mu m]$ compris sur une ligne de la caméra. La résolution spectrale augmente

proportionnellement à la dispersion du réseau, mais en conservant la même caméra cela engendre une diminution de la plage spectrale imagée. Les deux lentilles de collimations forment l'image de la fente d'entrée sur la caméra avec un grossissement $M = f_o/f_i$ qui dépend du rapport entre la focale du collimateur de sortie f_o et d'entrée f_i. Une fente de largeur $W_s\ [\mu m]$ a donc une largeur $W_i\ [\mu m] = \sqrt{M^2 W_s^2 + W_o^2}$ où $W_o\ [\mu m]$ représente l'élargissement causé par les aberrations. Le plus petit intervalle spectral qui peut être résolu sur le détecteur est donc limité par l'image de la fente formée sur le détecteur. Une fente plus étroite permet d'obtenir une meilleure résolution, mais limite la collection de signal.

$$\delta\lambda\ [nm]\ = \frac{\Delta\lambda \times W_i}{n \times W_p} \tag{2.9}$$

Un autre paramètre important pour les spectromètres est le f# qui quantifie le cône de lumière maximum collecté par la fente d'entrée du spectromètre. Plus le f# est petit, plus le cône de collection est grand et plus la quantité de signal projeté au détecteur est grande. Toutefois, une diminution du f# engendre généralement une augmentation des aberrations et du vignettage. Pour la plupart des applications, le but n'est pas de minimiser le f#, mais d'agencer la valeur de celui-ci avec l'optique qui se trouve avant le spectromètre. Par exemple, pour une fibre optique ayant une ouverture numérique (NA) de 0.22, un spectromètre ayant un f# de 2.3 permet de collecter la totalité du signal émanant de la fibre comme le montre l'équation (2.10) :

$$f\#_{spectrometre} \approx \frac{1}{2NA_{optique}} \tag{2.10}$$

2.2.2 Les caméras

Les caméras sont utilisées en spectroscopie Raman à titre de détecteur pour transformer le signal lumineux en signal électrique qui est par la suite numérisé. Cette section décrit le fonctionnement de deux types de caméras utilisées dans le cadre de ce projet : les dispositifs à couplage de charges (CCD) et les dispositifs multiplicateurs d'électrons à couplage de charges (EMCCD).

Une caméra CCD est une matrice de plusieurs milliers de photo-détecteurs qui représentent les pixels de l'image. Chaque photo-détecteur est construit à partir d'une jonction métal/oxyde/semi-conducteur auquel une différence de potentiel est appliquée. Ces jonctions agissent comme des

puits de potentiel qui piègent les électrons générés par les photons. Une fois l'acquisition terminée, les charges sont déplacées en changeant le potentiel entre les jonctions voisines jusqu'à ce qu'elles atteignent le registre de la caméra où elles sont transformées en différence de potentiel et numérisées. Dans les caméras EMCCD, un registre d'amplification suit le registre de la caméra où les charges de chaque pixel sont soumises à de forts potentiels pour générer d'autres électrons par ionisation. Le signal est donc amplifié avant la numérisation des charges ce qui permet de minimiser l'impact du bruit généré lors de l'étape de lecture. Les charges sont ensuite numérisées de la même manière que pour le capteur CCD.

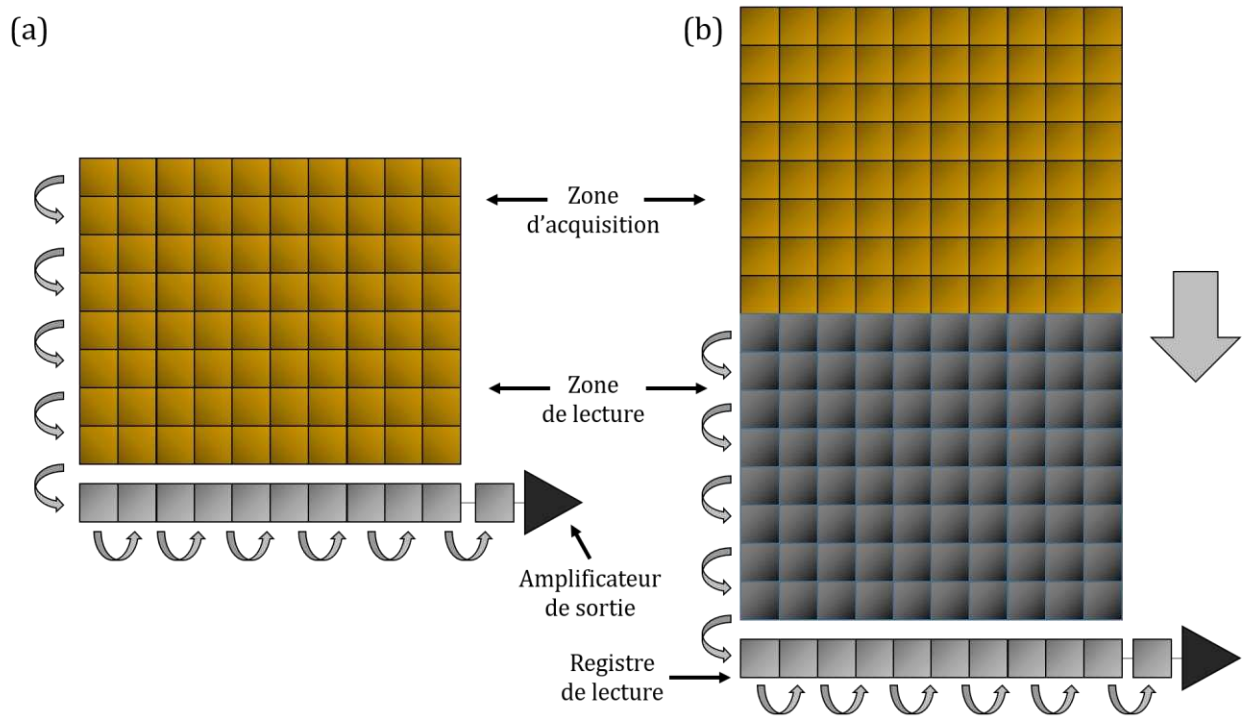

Figure 2.6. a) Mode de lecture conventionnel, b) Mode de lecture "Fast Frame Transfer (FFT)"

Il existe trois méthodes de lecture pour lire une caméra CCD, cependant ici seulement deux sont abordées et illustrées à la Figure 2.6. La méthode conventionnelle présentée à la Figure 2.6a consiste à lire les pixels à même le capteur. En changeant le potentiel entre chaque ligne du senseur, celles-ci sont envoyées à tour de rôle vers le registre de la caméra. Dans le registre, les pixels sont lus un à un en changeant le potentiel entre les différents puits. Pour un senseur de spectroscopie standard de 256 par 1024 pixels, le temps de lecture varie généralement entre 50-200ms. Durant la lecture, il est important que le capteur soit caché du flux de lumière sans quoi il peut y avoir génération de charges additionnelles pendant le transfert des charges entre les pixels

ce qui cause un effet de flou de déplacement (smearing) sur l'image. Il faut donc un obturateur optique qui s'ouvre lors de l'acquisition et se ferme à la lecture. En considérant le temps d'ouverture et de fermeture de l'obturateur de 5 à 10ms et le temps de lecture de la caméra, cette méthode est limitée à la lecture de moins de 10 images par seconde. Une autre méthode appelée « Fast Frame Transfer (FFT) » permet d'augmenter la rapidité de lecture en doublant la surface du capteur. Comme le montre la Figure 2.6b, la moitié du capteur est exposée alors que l'autre moitié est couverte de sorte qu'aucun flux lumineux n'atteigne cette partie du détecteur. Une fois l'acquisition terminée, toutes les charges contenues dans chaque puits (pixel) sont transférées vers la partie couverte du capteur où la lecture se fait de la même manière qu'en mode conventionnel. Cela permet de continuer à faire l'acquisition d'une image durant la lecture du senseur et ainsi doubler la quantité d'images acquises par seconde. Puisque la partie du capteur où se fait la lecture est constamment couverte, l'obturateur n'est pas nécessaire avec ce type de caméra. Toutefois, le prix de ce type de caméra est plus élevé puisque la surface du senseur doit être doublée. De ce fait, très peu de caméras de spectroscopie utilisent ce type de lecture puisque la surface de ces caméras est déjà très grande afin d'avoir une bonne résolution spectrale.

2.2.3 Source de bruit des caméras

Dans le but de comparer l'efficacité de plusieurs caméras, il est commun de mesurer leur rapport signal sur bruit (SNR) théorique en estimant le signal atteignant le détecteur et en identifiant les différentes sources de bruits. Ainsi pour comparer plusieurs caméras entre elles, il faut comprendre l'origine des sources de bruit qui affectent celles-ci.

- Facteur d'excès de bruit (F) : Le facteur d'excès de bruit existe seulement pour les caméras EMCCD. Il provient du gain appliqué aux charges avant la lecture qui n'est pas constant pour chaque lecture de pixel. Le facteur d'excès de bruit prend la valeur de $\sqrt{2}$ pour les caméras EMCCD et représente la variabilité du gain appliqué entre la lecture des différents pixels [56].

- Bruit de grenaille (N_S) : Ce bruit provient de la nature discrète des photons. Ce bruit est intrinsèque au flux de photons et ne peut pas être éliminé. Celui-ci dépend de l'efficacité quantique de la caméra ($QE(\lambda)$), du flux de photons incident ($\phi(\lambda)$), du gain de la caméra (M) et du facteur d'excès de bruit (F) comme le montre l'équation (2.11).

$$N_S = F \times M \times \sqrt{QE(\lambda) \times \phi(\lambda)} \tag{2.11}$$

- Bruit thermique (N_D) : Ce bruit provient de la génération d'électrons due à l'agitation thermique du semi-conducteur. Ce type de bruit est souvent négligeable puisque le capteur des caméras est refroidi à des températures au-dessous de -50°C par effet Peltier.
- Bruit de lecture (N_r) : C'est le bruit généré par le circuit électrique de lecture de la caméra qui permet de transformer les électrons en signal numérique. Le bruit augmente avec la vitesse de lecture de la caméra.
- Bruit de charges induit par l'horloge (N_{CIC}) : Ce bruit provient de la lecture à très haute fréquence qui se fait dans les caméras EMCCD, il est négligeable pour les caméras CCD.

Le flux de photon ϕ qui atteint la caméra en spectroscopie Raman peut s'exprimer comme l'addition de la composante associée à l'autofluorescence des tissus $B(\lambda)$ et du signal Raman $S(\lambda)$[1]. Toutefois, seulement le signal Raman ($QE(\lambda) \times S(\lambda)$) contribue au signal effectif alors que le flux total de photon ϕ contribue au bruit de grenaille. L'équation (2.12) présente l'équation du SNR.

$$SNR = \frac{QE(\lambda) \times S(\lambda)}{\sqrt{F^2 \left[N_D^2 + N_{CIC}^2 + QE(\lambda) \times \left(\underbrace{S(\lambda) + B(\lambda)}_{\phi(\lambda)} \right) \right] + \left(\frac{N_r}{M} \right)^2}} \tag{2.12}$$

Écrite sous cette forme, il est possible de voir que le terme de gain M offert par les caméras EMCCD affecte seulement le bruit de lecture. Sachant qu'un bruit de lecture est généralement < 30 e- et que le gain peut prendre des valeurs plus grandes que 1000 ; le bruit de lecture devient alors négligeable. Dans le cas où ϕ est grand alors le bruit est dominé par le bruit de grenaille et le SNR prend la forme de l'équation (2.13). Puisque le facteur d'excès de bruit (F) est plus grand avec la caméra EMCCD alors le SNR est plus avantageux pour le capteur CCD à très fort signal.

[1] Le terme $D(\lambda)$ est négligé ici puisque son amplitude est beaucoup plus basse comparé à $B(\lambda)$ et $S(\lambda)$.

En spectroscopie Raman le signal d'autofluorescence est relativement élevé ce qui contribue à augmenter le bruit de grenaille diminuant ainsi l'avantage qu'offre la caméra EMCCD.

$$SNR \approx \frac{QE(\lambda)\times S(\lambda)}{\sqrt{F^2\left[QE(\lambda)\times\left(S(\lambda)+B(\lambda)\right)\right]}} \tag{2.13}$$

2.3 Imagerie Raman

En optique, une image standard associe à chaque point (x, y) d'une surface une valeur d'intensité associée à un signal de fluorescence, de réflectance diffuse, de signal Raman ou tous autres signaux détectables. Une image hyperspectrale se présente sous la forme d'un volume de données où les valeurs d'intensité sont maintenant associées à une position (x, y) et une longueur d'onde (λ) sur la troisième dimension. Une image Raman est une image hyperspectrale où chaque position de l'image (x, y) est représentée par un spectre Raman. Cette section abordera l'imagerie Raman en trois volets qui présenteront respectivement les principales méthodes qui sont utilisées pour reconstruire ces images, les sondes d'imagerie Raman qui ont été développées jusqu'à présent et l'utilisation des matrices cohérentes de fibres optiques en imagerie hyperspectrale.

2.3.1 Technique d'imagerie Raman

En imagerie standard, il est possible de recréer une image à partir d'un capteur CCD et d'une lentille qui conjugue chaque point de l'objet sur un pixel du capteur de sorte à former une image. Même si l'efficacité des capteurs CCD dépend de la longueur d'onde, ils ne peuvent pas être utilisés directement pour associer les valeurs d'intensité mesurées à une longueur d'onde λ. De plus, ces capteurs permettent seulement de recréer un profil d'intensité sur deux dimensions et ils ne peuvent donc pas être utilisés directement pour former une image hyperspectrale. En spectroscopie Raman, il y a trois techniques qui sont principalement utilisées pour reconstruire des images hyperspectrales qui reposent essentiellement sur la capture d'une ou deux dimensions du cube hyperspectral de données par une caméra et le balayage des autres dimensions. Ces trois techniques sont illustrées à la Figure 2.7 et détaillées dans les paragraphes qui suivent. Le Tableau 2.1 fait une revue des spécifications atteignables avec chaque technique.

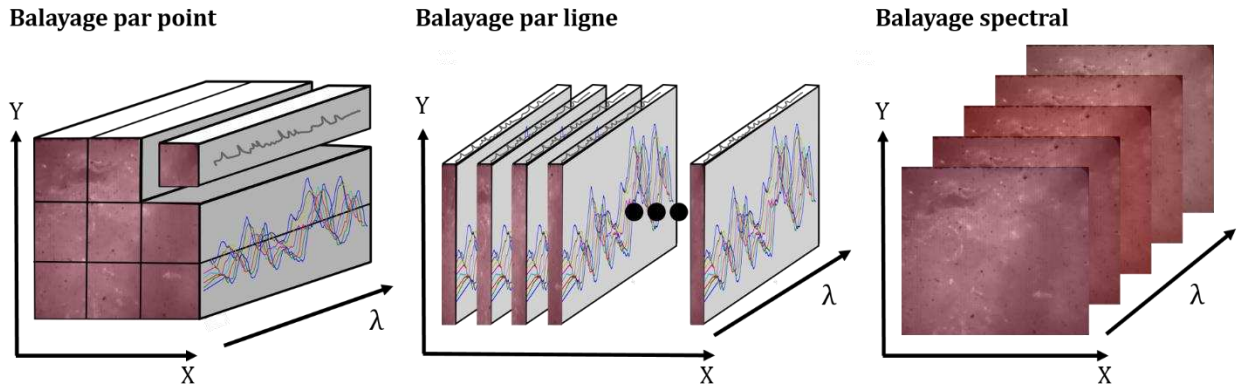

Figure 2.7. Illustration des méthodes de reconstruction d'images hyperspectrales

Balayage par point

La technique la plus répandue pour reconstruire des images Raman consiste à balayer l'objet point par point en utilisant un objectif de grande NA pour illuminer l'échantillon et collecter un maximum signal en chaque point. Le balayage de l'échantillon peut se faire à l'aide deux galvanomètres qui redirigent le faisceau avant l'objectif. Cette méthode permet d'atteindre jusqu'à 1 µm de résolution spatiale, mais elle est limitée par le champ de vue (FOV) de l'objectif qui est généralement de quelques dizaines de microns [57], [58]. Une deuxième option de balayage consiste à déplacer l'échantillon sous l'objectif (*raster scanning*). Cette technique permet d'imager un FOV pouvant aller de quelques millimètres à quelques centimètres, mais la résolution spatiale se limite à quelques centaines de microns [59], [60]. Le signal est collecté après chaque déplacement et renvoyé vers un spectromètre qui permet d'atteindre de très bonne résolution spectrale allant de 1 à 4cm^{-1} [61]. En focalisant l'illumination avec un objectif de grande NA et en plaçant un sténopé au conjugué de l'objet avant le détecteur, il est possible de rendre le système confocal. Cependant, la résolution spatiale est limitée par le FOV et le nombre de pixels discrétisés selon chaque direction (nb_x ou nb_y). Il est possible d'améliorer la résolution spatiale, mais cela se fait toujours au dépens du FOV et du temps d'acquisition de l'image entière. Le temps d'acquisition d'une image hyperspectrale complète (t_T) est souvent le facteur limitant de cette technique puisque pour chaque point, il faut compter le temps d'intégration d'un spectre (t_i), le temps de lecture de la caméra (t_r) ainsi que le temps de déplacement du mécanisme de balayage (t_s). De plus, puisque le laser est focalisé en un point infinitésimal, il y a plus de risque de dommage des tissus. La technique de balayage ponctuel a été utilisée dans

plusieurs systèmes d'imagerie Raman confocale [62]. Cette technique est aussi utilisée en spectroscopie Raman cohérente, mais la détection se fait à une longueur d'onde précise avec un simple photo-détecteur ce qui rend le temps de lecture négligeable [44], [45]. Cela permet de reconstruire des images très rapidement, mais l'analyse spectrale se restreint souvent à quelques nombres d'ondes.

Balayage par ligne

Une deuxième technique utilisée en imagerie Raman consiste à balayer l'image ligne par ligne en imageant l'objet sur la fente d'entrée du spectromètre. Chaque ligne du détecteur CCD est utilisée pour reconstruire le spectre du point sur la fente dont elle est conjuguée. L'illumination se fait généralement en suivant la ligne imagée par la fente d'entrée du spectromètre. Le balayage peut se faire à partir d'un galvanomètre placé avant l'objectif ou en déplaçant l'échantillon sous le FOV (*pushbroom scanning*). Les deux techniques de balayage présentent des avantages et désavantages similaires à ceux qui ont été notés pour le balayage ponctuel. Le balayage linéaire permet d'obtenir une résolution spectrale comparable à la technique de balayage point par point. Le temps pour balayer l'image est réduit par un facteur approximativement égal au nombre de spectres imagés sur l'axe parallèle à la fente. Cependant, il faut considérer que le temps de lecture de la caméra (t_r) est généralement plus long qu'en balayage ponctuel puisque chaque ligne spectrale de la caméra doit être lue séparément. La résolution spatiale selon l'axe parallèle à la fente est maintenant limitée par la diffraction alors que la résolution perpendiculaire à l'axe de la fente est limitée par la largeur de la fente elle-même et le nombre de pas effectués par le système de balayage (nb_x). Le rapport signal sur bruit obtenu avec cette technique est plus élevé qu'avec la méthode de balayage ponctuel [63] ce qui permet d'atteindre des temps d'intégration les plus courts [64]. De plus, l'illumination laser est maintenant élargie sur une ligne complète ce qui limite les probabilités de dommage aux tissus. Toutefois, le balayage linéaire permet seulement d'être confocal selon l'axe perpendiculaire à la fente, ce qui peut causer de la détection croisée entre les pixels selon l'autre axe. La technique de balayage linéaire se retrouve dans quelques systèmes commerciaux tels que Renishaw et Witec [65], [66]. La méthode a été utilisée par quelques groupes pour reconstruire des images hyperspectrales d'échantillons biologiques [63], [65], [67].

Balayage spectral

La troisième technique utilisée en imagerie Raman consiste à reconstruire l'image hyperspectrale en combinant plusieurs images acquises à différentes longueurs d'onde. Avec cette méthode, l'illumination laser est élargie de sorte à couvrir la totalité du champ de vue. Le balayage en longueur d'onde peut se faire à partir de lasers accordables [68], de filtre accordable à base de cristaux liquides (LCTF) [69]–[71] ou de filtre accordable acousto-optique (AOTF) [72], [73]. Puisque les images sont acquises sans balayage spatial, cette technique offre une bien meilleure résolution spatiale limitée par la diffraction. Toutefois, la résolution spectrale est limitée par le nombre d'images spectrales (nb_s) acquises et la plage spectrale imagée. De plus, les systèmes qui utilisent cette méthode ne sont généralement pas confocal. Il faut noter que la transmission est souvent moins bonne que celle des spectromètres à cause de la dépendance en polarisation des filtres accordables [64]. En plus, il faut considérer que l'efficacité de collection est souvent réduite puisque l'angle d'entrée des faisceaux est généralement restreint à ±5° par rapport à la normale du filtre accordable.

Tableau 2.1. Comparaison entre les méthodes de reconstruction d'images hyperspectrales.

	Balayage ponctuel	**Balayage linéaire**	**Balayage spectral**
Résolution spatiale	$\delta x = FOV_x/nb_x$ $\delta y = FOV_y/nb_y$	$\delta x = FOV_x/nb_x$ δy : limitée par la diffraction	$\delta x, \delta y$: limitée par la diffraction
Résolution spectrale	Limitée par le spectromètre 1-4cm^{-1}	Limitée par le spectromètre 1-4cm^{-1}	Limitée par le filtre accordable 4-8cm^{-1}
Temps d'intégration	$t_T = (t_r + t_s + t_i) \times nb_x \times nb_y$	$t_T = (t_r + t_s + t_i) \times nb_x$	$t_T = (t_r + t_s + t_i) \times nb_s$
Transmission [74]	35-65%	35-65%	15-40%

2.3.2 Les sondes d'imagerie

Pour faire la reconstruction d'images Raman, un système de balayage doit être utilisé ce qui complique la conception de sonde d'imagerie. Les systèmes d'illumination et de détection utilisés pour faire de la spectroscopie Raman ne peuvent pas être miniaturisés au point de pouvoir être incorporés à l'intérieur même de la sonde. Il est donc inévitable d'utiliser la fibre optique pour faire le relais du signal.

Une première approche est d'utiliser deux fibres pour faire l'illumination et la détection et de miniaturiser le système de balayage à l'intérieur de la sonde. Un groupe a construit un système d'imagerie Raman en miniaturisant deux galvanomètres à l'intérieur d'une sonde pour faire la reconstruction d'images point-par-point [75]. Cependant, cette implémentation demeure volumineuse pour l'utilisation en clinique avec une taille totale de 200 X 50 X 50 mm^3 et le champ de vue est limité à 90 µm de diamètre. Récemment, une sonde CARS beaucoup mieux adaptée au cadre clinique par sa petite taille de 41 mm de longueur et 3 mm de diamètre a été construite à partir de galvanomètres MEMS et d'une lentille à gradient d'indice [76]. Cependant, le champ de vue de celle-ci est restreint à 70 X 70 µm.

Une deuxième approche consiste à utiliser une matrice de fibres compressée linéairement. Ces matrices sont composées de plusieurs dizaines de fibres agencées pour former une surface de détection à l'extrémité proximale (extrémité qui fait face à l'échantillon) et redimensionnée de sorte à former une ligne qui s'aligne avec la fente du spectromètre à l'extrémité distale (extrémité qui fait face au système de détection). Cela permet de réduire le temps d'intégration d'une image hyperspectrale à celui d'une ligne sans avoir à effectuer de balayage. Suite à l'acquisition, chaque pixel de la ligne est associé à sa position dans l'image de sorte à reformer une image hyperspectrale. Cependant, la résolution spatiale de cette technique est principalement limitée par le nombre de pixels n dans l'axe parallèle à la fente qui doivent être redistribués sur une surface de $\sqrt{n} \times \sqrt{n}$ pixels pour former une image. Par exemple, pour un champ de vue de 1 mm^2 et un capteur de 256 pixels la résolution spatiale de l'image sera au mieux de 125 μm. Le Tableau 2.2 présente une revue de quelques implémentations utilisant une matrice de fibres compressée linéairement pour faire de l'imagerie Raman sur différents types d'échantillons.

Le champ de vue pour la plupart de ces articles est souvent au-dessous de $1mm^2$. Pour augmenter le champ de vue, l'utilisation d'un objectif ayant une plus petite ouverture numérique est généralement nécessaire ce qui engendre une diminution du signal collecté et ainsi une augmentation du temps d'intégration. L'article de E. Schmälzlin présente un relativement bon temps d'intégration par rapport au champ de vue imagé, cependant le spectromètre qu'ils ont utilisé est très volumineux et pourrait très difficilement être translaté vers le contexte médical.

Tableau 2.2. Revue de quelques implémentations pratiques de systèmes utilisant une matrice de fibres compressée linéairement [77]–[80].

	FOV	Résolution spatiale	# fibres	Temps (s)	Échantillon imagé	Résolution spectrale
M. Brückner *et al.* 2015	10 x 10 µm	1.25 µm	64	10	Cellules rouges du sang	1 cm^{-1}
E. Schmälzlin *et al.* 2014	Ø = 1.2 mm	-	400	240	Tissue de porc	-
S. Tafaili *et al.* 2012	Ø = 10 µm	1 µm	61	10	Produit pharmaceutique	4 cm^{-1}
A.D. Gift *et al.* 1999	530 x 435 µm	≈2 µm	100	480	Microcristal de sucrose et de fructose	5 cm^{-1}

2.3.3 Imagerie hyperspectrale avec une matrice cohérente de fibres optiques

Les matrices cohérentes de fibres (MCF) sont des câbles flexibles constitués de milliers de fibres optiques qui permettent de reproduire une image de l'extrémité proximale vers l'extrémité distale. Les MCF sont particulièrement intéressantes pour le milieu médical puisqu'elles se prêtent bien à la fabrication de sondes ou d'endoscopes d'imagerie.

Contrairement aux matrices de fibres compressées linéairement, la discrétisation spatiale est beaucoup plus importante ce qui permet d'obtenir une meilleure résolution spatiale sur de grands champs de vue. Cependant, l'extrémité distale des MCF est aussi une surface, ainsi la reconstruction d'images hyperspectrales doit se faire avec l'une des techniques vues précédemment, ce qui augmente inévitablement le temps total d'acquisition. Il n'existe pas beaucoup d'implémentations utilisant les MCF pour faire de la spectroscopie Raman dans la littérature. Une première implémentation a été proposée en combinant une MCF à un filtre accordable (LCTF) pour reconstruire des images Raman de comprimés d'aspirine avec une sonde de moins de 2 mm de diamètre avec un champ de vue d'approximativement 100 µm [81]. L'instrument nommé Fiberscope RAVEN^{TM} est maintenant breveté [82]. Dans une étude plus récente, une MCF a été utilisée combinée à un système de balayage point par point pour reconstruire des images Raman de nanoparticules de diamant [83]. Le champ de vue est toujours limité à 100 µm de diamètre et une résolution spatiale variant de 1-3 µm.

Les MCF ont aussi été utilisées avec d'autres modalités d'imagerie hyperspectrale comme la fluorescence et la réflectance diffuse. Une sonde de 1.6 mm de diamètre constituée de 50,000 fibres combinées à un système de détection par balayage linéaire a permis de reconstruire des images hyperspectrales de réflectance diffuse sur un champ de vue d'approximativement 1 mm^2 avec une résolution spatiale de 40 µm [84]. Une autre sonde de 1.1 mm de diamètre constituée de 10,000 fibres combinées à un système de balayage spectral a permis de reconstruire des images hyperspectrales en fluorescence sur un champ de vue de 2.5 mm de diamètre avec une résolution de 38 µm [85]. Ces études laissent penser qu'une approche similaire pourrait être utilisée pour reconstruire des images Raman sur un champ de vue de quelques millimètres avec une résolution spatiale <100 µm.

2.4 Spectroscopie Raman en oncologie

La réponse Raman d'un tissu est proportionnelle à la concentration et aux interactions des macromolécules comme l'ADN, les protéines et les lipides qui composent le tissu [86]. La spectroscopie Raman a déjà démontré son potentiel pour différencier les cellules cancéreuses des cellules saines en se basant sur le contraste intrinsèque préexistant dans l'expression et l'interaction des biomolécules [16]. Ainsi, cette modalité d'imagerie se présente comme une avenue prometteuse dans le développement d'instruments destinés à localiser les tumeurs chez les patients atteints d'un cancer. La majeure partie des implémentations actuelles sont encore au stade de recherche, mais un bon nombre ont démontré un potentiel pour s'insérer à différents stades du traitement de la maladie : du diagnostic, passant par l'intervention chirurgicale jusqu'à l'analyse des tissus en pathologie. Il existe plus d'une centaine d'études ayant démontré des résultats positifs pour faire la discrimination de tissus cancéreux à partir de la spectroscopie Raman. Ces études sont très bien résumées dans plusieurs revues de littérature qui présentent les dernières nouveautés de la technologie appliquées à différents types de cancer incluant le cancer du sein, de la prostate, du cerveau, du pancréas, du poumon et bien d'autres [17], [87]–[90]. Le but de cette section est de mettre l'accent sur certaines de ces études rejoignant les objectifs du projet actuel dont l'objectif est de guider le chirurgien.

Deux caractéristiques principales doivent être satisfaites pour qu'une technologie Raman puisse être introduite en contexte intra-opératoire. Premièrement, l'instrument de détection doit être flexible, malléable et de taille raisonnable, de sorte que le chirurgien puisse le manipuler

aisément. Deuxièmement, l'instrument doit être capable de prendre des mesures en temps réel pour ne pas encombrer son travail. L'implémentation la plus courante dans la littérature se présente sous la forme de sonde d'acquisition ponctuelle (mesure d'un point à la fois). Ces sondes sont testées lors d'études cliniques pendant lesquelles des acquisitions sont prises sur les tissus potentiellement atteints avant la résection. Une analyse histopathologique du tissu est utilisée à titre d'étalon standard ("gold standard") pour associer chaque spectre Raman acquis à une classe de tissu (*e.g.*, cancer ou normal). L'acquisition de spectres Raman sur plusieurs patients et différents types de tissus permet de construire une base de données qui peut être utilisée pour entraîner et valider des algorithmes de classifications. À partir des résultats de classification, il est possible de calculer la spécificité (% de vrais négatifs) et la sensibilité (% de vrais positifs) de la sonde qui permettent de quantifier l'efficacité de la sonde à guider le chirurgien durant la chirurgie.

Tableau 2.3. Principales études faites *in vivo* qui montrent le potentiel de la spectroscopie Raman pour guider le chirurgien lors de la résection de tumeur.

	Diamètre	Temps par point	#points/ sujets	Sensitivité (SE) Spécificité (SP)	Type de tissu
M. Jermyn *et al.* 2015 [42]	0.5 mm	0.2 s	161/17	SE : 93% SP : 91%	Cerveau : gliome/normal
H. lui *et al.* 2012 [91]	3.5 mm	1 s	330/136	SE : 90% SP : 68%	Peau : Mélanome/non mélanome pigmenté
M. Short *et al.* 2011 [92]	<2 mm	1 s	129/46	SE : 96% SP : 91%	Poumon : Cancer+pre-cancer/normal
J. Wang *et al* 2015 [93]	0.2 mm	<1 s	1172/48	SE : 97% SP : 97.4%	Œsophage : Carcinome des cellules squameuse (SCC) /normal
M.S. Bergholt *et al* 2011 [94]	<0.2 mm	0.5 s	1189/107	SE : 92.6% SP : 88.6%	Gastrique : adénocarcinome /normal
S. Duraipandian *et al* 2012 [95]	<0.2 mm	1 s	476/44	SE : 85.0% SP : 81.7%	Col de l'utérus : cancer/normal
M.S. Bergholt *et al* 2015 [96]	<0.2 mm	<0.5 s	1869/50	SE : 90.9% SP : 83.3%	Colon : adénome/polype hyperplasique

Une sonde ponctuelle appliquée au cancer du cerveau (Figure 2.4) a récemment démontré une efficacité de 92% pour discriminer les tissus cancéreux des tissus sains dans un contexte intra-opératoire [42]. Cette même sonde a aussi permis l'identification de tissus tumoraux au-delà de la région identifiée par l'IRM, ce qui démontre l'importance d'un outil de guidance intra-opératoire par rapport aux méthodes standards [97]. D'autres sondes ont aussi démontré un grand potentiel pour d'autres types de cancer; le Tableau 2.3 répertorie les résultats et les caractéristiques telles que le diamètre d'échantillonnage et le temps d'acquisition de quelques-unes de celles-ci. Avec une efficacité moyenne supérieure à 85%, ces sondes confirment le potentiel de la spectroscopie Raman pour identifier les tissus cancéreux dans un contexte intra-opératoire. Le temps d'intégration de moins d'une seconde permet leur utilisation sans affecter de façon notable le travail du chirurgien. Toutefois, les sondes actuelles se limitent à des acquisitions ponctuelles et ne permettent pas de faire la reconstruction d'images moléculaires résolues sur un grand champ de vue.

Quelques études ont démontré la capacité de reconstruire des images Raman dans un contexte *in vivo* sur des rats. Les images Raman *in vivo* sont souvent acquises en spectroscopie CRS puisque c'est la seule modalité qui permet d'acquérir une image entière dans une plage de temps raisonnable (<5 s). La spectroscopie SRS a permis d'identifier précisément la marge d'une tumeur sur des rats ayant reçu des xénogreffes de glioblastome multiforme humain en utilisant deux bandes associées au gras et aux protéines [98]. Le microscope qu'ils ont développé permet d'acquérir des images sur un champ de vue de 350 x 350 μm avec un temps d'intégration total de deux secondes pour acquérir deux bandes spectrales. Ensuite, la juxtaposition de plusieurs acquisitions successives en déplaçant l'échantillon sous le microscope avec des stages de translation (*raster scanning*) permet de recréer des images très intuitives sur un champ de vue de quelques millimètres montrant la frontière entre les tissus cancéreux et les tissus sains (Figure 2.8). Une autre expérience a démontré des résultats similaires en utilisant la spectroscopie CARS [46]. Cependant, les expériences actuelles se font sur des rats disposés sur des stages motorisés qui doivent demeurer immobiles. Les systèmes d'imageries sont souvent très volumineux et non malléables, ainsi l'utilisation de ces technologies en contexte *in vivo* sur des humains est limitée.

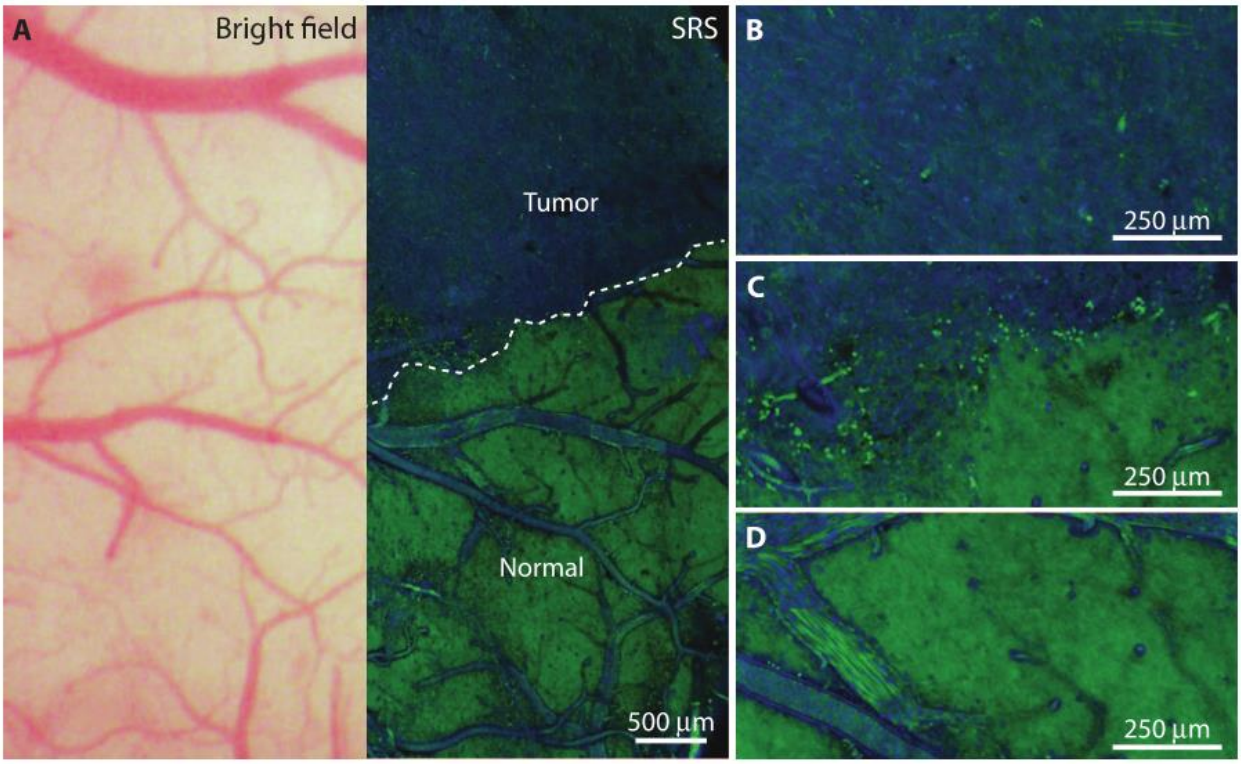

Figure 2.8. A) Comparaison d'une image prise en photographie standard et d'une image reconstruite en spectroscopie Raman sur un cerveau de rat ayant reçu des xénogreffes de cellules gliales associées à un glioblastome multiforme humain (B-D) Les images montrent respectivement des régions élargies de l'image A : sur la région tumorale (B), sur la jonction entre les deux types de tissus (C) et le tissu sain (D) [98]. Reproduction avec autorisation de l'American association for the advancement of science (AAAS).

CHAPITRE 3 OBJECTIFS DU PROJET

Jusqu'à maintenant, le développement de sonde de spectroscopie Raman s'est principalement restreint à l'analyse ponctuelle des tissus sur une surface de moins de 500 µm de diamètre. Des systèmes d'imagerie Raman pour le contexte *in vivo* ont été proposés, cependant ceux-ci impliquent généralement l'utilisation de microscopes volumineux et le déplacement continu de l'échantillon. Quelques sondes permettant de faire de l'imagerie Raman ont été proposées dans la littérature, mais celles-ci sont limitées soit par leur champ de vue de moins de 1 mm^2 ou par une implémentation non cliniquement viable.

Le but du projet de maîtrise consistait à développer une sonde d'imagerie Raman malléable capable de reproduire des images moléculaires sur un champ de vue de quelques millimètres de diamètre ayant le potentiel d'être utilisé en clinique pour guider le chirurgien dans la résection de tumeur. Le projet se divise par l'atteinte de deux objectifs détaillés dans les deux prochains paragraphes.

Le premier objectif visait à démontrer qu'il était possible de faire de l'imagerie Raman sur un champ de vue de quelques millimètres de diamètre à travers une sonde flexible. À ce stade du projet, aucune contrainte n'a été fixée sur la résolution spatiale et spectrale et sur le temps d'intégration. L'idée initiale pour construire le prototype de sonde capable de relayer le signal Raman de l'échantillon au système de détection à travers un câble flexible a été d'utiliser une matrice cohérente de fibres optiques. Pour reconstruire l'image Raman, l'utilisation d'un filtre accordable à base de cristaux liquides (LCTF) a été proposée combinée à une caméra EMCCD de Nüvü pour assurer la détection du faible signal Raman transmis à travers le LCTF et la MCF.

Objectif 1 : Démontrer la possibilité d'implémenter une sonde d'imagerie Raman flexible capable de reconstruire des images moléculaires sur un champ de vue de quelques millimètres.

Hypothèse 1 : En utilisant une matrice cohérente de fibres, le signal Raman peut être relayé par un câble flexible du tissu vers le système volumineux de détection.

Hypothèse 2 : L'utilisation d'une caméra EMCCD permettra de compenser la faible transmission du LCTF et de la MCF pour assurer la détection du signal Raman.

Le deuxième objectif consistait à développer une sonde d'imagerie Raman capable de reproduire des spectres similaires au sondes d'acquisitions ponctuelles pour démontrer le potentiel clinique à guider le chirurgien dans la résection de tumeur. Ainsi, le développement du système intermédiaire s'est fait dans l'optique d'atteindre des spécifications similaires en termes de résolution spectrales et de SNR aux sondes d'acquisitions ponctuelles qui ont fait leurs preuves pour discriminer les tissus cancéreux des tissus normaux. Pour y arriver, le système intermédiaire a été conçu en changeant le système de détection pour un miroir rotatif et un spectromètre d'imagerie similaire à ceux utilisés pour faire la détection du signal avec les sondes ponctuelles. Un prototype de sonde facilement malléable a aussi été proposé capable de combiner l'illumination et la collection du signal dans un même instrument.

Objectif 2 : Développer le prototype d'une sonde d'imagerie Raman champ large capable de reproduire des spectres similaires aux sondes d'acquisitions ponctuelles et ainsi démontrer un potentiel clinique.

Hypothèse 1 : L'utilisation d'un spectromètre combiné à un miroir rotatif peut permettre de balayer l'échantillon afin de reconstruire le contenu spectral d'une image en intégrant une ligne spectrale à la fois et ainsi atteindre une résolution spectrale et un SNR comparable aux sondes Raman ponctuelles qui utilise un système de détection comparable.

Les deux prochains chapitres décrivent respectivement le système préliminaire et le système intermédiaire qui ont été conçus dans le but de répondre aux deux objectifs du projet de maîtrise. L'implémentation d'un système cliniquement viable pouvant être utilisé en chirurgie pour tester la capacité à guider la résection de tumeur dans le cadre d'étude clinique sort du cadre du projet de maîtrise et s'inscrit comme projet pour un futur doctorant. Le projet de maîtrise se limite à la conception d'une preuve de concept qui servira de base à la future implémentation d'une sonde d'imagerie Raman cliniquement viable à partir de laquelle des études cliniques seront effectuées.

CHAPITRE 4 ARTICLE 1: WIDE-FIELD SPONTANEOUS RAMAN SPECTROSCOPY IMAGING SYSTEM FOR BIOLOGICAL TISSUE INTERROGATION

4.1 Mise en contexte

La première idée pour faire la conception d'une sonde d'imagerie Raman capable de faire le relais du signal Raman d'une image entière de l'échantillon au système de détection à travers un câble flexible a été d'utiliser une matrice cohérente de fibre optique. Dans la littérature, très peu d'études ont étudié l'utilisation des MCF pour faire de la spectroscopie Raman et encore moins pour faire de l'imagerie. Les MCF ont généralement une transmission très faible et les fibres qui composent ceux-ci ont souvent une très grande NA ce qui rend leur utilisation en spectroscopie Raman plus difficile comparé à l'utilisation de fibres optiques plus standard. Pour valider la première hypothèse, un système a été conçu en se limitant autant que possible aux matériels déjà présents au laboratoire de sorte à limiter l'achat inutile d'instruments dans le cas où l'hypothèse ne serait pas vérifiée. Cette contrainte a fixé le choix de la méthode de reconstruction d'image hyperspectrale au balayage spectral avec un LCTF. Le choix de la matrice de fibres de 4x4mm de Schott s'est fait selon le respect des mêmes contraintes. Le matériel utilisé pour ces premières expériences n'était pas optimal à l'atteinte de résultats pouvant atteindre les requis cliniques vu la mauvaise transmission ou la mauvaise résolution spectrale du filtre accordable. C'est pourquoi les échantillons testés se sont restreints à des composés chimiques et des tissus biologiques ayant une très forte réponse Raman. Les premières expériences ont permis d'obtenir les premiers résultats quantitatifs et d'identifier les limitations susceptibles d'affecter l'implémentation du prochain système. Cela a permis d'évaluer les avenues potentielles pour le projet et de calculer théoriquement les spécifications atteignables à partir des résultats observés. Les premiers résultats obtenus ont été publiés dans le journal Optic Letters sous la forme de résultat préliminaire vers le développement d'un système d'imagerie Raman à travers une sonde flexible. Au final, ce premier système a permis de répondre au premier objectif en démontrant la possibilité de reconstruire des images Raman à travers une sonde.

La publication a été rédigée par Karl St-Arnaud avec l'aide des étudiants postdoctoraux Kelly Aubertin, Mathias Strupler et Mike Jermyn, du neurochirurgien Kevin Petrecca, de la

pathologiste Dominique Trudel et du professeur Frédéric Leblond. La contribution du premier auteur est évalué à environ 90% par sa participation et sa gestion des expériences, l'analyse des données recueillies et la rédaction de l'article. Les auteurs qui ont contribué à cet article sont affiliés au département de génie physique de Polytechnique Montréal, à l'axe d'imagerie du centre de recherche du CHUM ainsi qu'à l'institut neurologique de Montréal (MNI). La publication est paru en 2016 dans le journal *Optics Letters* dans le volume 41 de l'issue 20 aux pages 4692 à 4695 [99].

La publication est reproduite avec permission du journal à la prochaine sous-section. Notez que les références pour cet article sont présentées à même le chapitre 4.

4.2 Wide-field spontaneous Raman spectroscopy imaging system for biological tissue interrogation

Journal: Optics Letters

K. ST-ARNAUD[1,2], K. AUBERTIN[1,2], M. STRUPLER[1], M. JERMYN[3,1], K. PETRECCA[3]

D. TRUDEL[2], AND F. LEBLOND[1,2,*]

[1]Department of Engineering Physics, Polytechnique Montreal, CP 6079, Succ. Centre-Ville, Montreal, Quebec H3C 3A7, Canada

[2]Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, 900 rue Saint-Denis, Quebec H2X 0A9, Canada

[3]Department of Neurology and Neurosurgery, Montreal Neurological Institute and Hospital, McGill University, 3801 University St., Montreal, Quebec H3A 2B4, Canada

*Corresponding author: Frederic.leblond@polymtl.ca

4.2.1 Abstract

Raman spectroscopy has shown great promise as a method to discriminate between cancerous and normal tissue/cells for a range of oncology applications using microscopy and tissue interrogation instruments such as handheld probes and needles. Here we are presenting preliminary steps toward the development of a practical handheld macroscopic Raman spectroscopy instrument, demonstrating its capabilities to discriminate between different

biological tissue types during ex vivo porcine experiments. The novel probe design can image a field of view of 25 mm^2 with a spatial resolution <100 μm and an average spectral resolution of 95 cm^{-1}, covering the fingerprint region between 450 to 1750 cm^{-1}. The ability of the system to produce tissue maps based on molecular characteristics is demonstrated using a neural network machine learning technique.

4.2.2 Introduction

For interventional procedures requiring the resection of cancer tissue, patient outcome (survival, quality of life) can be improved by maximizing the volume of cancer resected. Thus, there is a critical need in surgical oncology for portable and accurate tissue characterization tools that can see cancer beyond what can currently be detected with standard-of-care medical imaging techniques (e.g., magnetic resonance imaging, computed tomography, nuclear medicine) and minimize the unnecessary removal of healthy tissue to reduce debilitating effects. Optical techniques exploiting the contrast associated with light tissue interactions are ideal for intraoperative use because of the non-ionizing nature of the interactions, and they can potentiallyprovide high-resolution spectroscopic information to detect the signature of a multitude of molecular species. Several approaches have been developed to guide surgeries following the injection of contrast agents targeting molecular processes associated with specific biomarkers. In vivo methods include fluorescence induced by the injection of aminolevulenic acid (ALA), indocynanine green (ICG), and fluorescein [1], but there is a wide range of ongoing research developing targeted fluorescent markers. Another option for surgical guidance is exploiting intrinsic optical contrast of tissue for in vivo intraoperative characterization, avoiding the need to administer an exogenous compound and, thus, significantly facilitating clinical translation. Such techniques have been developed for interventional use, including optical coherence tomography to image the attenuation contrast associated with elastic scattering, label-free tissue fluorescence to image intrinsic tissue fluorophores, diffuse reflectance to image the optical contrast associated with tissue chromophores (e.g., haemoglobin, melanin, lipids, water) and elastic scattering, as well as vibrational techniques interrogating tissue based on its fine molecular constituents based on inelastic light scattering [2].

Human tissue is composed of a multitude of molecular species with vibrational properties that can be probed using spontaneous Raman spectroscopy (RS). This technique is thus used for

label-free tissue characterization based on molecular fingerprinting in terms of tissue constituents, including lipids, proteins and amino acids, cholesterol, and DNA. Because the concentrations of these biomolecules, as well as their interactions with the cellular/extra-cellular environment, are known to vary between tissue types and pathological status, RS is a promising approach for eventual routine use as an adjunct guidance tool during surgical oncology interventions. Over the past two decades, Raman micro-spectroscopy has been used to detect cancer tissue with high accuracy with ex vivo tissue samples and cell cultures for several pathologies [3]. However, only a limited number of studies have been conducted evaluating RS in vivo for surgical guidance applications. One of the impediments to the clinical translation of RS for interventional medicine applications includes the difficulty to acquire sufficiently high signal-to-noise ratio (SNR) inelastic scattering within time frames compatible with the workflow of surgeons. Raman signals are associated with inelastically scattered light following tissue excitation with a monochromatic laser. Because of the rarity of Raman scattering photons, in vivo applications have mostly focused on the development of instruments collecting signals for a limited number of points using small footprint optical probes and needles [4]. Our objective is to move beyond current capabilities associated with single-point detection by developing macroscopic wide-field RS instruments for rapid cancer detection over fields of view as large as several millimeters across with ~100 μm resolution. These length scales are selected because they are consistent with state-of-the-art surgical microscopes and tissue dissection techniques for many applications, including neurosurgery [5].

Here we are presenting preliminary work in the form of a proof-of-principle study that a practical wide-field RS imaging system can be designed using a flexible coherent imaging bundle to image the principal vibrational tissue characteristics associated with proteins and lipids. Only a limited number of wide-field imaging systems have been designed for in vivo tissue interrogation with RS. Stimulated Raman spectroscopy was demonstrated in vivo for rat brain imaging [6]. However, there remain several challenges before practical optical fiber based nonlinear signal detection can be used in an operating room [4]. A probe was introduced using spontaneous Raman spectroscopy and mirror displacement at the end of the tip for imaging [7]. However, the incorporation of a spatial scanning setup at the end of the probe makes miniaturization more difficult. Coherent imaging bundles were also used as an optics relay for Raman spectroscopy applications [8,9].

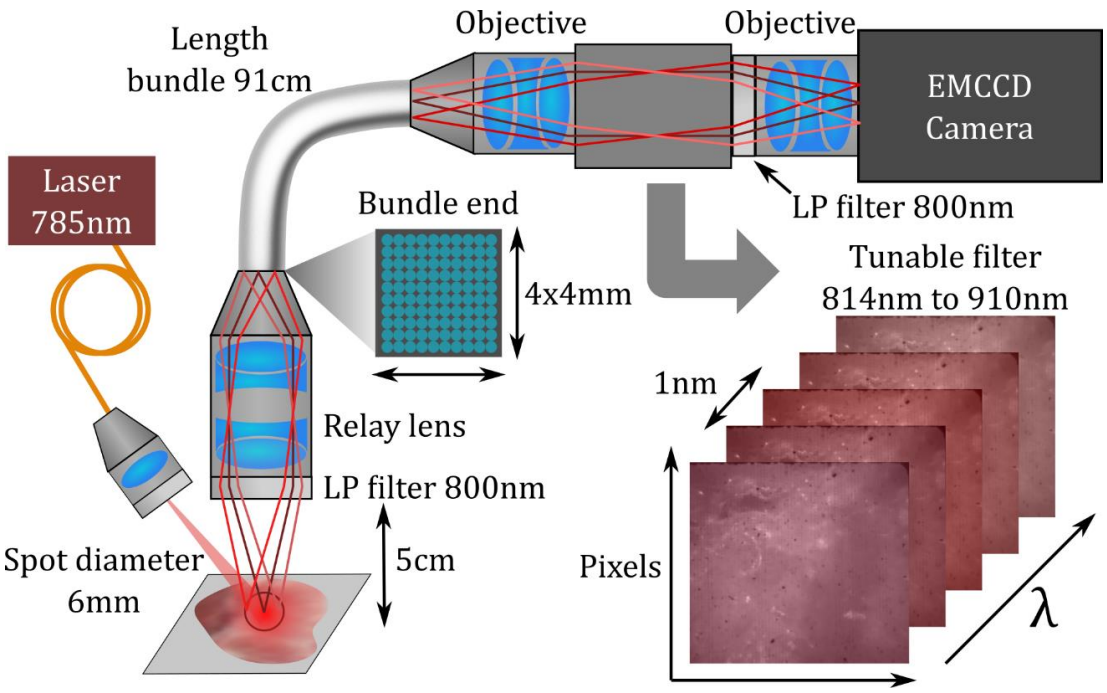

Figure 4.1. Schematic depiction of the wide-field spontaneous Raman spectroscopy system

4.2.3 Methods

The imaging system (Figure 4.1) is composed of a tissue interrogating probe and a hyperspectral imaging camera connected through a 91 cm length flexible coherent imaging fiber optics bundle (Schott, Germany). Tissue illumination is achieved using a 785 nm wavelength-stabilized monochromatic laser (Innovative Photonic Solutions, New Jersey, USA). The excitation light is collimated before passing through a 785±3 nm line filter (Semrock, New York, USA) with subsequent beam expansion, resulting in a circular illumination area of 6 mm diameter in the imaging plane. The light collection probe (proximal end of the imaging bundle) consists of a relay lens in front of which a long-pass filter [>800 nm, optical density (OD) >5] has been placed to block Rayleigh scattering. The relay lens was designed to ensure that the imaging plane is projected onto the entrance plane of the coherent bundle which is composed of a square array of 400 × 400 fibers of 10 μm diameter and has a numerical aperture of 0.6. Light detection is done across a liquid crystal tunable filter (Varispec SNIR LCTF, 650–1100 nm, 7 nm bandwidth) allowing spectral bands to be sequentially selected and imaged with a high-speed EMCCD camera (Hnu, Nuvu; 512 × 512 pixels, 45% quantum efficiency at 850 nm. Another >800 nm long-pass filter is placed in the optical path after the tunable filter to eliminate residual Rayleigh

scattering. Objectives are disposed on each side of the tunable filter to ensure that light passing through it is collimated. A full dataset consists of images sequentially acquired for wavelengths between 814 and 910 nm, resulting in one Raman spectrum for each EMCCD pixel. The Raman spectral resolution is limited by the 7 nm bandwidth (95 cm^{-1}) of the tunable filter, resulting in wavenumbers ranging from 453 to 1749 cm^{-1} covering most of the fingerprint region. The field of view (FOV) and the spatial resolution of the system were evaluated using a standard 1951 USAF resolution target. As shown in Figure 4.2, the system produces images over a FOV of 25 mm^2 with 55.7 µm spatial resolution. The FOV was determined by imaging the line pairs separated by 2 mm, and the spatial resolution was measured using the Rayleigh criterion.

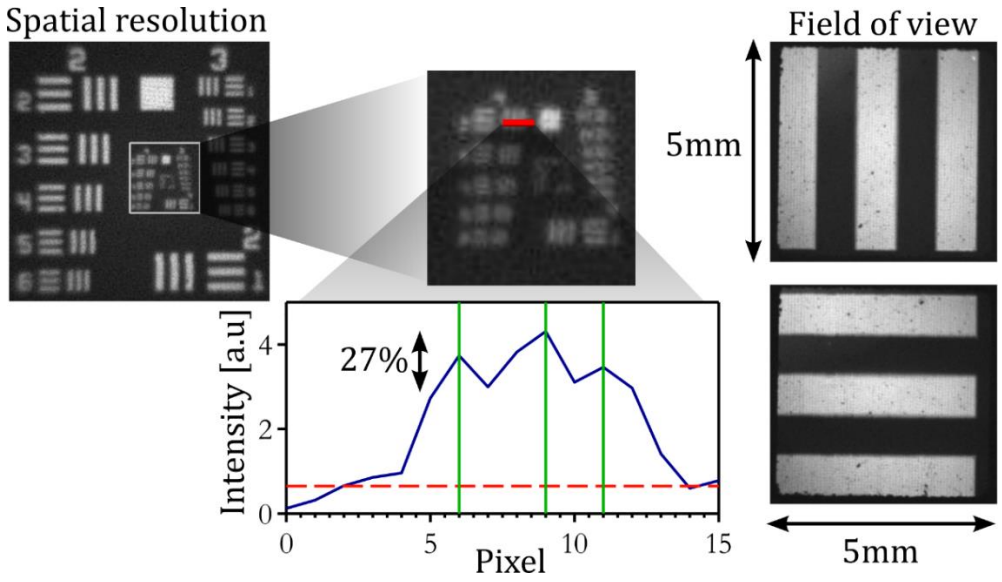

Figure 4.2. Measurements made with a standard 1951 USAF resolution target to evaluate the FOV and the spatial resolution of the system.

To evaluate the potential of the wide-field system to distinguish different tissue types, measurements were made on a porcine meat sample, specifically along the longissimus dorsi muscle. A sample of approximately 1 cm thickness was purchased from a grocer and kept frozen overnight at 20°C. Measurements were made at an ambient temperature, ensuring that the FOV includes two tissue types (muscle and adipose tissue) separated by a visually detectable frontier (see the photograph in Figure 4.3). Each measurement was performed using an integration time of 500 ms per spectral band, resulting in a total imaging time (laser on) <90 s. During each imaging session, the laser was operated at 500 mW and turned off for 150 ms between bands. A dark noise dataset was acquired which consists of a measurement made with the same integration

time as for the tissue, but with the laser turned off. Moreover, the instrument response function (IRF) of the system was measured using a 785 nm Raman standard (NIST, Maryland, USA; model SRM2241) for which the luminescence spectrum is known a priori. The measurement on the standard material was done using the same laser power and integration time as for tissue imaging.

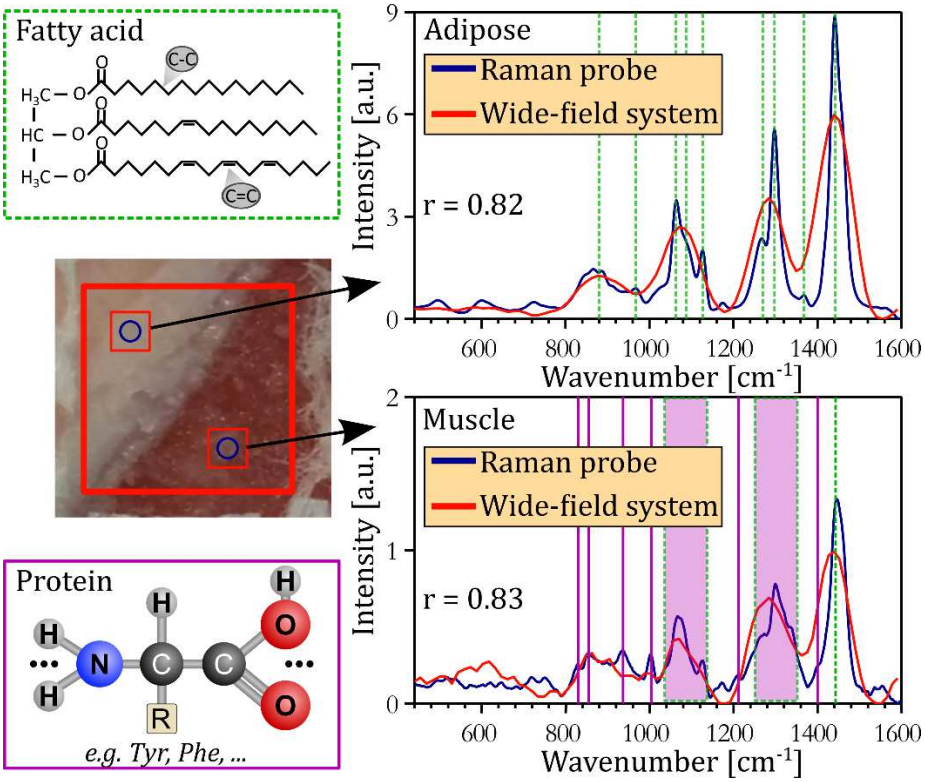

Figure 4.3. Direct comparison of the measurements made with the single-point probe and the wide-field Raman spectroscopy system. The larger square in the photograph is the FOV of the imager; the circles are associated with the two tissue areas imagined with the single-point probe that were co-registered with average wide-field spectra acquired within the smaller squares. The spectra for both systems are shown with dotted and plain vertical lines drawn to highlight the characteristics of fatty acid and protein bands, respectively.

Post-processing was applied to the raw hyperspectral tissue data using a custom Matlab (MathWorks, Massachusetts, USA) program to isolate the signal component associated with inelastic scattering. A dark noise measurement was initially subtracted from the tissue imaging dataset followed by a pixel-per-pixel division by the Raman response of the system retrieved from the NIST standard material to remove the IRF and to correct for the nonuniform

illumination of the sample. An iterative smoothing function based on a polynomial fit algorithm [10] was then applied to the spectra to evaluate and subtract the contribution from intrinsic tissue fluorescence, and a Savitzky–Golay filter was applied to maximize the removal of non- Raman spectral artifacts. Finally, 4 by 4 spatial binning was applied to maximize the SNR. To verify that the reconstructed spectroscopic features are associated with the expected vibrational tissue characteristics (e.g., amide bands, aromatic amino acid peaks, proteins, and lipid bands), the measurements were made using an established single-point Raman spectroscopy system developed in our laboratory [11]. Single-point measurements were made corresponding to a 0.2 mm^2 area using a 0.2 s total integration time and 60 mW of laser power. Figure 4.3 shows that single-point probe measurements (circles) were compared with a spectrum averaged over multiple EMCCD pixels in regions of interest (small squares) located within the FOV of the wide-field system (larger square). The raw spectroscopic data collected with the single-point probe were post-processed using a similar procedure as described for the wide-field data.

4.2.4 Results and discussions

Spectra were compared (single-point probe versus macroscopic imaging system) for porcine meat measurements in areas associated with muscle and adipose tissue. Single-point probe measurements made on adipose tissue show the distinguishing spectral features associated with the fatty acids [12] represented as dotted vertical lines in Figure 4.3. The dominant band at 1438 cm^{-1} is the scissor deformation of CH_2, while the peak associated with the umbrella deformation of CH_3 is seen around 1368 cm^{-1}. Other peaks associated with in-phase twisting of CH_2 and symmetric rock cis isomer of =C-H can be observed around 1300 and 1270 cm^{-1}, respectively. The region from 1000 to 1200 cm^{-1} presents three peaks at 1063, 1087, and 1127 cm^{-1}, which are associated with C-C aliphatic stretches. Bands around 967 and 880 cm^{-1} are associated with an out-of-phase bend cis isomer of =C-H and C-C stretches. The measurements made on muscle tissue differ from those made on adipose tissue, principally due to higher protein content with relatively fewer lipids [13]. The proteins yield spectral features associated with the backbone of the polypeptide chain (amide bands), the peaks associated with the structure of aromatic amino acids, as well as band characteristics similar to those observed for fatty acids [14]. For example, the large peak between 1220 and 1380 cm^{-1} can be associated with lipids, but also with the amide III band that is usually situated between 1225 and 1305 cm^{-1}. The peaks in the region from 1000

to 1200 cm^{-1} can be associated with a C-C or N stretch of proteins, but also with the presence of lipids. The peaks at 830 and 855 cm^{-1} are associated with tyrosine (Tyr) and the peak at 1004 cm^{-1} is that of phenylalanine (Phe). Although a strong correlation is observed between single-point and wide-field measurements ($r > 0.8$), the limited spectral resolution of the latter thwarts its ability to specifically resolve all spectral features detected with the single-point probe. For example, Figure 4.4(b) shows that for adipose tissue the scissor deformation of CH_2 is resolved with the wide-field system, and a second peak is observed representing an average of the 1300 and 1270 cm^{-1} bands. However, the band associated with the umbrella deformation at 1368 cm^{-1} is lost due to its low intensity, but two peaks are observed representing averages over the three C-C aliphatic stretches and averages over the cis isomer of =C-H and C-C stretches. Similar conclusions can be reached for muscle tissue but, in this case, the wide-field system also detects a band at 850 cm^{-1} associated with the Tyr peaks and a band around 1005 cm^{-1} that is associated with Phe.

The ability of wide-field RS imaging to automatically distinguish tissue types and produce tissue-specific images was tested using a supervised machine learning technique. To recreate images based on the molecular contrast provided by inelastic scattering, the Matlab neural network classification algorithm was used with 20 hidden neurons. The training dataset consisted of 256 spectra taken over adipose and muscle tissue. To avoid bias, training data were acquired on a different day along the longissimus dorsi muscle associated with a different porcine tissue sample. The “tissue type” ground truth was assessed by visual inspection, and 70% of the 256 spectra were used randomly as training data, while the rest were utilized for testing and validation. All spectra were normalized to get a mean of zero and a unitary standard deviation (standard normal variate). This pre-processing was done to ensure classification is more heavily weighted toward spectral rather than intensity differences. The false color image shown in Figure 4.4(a) was reconstructed based on the classification result demonstrating that the Raman-based reconstruction reproduces features seen in the white light photograph of the sample. The frontier between adipose and muscle tissue is characterized by a ~500 μm thick region composed of a mixture of the two tissue types. On the reconstructed images, this region appears as a mixture of both types of tissues since pixels, including infiltrations of a certain tissue type, may be more difficult to classify correctly. The neural network analysis was restricted to the wavenumber region from 800 and 1550 cm^{-1} since, as suggested by Figure 4.4(b), most of the tissue

information captured by the wide-field system is within that range. The most notable differences between adipose and muscle tissue spectra are associated with the presence of aromatic amino acid peaks in the 800 to 1000 cm^{-1} region. Other differences are associated with the two peaks in the region from 1000 to 1400 cm^{-1}. In adipose tissue, these peaks are only influenced by the fatty acid content while, in muscle tissue, there is also a contribution from proteins. The shape of the peak between 1400 and 1550 cm^{-1} is similar for both adipose and muscle tissue, since it is determined by molecular characteristics similar in both tissue types. However, it was noted on the non-normalized spectra that the intensity of that peak is more prominent in adipose tissue, since it contains much more lipids than muscle tissue.

4.2.5 Conclusion

A proof-of-concept study was presented suggesting widefield Raman spectroscopy macroscopic tissue imaging could be achieved under experimental conditions compatible with in vivo clinical translation for surgical oncology applications. Specifically, we have demonstrated that a frontier between different tissue types (muscle versus adipose tissue) can be detected within ~1 min with a practical non-contact handheld probe using a flexible imaging bundle. Although the FOV and spatial resolution of the wide-field system are consistent with the intended use for guidance during microsurgical procedures, its usefulness in surgical oncology may be limited by a lack of sensitivity. For example, the computed root-mean-square difference of average single-point probe spectra for adipose versus muscle porcine tissue is 19.4%, whereas it is <4% for normal brain versus glioma [5].

Important characteristics to consider when evaluating system requirements for specific oncology applications include evaluating a minimum per-band Raman SNR, as well as the spectral resolution required to detect tissue peaks important for tissue discrimination. Moreover, some clinical applications will require a larger dynamical range of detection since some tissue types generate high levels of intrinsic fluorescence. For example, the level of auto-fluorescence in prostate tissue can be up to four times larger than in the normal brain. Other system characteristics that may depend on the targeted clinical application include FOV and spatial resolution. For instance, a larger FOV may be advantageous when only gross tumor detection is required, but may be inadequate for applications where cellular infiltrations need to be detected.

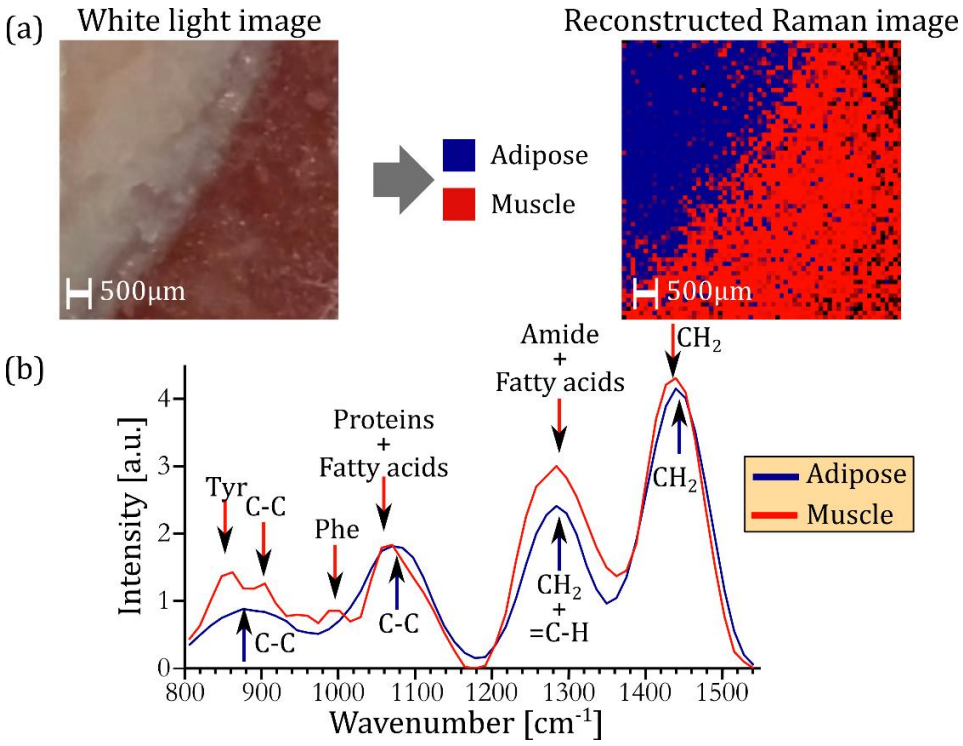

Figure 4.4. (a) Image on the left shows a white light photograph of the region imaged with the wide-field system. The image on the right is a false color rendering of the classification result. (b) Representative normalized spectra acquired with the wide-field system for adipose and muscle tissue.

Other important factors to consider are imaging time and sensitivity. These parameters can be improved in the actual wide-field system by using a different photodetection strategy. For example, the liquid crystal tunable filter transmits on average <30% of incoming light to an EMCCD with <45% quantum yield for wavelengths >785 nm. Imaging with improved spectral resolution could, for example, be achieved by using a CCD-grating spectroscopic detection system achieving rapid snapshot full-spectra acquisition through line scanning, instead of wavelength scanning, as is the case in Figure 4.1. Future work will address those issues through the development of a state-of-the art handheld imaging device combining Raman illumination with higher sensitivity and spectral resolution.

Funding. Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT); Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC); Canadian Institutes of Health Research (CIHR).

4.2.6 References

1. P. A. Valdes, F. Leblond, V. L. Jacobs, K. D. Paulsen, and D. W.Roberts, Curr. Med. Imaging Rev. **8**, 211 (2012).

2. C. Balas, Meas. Sci. Technol. **20**, 104020 (2009).

3. L. A. Austin, S. Osseiran, and C. L. Evans, Analyst **141**, 476 (2016).

4. I. Latka, S. Dochow, C. Krafft, and B. Dietzek, Laser Photon. Rev. **7**, 698 (2013).

5. M. Jermyn, K. Mok, J. Mercier, J. Desroches, J. Pichette, K. Saint-Arnaud, L. Bernstein, M. Guiot, K. Petrecca, and F. Leblond, Sci. Transl. Med. **7**, 274ra19 (2015).

6. M. Ji, D. A. Orringer, C. W. Freudiger, S. Ramkissoon, 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, Sci. Transl. Med. **5**, 201ra119 (2013).

7. H. Sato, T. Tanaka, T. Ikeda, S. Wada, H. Tashiro, and Y. Ozaki, J. Mol. Struct. **598**, 93 (2001).

8. E. Schmälzlin, B. Moralejo, M. Rutowska, A. Monreal-Ibero, C. Sandin, N. Tarcea, J. Popp, and M. M. Roth, Sensors **14**, 21968 (2014).

9. L. V. Doronina-Amitonova, I. V. Fedotov, A. B. Fedotov, and A. M. Zheltikov, Appl. Phys. Lett. **102**, 161113 (2013).

10. J. Zhao, H. Lui, D. I. Mclean, and H. Zeng, Appl. Spectrosc. **61**, 1225 (2007).

11. J. Desroches, M. Jermyn, K. Mok, C. Lemieux-Leduc, J. Mercier, K. St-Arnaud, K. Urmey, M.-C. Guiot, E. Marple, K. Petrecca, and F. Leblond, Biomed. Opt. Express **6**, 2380 (2015).

12. J. R. Beattie, S. E. J. Bell, C. Borgaard, A. Fearon, and B. W. Moss, Lipids **41**, 287 (2006).

13. H. Schmidt, K. Sowoidnich, and H. D. Kronfeldt, Appl. Spectrosc. **64**, 888 (2010).

14. J. R. Beattie, S. E. J. Bell, C. Borggaard, and B. W. Moss, Meat Sci. **80**, 1205 (2008).

CHAPITRE 5 ARTICLE 2: DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF A HYPERSPECTRAL RAMAN IMAGING SYSTEM FOR MESOSCOPIC TISSUE MOLECULAR CHARACTERIZATION

5.1 Mise en contexte

Dans la dernière section, un prototype de système d'imagerie Raman a été présenté capable de reconstruire des images sur un champ de vue 5 x 5 mm à travers une sonde flexible. Cependant, ce premier système est encore loin de satisfaire les spécifications requises pour une future implémentation clinique. Pour commencer, la résolution spectrale du système préliminaire est beaucoup trop faible pour permettre l'identification de composants spectraux requis à la discrimination de tissus biologiques dont la différence moléculaire est plus subtile comme pour les tissus sains et cancéreux [90]. À cela s'ajoute un très faible SNR causé par la très faible transmission du LCTF et de la MCF. Finalement, l'illumination et la détection du système préliminaire se font à travers deux chemins optiques différents ce qui ne reflète pas l'objectif du projet de développer une sonde d'imagerie flexible pouvant facilement être tenu par le chirurgien pour interroger les tissus. Le développement d'un système cliniquement viable à partir du système préliminaire constitue un projet complexe qui nécessite la modification d'un grand nombre d'aspects techniques et des connaissances accrues du cadre clinique de l'application visée. Un objectif plus réaliste a donc été fixé visant à faire la conception d'un système intermédiaire capable d'acquérir des spectres similaires en termes de SNR et de résolution spectrale à ceux obtenus par une sonde ponctuelle, dont les performances à discriminer les tissus cancéreux ont déjà été testées [42]. Pour augmenter à la fois la résolution spectrale et le SNR, le système de détection a été changé pour un système de balayage spatial linéaire en utilisant un spectromètre d'imagerie et un miroir rotatifs. Une nouvelle sonde d'imagerie a été développée pour optimiser la collection du signal et combiner l'illumination et la collection dans le but de mieux refléter le caractère flexible et malléable de la sonde. Pour comparer la nouvelle implémentation au système préliminaire, des expériences similaires à ceux du premier article ont été reproduites sur des tissus de viande porcine. Des résultats ont aussi été acquis sur des tissus présentant des différences moléculaires subtiles tels que la matière blanche et grise du cerveau de

veau. Au final, le nouveau système a répondu au deuxième objectif en démontrant sa capacité à reproduire des spectres similaires à ceux d'une sonde ponctuelle et à reconstruire des images basées sur leur contraste moléculaire. L'utilisation du spectromètre a permis d'atteindre une résolution spectrale comparable à la sonde ponctuelle, mais il n'a pas été possible d'aller chercher un SNR équivalent à celui de la sonde ponctuelle pour des raisons qui sont détaillées dans l'article qui suit.

Ces résultats ont été soumis pour publication dans la revue *Medical Physics* en juillet par Karl St-Arnaud avec l'aide des étudiants postdoctoraux Kelly Aubertin, Mathias Strupler et Wendy-Julie Madore, du neurochirurgien Kevin Petrecca, de la pathologiste Dominique Trudel et du professeur Frédéric Leblond. La contribution du premier auteur est évalué à environ 90% par sa participation et sa gestion des expériences, l'analyse des données recueillies et la rédaction de l'article. Les auteurs qui ont contribué à cet article sont affiliés au département de génie physique de Polytechnique Montréal, à l'axe d'imagerie du centre de recherche du CHUM ainsi qu'à l'institut neurologique de Montréal (MNI). La publication est présentement acceptée avec des révisions mineures.

La publication est reproduite avec permission du journal à la prochaine sous-section. Notez bien que les références pour cet article sont présentées à même la section 5.

5.2 Development and characterization of a hyperspectral Raman imaging system for mesoscopic tissue molecular characterization

Journal: Medical Physics

Karl St-Arnaud[1,2], Kelly Aubertin[2,5], Mathias Strupler[1], Wendy-Julie Madore[1,2], Kevin Petrecca[4], Dominique Trudel[3,5,6], Frédéric Leblond[1,2,*]

*Corresponding Author: frederic.leblond@polymtl.ca

[1] Dept. of Engineering Physics, Polytechnique Montreal, CP 6079, Succ. Centre-Ville, Montreal, QC, H3C 3A7, Canada

[2] Centre Hospitalier Universitaire de Montréal Research Center (CRCHUM), 900 Rue Saint-Denis, Montréal, QC H2X 0A9, Canada

[3] Dept. of Pathology, Centre Hospitalier Universitaire de Montréal, Montreal (CHUM), QC, H2X 3J4, Canada

[4] Department of Neurology and Neurosurgery, Montreal Neurological Institute and Hospital, McGill University, 3801 University St., Montreal, Quebec H3A 2B4, Canada¸

[5] CRCHUM / Montreal Cancer Institute, 900 Rue Saint-Denis, Montréal, QC H2X 0A9,

[6] Dept. of Pathology and Cellular Biology, University of Montreal, Montreal, QC, H3T 1J4, Canada

5.2.1 Abstract

Purpose: Raman spectroscopy is a promising cancer detection technique for surgical guidance applications. It can provide quantitative information relating to global tissue properties associated with structural, metabolic, immunological and genetic biochemical phenomena in terms of molecular species including amino acids, lipids, proteins, and nucleic acid (DNA). To date *in vivo* Raman spectroscopy systems mostly included probes and biopsy needles typically limited to single-point tissue interrogation over a scale between 100 and 500 microns. The development of wider field handheld systems could improve tumor localization for a range of open surgery applications including brain, ovarian and skin cancers.

Methods: Here we present a novel Raman spectroscopy implementation using a coherent imaging bundle of fibers to create a probe capable of reconstructing molecular images over mesoscopic fields of view. Detection is performed using linear scanning with a rotation mirror and an imaging spectrometer. Different slits widths were tested at the entrance of the spectrometer to optimize spatial and spectral resolution while preserving sufficient signal to noise ratios to detect the principal Raman tissue features. The new wide-field probe was tested on *ex vivo* sample of calf brain and swine tissue. Raman spectral content of both tissue types were validated with data from the literature and compared with data acquired with an established single-point Raman probe.

Result: We have developed and characterized a practical non-contact handheld Raman imager providing tissue information at a spatial resolution of 115 microns over a field of view >14 mm^2 and a spectral resolution of 6 cm^{-1} over the whole fingerprint region. Typical integration time to acquire an entire Raman image over swine tissue was set to approximately 100 s. Spectra

acquired with both probes (single point and wide-field) showed good agreement, with a Pearson correlation factor > 0.85 over different tissue categories. Protein and lipid content of imaged tissue were manifested into the measured spectra which correlated well with previous findings in the literature. An example of quantitative molecular map is presented for swine tissue and calf brain based on the ratio of protein-to lipid-content showing clear delineations between white and gray matter as well as between adipose and muscle tissue.

Conclusion: We presented the development of a Raman imaging probe with a field of view of a few millimeters and a spatial resolution consistent with standard surgical imaging methods using an imaging bundle. Spectra acquired with the newly developed system on swine tissue and calf brain correlated well with an establish single-point probe and observed spectral features agreed with previous finding in the literature. The imaging probe has demonstrated its ability to reconstruct molecular images of soft tissues. The approach presented here has a lot of potential for the development of surgical Raman imaging probe to guide the surgeon during cancer surgery. In addition, the technology is perfectly suitable for less invasively instruments as imaging endoscope which are usually built around imaging probe. Under few modifications, Raman imaging modality could be added to those instruments and provide a better contrast between the different type of tissue.

Key words: Raman spectroscopy, Medical imaging, Surgery, Molecular imaging, Spectrometers

5.2.2 Introduction

In oncology, surgical resection remains the first line of defense against most solid cancers with patient outcome directly impacted by residual cancer tissue and cells. This is because residual cells are the cause of recurrences [1,2,3] and achieving a high degree of tumor resection can positively impact the potency of adjuvant therapies including chemotherapy and radiotherapy. While surgical approaches and strategies greatly vary across pathologies and organ sites, the need for highly accurate cancer detection approaches is common to all surgical oncology procedures. For instance: in prostate the whole organ is often resected but cancer can invade beyond the prostate [4]; in skin and breast cancer it is common to resect safety margins to reduce the likelihood of residual tissue but minimizing the size of these margins can have a positive clinical impact [5,6]; in gynaecological cancers (*e.g.* ovarian cancer) several organs are removed as a precautionary measure but there often remains tumor nodules in the abdominal cavity. For other pathologies

including brain tumors (*e.g.* gliomas), surgical strategies are different requiring normal tissue removal to be minimized to limit the impact on neurological functions but achieving resections as complete as possible critically affects patient survival [7].

In modern medicine, surgical planning is achieved based on contrast detected preoperatively using conventional imaging techniques including magnetic resonance imaging, computed tomography, ultrasound and nuclear medicine functional imaging techniques such as positron emission tomography. For some surgical applications (e.g., neurosurgery), pre-operative images are spatially registered with the coordinates of the operating room using sophisticated navigation techniques. However, co-registration methods and organs shifts can lead to large registration errors making it difficult to localize margins [8] and high costs of such instrumentation can be prohibitive. As a result, for most surgical oncology applications surgeons must rely on visual inspection and palpation of the tissue, which lacks sensitivity and specificity for detecting subtle molecular changes associated with differences between cancerous and normal tissue, thereby often limiting the surgeon's ability to remove the full extent of a tumor or leaving behind small tumor nodules. There is thus a critical need for a dedicated tool for highly accurate margins assessment to assist surgeons and improve the completeness of cancer resection.

Over the past few decades, label-free imaging techniques exploiting intrinsic optical tissue contrast (*e.g.* fluorescence [9], diffuse reflectance [10], Raman spectroscopy [11]) have shown potential in oncology to be used as surgical guidance tools [12]. In particular Raman spectroscopy (RS) distinguishes itself from fluorescence and diffuse reflectance by providing highly specific information relating with molecular bonds in amino acids, lipids, proteins, and nucleic acid (DNA) [13]. RS is based on the detection of inelastically scattered light following tissue excitation with a near-infrared laser. However, inelastic scattering events resulting from the excitation of vibrational molecular bonds are relatively rare, occurring approximately for 1 over 10^7 photonic events. High quality optics and filters combined with frequency-stabilized laser and sensitive spectroscopic cameras are required to detect and isolate the Raman signal from large background signals associated with elastic scattering (Rayleigh scattering), tissue fluorescence and, depending on the application, ambient light sources. Improvements in laser and sensor technologies over the past decade have led to progress in Raman spectroscopy technology making its applicability for surgical applications possible [11] noticeably in the form of single-point probe designs [14]. Those instruments are implemented using fiber optics to relay illumination and

detection through a small probe that can be held by the surgeon. Several groups have shown discrimination of cancerous tissues in real time using those probes with an average accuracy <85% [15,16,17,18]. However, current probes are restricted to single point analysis, interrogating a surface from roughly 100 to 500 µm.

Imaging rather than single-point probes could benefit surgeons allowing more complete visualization of the tumor extend close to margins. Such probes could also be used as auxiliary instruments by pathologist to quickly analyze biopsies. Clear visualization of tumor margins was shown *in vivo* in mice using coherent Raman imaging [19], or a raster scanning point probe [20]. However, the applicability of those implementations is limited either by the small field of view or prohibitively large imaging times. Moreover, these instruments are expensive, bulky and may require the sample to move for scanning purposes. Some Raman imaging probe implementations have shown promises for faster clinical translation as surgical guidance tools. One probe was developed by using a miniaturized scanning system at the tip of a probe, but the field of view was limited to a diameter below 100 µm [21]. Other probes were developed using fibers array spectral translation composed of a few dozens of optical fibers aligned to capture an image at the tip of the probe and reorganized at the detection end along the slit height on the spectrometer. This method was used successfully by a few groups to image blood cells [22], chemical components [23] and soft tissue [24]. However, the discretization of the image is limited to the number of spectra simultaneously acquired by the spectrometer. Another option is to use a coherent bundle of fibers composed of few thousands of coherently aligned optics fibers in which an image captured at its proximal end can be displayed at its distal end without any loss of integrity. Imaging bundles were used in the past for the design of fluorescence and reflectance probes for biological applications [25,26]. More recently, an imaging bundle was used in a Raman imaging probe developed by our group with a field of view of 25 mm^2 and a spatial resolution of 55 µm [27]. The probe allowed for differentiation between fat and muscle of swine tissue based on molecular contrast. However, the imaging system was limited by its spectral resolution of 95 cm^{-1} and a poor signal transmission.

Here we are presenting the development and characterization of a non-contact 2 cm working distance handheld Raman imaging probe with a spatial resolution <125 µm and a spectral resolution of 6 cm^{-1} over a field of view of 14 mm^2 and a spectral domain covering the whole biological tissue fingerprint region. A tissue imaging proof-of-principle is presented that is not

specifically aimed at any particular oncology application, setting the stage for the technique to be tested for surgical guidance in the scope of clinical studies during open surgery procedures such as in skin, breast and brain cancer. Development steps are presented leading to a system achieving a spectral resolution and a light throughput suitable to detect the main Raman features associated with biological tissue. Our study details the principal characteristics of the system and discusses the data processing steps leading to the retrieval of calibrated hyperspectral Raman images in less than 100 s leaving further optimization to reduce imaging time for later work. An *ex vivo* proof-of-principle is presented using calf brain and swine tissue samples demonstrating molecular images can be created to distinguish tissue types based on Raman contrast. Validation of the system is achieved by comparing spectra from the new system with data obtained using a proven single-point Raman spectroscopy probe as the gold standard.

5.2.3 Materials and methods

5.2.3.1 Mesoscopic Raman imaging system

5.2.3.1.1 Mesoscopic Raman imaging system

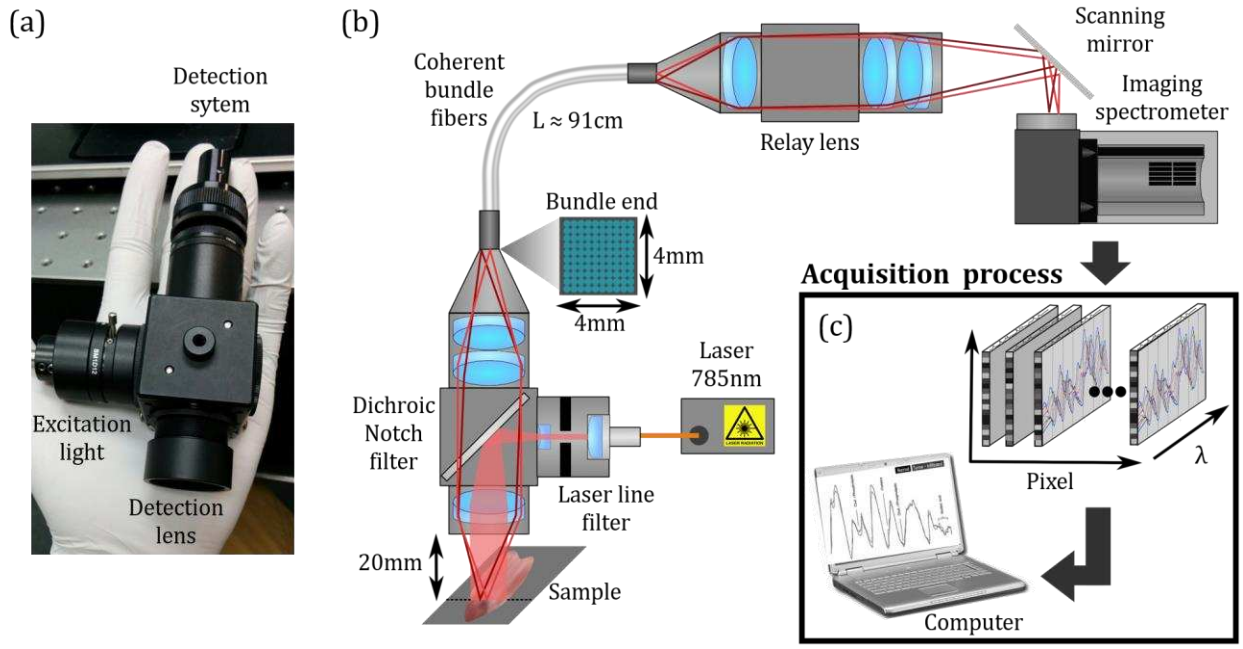

Figure 5.1. (a) Image of the handheld probe showing the position of the detection lens and the ports associated with light excitation and detection; (b) Schematic depiction of the wide-field

spontaneous Raman imaging system; (c) Representation of a hyperspectral image consisting of multiple concatenated spectrally-resolved line acquisitions.

The Raman spectroscopy (RS) system is composed of a handheld imaging probe and an illumination/detection module. Figure 5.1 presents a schematic of the system's main components, as well as a photograph of the probe. The imaging probe (Fig. 5.1(a)) includes a side port for wide-field sample illumination and a back port for hyperspectral signal detection. A monochromatic wavelength-stabilized laser centered at 785 nm (Innovative Photonic Solution, New Jersey, USA) is controlled with analog tension and coupled to the illumination port. The laser can deliver up to 1.5 W and is filtered using a 785 ± 3 nm laser line filter (Semrock, New York, USA) prior to being redirected toward the imaging optics of the system (Fig. 1(b)) using a dichroic notch filter centered at 785 nm (Semrock, New York, USA) with optical density (OD) >5. A 6 mm diameter light field illuminates the sample and the working distance of the detection optics is 20 mm. To maximize the homogeneity of the illumination field, an iris is disposed along the illumination path with aperture opening adjusted to keep only light that is ~60% of the maximum intensity of the Gaussian output beam.

Backscattered light from the sample is transmitted through the dichroic notch filter responsible for rejecting the Rayleigh component (elastic scattering) of the signal. The imaging bundle has a 91 cm length and consists of a square array of 400 x 400 fibers with 10 µm diameter each, a numerical aperture (NA) of 0.6 and an average light transmission of 45% (Schott, Germany). The detection subassembly projects complete images of the proximal end of the bundle onto the entrance slit of the spectrometer. The scanning mirror ensures full Raman spectroscopic images can be reconstructed by moving the projected images onto the entrance slit of the spectrometer. The scanning mirror consists of a 25 mm circular aperture mounted onto a single axis galvanometer (Model 6240H, Cambridge Technology, USA). A field of view (FOV) of 4.0 mm by 3.5 mm was measured along the scanning axis (*X* axis) and along the detector slit height (*Y* axis), respectively. The spectrometer (Emvision LLC, Florida, USA) has a 1:1 magnification and was custom-built to accommodate three interchangeable slits. Choosing slits with different widths allowed to find an optimal compromise between light throughout and spectral resolution. An annealed long-pass filter centered at 808 nm (Semrock, New York, USA) ensures rejection of any residual Rayleigh scattering light. Inelastically scattered light detection is achieved using a back illuminated CCD camera with a rectangular chip (Newton 920BR-DD, cooled down to -

50°C, QE > 90% at 850 nm). The sensor has 256 X 1024 pixels of 26 µm size and can detect up to 256 spectra associated with the image of a line on the sample. The optics of the system was designed ensuring each line is projected along the shorter length (6.6 mm) of the chip through the length of the entrance slit. The sensor can detect up to 1024 spectral features in the fingerprint RS region from 807 to 932 nm (355 to 2000 cm^{-1}). The camera is limited to ~6 frames/second when operating at is the maximum read-out rate. A shutter (model CH-61, EOPC, New York, USA) is placed at the entrance slit to eliminate smearing effect caused by the generation of undesired signals during the read-out process.

5.2.3.1.2 Custom software for instrument control and data acquisition

Data acquisition and hardware control was performed using a custom Labview software (National Instruments, USA) with the laser, scanning mirror, shutters and imaging spectrometer synchronized using a USB-6351 multifunction I/O device (National Instruments, Texas, USA). The software allows sequential data acquisition for hyperspectral lines on the tissue, then shifts the mirror to the next position before another cycle of acquisition is initiated. The process continues until line scanning covering the entire pre-determined field of view is completed. The line images are then concatenated to create a hyperspectral map (Fig 5.1(c)). The software acquires 30,720 spectra per acquisition, over an area of 4.0 x 3.5 mm. Total acquisition time will vary depending on tissue properties (absorption, elastic scattering and fluorescence) and so should be optimized for each application. For example, a 100 s imaging time leads to a SNR (Maximum peak intensity divided by standard deviation of the noise) of ~9.75 on the CH2 peak at 1438 cm^{-1} for ex vivo porcine adipose tissue.

5.2.3.2 System optimization and characterisation

The slit width of the spectrometer affects the spectral resolution and the amount of light collected, as well as the spatial resolution of each line imaged on the tissue surface. Here data analysis associated with three different slit widths (50, 75 and 100 µm) was considered to find the optimal compromise between spectral resolution, light throughput, and spatial resolution for tissue imaging. To this end a thorough system characterisation study was conducted evaluating the impact of slit width on each of those parameters. The three slit width values were selected based on theoretical computations insuring a spatial resolution <125 µm and a spectral resolution

below 8cm^{-1} can in principle be achieved allowing to accurately resolve the principal Raman features associated with biological tissue [28].

5.2.3.2.1 Spectral resolution

The spectral resolution of the system was evaluated using a sample of calcite which has a strong and narrow Raman peak centered at 1085 cm^{-1}. Calcite is commonly used as a standard to measure the spectral resolution of Raman systems with a standard accuracy of 20% [29]. The sample was imaged with 400 ms integration time per spectral line using each of the three slit widths. The full width at half maximum (FWHM) of the calcite peak was evaluated for each spectrum acquired and used to compute the spectral resolution [29].

5.2.3.2.2 Spatial resolution and system response

A standard USAF 1951 transmission resolution target was imaged using a tungsten lamp to evaluate the spatial resolution of the system. Images were registered with [60, 80, 100, 120, 140, 160 and 200] motor steps for each entrance slit using a constant 100 ms integration time. All acquired images were averaged along the spectral axis before being normalized by the spatial illumination of the source measured from a uniform region on the target. To evaluate the spatial resolution, the contrast associated with each group element within the target was evaluated along both the *X* and *Y* axes by computing the ratio between the average normalized intensity of the reflective glass lines and the metallic spacing used as a reference. Spatial resolution was defined by the element with a minimal contrast value of 27% in accordance with the Rayleigh criterion [30].

Spectral acquisitions were made of a uniform polytetrafluoroethylene (PTFE) sample to assess the linear response of the system in terms of signal and noise using the signal to background ratio (SBR) associated with specific Raman peaks as a surrogate. The PTFE has several peaks of different intensities over the spectral range of the system. The sample was imaged with different integration times and entrance slits using a constant laser power of 950 mW. One representative spectrum was obtained from each Raman image by averaging five spectra across the field of view. For each representative spectrum, four peaks were selected for processing: 731 cm^{-1}, 1280 cm^{-1}, 1302 cm^{-1} and 1380 cm^{-1}. The maximum intensity and the background values were computed and divided to obtain the SBR. Here the background is mainly associated with

autofluorescence and is estimated for each peak as the average intensity from either side of each peak.

5.2.3.3 Data calibration

All spectra and images presented in this study were submitted to the same calibration and data pre-processing procedures: 1) spectral calibration, 2) dark count removal, 3) correction for the system's spectral and spatial responses, and 4) background subtraction. Those data processing steps are now briefly described. Equation 5.1 models the raw signal acquired for each spatial position x_i, y_i and wavenumber ν_i (i = 1, 2, …, N, where N is the total number of pixels) where t is the integration time and I the intensity of the excitation light.

$$\begin{aligned} I_{raw}(x_i, y_i, \nu_i, I, t) \\ = E_{xy}(x_i, y_i) \times E_{\nu}(x_i, y_i, \nu_i) \times [R(x_i, y_i, \nu_i, I, t) \\ + B(x_i, y_i, \nu_i, I, t) + D(x_i, y_i, \nu_i, t)] \end{aligned} \tag{5.1}$$

The measured Raman signal is labeled $R(x_i, y_i, \nu_i, I, t)$, and other non-Raman quantities affecting the signal include the spatial and spectral instrument response function $E_{xy}(x_i, y_i)$ and $E_{\nu}(x_i, y_i, \nu_i)$, background signal associated with potential ambient light sources $D(x_i, y_i, \nu_i, t)$, intrinsic tissue fluorescence background & residual Rayleigh scattering bleed-through $B(x_i, y_i, \nu_i, I, t)$ and various sources of stochastic noise (*e.g.*, shot noise and read-out noise). A Matlab (MathWorks, USA) program was custom-made to isolate the Raman-specific component from the raw signal for each pixel x_i, y_i:

$$R(\nu, I, t) = \frac{I_{raw}(\nu, I, t) - D(\nu, t)}{E_{xy}E_{\nu}(\nu)} - B(\nu, I, t) \tag{5.2}$$

The first correction step allowed for spectral calibration on the camera sensor. The calibration associating all 1024 pixels to their Raman shift axis must be done independently for each of the 256 spectral lines to correct the smile aberration that causes translation of up to 0.7nm (9.4 cm^{-1}) between spectral features at the bottom of the sensor and at the middle of the sensor. The calibration was performed using acetaminophen since it exhibits several strong spectral features over the spectral domain of the system. This data was used to determine the Raman shift axis for

each pixel position. Spectral content was limited and calibrated from 940 to 1800cm^{-1}. Following this procedure, all pixels of the Raman image were expressed on a common spectral base and post treatment in Eq. (5.2) was applied for each pixel of the hyperspectral image.

The second step of the calibration procedure required a measurement without any laser excitation at the beginning of every set of measurements to estimate the dark count $D(\nu, I, t)$ and subtract it. Since light sources in the room were constant throughout the experiments, only one dark count measurement was needed for all subsequent measurements performed with the same integration time. The third step addressed the system efficiency, both spatially (laser illumination profile across the field of view), and spectrally (spectral response of all optical components). Spatial efficiency E_{xy} was calculated using the intensity map of the 1302 cm^{-1} Raman peak of Teflon obtained from a uniform sample. The intensity map was normalized to unity and pixels below a third of the maximal value were associated with dead pixels in the image. The instrument's spectral response function E_ν was also measured in this step using a 785 nm Raman standard (Model SRM2241, National Institute for Standards and Technology (NIST), USA) which generates a fully characterized luminescence spectrum $R_T(\nu)$. Ten measurements were performed on the Raman standard to minimize the contribution from the noise and spectral response $E_\nu(\nu)$ was isolated in each pixel by dividing the measure by $R_T(\nu)$.

The fourth and final calibration step addressed mainly the autofluorescence background removal. Here, a similar method to iterative polynomial regression [31] was used, and consisted of a smooth curve estimation using the *smooth* function of Matlab through a large window. The size of the window was chosen so that it was at least 3 times larger than the typical larger of one Raman peak resulting in 90 spectral features. For each iteration, spectral features above the given threshold (1% of the spectrum standard deviation) compare to smooth curve fit were replaced by the smooth curve for the next iteration until no spectral features above the threshold remained. Noise filtering was also applied at the end of the post treatment on $R(\nu, I, t)$ using a Savitsky-Golay filter (windows: 15, fit: 2nd order).

5.2.3.4 Ex vivo animal specimen imaging

To further characterize imaging performances of the imaging system, experiments were conducted imaging *ex vivo* animal specimens namely calf brain and tissue along the *longissimus dorsi* muscle of a swine. Samples were purchased from the grocer, cut in slices of approximately

1 cm thick and frozen overnight between two flat surfaces to surface targeted for imaging is a flat as possible. Measurements were performed the next day at an ambient temperature of 20°C over tissue regions containing two tissue types of interest: gray and white matter for calf brain, fat and muscle tissue on swine meat sample. For calf brain acquisitions, integration time was fixed at 900 ms per spectral line for a total acquisition time of 123 s when adding the read-out time and the shutter transfer time of the camera. The laser power was set at 950 mW over an area of 28 mm^2, which represent an intensity of 33.9 mW/mm^2. The same power was used over the sample of swine tissue, but the integration time per spectral line was reduced to 700 ms for a total acquisition time of 100 s. Each hyperspectral image was post-processed using the procedure outlined in section 2C.

Table 5.1. Main Raman peaks found in calf brain and porcine tissue along with the main vibrational bonds and organic molecules at the origin of the optical contrast.

Raman shift (cm^{-1})	Main source of molecular contrast	Organic molecules	References
970	=C-H out-of-plane bend *cis*	Lipid	[33]
1002	Phenylalanine breathing mode (insensitive to biochemical environment)	Protein	[34,35]
1064	C-C Aliphatic out-of-phase stretch	Lipid	[33,35]
1085	C-C Aliphatic stretch	Lipid	[36,35]
1125	C-C aliphatic in-phase stretch, C-N stretch in protein	Lipid & protein	[36,35]
1265	=C-H symmetric rock cis or amide III band	Lipid & protein	[36,35]
1296	$>CH_2$ twisting (all in phase)	Lipid	[36,35]
1339	CH_2/CH_3 wagging, twisting &bending of lipids, nucleic acids	Lipid & nucleic acid	[35]
1368	CH_3 Symmetric deformation (umbrella)	Lipid	[33]
1438	$>CH_2$ Symmetric deformation (scissor)	Lipid	[33,35]
1458	CH_3 Antisymmetric deformation	Lipid	[36,35]
1558	Tyrosine	Protein	[35]
1608	Tyrosine, Phenylalanine ring vibration	Protein	[34,35]
1640	Amide I band	Protein	[34,35]
1655	C=C stretch, Amide I band	Lipid & protein	[33,34,35]

An initial experiment was planned in order to benchmark spectra acquired with the wide-field probe (WFP) against measurements from an established single-point probe (SPP) [32]. For SPP measurements, integration time was fixed at 150 ms per point and averaged over 3 different

acquisitions for a total of 450 ms. The contact SPP illuminated an area of 0.2 mm^2 with a laser power of 50 mW, which represents an intensity of 250 mW/mm^2. To quantify the similarity between the spectra acquired with both systems, the Pearson correlation factor (R) was calculated on the overlapping spectral region from 950 cm^{-1} to 1650 cm^{-1}.

A second experiment was designed to assess the ability of the WFP to detect known Raman tissue signatures in brain and swine meat. Table 5.1 presents the principal Raman shifts associated with both of those tissues as well as the main sources of vibrational contrast.

A third experiment was designed to test whether or not Raman images obtained with the WFP can be used to recreate tissue maps with molecular specificity at mesoscopic scales. To this end, images were formed based on the contrast associated with ratios between peaks whose intensity changes between tissue types. Peaks, spectral widths and spectral regions were carefully chosen to maximize molecular information and to insure strong Raman signal-to-noise ratios inuring highest quality images. The first ratio was obtained by dividing the lipid peak at 1438 cm^{-1} (scissor deformation of CH_2) with the integral over a specral region (1605 to 1640 cm^{-1}) capturing peaks associated with several proteins including tyrosine, phenylalanine and amide I band. The molecular interpretation of this ratio is that it correlates with the concentration of lipids. A second ratio was computed by dividing the lipid and protein peak at 1265 cm^{-1} with a pure lipid peak at 1296 cm^{-1}. The molecular interpretation of this ratio is that it correlates with the concentration of proteins. Both ratios were computed for each pixel and encoded in different colormaps for visual representation. Each colormap channel was normalized to its minimal and maximal values.

5.2.4 Results

5.2.4.1 Characterization of the mesoscopic Raman imaging system

Table 5.2 and Figure 5.2 present a system performance evaluation in terms of spectral resolution, spatial resolution and signal-to-background ratio (SBR) to be used as a basis to select the optimal slit width, number of motor steps and integration time per line for tissue imaging.

The spectral resolution of the system was measured using calcite for each of the three slit widths and are reported in Table 5.2. The theoretical values associated with each measurement are also listed and were computed using a spectrometer bandpass formula [37]. Measured resolutions were

always larger compared with the theoretical values by >25% because experimental peak detection always includes at least a minimum of three pixels. Based on this evaluation, a slit width of 75 μm and less lead to a spectral resolution <8 cm^{-1} and would allow principal tissue Raman peaks to be imaged.

Table 5.2. Experimental and theoretical resolution of the Raman imaging system for different spectrometer slit widths.

Slit width (μm)	$\delta\omega_{exp}[cm^{-1}]$	$\delta\omega_{theo}[cm^{-1}]$
50	4.75	3.25
75	5.97	4.88
100	8.14	6.51

SBR analyses are only presented for the Teflon (PTFE) peak at 1302 cm^{-1} since it leads to the same conclusions as the other peaks that were considered. The SBR as a function of integration time for different slit widths is shown in Fig. 5.2(a). For low integration time, SBR presents a clear advantage for larger slits because of the increased light throughput and improved signal to noise ratio (SNR) associated with the inelastic scattering part of the signal. For sufficiently large integration time, Raman signal is less affected by the noise and both the Raman and background components of the raw signal are increasing linearly with integration time causing the SBR to asymptotically converge to a maximum value. For Teflon, this critical time to reach the plateau is around 400 ms but it will differ for different materials and will be longer in biological tissue because of the presence of larger autofluorescence backgrounds. For larger slits, the spectral content of each peak will spread out over more pixels (degradation of spectral resolution, see below) and the total intensity per pixel will decrease. The background intensity is not affected by the spectral resolution since it is continuous over the spectral range and therefore larger slits may not give optimal SBR for large Raman SNR as shown by all the slit reaching the same asymptotic value. However, since the signal of biological tissue is expected to be smaller than for Teflon the integration time required to reach the SBR plateau may be larger and therefore a larger slit should be privileged to optimize signal detection. Although the 100 μm slit width should be selected based on the SBR analysis, as shown above it doesn't fit the spectral resolution requirement for the system. Based on the SBR analysis and spectral resolution constraint, a slit width of 75 μm should be selected since it SBR value is larger than 50 μm yet very close to 100 μm for

integration times above 400 ms. However, because of the expected smaller Raman signal in tissue, a minimum value of 700 ms is chosen moving forward with the tissue experiments.

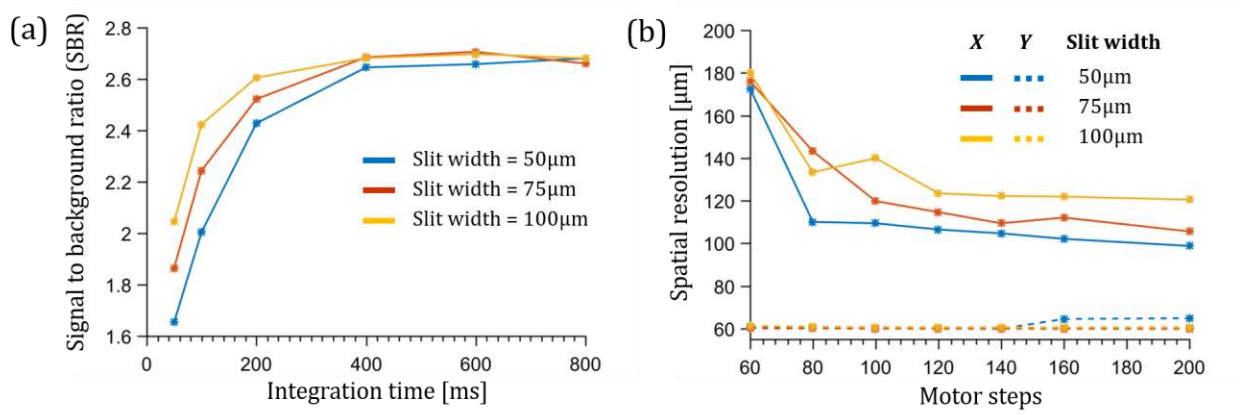

Figure 5.2. Signal to background ratio (SBR) and spatial resolution for three different entrance spectrometers slit width: (a) SBR as a function of integration time; (b) spatial resolution as a function of the number of motor steps along the *X* and *Y* axes of the image.

Figure 5.2(b) presents the spatial resolution of the system along the *X* and *Y* axes of the image for all three slit widths as a function of motor steps. The spatial resolution along the *Y* axis is limited by the constant value of 62 µm due to aberrations generated by optical components in the detection path. The spatial resolution along the *X* axis is mainly limited by the entrance slit width and the number of motor steps. Fewer motor steps lead to a poorer spatial resolution and as the number of steps increases the spatial resolution sharpens until it reaches a slit width-limited maximal spatial resolution at about 120 motor steps for all slit widths. Although the optimal spatial resolution is associated with the 50 µm, the gain of <10 µm in spatial resolution compared with the 75 µm slit does not justify the loss in light throughput.

5.2.4.2 Ex vivo animal specimen imaging

Based on the system characterisation results from Section 2, the main specifications and acquisition parameters retained for tissue imaging are reported in Table 5.3. Briefly, the 75 µm slit width was used to insure a spectral resolution of approximately 6 cm^{-1} because it is suitable for discerning most of the spectral components of biological tissue. The number of motor steps was fixed at 120 since very few improvements were observed for larger motor steps. The resulting spatial resolution was 115 µm and 62 µm along the *X* and *Y* axes, respectively.

Table 5.3. Raman imaging system technical specifications selected for the ex vivo tissue experiments.

	Specifications
Field of view	3.5 x 4.0 mm
Working distance	20mm
Entrance slit width	75 µm
Number of motor step	120
Spatial resolution	*Y*-axis: 62 µm *X*-axis: 115 µm
Total number of voxel	256 (*Y*-axis) x 120 (*X*-axis) x 1024 (spectral features)
Spectral resolution	~6 cm^{-1} (@ 1085 cm^{-1})
Spectral Range	940 – 1800 cm^{-1}
Registration time	16s (read out and shutter transfer time)
Integration time	700-900 ms per spectral line (100-123s in total)

5.2.4.2.1 Wide-field vs. single-point probe measurements

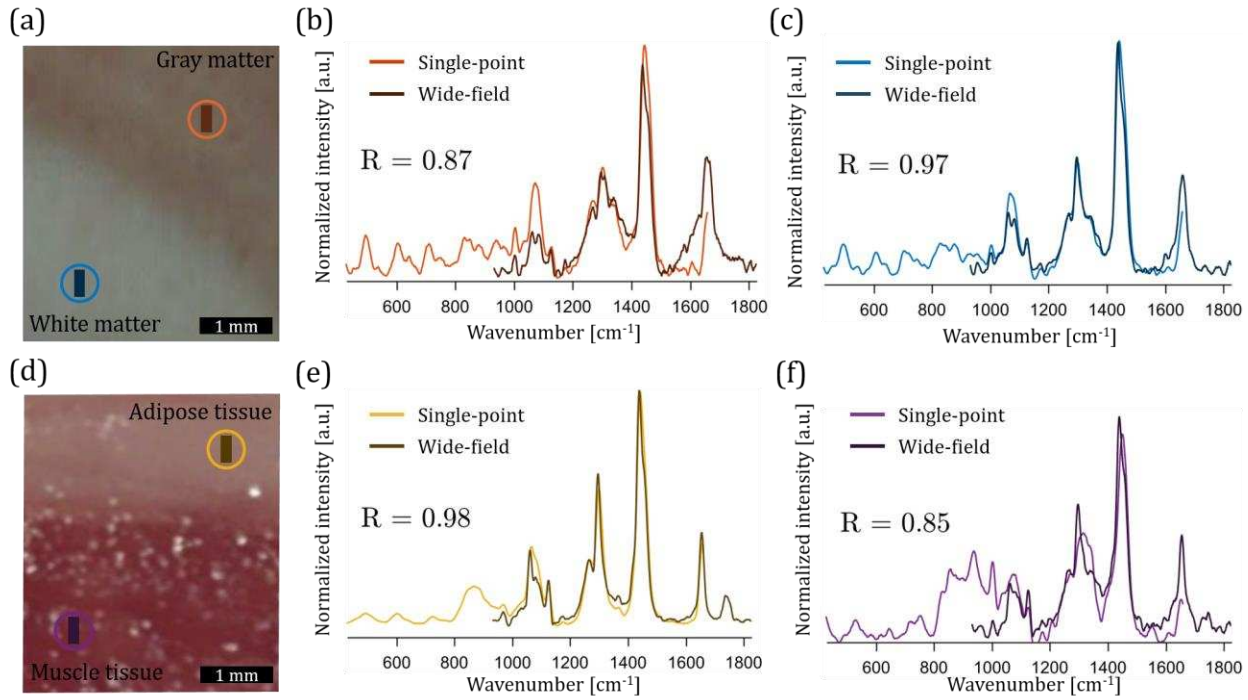

Figure 5.3. (a) White-light image of a calf brain showing the area where a Raman image was acquired: the circles and rectangles represent the region where SPP and WFP are compared: (b) gray matter, (c) white matter. (d) White-light image of porcine meat sample showing the area where a Raman image was acquired: the circles and rectangles represent the region where SPP and WFP are compared: (e) adipose tissue, (f) muscle tissue.

Figure 5.3 shows white light images and representative Raman spectra for calf brain and porcine tissue. SPP acquisitions are identified with a circle whereas the WFP sub-regions with which it was compared (121 pixels averaged to one spectrum) are identified by a rectangle. Figures 5.3 (a) and (d) show white light structural images of the calf brain and swine meat sample, respectively. Figures 5.3 (b) and (c) show Raman spectra acquired with the SPP and WFP for gray matter and white matter, respectively. Fig. 5.3 (e) and (f) show the same information for adipose and muscular tissue in porcine tissue, respectively. The Pearson correlation factors were R=0.87 and 0.85 for gray matter and muscle. Fat and white matter spectra showed higher correlation factors with R > 0.97.

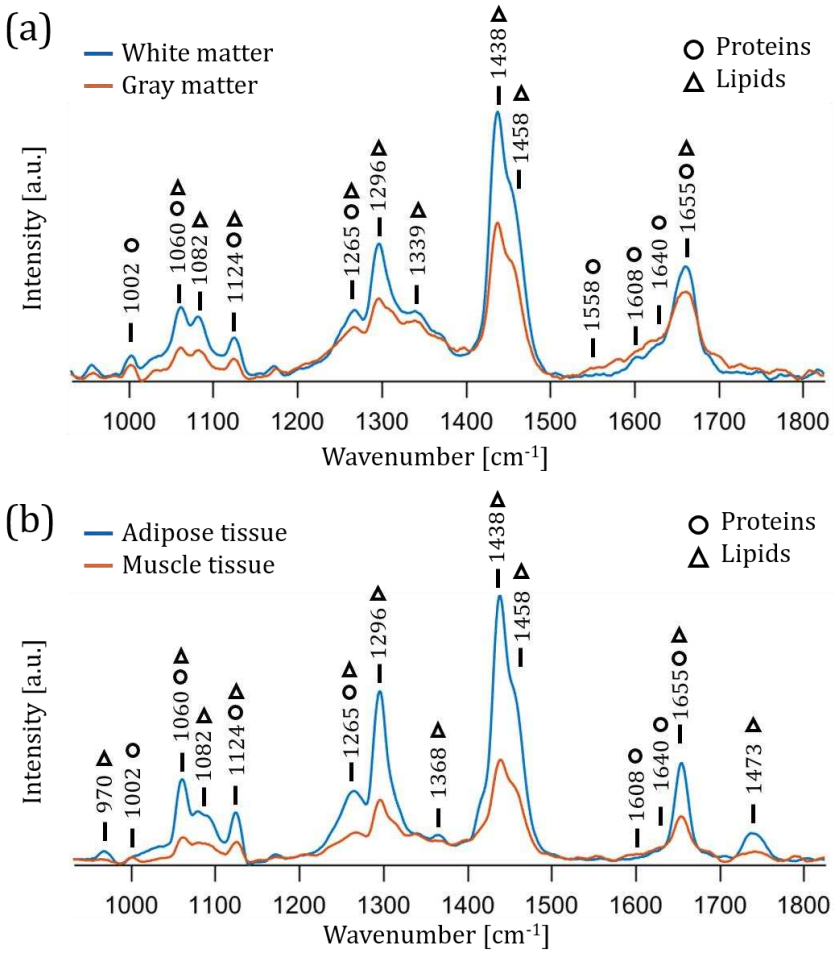

Figure 5.4. Raman spectra acquired with the imaging system on ex vivo samples for: (a) white and gray matter in a calf brain, (b) adipose and muscle tissue in porcine meat. The main tissue peaks are identified according to whether they are mostly associated with proteins (circles) or lipids (triangles).

5.2.4.2.2 Identification of main tissue peaks

Figure 5.4 presents a comparison between WFP spectra of different tissue types in calf brain and porcine tissue. The main tissue peaks were labeled with containing mostly protein and/or lipids according to the molecular vibrations listed in Table 5.1. As previously reported, white matter presents a higher content in saturated lipids which resulted into an increase of the peaks at 1065, 1296 and 1438 cm^{-1} [38]. Gray matter, on the other hand, presented a larger concentration of protein which resulted in a shaper peak at 1002 cm^{-1} associated with phenylalanine and higher peak intensities at 1608, 1620 and 1640 cm^{-1} [35]. Similar behaviour can be observed on swine tissue where muscle is shown to present several spectral features associated with high protein content [34], while adipose tissue presented a larger concentrations of fatty acid [33,36]. Since muscle tissue also contains fatty acids, the protein peaks close to the lipid peaks might have been overwhelmed by the contribution of lipid signal from those tissues.

5.2.4.2.3 Molecular image reconstruction

The system's capability to recreate molecular image was validated by forming images based on contrast associated with peak ratios predominantly representing either lipid or protein content. Figures 5.5 (a) and (c) present the imaging results for the calf brain specimen, while Fig. 5.5 (b) and (d) show the corresponding swine tissue results. In those images the green color map represent the protein-rich ratio, whereas the blue color map scales with the ratio that correlated with lipid-rich content. As was expected, both the gray matter and the muscular tissue show a high protein content, while white matter and adipose tissue show a higher concentration of lipids. The frontier between different types of tissue is depicted with a dash line overlay on both the white light and reconstructed images.

5.2.5 Discussion and conclusion

In this study, a mesoscopic wide-field Raman imaging probe was developed using an imaging bundle of fibers. This work represents the first attempt toward the development of a practical Raman imaging handheld probe with a mesoscopic field of view of view of 3.5 x 4.0 mm and respective spatial resolutions of 62 µm and 115 µm along *Y* and *X* axis and spectral resolution of 6 cm^{-1}. *Ex vivo* animal specimens were successfully imaged to generate maps of Raman spectra.

The implementation of this system compared well with state-of-the-art single-point RS probes. It also allowed for visualization of Raman shifts as predicted in the literature.

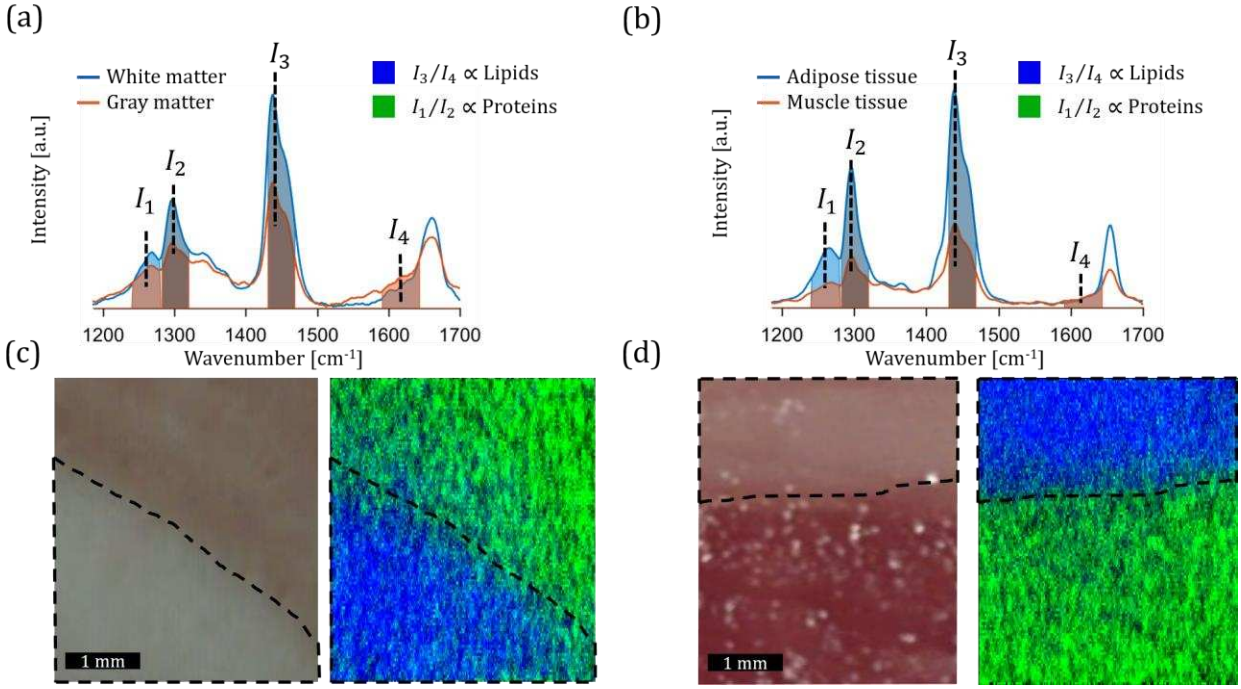

Figure 5.5. Representative Raman spectra showing the peaks and spectral regions used to compute ratios associated with lipids and proteins for: (a) white and gray matter in calf brain, (b) adipose and muscle tissue in swine specimens. Reconstructed molecular images for: (c) calf brain and (d) swine muscle. For visualization purposes the frontier between different tissue types is depicted by a dash line. Green and blue color shows a high content in protein and lipid, respectively.

To preliminarily demonstrate the ability of the system to detect margins between different tissue types, molecular maps of calf brain and swine tissue were generated based on ratio of protein and lipid contents showing clear delineations between white and gray matter as well as between muscle and adipose tissue. In the literature, other groups have used the ratio between lipid and protein Raman peak to discriminate between cancerous and normal tissue [15,19,39]. As a result, the approach used here could potentially be used in the future to discriminate between cancerous and normal tissue based on spectral features associated with protein and lipid content. However, even if the reconstructed images in Fig. 5.5 show a dominant green and blue color over their respective tissues type, there is a 500µm region around the edge of both tissues that is not well defined.

Since the illumination covers the entire field of view for each spectral line acquisition, detection in each point may have been affected by spatially offset Raman scattering leading to migration of photons generated deeper in the tissue up to a point on the surface spatially offset from the illumination [40]. Signal generated by the illumination over the fat tissue may diffuse up to reach the surface of muscle tissue leading to a blurry edge between the two tissues. This problem could be corrected along one axis of the image using line scanning illumination, but this would require the addition of a scanning illumination system inside the probe. Other factors as the tilt and roughness of the surface sample may also explain the blurry edge.

Minor differences in the spectra from both probes (Fig. 5.3) can be observed especially between 1000 and 1200 cm^{-1} for white matter where a single peak is observed with the SPP while two peaks are resolved with the WFP. The wide field system has a spectral resolution of 6 cm^{-1} which is more than twice that of the SPP which allowed the resolution of more peaks. Another source of variations between measured spectra may arise from the autofluorescence estimation that slightly differs between the two systems since neither of it covered the same spectral range. Both estimated very similar autofluorescence spectrum inside their own spectral region, however a more important error was noticed when spectral range border was overlapping with a peak. For example, muscle tissue has important peaks between 800 and 1100 cm^{-1} leading to a difficulty in estimating the background in this region for WFP measurement – for which the spectral range begin at 940 cm^{-1} – resulting in a lower correlation in this specific region. Even if the shape is not perfectly correlated in this region, similar peak can be identified with both probe. A similar error can be observed at the upper edge of the spectral limit of the SPP measurements around 1600 cm^{-1}. The correlation also decrease for gray matter and muscle tissue since the SNR of those tissue is lower.

Single point probes are considered as the state-of-the-art technology for Raman spectroscopy in oncology since they have shown the ability to discriminate cancerous tissue in-vivo with accuracy higher than 85% [15,16,17,18]. To translate any other technology into a surgical guidance tool, one should aim at SNRs equivalent to SPP. The SPP used in this study illuminated a sample surface of 0.5 mm diameter and converted all of that signal into one spectrum. With the WFP, signal collected from the illuminated area is divided by the number of pixels that compose the image. Therefore, the signal available for the mesoscopic system was divided by approximately 400 compared to the single-point Raman probe. Calculated SNR for the strong peak of CH_2 at

1438 cm^{-1} reach value of ~40 on white matter using the SPP while the same SNR calculated for the WFP drop to ~7. Under the current acquisition parameters, integration time for the WFP is 18 times higher while the illumination intensity is ~7.5 times higher for the SPP. Considering those numbers, the collection efficiency of the WFP was higher than the SPP, however, since the signal was divided a larger number of pixels, SNR was lower for WFP. Before bringing the system for clinical RS acquisition, collection efficiency still needs to be improved. Part of this optimisation could be achieved using custom made optic instead of off-the-shelf lenses to improve signal throughput. The custom design could also include a zero power optical windows in front of the first lens to bring the probe in contact with the tissue. During measurements, the tissue would be gently pressed on the front window of the probe to maintain the perfect focal distance for the object during the measurement.

In addition to the development of Raman imaging probes for intra-operative cancer surgery guidance, the approach used here has great potential to improve minimally invasive procedure performs with an endoscope or surgical robots. Both of those technologies are currently using imaging bundle to recreate white light images of the tissue from which the surgeon guided himself through the tissue. However, white light image suffers from poor contrast and pathological tissues are not always depicted clearly to the surgeon which increases the time of analysis and the discomfort of the patient. In this paper, we demonstrate that under a few modifications Raman imaging modality could be added to currently used endoscopes using the imaging bundle channel to perform the detection. Surgical robot offer a better precision; however, they don't offer the palpation sensation of the tissue to the surgeon which may lead to lack of sensitivity compared to standard surgery [41]. The addition of an imagery modality as Raman spectroscopy could improve the sensitivity and overcome this lack.

5.2.6 Acknowledgement

This work is supported by the Discovery Grant program from Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and the Collaborative Health Research Program (CIHR and NSERC). Authors would like to gratefully acknowledge the contribution of Eric Marple for fruitful discussions.

5.2.7 Disclosure of conflicts of interest

The authors have no relevant conflicts of interest to disclose

5.2.8 References

1. Nagtegaal ID, Marijnen CAM, Kranenbarg EK, Velde CJH Van De, Krieken JHJM van. Circumferential margin involvement is still an important predictor of local recurrence in rectal carcinoma not one millimeter but two millimeters is the limit. Am J Surg Pathol. 2002;26(3):350-357.

2. Spiro RH, Guillamondegui O, Paulino AF, Huvos AG. Pattern of invasion and margin assessment in patients with oral tongue cancer. Head Neck. 1999;21(5):408-413.

3. Karakiewicz PI, Eastham JA, Graefen M, et al. Prognostic impact of positive surgical margins multi-institutional assessment of 5831 patients. Urology. 2005;66(6):1245-1250. doi:10.1016/j.urology.2005.06.108.

4. Pisansky TM, Wilson TM, Rothenberg HJ, et al. The radial distance of extraprostatic extension of prostate carcinoma implications for prostate brachytherapy. Cancer. 1999;85(12):2630-2637.

5. Azu M, Abrahamse P, Katz SJ, Jagsi R, Morrow M. What is an adequate margin for breast-conserving surgery? Surgeon attitudes and correlates. Ann Surg Oncol. 2010;17(2):558-563. doi:10.1245/s10434-009-0765-1.What.

6. Nahhas AF, Scarbrough CA, Trotter S. A review of the global guidelines on surgical margins for nonmelanoma skin cancers. J Clin Aesthet Dermatol. 2017;10(4):37-46.

7. Stummer W, Tonn J-C, Mehdorn HM, et al. Counterbalancing risks and gains from extended resections in malignant glioma surgery: a supplemental analysis from the randomized 5-aminolevulinic acid glioma resection study. J Neurosurg. 2011;114(March):613-623. doi:10.3171/2010.3.JNS097.

8. Gerard IJ, Kersten-oertel M, Petrecca K, Sirhan D, Hall JA, Collins DL. Brain shift in neuronavigation of brain tumors : A review. Med Image Anal. 2017;35:403-420. doi:10.1016/j.media.2016.08.007.

9. Zhang RR, Schroeder AB, Grudzinski JJ, et al. Beyond the margins: real-time detection of cancer using targeted fluorophores. Nat Rev Clin Oncol. 2017;14(6):347–364. doi:10.1038/nrclinonc.2016.212.

10. Xu RX, Povoski SP. Diffuse optical imaging and spectroscopy for cancer. Expert Rev Med Devices. 2007;4(1):83-95. doi:10.1586/17434440.4.1.83.

11. Jermyn M, Desroches J, Aubertin K, et al. A review of Raman spectroscopy advances with an emphasis on clinical translation challenges in oncology. Phys Med Biol. 2016;61(23):R370-R400. doi:10.1088/0031-9155/61/23/R370.

12. Rosenthal EL, Warram JM, Bland KI, Zinn KR. The status of contemporary image-guided modalities in oncologic surgery. Ann Surg. 2015;261(1):46-55. doi:10.1097/SLA.0000000000000622.The.

13. Taylor P, Chandra A, Talari S, Movasaghi Z, Rehman S. Raman Spectroscopy of Biological Tissues. Appl Spectrosc Rev. 2015;50(1):46-111. doi:10.1080/05704928.2014.923902.

14. Wang W, Zhao J, Short M, Zeng H. Real-time in vivo cancer diagnosis using raman spectroscopy. J Biophotonics. 2015;8(7):527-545. doi:10.1002/jbio.201400026.

15. Wang J, Lin K, Zheng W, Ho KY, Teh M, Yeoh KG. Simultaneous fingerprint and high-wavenumber fiber-optic Raman spectroscopy improves in vivo diagnosis of esophageal squamous cell carcinoma at endoscopy. scien. 2015;(July):1-10. doi:10.1038/srep12957.

16. Jermyn M, Mok K, Mercier J, et al. Intraoperative brain cancer detection with Raman spectroscopy in humans. Sci Transl Med. 2015;7(274):1-10.

17. Bergholt MS, Lin K, Wang J, et al. Simultaneous fingerprint and high-wavenumber fiber-optic Raman spectroscopy enhances real-time in vivo diagnosis of adenomatous polyps during colonoscopy. J Biophotonics. 2016;342(4):333-342. doi:10.1002/jbio.201400141.

18. Haka AS, Volynskaya Z, Gardecki JA, et al. In vivo margin assessment during partial mastectomy breast surgery using Raman spectroscopy. Cancer Res. 2006;66(6):3317-3323. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-2815.

19. Ji M, Orringer D a., Freudiger CW, et al. Rapid, Label-Free Detection of Brain Tumors with Stimulated Raman Scattering Microscopy. Sci Transl Med. 2013;5(201):201ra119-201ra119. doi:10.1126/scitranslmed.3005954.

20. Latka I, Dochow S, Krafft C, Dietzek B, Bartelt H. Development of a fiber-based Raman probe for clinical diagnostics. In: Clinical and Biomedical Spectroscopy and Imaging II. Vol 8087. ; 2011:1-8. doi:10.1117/12.889924.

21. Sato H, Tanaka T, Ikeda T, Wada S, Tashiro H, Ozaki Y. Biomedical applications of a new portable Raman imaging probe. J Mol Struct. 2001;598(1):93-96. doi:10.1016/S0022-2860(01)00809-2.

22. Brückner M, Becker K, Popp J, Frosch T. Analytica Chimica Acta Fiber array based hyperspectral Raman imaging for chemical selective analysis of malaria-infected red blood cells. Anal Chim Acta. 2015;894:76-84. doi:10.1016/j.aca.2015.08.025.

23. Gift AD, Ma JY, Haber KS, McClain BL, Ben-Amotz D. Near-infrared Raman imaging microscope based on fiber-bundle image compression. J Raman Spectrosc. 1999;30(9):757-765.

24. Schmälzlin E, Moralejo B, Rutowska M, et al. Raman imaging with a fiber-coupled multichannel spectrograph. Sensors (Switzerland). 2014;14(11):21968-21980. doi:10.3390/s141121950.

25. Jean F, Bourg-Heckly G, Viellerobe B. Fibered confocal spectroscopy and multicolor imaging system for in vivo fluorescence analysis. Opt Express. 2007;15(7):4008-4017. doi:10.1364/OE.15.004008.

26. Lim H, Murukeshan VM, Lim H, Matham V. Spatial-scanning hyperspectral imaging probe for bio-imaging applications. Rev Sci Instrum. 2016;33707(87):1-7. doi:10.1063/1.4943968.

27. St-arnaud K, Aubertin K, Strupler M, et al. Wide-field spontaneous Raman spectroscopy imaging system for biological tissue interrogation. Opt Lett. 2016;41(20):4692-4695.

28. Pence I, Mahadevan-jansen A. Clinical instrumentation and applications of Raman spectroscopy. Chem Soc Rev. 2016;45(7):1958-1979. doi:10.1039/c5cs00581g.Clinical.

29. E2529-06 A. Standard Guide for Testing the Resolution of a Raman Spectrometer. ASTM Int. 2014:1-5.

30. Lasch P, Naumann D. Spatial resolution in infrared microspectroscopic imaging of tissues. Biochim Biophys Acta. 2006;1758(7):814-829. doi:10.1016/j.bbamem.2006.06.008.

31. Zhao J, Lui H, Mclean DI, Zeng H. Automated autofluorescence background subtraction algorithm for biomedical raman spectroscopy. Appl Spectrosc. 2007;61(11):1225-1232. doi:10.1366/000370207782597003.

32. Desroches J, Jermyn M, Mok K, et al. Characterization of a Raman spectroscopy probe system for intraoperative brain tissue classification. Biomed Opt Express. 2015;6(7):2380. doi:10.1364/BOE.6.002380.

33. Berhe DT, Eskildsen CE, Lametsch R, Hviid MS, van den Berg F, Engelsen SB. Prediction of total fatty acid parameters and individual fatty acids in pork backfat using Raman spectroscopy and chemometrics: Understanding the cage of covariance between highly correlated fat parameters. Meat Sci. 2016;111:18-26. doi:10.1016/j.meatsci.2015.08.009.

34. Beattie JR, Bell SEJ, Borggaard C, Moss BW. Preliminary investigations on the effects of ageing and cooking on the Raman spectra of porcine longissimus dorsi. Meat Sci. 2008;80(4):1205-1211. doi:10.1016/j.meatsci.2008.05.016.

35. Dakovi M, Stojiljkovi AS, Bajuk-bogdanovi D, et al. Talanta Pro fi ling differences in chemical composition of brain structures using Raman spectroscopy. 2013;117:133-138. doi:10.1016/j.talanta.2013.08.058.

36. Lyndgaard LB, Sørensen KM, Van Den Berg F, Engelsen SB. Depth profiling of porcine adipose tissue by Raman spectroscopy. J Raman Spectrosc. 2012;43(4):482-489. doi:10.1002/jrs.3067.

37. Lerner JM. Imaging Spectrometer fundamentals for researchers in the biosciences — A Tutorial. Cytom Part A. 2006;69(8):712-734. doi:10.1002/cyto.a.

38. Desroches J, Laurence A, Jermyn M, et al. Raman spectroscopy in microsurgery: impact of operating microscope illumination sources on data quality and tissue classification. Analyst. 2017;142(8):1185-1191. doi:10.1039/C6AN02061E.

39. Singh SP, Krishna CM. Analytical Methods Raman spectroscopic studies of oral cancers : correlation of spectral and biochemical markers. Anal Methods. 2014;6:8613-8620. doi:10.1039/C4AY01615G.

40. Matousek P, Clark IP, Draper ERC, et al. Subsurface Probing in Diffusely Scattering Media Using Spatially Offset Raman Spectroscopy. Appl Spectrosc. 2005;59(4):393-400.

41. Williams SB, Chen M, Amico AVD, et al. Radical retropubic prostatectomy and robotic-assisted laparoscopic prostatectomy: likelihood of positive surgical margin(s). Urology. 2010;76(5):1097-1101. doi:10.1016/j.urology.2009.11.079.

CHAPITRE 6 DISCUSSION GÉNÉRALE

Cette section abordera des aspects non couverts dans les articles tels que des détails techniques sur le choix du système de détection, les limites imposées par le signal d'autofluorescence, les limites pratiques du système intermédiaire et finalement la comparaison entre les systèmes préliminaire (article 1) et intermédiaire (article 2).

6.1 Système de détection

Pour le système préliminaire, le choix de la caméra de type EMCCD combinée à un filtre accordable pour reconstruire les images hyperspectrales s'est fait essentiellement pour des raisons de disponibilité et de compatibilité des instruments avec la MCF. Pour la conception du système intermédiaire, une étude plus approfondie a été réalisée afin de déterminer la méthode d'imagerie optimale pour l'application visée. La section qui suit décrit le raisonnement scientifique qui a mené au système de détection actuel.

6.1.1 Méthode de détection

La première option envisagée était de remplacer le filtre accordable pour un modèle différent offert par la même compagnie offrant une meilleure résolution spectrale de 0.75 nm (~6.4 cm^{-1}). Toutefois, pour atteindre cette résolution l'angle maximal des rayons par rapport à l'axe optique devait passer de 7.5° à 3.5°, ce qui aurait affecté négativement le champ de vue du système et l'efficacité de collection du signal sortant de la MCF. De plus, la transmission totale de ce filtre varie entre 25 et 30% dans la plage spectrale voulue ce qui représente une diminution d'environ 5% par rapport au filtre utilisé dans le système préliminaire. Le temps de réponse du filtre est de 150 ms, ainsi pour couvrir l'ensemble du spectre de 850 à 930 nm avec une résolution de 0.75 nm un temps d'acquisition total minimum de 42 s est requis considérant un temps d'intégration minimale de 50 ms par image spectrale. D'autre part, cette option est plus avantageuse en ce qui a trait à la résolution spatiale qui peut atteindre 20 µm sur un champ de vue de 5 x 5 mm en utilisant une caméra de 512 x 512 pixels. Au final, cette solution n'a pas été choisie à cause de sa faible efficacité, la dégradation du champ de vue et le prix du système qui dépasse 100,000$ US.

Tableau 6.1. Comparaison pratique entre les différentes méthodes de reconstruction d'images hyperspectrales.

	Balayage spectral	**Balayage ponctuel**	**Balayage linéaire**
Efficacité de collection de la lumière	25-30%	>60%	>60%
Résolution spatiale	20 µm	100 µm	X : 100 µm Y : 40 µm
Résolution spectrale	0.75 nm (6.4 cm^{-1})	0.1 nm (~1 cm^{-1})	0.1 nm (~1 cm^{-1})
Temps d'acquisition	42 s	500 s	25 s
Prix	>100 000$ US	< 80 000$ US	< 80 000$ US

Dans le but d'augmenter l'efficacité ainsi que la résolution spectrale par rapport au système préliminaire, un système de balayage spatial combiné à un spectromètre a été choisi pour faire la reconstruction d'images Raman. La transmission d'un spectromètre peut atteindre plus de 60% avec une résolution spectrale pouvant aller jusqu'à 0.1 nm et la collection du signal est moins restrictive que celle des filtres accordables avec une ouverture numérique qui peut atteindre 0.27. Pour reconstruire l'image hyperspectrale, la technique de balayage ponctuel ou linéaire avec des galvanomètres peut être utilisée. En utilisant un balayage ponctuel de 100 x 100 points sur une région de 5 x 5 mm, il est possible d'obtenir une résolution spatiale de 100 µm. En considérant un temps d'intégration de 50 ms par pixel un temps minimal de 500 s est requis pour acquérir une image hyperspectrale complète. Le temps de mouvement des galvanomètres et le temps de lecture de la caméra peuvent être négligés puisqu'ils sont beaucoup plus petits que le temps d'intégration requis en chaque pixel pour obtenir un SNR supérieur à 1. En balayage linéaire, le même temps d'intégration minimum est requis pour obtenir un SNR supérieur à 1, mais chaque acquisition permet d'acquérir un nombre X de spectres définis par le nombre de pixels sur l'axe de la caméra parallèle à la fente du spectromètre. Pour une caméra de 256 pixels de hauteur et un balayage linéaire de 100 pas sur un champ de vue de 5 x 5 mm, il est possible d'atteindre une résolution spatiale de 40 µm et 100 µm respectivement selon l'axe parallèle et perpendiculaire à la fente. Toutefois, le temps de lecture de la caméra n'est plus négligeable et peut atteindre 200 ms par lecture. Cette technique demeure la plus avantageuse en termes de rapidité avec un temps d'acquisition total de 25 s pour acquérir une image hyperspectrale entière en considérant un

temps d'intégration de 50 ms par ligne spectrale. Le Tableau 6.1 montre les limites pratiques de chaque technique.

Tableau 6.2. Spécifications principales des systèmes de spectroscopie d'imagerie considérés dans le cadre du développement du système intermédiaire.

Spectromètre	**Holospec 1.8i**	**Holospec 1.8i**	**P&P optica**	**P&P optica**	**EMvision**
Caméra	Xion ultra897	Newton 920	Xion ultra897	Newton 920	Newton 920
Plage spectrale[2]	784-914nm (17)-1798 cm^{-1}	776-937nm (148)-2066 cm^{-1}	794-952nm 144-2234 cm^{-1}	792-991nm 112-2648 cm^{-1}	809-935nm 378-2043 cm^{-1}
Dispersion spectrale	15.85 nm/mm	6.05 nm/mm	19.26 nm/mm	7.48 nm/mm	4.73 nm/mm
Résolution spectrale[3]	1.1 nm (12.2 cm^{-1})	0.6 nm (8.29 cm^{-1})	0.93 nm (12.9 cm^{-1})	0.75 nm (10.4 cm^{-1})	0.35 nm (4.9 cm^{-1})
Fente	50 µm	75µm	40µm	75µm	75µm
F# (NA)	F/1.8 (0.2676)	F/1.8 (0.2676)	F/3 (0.1644)	F/3 (0.1644)	F/2.2 (0.2216)
Efficacité du réseau de diffraction	50-70%	50-70%	70-85%	70-85%	70-85%
Nombre d'images par seconde (fps)	56	6	56	6	6

Finalement, c'est la technique de balayage linéaire qui a été choisie pour la conception du système intermédiaire pour sa rapidité à reconstruire des images, son efficacité et son prix de moins de 80 000$ US. Pour faire l'achat du spectromètre d'imagerie, plusieurs fournisseurs ont été approchés tels que : Andor, P&P Optica, EMvision, Headwall et Horiba. Les solutions offertes par les compagnies Headwall et Horiba ont rapidement été écartées puisque ces compagnies offrent des spectromètres en réflexion. Or, pour des applications en biologie, il est important d'avoir un spectromètre robuste qui peut facilement être déplacé sans risque de désalignement majeur et dont les mesures peuvent être facilement calibrées. Les spectromètres en transmission respectent mieux ces critères et offrent une efficacité qui est généralement meilleure

[2] Les chiffres entre parenthèse indiquent qu'il s'agit d'un nombre d'ondes négatif.

[3] Résolution spectrale tel que fournit par les fournisseurs.

tout en offrant une plage spectrale qui convient à l'application visée. Au final, le choix s'est porté sur 5 systèmes offerts par les compagnies Andor, P&P optica et EMvision dont les principales caractéristiques sont répertoriées dans le Tableau 6.2.

6.1.2 Choix de caméra

Deux caméras ont été sérieusement considérées : la première est une caméra EMCCD de modèle Xion ultra897 de Andor similaire à la caméra Nüvü Hnu 512 utilisée dans le système préliminaire et la deuxième est une caméra CCD conventionnelle de modèle Newton 920 BR-DD de Andor souvent utilisée en spectroscopie Raman à 785nm. La caméra EMCCD offre un temps de lecture beaucoup plus rapide que la caméra CCD puisqu'elle utilise une méthode de lecture « FFT ». Toutefois, elle perd rapidement son avantage par rapport à la caméra CCD conventionnelle pour des applications de spectroscopie Raman à 785 nm. Pour commencer, le capteur CCD du modèle Newton est spécifiquement conçu pour la spectroscopie Raman à 785 nm, ainsi l'efficacité quantique de celle-ci est environ de 5% supérieure sur l'ensemble de la plage spectrale d'intérêt. De plus, les pixels de plus petite taille de la caméra EMCCD nécessitent une plus petite fente pour obtenir une résolution spectrale équivalente à la caméra CCD ce qui se traduit par un SNR plus faible à chaque acquisition. Il aurait été possible de choisir une caméra EMCCD de spectroscopie telle que le modèle Newton 971 BVF pour obtenir une résolution spectrale équivalente à la caméra CCD sans avoir à changer la fente d'entrée, mais celle-ci possède un temps de lecture aussi long que la caméra CCD à un prix supérieur.

Le facteur le plus important à considérer entre les deux caméras est le fort signal d'autofluorescence des tissus qui génère un très fort bruit de grenaille amplifié par le facteur d'excès de bruit pour la caméra EMCCD. Afin de quantifier l'impact de ce facteur, le SNR théorique des deux caméras a été tracé à la Figure 6.1 en fonction du temps d'intégration. Le SNR a été calculé en utilisant un signal Raman $S(\lambda)$ d'amplitude comparable à celui capté par le système préliminaire sur des tissus de gras de porc. L'amplitude du signal d'autofluorescence a été fixé à la valeur du signal Raman à titre de limite inférieure considérant que le signal d'autofluorescence est généralement supérieur au signal Raman. La caméra CCD Newton 920 BR-DD de Andor a été choisie puisqu'elle offre un net avantage par rapport à la caméra EMCCD comme le montre la Figure 6.1. Cette conclusion démontre que l'hypothèse initiale d'utiliser une caméra EMCCD pour faire la détection du signal Raman n'était pas complètement correcte

puisque le signal d'autofluorescence est trop important et annule l'avantage d'utiliser une telle caméra.

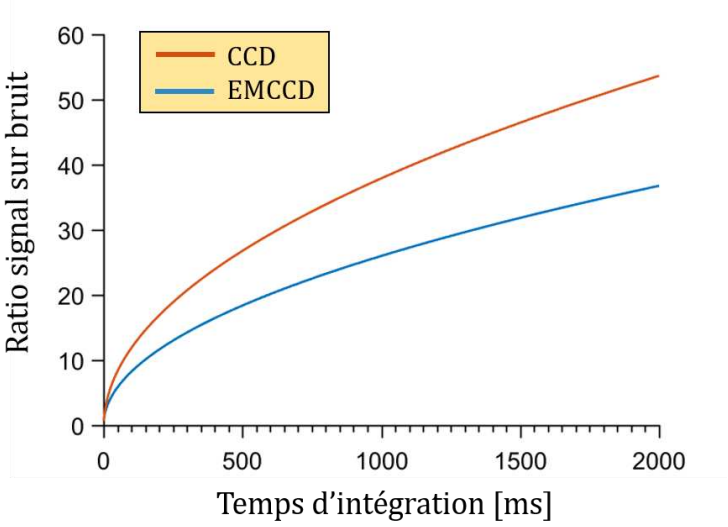

Figure 6.1. Comparaison du rapport signal sur bruit entre une caméra EMCCD et CCD pour un flux photonique similaire

6.1.3 Choix du spectromètre

Le choix du spectromètre a été effectué de manière à optimiser la collection du signal. L'optique qui précède le spectromètre forme l'image du plan objet sur la fente d'entrée avec un f# de 2.4. Ainsi, pour maximiser la collection du signal le spectromètre doit avoir un f# équivalent ou plus petit. Le choix du spectromètre de P & P optica a donc été écarté puisque ce dernier aurait limité la collection du signal à ~60% de la lumière entrante avec son f# de 3. Un autre facteur important à considérer pour comparer des spectromètres est l'efficacité du réseau. Le spectromètre Holospec utilise un réseau de Kaiser dont l'efficacité décroît considérablement à plus grande longueur d'onde [100]. Le réseau de Wasatch (EMvision) quant à lui présente une efficacité moyenne de 80% beaucoup plus stable sur l'ensemble du spectre. L'efficacité du réseau de Kaiser a été analysée en pratique en comparant des spectres d'Acétaminophène acquis avec le même temps d'intégration avec le spectromètre de Andor et de EMvision. Comme le montre la Figure 6.2, les pics à grand nombre d'ondes du spectre acquis avec le réseau de Kaiser présentent une forte diminution de l'amplitude par rapport à ceux du spectre acquis avec le réseau de Wasatch. Cette analyse confirme la diminution de l'efficacité à plus grand nombre d'ondes qui

avait été rapportée dans la littérature. Ainsi afin de maximiser la collection du signal sans déformer les spectres qui sont acquis, le spectromètre de la compagnie EMvision a été choisi.

6.2 Autofluorescence

L'autofluorescence est l'un des signaux parasites les plus limitants en spectroscopie Raman spontanée sur les tissus biologiques. Celui-ci affecte la détection en générant un bruit de grenaille supplémentaire qui peut parfois surpasser l'amplitude du signal Raman et il limite la plage dynamique effective de la caméra. L'autofluorescence a aussi un effet non négligeable sur le traitement des données puisque les algorithmes pour la soustraire ne sont pas parfaits.

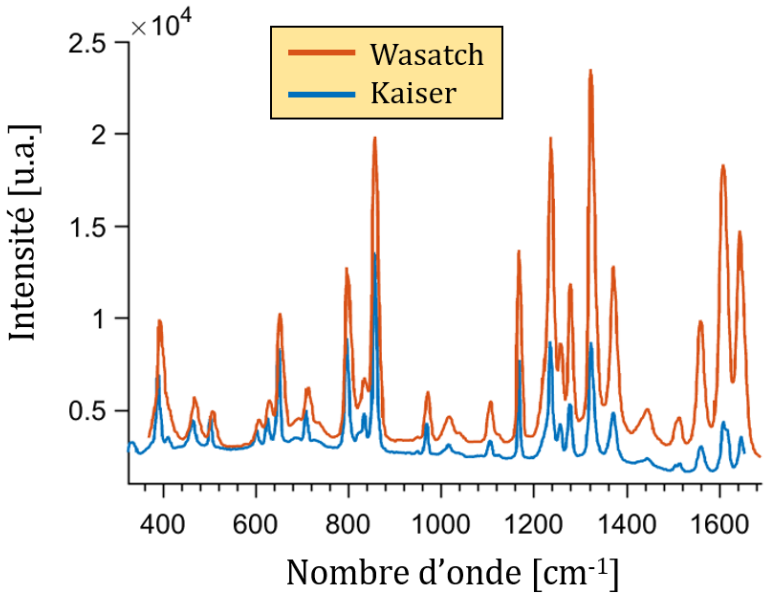

Figure 6.2. Comparaison des spectres bruts d'Acétaminophène acquis avec le réseau de Wasatch et celui de Kaiser

6.2.1 Détection

Pour des tissus qui présentent une forte concentration de fluorophores tels que les tissus de prostates ou les os dont la matrice extracellulaire est principalement composée de collagènes, les expériences en laboratoires ont démontré que le signal d'autofluorescence peut être jusqu'à deux ordres de grandeur plus grands que le signal Raman. Pour ces tissus, l'autofluorescence occupe une grande partie de la plage dynamique ce qui limite le temps d'intégration et la puissance laser maximale qui peuvent être utilisés avant que le capteur ne sature. Par exemple, cette

problématique est survenue avec le système préliminaire en tentant d'imager des os de porc. En augmentant le temps d'intégration et la puissance laser, l'autofluorescence des os saturait rapidement la caméra empêchant d'atteindre les paramètres d'acquisitions requis pour obtenir un signal Raman perceptible.

L'impact majeur de l'autofluorescence sur la détection est la quantité de bruit de grenaille qu'elle génère. Ce type de bruit varie proportionnellement à la racine carrée du flux lumineux total I_T qui atteint le détecteur, alors que le signal quant à lui varie linéairement. Cela permet en théorie d'obtenir un signal sur bruit maximal égal à $\sqrt{I_T}$. Toutefois, l'autofluorescence contribue à l'augmentation du bruit de grenaille, sans contribuer à l'augmentation du signal Raman. Ainsi, pour un flux d'autofluorescence B et un signal Raman R, l'équation du SNR Raman théorique maximal prend maintenant la forme de l'équation (6.1).

$$SNR = \frac{R}{\sqrt{B + R}} \tag{6.1}$$

Sachant que le signal d'autofluorescence est généralement beaucoup plus grand que le signal Raman ($B \gg R$), l'amplitude du signal Raman doit être plus grande que $\sqrt{B}$ pour avoir un SNR supérieur à 1. Si le signal Raman est inférieur à $\sqrt{B}$, le temps d'intégration et la puissance laser peuvent être augmentés, mais cela engendre aussi l'augmentation de B. La Figure 6.3 montre l'évolution du SNR Raman pour un signal Raman de 1 photon/ms avec un signal d'autofluorescence 100 fois plus efficace. L'augmentation du SNR augmente rapidement à faible temps d'intégration, mais augmente plus lentement par la suite. Ainsi, pour des tissus dont la section efficace de diffusion Raman est très faible par rapport à celle de l'autofluorescence, une grande augmentation du temps d'intégration peut être requise pour atteindre un SNR supérieur à 1. Une telle augmentation n'est souvent pas possible à cause des limites imposées par les normes d'exposition laser (AINSI Z136.1). Cette limitation est survenue lors de mesures sur des tissus de prostates humaines cancéreuses avec le système préliminaire où un temps d'intégration de 2 s par image spectrale n'a pas permis d'obtenir un SNR supérieur à 1. La même limitation a été observée avec le système intermédiaire en tentant d'imager du foie de veau dont l'amplitude de l'autofluorescence est comparable à celle des prostates. Cette fois-ci le temps d'intégration a été augmenté jusqu'à 5 s par ligne spectrale pour avoir un signal minimalement perceptible. Cependant, cela a engendré des dommages notables sur les tissus.

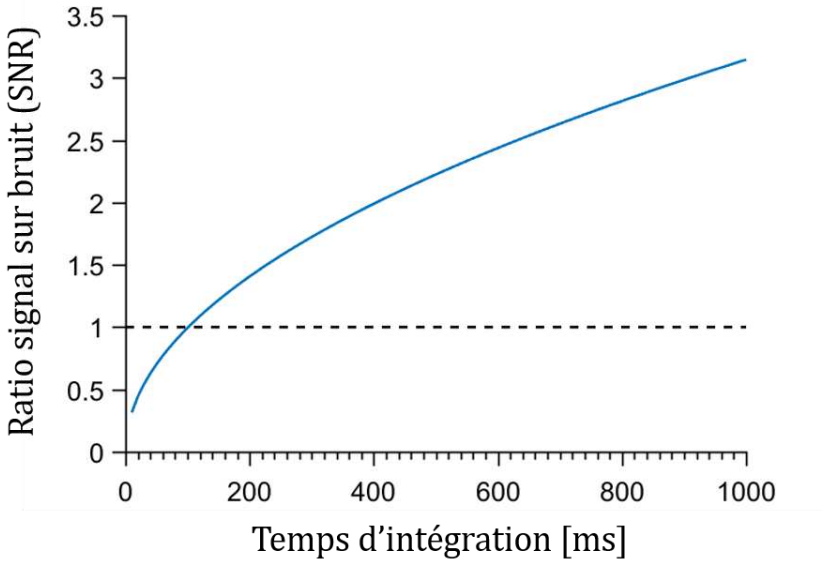

Figure 6.3. Évolution du rapport signal sur bruit Raman en fonction du temps d'intégration pour un signal d'autofluorescence 100 fois supérieur à la partie Raman du signal correspondant à 1 photon/ms.

6.2.1 Traitement des données

À l'équation (6.1), la contribution de l'autofluorescence et de la diffusion Raman ont été considérées comme contribution au signal brut, mais en pratique il faut aussi considérer les sources externes de lumière dans la pièce et le bruit. Ainsi, le signal Raman brut $S(\lambda)$ qui atteint la caméra peut s'exprimer comme l'addition de quatre signaux; le signal de fond $D(\lambda)$ qui tient compte des sources externes de lumières, l'autofluorescence $B(\lambda)$, le signal Raman $R(\lambda)$ et le bruit $N(\phi, \lambda)$ qui inclut les différentes sources de bruits tels que le bruit de grenaille et de lecture:

$$S(\lambda) = \underbrace{R(\lambda) + B(\lambda) + D(\lambda)}_{\phi} + N(\phi, \lambda) \tag{6.2}$$

En pratique, l'efficacité spectrale du système affecte aussi le signal brut $S(\lambda)$, mais une correction appliquée au début du traitement de données à partir d'un standard Raman du NIST (Modèle SRM2241) permet de corriger l'efficacité spectrale du système. Le but du traitement de données est d'isoler le signal d'intérêt $R(\lambda)$. Le signal de fond $D(\lambda)$ est facilement évalué et soustrait à partir d'une mesure faite avec le laser éteint. Ensuite, le signal d'autofluorescence est généralement estimé et soustrait en utilisant un algorithme de régression polynomiale. Même si

cette méthode est très efficace, l'estimation finale $B'(\lambda)$ n'est qu'une approximation de $B(\lambda)$ avec une certaine erreur $E(\lambda)$ qui peut varier selon la forme du spectre d'autofluorescence. Le terme d'erreur renferme aussi d'autres signaux non inclus dans l'équation (6.2) qui sont très difficiles à évaluer tel que la diffusion élastique résiduelle (Rayleigh) et le signal Raman généré par les composants du système optique qui sont souvent inclus dans le terme $B(\lambda)$ [101]. Ainsi, après avoir soustrait $B'(\lambda)$, le spectre obtenu $S'(\lambda)$ prend la forme de l'équation (6.3).

$$S'(\lambda) = R(\lambda) + E(\lambda) + N(\phi, \lambda) \tag{6.3}$$

Suite à cela, le bruit est généralement filtré en utilisant un filtre de Savitsy-Golay (SG) pour atténuer qualitativement l'impact du bruit sur les spectres et mieux visualiser les pics Raman. À la fin du traitement, l'estimation du spectre Raman $R'(\lambda)$, diffère du vrai spectre par un terme d'erreur $E'(\lambda)$ qui provient principalement de l'estimation imparfaite du signal d'autofluorescence, de la filtration incomplète du bruit et des autres signaux mentionnés plus tôt.

$$R'(\lambda) = \mathrm{F}_{SG}[R(\lambda) + E(\lambda) + N(\phi, \lambda)] = R(\lambda) + E'(\lambda) \tag{6.4}$$

La forme du spectre d'autofluorescence varie très peu pour les tissus d'une même catégorie, mais pour deux classes de tissus différentes, il y aura une plus grande variation du spectre d'autofluorescence comme le montre la Figure 6.4. Les mêmes différences peuvent être observées sur l'erreur produite lors de l'estimation de l'autofluorescence entre différentes classes de tissus. Pour deux classes de tissus X et Y, la classification subséquente des données est faite sur l'estimation des spectres Raman ${R_x}'(\lambda)$ et ${R_y}'(\lambda)$ qui inclut leurs erreurs respectives ${E'}_x(\lambda)$ et ${E'}_y(\lambda)$. Ainsi, si les erreurs sont très différentes entre les deux classes de tissus, elles peuvent participer à la classification des tissus et démontrer une différence faussement associée à un contraste Raman entre les deux types de tissus. Une autre cause d'erreur plus subtile de l'autofluorescence des tissus se cache dans la différence d'intensité du spectre d'autofluorescence entre deux tissus. Le bruit dépend du flux lumineux ϕ qui atteint la caméra, ainsi un spectre d'autofluorescence de plus forte intensité générera un bruit plus élevé. Deux classes de tissus qui possèdent des spectres d'autofluorescence d'amplitudes très différentes peuvent ainsi présenter deux spectres ${R_x}'(\lambda)$ et ${R_y}'(\lambda)$ qui se différencient par leur quantité de bruit.

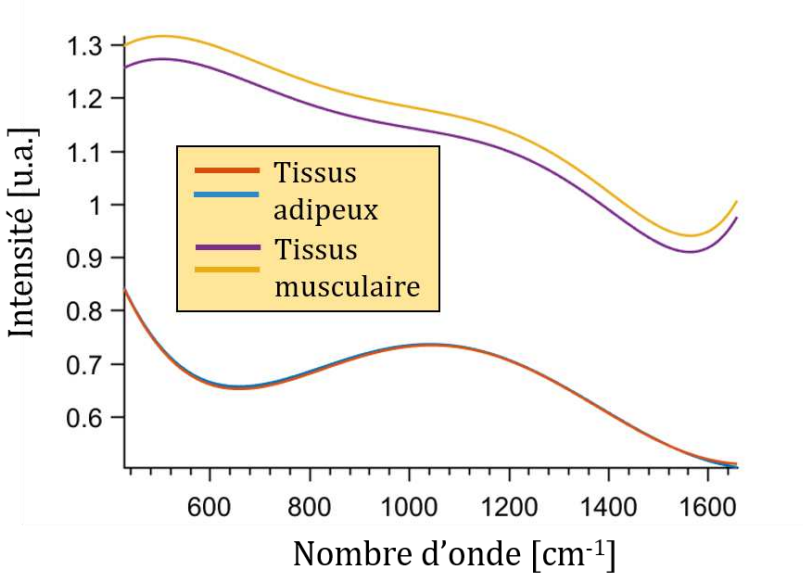

Figure 6.4. Exemples de spectres d'autofluorescence pour des tissus adipeux et musculaires de viande porcine. Deux spectres sont présentés pour chaque tissu pour montrer la similarité entre les spectres d'un même tissu et la différence entre deux types de tissus.

Il s'agit de causes possibles d'erreurs sur les résultats qui ont été présentés dans le premier article puisque les tissus adipeux et les tissus musculaires de porc possèdent des spectres d'autofluorescence très distincts. En d'autres mots, il est possible que la classification des tissus se soit partiellement faite sur le spectre d'autofluorescence des tissus. Il demeure que les pics observés sur chaque tissu concordaient bien avec les données de la littérature. Dans le deuxième article, la reconstruction d'images s'est faite en se basant sur des composantes spectrales précises des spectres Raman dans le but de minimiser l'impact de ces causes d'erreurs.

6.3 Algorithmes de classification

Dans le premier article, la classification par réseaux de neurones a été utilisée pour classifier les tissus de porc. Cette méthode de classification utilise plusieurs couches constituées de plusieurs neurones qui appliquent une fonction de transfert sur les neurones de la couche qui la précèdent comme le montre le schéma de la Figure 6.5. Les neurones de la première couche sont connectés directement au spectre Raman alors que ceux de la dernière couche sont connectés aux classes de sortie et permettent de déterminer dans le cas du premier article s'il s'agit d'un tissu adipeux ou d'un tissu musculaire. Chaque neurone et composante d'entrée est pondéré par un poids dont la

valeur est fixée lors de l'entraînement de l'algorithme. La fonction de transfert la plus communément utilisée est une sigmoïde appliquée sur la sommation pondérée des neurones de la couche inférieure [102]. Dans le cas du premier article, une fonction tan-sigmoïde et une fonction exponentielle normalisée (Softmax) ont respectivement été utilisées pour les premières couches et la dernière couche de neurones. Un des avantages des algorithmes de classification est qu'ils permettent de faire ressortir les différences qui se cachent à l'intérieur de relations complexes entre les différentes composantes spectrales du spectre. Toutefois, l'un des désavantages majeurs est qu'il devient difficile de visualiser intuitivement les composantes spectrales qui ont contribué à la différenciation des deux classes de tissus. L'algorithme agit un peu comme une boîte noire. Ainsi, il est difficile de rejeter hors de tout doute l'hypothèse selon laquelle des résidus spectraux du spectre d'autofluorescence et du bruit auraient pu contribuer à la différenciation des deux classes dans la reconstruction d'image du premier article.

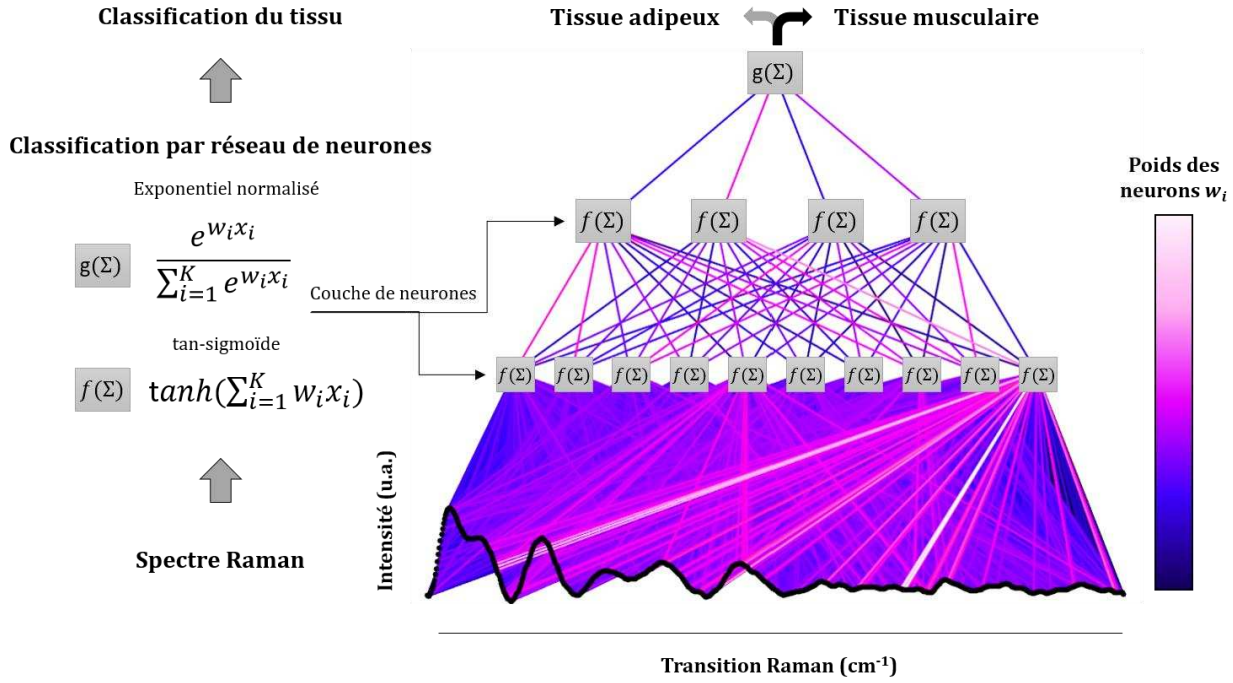

Figure 6.5. Schéma montrant le fonctionnement simplifié de la classification par réseau de neurones. L'algorithme construit un réseau à plusieurs étages où chaque neurone de chaque étage applique une opération mathématique sur les neurones ou les composantes spectrales de l'étage précédent. Ce réseau permet de classifier les spectres Raman selon la catégorie de tissu à laquelle ils sont susceptibles d'appartenir. Reproduction avec autorisation de l'auteur (Dr. Michael Jermyn).

C'est pourquoi dans le second article, l'utilisation de ratios associés à des liens moléculaires précis a été priorisée à l'utilisation d'un algorithme de classification. En utilisant des ratios entre des pics connus de lipides et de protéines, la différenciation entre les deux classes de tissus peut être associée plus directement aux différences de concentrations entre les macromolécules qui composent les tissus.

6.4 Limite pratique du système intermédiaire

6.4.1 Filtre dichroïque

L'utilisation du filtre dichroïque dans le système intermédiaire a permis de combiner l'illumination et la détection du signal à travers un même instrument. La dépendance en polarisation du filtre dichroïque a pour effet d'élargir la région coupe-bande de celui-ci ce qui fait en sorte que la transmission du filtre ne se stabilise pas avant 840 nm (834 cm^{-1}). La longueur d'onde de coupure du filtre est centrée à 785 nm pour les rayons qui traversent celui-ci avec un angle de 45° par rapport sa normale. Pour une déviation de l'angle d'incidence, la longueur de coupure λ_c varie en fonction de la différence d'angle θ et l'indice de réfraction du filtre n_{eff} comme le montre l'équation (6.5). Il est possible de placer le filtre de sorte que le rayon provenant du centre de l'image arrive à un angle de 45° sur le filtre. Toutefois, puisque le champ de vue s'étend sur quelques millimètres, les rayons émanant de la périphérie de l'image ne traversent pas le filtre avec un angle de 45° causant le déplacement de λ_c et de la longueur d'onde à laquelle la transmission du filtre se stabilise en fonction de la position dans l'image.

$$\lambda_c = \lambda_0 \sqrt{1 \pm (\sin(\theta)/n_{eff})^2} \tag{6.5}$$

La Figure 6.6 montre des spectres de références obtenus sur le standard Raman NIST pour différentes régions de l'image. La transmission du filtre se stabilise maintenant entre 730 et 940 cm^{-1} selon la région de l'image. Ainsi, pour certains pixels la réponse spectrale varie de plus de 40% sur un intervalle de moins de 100 cm^{-1}. Une variation de l'efficacité spectrale aussi abrupte est difficilement corrigible avec le standard Raman. Ainsi, pour assurer la reproduction de spectres uniformes pour chaque pixel de l'image, la plage spectrale avant 940 cm^{-1} n'a pas été utilisée ce qui limite la quantité d'informations moléculaires capturées par le système.

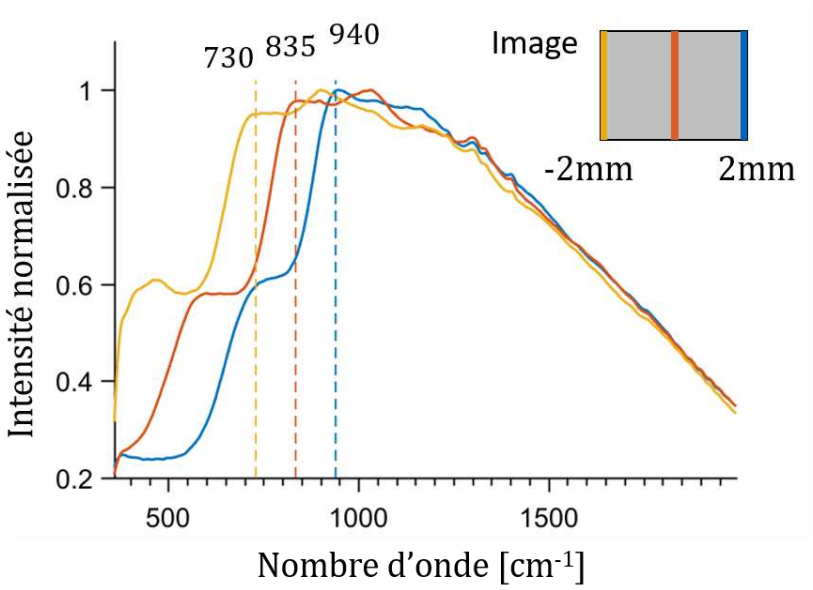

Figure 6.6. Variation de la réponse spectrale du système en fonction du champ de vue dans l'image.

6.4.2 Champ de vue

Le système intermédiaire a été conçu de manière à obtenir un champ de vue comparable à celui du système préliminaire de 4 x 4 mm. La lentille relais à l'intérieur de la sonde permet d'imager le plan objet sur l'embout proximal de la MCF avec un grossissement unitaire. La lentille-relais à la détection devait quant à elle permettre de projeter l'embout distal de la MCF sur toute la hauteur de la fente d'entrée du spectromètre faisant 6.6 mm. Toutefois, une contrainte mécanique impliquant le support du galvanomètre et de la fente d'entrée dans le spectromètre a causé un déplacement de 8 mm du spectromètre par rapport à la position initiale prévue. La lentille-relais a été ajustée en conséquence, mais l'image formée sur le spectromètre s'est avérée plus grande que la fente d'entrée causant une coupure du champ de vue selon une dimension et une augmentation du déplacement angulaire total du galvanomètre.

6.5 Comparaison entre les systèmes préliminaire et intermédiaire

Le système intermédiaire a été conçu avec pour objectif d'améliorer le SNR et la résolution spectrale par rapport au système préliminaire afin de reproduire des spectres similaires à ceux de la sonde ponctuelle. Cependant, pour atteindre cet objectif, d'autres spécifications telles que la

résolution spatiale et le champ de vue imagé ont été légèrement affectées. Le Tableau 6.3 présente les principales spécifications de chaque système.

Tableau 6.3.Comparaison des spécifications principales entre le système préliminaire et le système intermédiaire.

Spécifications	Système préliminaire	Système intermédiaire
Résolution spatiale	X : 55.5 µm Y : 55.5 µm	X : 62.5 µm Y : 114 µm
Champ de vue	5 x 5 mm	3.5 x 4 mm
Résolution spectrale	~95 cm^{-1}	~6 cm^{-1}
Intervalle spectrale	453-1749 cm^{-1}	940-1800 cm^{-1}
Intensité laser	17.68 mW/mm^2	33.9 mW/mm^2
Temps d'intégration	500 ms/nm (Totale : 65 s)	700ms/256 spectres (Totale : 100 s)
Rapport signal sur bruit	~2.9	~10

Les deux systèmes présentent une résolution spatiale similaire en X avec un léger avantage pour le système préliminaire. Cependant, en Y la résolution spatiale du système intermédiaire est dégradée d'un facteur deux par rapport à celle du système préliminaire à cause du changement vers le système de détection par balayage linéaire. Cependant, de tous les résultats présentés dans ce mémoire se sont les images Raman reconstruites avec le système intermédiaire qui présentent la meilleure résolution spatiale. À cause du très bas SNR du système préliminaire, des sous-ensembles de 4 × 4 pixels ont été moyennés dans le but d'augmenter le SNR causant ainsi une dégradation de la résolution spatiale à plus de 200 µm sur l'image Raman reconstruite à la Figure 4.4. En revanche, aucune moyenne de pixels n'a été effectuée pour les images Raman de la Figure 5.5 reconstruite avec le système intermédiaire. En pratique, il demeure qu'à signal collecté égal, le système préliminaire pourrait reconstruire des images avec une meilleure résolution spatiale.

Dans le système préliminaire, un filtre passe-haut a été placé devant la lentille-relais pour rejeter le plus de diffusion Rayleigh susceptible de se propager le long de la MCF et générer un signal Raman non spécifique au tissu. Tel que présenté à l'équation (6.5), la longueur d'onde de coupure du filtre λ_c dépend de l'angle d'entrée des rayons. Ainsi pour s'assurer que la longueur d'onde centrale du filtre reste au-dessus de 786nm – pour rejeter la diffusion Rayleigh à 785nm – une distance de travail minimale de 50mm a dû être imposée. Cela a causé une diminution de l'ouverture numérique du système et ainsi limité l'efficacité de collection du signal. Pour le système intermédiaire, un filtre dichroïque a été placé au centre d'une lentille-relais développée

sur mesure. L'ajout de ce filtre dichroïque a permis de combiner l'illumination et la collection à même la sonde et de réduire la distance de travail de la sonde. Le système intermédiaire présente donc une ouverture numérique plus grande, mais cela engendre une faible diminution du champ de vue comparé au système préliminaire.

L'utilisation d'un spectromètre au lieu d'un filtre accordable dans le système intermédiaire a permis d'obtenir une résolution spectrale près de 15 fois meilleure à celle du système préliminaire. Cette nouvelle résolution spectrale de ~6 cm^{-1} est mieux adaptée pour isoler les différentes signatures spectrales moléculaires qui composent les tissus [90].

L'un des buts principaux de l'implémentation du système intermédiaire était d'augmenter le signal collecté afin d'améliorer le SNR. À titre de comparaison, le SNR des deux systèmes a été calculé pour le fort pic à 1438 cm^{-1} associé à la vibration du lien CH_2 dans les tissus adipeux. Pour comparer l'efficacité de collection des deux systèmes, les SNR calculés doivent être corrigés pour tenir compte des différents paramètres d'acquisition utilisés avec les deux systèmes. Les mesures effectuées avec le système intermédiaire ont été faites avec un temps d'intégration de 700 ms par acquisition de ligne spectrale alors que les acquisitions avec le système préliminaire se sont faites avec un temps d'intégration de 500 ms par image spectrale. Le temps d'intégration et la puissance laser ont pu être augmentés pour le système intermédiaire puisque la plage dynamique de ce dernier est plus grande. L'augmentation de ces paramètres à fait en sorte d'augmenter de 2.7 fois le signal disponible par acquisition avec le système intermédiaire. Pour un signal I collecté par le système préliminaire, le SNR théorique est limité à $\sqrt{I}$. Ainsi, pour avoir une efficacité de collection équivalente à celui du système préliminaire le système intermédiaire devrait présenté un SNR minimal d'au moins $\sqrt{2.7I}$. Selon cette approche, le SNR du système intermédiaire devrait au moins être de ~4.75 considérant que celui du système préliminaire est de 2.9. Ainsi, avec un SNR de 10, le système intermédiaire présente une efficacité de collection qui est approximativement 4.5 fois supérieure à celle du système préliminaire.

CHAPITRE 7 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

Dans le cadre de ce mémoire, une sonde d'imagerie Raman avec un champ de vue de quelques millimètres a été conçue ayant le potentiel d'être utilisé en clinique pour guider la résection de tumeur. Pour arriver au développement de cette sonde, un système préliminaire a été assemblé pour démontrer la possibilité de faire de l'imagerie Raman sur un champ de vue de quelques millimètres en utilisant une matrice cohérente de fibres optiques. La reconstruction d'images hyperspectrales a été effectuée par balayage spectral à l'aide d'un filtre accordable à base de cristaux liquides (LCTF) et d'une caméra EMCCD. Le système a démontré sa capacité à reconstruire des images moléculaires sur des tissus de viande porcine sur un champ de vue de 5 x 5 mm avec une résolution de 55 µm en moins de 90 s. Il s'agit des premiers résultats dans la littérature à démontrer l'utilisation d'une MCF pour faire la reconstruction d'images Raman sur un champ de vue de plus de 1 mm^2. Toutefois, ce premier système s'est avéré très limité pour une future implémentation clinique de par sa résolution spectrale limitée à 95 cm^{-1} et de par sa très faible efficacité de collection de lumière. De plus, le prototype de sonde proposé ne reflétait pas entièrement le concept de sonde malléable étant associée à des ports d'illumination et de détection séparés.

Pour pallier aux limitations du système préliminaire, le développement d'un système intermédiaire a été proposé en réutilisant la même MCF mais avec un nouveau système de détection. L'objectif était de développer une sonde d'imagerie Raman avec des spécifications techniques plus près des requis cliniques la rendant capable de reproduire des spectres Raman similaires à ceux obtenus à l'aide d'une sonde ponctuelle ayant déjà fait ses preuves dans le cadre d'applications pour le cancer du cerveau, du poumon et de la prostate. Dans le but d'augmenter la résolution spectrale et le SNR, le système de balayage spectral a été remplacé par un système de balayage spatial composé d'un miroir rotatif monté sur l'axe d'un galvanomètre et d'un spectromètre d'imagerie. Une nouvelle sonde a été développée afin de combiner l'illumination et la détection dans un même instrument pouvant facilement être manipulé par le chirurgien pour interroger les tissus. Le système intermédiaire présente une meilleure résolution spectrale (6 cm^{-1}) et une efficacité de collection près de 5 fois plus grande que celle du système préliminaire. Les modifications apportées ont engendré une faible diminution du champ de vue maintenant limité à 3.5 x 4 mm et une dégradation de la résolution spatiale à 115 µm selon l'un des axes de l'image. Malgré ces quelques points négatifs, une meilleure corrélation a été observée entre les spectres

acquis avec ce système et ceux acquis avec une sonde ponctuelle (coefficient de Pearson R>0.85). La capacité de reconstruire des images moléculaires en se basant sur le contraste offert par la spectroscopie Raman a été testée sur différents types de tissus incluant du cerveau de veau et la viande porcine. L'augmentation du SNR et la meilleure résolution spectrale ont permis d'imager des tissus présentant un contraste moléculaire plus faible telles que la matière blanche et la matière grise du cerveau de veau.

En conclusion, le projet de maîtrise a mené au développement d'une sonde d'imagerie Raman capable de reproduire des spectres similaires à ceux d'une sonde ponctuelle sur un champ de vue de quelques millimètres. Basées sur le contraste moléculaire offert par la spectroscopie Raman, des images ont pu être reconstruites en comparant la concentration en lipides et en protéines des tissus. D'autres groupes dans la littérature ont aussi utilisé ces marqueurs moléculaires afin de discriminer les tissus sains et cancéreux, ce qui démontre le potentiel futur du système pour guider la résection de tumeur. En plus d'être utilisée pour faire l'implémentation de sondes intra-opératoires, cette technologie pourrait être incorporée aux endoscopes utilisés lors de chirurgies moins invasives. Ces instruments pourraient permettre une identification plus précise des marges de la tumeur et ainsi améliorer le pronostic du patient après la chirurgie. Toutefois, avant d'utiliser le système actuel dans un contexte clinique, des modifications devront être apportées afin d'augmenter l'efficacité de collection du signal Raman et d'adapter les dimensions de la sonde aux contraintes associées à la pratique clinique. Une première modification serait d'implémenter une nouvelle version de la sonde en utilisant des lentilles fabriquées sur mesure pour atteindre les dimensions désirées et augmenter l'efficacité de collection. Une fenêtre optique pourrait être placée à l'embout de la nouvelle sonde pour faire contact au tissu et ainsi assurer une distance fixe de l'échantillon afin de conserver un focus constant avec l'échantillon à analyser. Pour contourner le désagrément du long temps d'intégration actuelle, d'autres modalités d'imagerie pourraient être combinées à la sonde actuelle comme un système de mesure de l'autofluorescence des tissus et un système de réflectance diffuse. Ces deux modalités d'imagerie pourraient permettre de faire l'acquisition d'images en temps réel et la modalité d'imagerie Raman pourrait être activée au besoin sur les tissus nécessitant une analyse plus approfondie requérant une mesure plus longue.

RÉFÉRENCES

[1] F. J. Fleming, A. D. K. Hill, E. W. M. Dermott, A. O. Doherty, N. J. O. Higgins, et C. M. Quinn, « Intraoperative margin assessment and re-excision rate in breast conserving surgery », *Eur. J. Surg. Oncol.*, vol. 30, n° 3, p. 233-237, 2004.

[2] P. I. Karakiewicz, J. A. Eastham, M. Graefen, I. Cagiannos, P. D. Stricker, E. Klein, T. Cangiano, F. H. Schröder, P. T. Scardino, et M. W. Kattan, « Prognostic impact of positive surgical margins multi-institutional assessment of 5831 patients », *Urology*, vol. 66, n° 6, p. 1245-1250, 2005.

[3] R. H. Spiro, O. Guillamondegui, A. F. Paulino, et A. G. Huvos, « Pattern of invasion and margin assessment in patients with oral tongue cancer », *Head Neck*, vol. 21, n° 5, p. 408-413, 1999.

[4] I. D. Nagtegaal, C. A. M. Marijnen, E. K. Kranenbarg, C. J. H. Van De Velde, et J. H. J. M. van Krieken, « Circumferential margin involvement is still an important predictor of local recurrence in rectal carcinoma not one millimeter but two millimeters is the limit », *Am. J. Surg. Pathol.*, vol. 26, n° 3, p. 350-357, 2002.

[5] W. Stummer, J.-C. Tonn, H. M. Mehdorn, U. Nestler, F. Kea, G. Claudia, A. Bink, et U. Pichlmeier, « Counterbalancing risks and gains from extended resections in malignant glioma surgery: a supplemental analysis from the randomized 5-aminolevulinic acid glioma resection study », *J. Neurosurg.*, vol. 114, n° March, p. 613-623, 2011.

[6] C. M. Schmidt, J. Glant, J. M. Winter, et J. Kennard, « Total pancreatectomy (R0 resection) improves survival over subtotal pancreatectomy in isolated neck margin positive pancreatic adenocarcinoma », *Surgery*, vol. 142, n° 4, p. 572-580, 2006.

[7] R. G. Pleijhuis, M. Graafland, J. de Vries, J. Bart, J. S. de Jong, et G. M. van Dam, « Obtaining adequate surgical margins in breast-conserving therapy for patients with early-stage breast cancer: current modalities and future directions. », *Ann. Surg. Oncol.*, vol. 16, n° 10, p. 2717-2730, 2009.

[8] N. N. Vakharia, D. Paraskevopoulos, J. Lang, V. N. Vakharia, M. B. Bchir, et M. A. Cantab, « The Assessment of Distortion in Neurosurgical Image Overlay Projection »,

Surggical Innov., vol. 23, nº 1, p. 14-23, 2016.

[9] V. Rohde et J. M. Gilsbach, « Course of brain shift during microsurgical resection of supratentorial cerebral lesions : limits of conventional neuronavigation », *Acta Neurochir. (Wien).*, vol. 146, nº 4, p. 369-377, 2004.

[10] G. L. Beets, R. F. A. Vliegen, A. G. H. Kessels, H. Van Boven, A. De Bruine, C. G. M. I. Baeten, et J. M. A. Van Engelshoven, « Accuracy of magnetic resonance imaging in prediction of tumour-free resection margin in rectal cancer surgery », vol. 357, nº 9255, p. 497-504, 2001.

[11] D. J. Evers, B. H. W. Hendriks, G. W. Lucassen, et T. J. M. Ruers, « Optical spectroscopy: current advances and future applications in cancer diagnostics and therapy. », *Future Oncol.*, vol. 8, nº 3, p. 307-20, 2012.

[12] P. A. Valdes, F. Leblond, V. L. Jacobs, K. D. Paulsen, et D. W. Roberts, « Fluorescence detection in the operating room: a review of principles, methods, and applications », *Curr. Med. Imaging Rev.*, vol. 8, nº 3, p. 211-232, 2012.

[13] R. X. Xu et S. P. Povoski, « Diffuse optical imaging and spectroscopy for cancer. », *Expert Rev. Med. Devices*, vol. 4, nº 1, p. 83-95, 2007.

[14] M. Jermyn, J. Desroches, K. Aubertin, K. St-arnaud, W. D. Madore, E. De Montigny, M. Guiot, D. Trudel, B. C. Wilson, K. Petrecca, et F. Leblond, « A review of Raman spectroscopy advances with an emphasis on clinical translation challenges in oncology », *Phys. Med. Biol.*, vol. 61, nº 23, p. R370-R400, 2016.

[15] A. J. Berger, « Raman, SERS, and FTIR Spectroscopy », dans *Handbook of biomedical optics*, CRC Press., D. A. Boas, C. Pitris, et N. Ramanujam, Éd. Boca Raton, 2011, p. 233-249.

[16] J. W. Chan, D. S. Taylor, T. Zwerdling, S. M. Lane, K. Ihara, et T. Huser, « Micro-Raman Spectroscopy Detects Individual Neoplastic and Normal Hematopoietic Cells », *Biophys. J.*, vol. 90, nº 2, p. 648-656, 2006.

[17] W. Wang, J. Zhao, M. Short, et H. Zeng, « Real-time in vivo cancer diagnosis using raman spectroscopy », *J. Biophotonics*, vol. 8, nº 7, p. 527-545, 2015.

[18] C. V. Raman, « A change of wave-length in light scattering », *Nature*, vol. 121, n° 619, 1928.

[19] H. J. Butler, L. Ashton, B. Bird, G. Cinque, K. Curtis, J. Dorney, K. Esmonde-white, N. J. Fullwood, B. Gardner, P. L. Martin-hirsch, M. J. Walsh, M. R. Mcainsh, N. Stone, et F. L. Martin, « Using Raman spectroscopy to characterize biological materials », *Nat. Protoc.*, vol. 11, n° 4, p. 664-687, 2016.

[20] L. M. Miller et P. Dumas, « From structure to cellular mechanism with infrared microspectroscopy », *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 20, n° 5, p. 649-656, 2010.

[21] B. Dietzek, D. Cialla, M. Schmitt, et and J. Popp, « Introduction to the Fundamentals of Raman Spectroscopy Benjamin », dans *Confocal Raman Microscopy*, Springer., T. Dieing, O. Hollricher, et J. Toporski, Éd. Ulm, Germany, 2010, p. 21-40.

[22] I. Latka, S. Dochow, C. Krafft, et B. Dietzek, « Fiber optic probes for linear and nonlinear Raman applications – Current trends and future development », *Laser Photon. Rev.*, vol. 731, n° 5, p. 698-731, 2013.

[23] S. A. Meyer, E. C. Le Ru, et P. G. Etchegoin, « Quantifying Resonant Raman Cross Sections with SERS », *J. Phys. Chem.*, vol. 114, p. 5515-5519, 2010.

[24] J. Zhao, H. Lui, D. I. Mclean, et H. Zeng, « Automated autofluorescence background subtraction algorithm for biomedical raman spectroscopy », *Appl. Spectrosc.*, vol. 61, n° 11, p. 1225-1232, 2007.

[25] M. Monici, « Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications », *Biotechnol. Annu. Rev.*, vol. 11, n° 5, p. 39-55, 2005.

[26] A. P. Shreve, N. J. Cherepy, et R. A. Mathies, « Effective Rejection of Fluorescence Interference in Raman Spectroscopy Using a Shifted Excitation Difference Technique », *Appl. Spectrosc.*, vol. 46, n° 4, p. 707-711, 1992.

[27] J. U. N. Zhao, M. I. K. E. M. Carrabba, et F. S. Allen, « Automated Fluorescence Rejection Using Shifted Excitation Raman Difference Spectroscopy », *Appl. Spectrosc.*, vol. 56, n° 7, p. 834-845, 2002.

[28] S. T. Mccain, R. M. Willett, et D. J. Brady, « Multi-excitation Raman spectroscopy

technique for fluorescence rejection », *Opt. Express*, vol. 16, nº 15, p. 1729-1734, 2008.

[29] P. Matousek, M. Towrie, A. Stanley, et A. W. Parker, « Efficient Rejection of Fluorescence from Raman Spectra Using Picosecond Kerr Gating », *Appl. Spectrosc.*, vol. 53, nº 12, p. 1485-1489, 1999.

[30] T. Hasegawa, « Separation of Raman spectra from fluorescence emission background by principal component analysis », *Chem. Phys. Lett.*, vol. 6, nº February, p. 642-646, 2000.

[31] C. A. Lieber et A. M. Ahadevan-jansen, « Automated Method for Subtraction of Fluorescence from Biological Raman Spectra », *Appl. Spectrosc.*, vol. 57, nº 11, p. 1363-1367, 2003.

[32] E. Le Ru, C. M. Galloway, E. C. L. E. Ru, et P. G. Etchegoin, « An Iterative Algorithm for Background Removal in Spectroscopy by Wavelet Transforms An Iterative Algorithm for Background Removal in Spectroscopy by Wavelet Transforms », *Appl. Spectrosc.*, vol. 63, nº 12, p. 1370-1376, 2009.

[33] J. Barbillat et P. Dhamelincourt, « Raman Confocal Microprobing , Imaging and Fibre-Optic Remote Sensing : a Further Step in Molecular Analysis », *J. Raman Spectrosc.*, vol. 25, nº 1, p. 3-11, 1994.

[34] K. Kong, C. J. Rowlands, S. Varma, W. Perkins, I. H. Leach, et A. A. Koloydenko, « Diagnosis of tumors during tissue-conserving surgery with integrated auto fl uorescence and Raman scattering microscopy », *PNAS*, vol. 110, nº 38, p. 1-6, 2013.

[35] K. Tanaka, M. T. T. Pacheco, J. F. B. Iii, I. Itzkan, A. J. Berger, R. R. Dasari, et M. S. Feld, « Compound parabolic concentrator probe for efficient light collection in spectroscopy of biological tissue Kazunori », *Appl. Opt.*, vol. 35, nº 4, p. 1-6, 1996.

[36] J. T. Motz, M. Hunter, L. H. Galindo, J. A. Gardecki, J. R. Kramer, R. R. Dasari, et M. S. Feld, « Optical fiber probe for biomedical Raman spectroscopy », *Appl. Opt.*, vol. 35, nº 4, p. 758-763, 2004.

[37] L. F. Santos, R. Wolthuis, S. Koljenović, R. M. Almeida, et G. J. Puppels, « Fiber-optic probes for in vivo Raman spectroscopy in the high-wavenumber region », *Anal. Chem.*, vol. 77, nº 20, p. 6747-6752, 2005.

[38] I. Latka, S. Dochow, C. Krafft, B. Dietzek, et H. Bartelt, « Development of a fiber-based Raman probe for clinical diagnostics », dans *SPIE-OSA biomedical optics, Clinical and Biomedical Spectroscopy and Imaging II*, 2011, vol. 8087, p. 1-8.

[39] S. O. Konorov, C. J. Addison, H. G. Schulze, R. F. B. Turner, et M. W. Blades, « Hollow-core photonic crystal fiber-optic probes for Raman spectroscopy », vol. 31, n° 12, p. 1911-1913, 2006.

[40] S. Dochow, I. Latka, M. Becker, R. Spittel, J. Kobelke, K. Schuster, A. Graf, S. Brückner, S. Unger, M. Rothhardt, B. Dietzek, C. Krafft, et J. Popp, « Multicore fiber with integrated fiber Bragg gratings for background-free Raman sensing », *Opt. Express*, vol. 20, n° 18, p. 1761-1774, 2012.

[41] E. T. Marple et K. D. Urmey, « FILTERED FIBER OPTIC PROBE », US 8,702,321 B2, 2014.

[42] M. Jermyn, K. Mok, J. Mercier, J. Desroches, J. Pichette, K. Saint-arnaud, L. Bernstein, M. Guiot, K. Petrecca, et F. Leblond, « Intraoperative brain cancer detection with Raman spectroscopy in humans », *Sci. Transl. Med.*, vol. 7, n° 274, p. 1-10, 2015.

[43] EMVISION, « http://emvisionllc.com/index-Product-1.html », 2015. .

[44] A. Alfonso-García, R. Mittal, E. S. Lee, et E. O. Potma, « Biological imaging with coherent Raman scattering microscopy: a tutorial. », *J. Biomed. Opt.*, vol. 19, n° 7, p. 71407, 2014.

[45] H. Kano, H. S. Egawa, P. L. Eproux, et V. C. Ouderc, « Linear and Nonlinear Raman Microspectroscopy : History , Instrumentation , and Applications », *Opt. Rev.*, vol. 21, n° 6, p. 752-761, 2014.

[46] C. L. Evans, E. O. Potma, M. Puoris'haag, D. Côté, C. P. Lin, et X. S. Xie, « Chemical imaging of tissue in vivo with video-rate coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, n° 46, p. 16807-16812, 2005.

[47] B. G. Saar, C. W. Freudiger, C. M. Stanley, G. R. Holtom, et S. X. Xie, « Video-Rate Molecular imaging In Vivo Stimulated Raman Scattering », *Sci. Transl. Med.*, vol. 330, n° 6009, p. 1368-1370, 2010.

[48] S. Bégin, E. Bélanger, S. Laffray, R. Vallée, et D. Côté, « In vivo monitoring of tissue pathologies and diseases with vibrational contrast », *J. Biophotonics*, vol. 642, nº 11, p. 632-642, 2009.

[49] D. Fu, G. Holtom, C. Freudiger, X. Zhang, et X. S. Xie, « Hyperspectral imaging with stimulated Raman scattering by chirped femtosecond lasers. », *J. Phys. Chem. B*, vol. 117, nº 16, p. 4634-40, 2013.

[50] L. Fu et M. Gu, « Fibre-optic nonlinear optical microscopy and endoscopy », *J. Microsc.*, vol. 226, nº 3, p. 195-206, 2007.

[51] S. T. Wollman et P. W. Bohn, « Evaluation of Polynomial Fitting Functions for Use with CCD Arrays in Raman Spectroscopy », *Appl. Spectrosc.*, vol. 47, nº 1, p. 125-126, 1993.

[52] S. J. Choquette, E. S. Etz, W. S. Hurst, D. H. Blackburn, et S. D. Leigh, « feature article Relative Intensity Correction of Raman Spectrometers : NIST SRMs 2241 Through 2243 for 785 nm , 532 nm , and 488 nm / 514 . 5 nm Excitation », *Appl. Spectrosc.*, vol. 61, nº 2, p. 117-129, 2007.

[53] R. Gautam, S. Vanga, F. Ariese, et S. Umapathy, « Review of multidimensional data processing approaches for Raman and infrared spectroscopy », *EPJ Tech. Instrum.*, vol. 2, nº 8, p. 1-38, 2015.

[54] M. Diem, A. Mazur, K. Lenau, J. Schubert, B. Bird, M. Miljković, C. Krafft, et J. Popp, « Molecular pathology via IR and Raman spectral imaging », *J. Biophotonics*, vol. 6, nº 11-12, p. 855-886, 2013.

[55] O. Pawluczyk et R. Pawluczyk, « Applications of Multichannel Imaging Spectrometer », dans *Phtonic north, Photonic Applications in Astronomy, Biomedicine, Imaging, Materials Processing, and Education*, 2004, vol. 5578, p. 227-238.

[56] M. S. Robbins, S. Member, et B. J. Hadwen, « The Noise Performance of Electron Multiplying Charge-Coupled Devices », *IEEE Trans. Electron Devices*, vol. 50, nº 5, p. 1227-1232, 2003.

[57] C. Yu, E. Gestl, K. Eckert, D. Allara, et J. Irudayaraj, « Characterization of human breast epithelial cells by confocal Raman microspectroscopy », *Cancer Detect. Prev.*, vol. 30, nº 6, p. 515-522, 2006.

[58] N. Bergner, C. Krafft, K. D. Geiger, M. Kirsch, G. Schackert, et J. Popp, « Unsupervised unmixing of Raman microspectroscopic images for morphochemical analysis of non-dried brain tumor specimens », *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 403, nº 3, p. 719-725, 2012.

[59] A. Beljebbar, O. Bouché, M. D. Diébold, P. J. Guillou, J. P. Palot, D. Eudes, et M. Manfait, « Identification of Raman spectroscopic markers for the characterization of normal and adenocarcinomatous colonic tissues », *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, vol. 72, nº 3, p. 255-264, 2009.

[60] N. Lue, J. W. Kang, C.-C. Yu, I. Barman, N. C. Dingari, M. S. Feld, R. R. Dasari, et M. Fitzmaurice, « Portable Optical Fiber Probe-Based Spectroscopic Scanner for Rapid Cancer Diagnosis: A New Tool for Intraoperative Margin Assessment », *PLoS One*, vol. 7, nº 1, p. e30887, 2012.

[61] D. Clark, M. Henson, F. Laplant, S. Saˇ, et L. Zhang, « Pharmaceutical Applications of Chemical Mapping and Imaging », dans *Handbook of Vibrational Spectroscopy*, John Wiley., J. M. Charlmers et P. R. Griffiths, Éd. 2007, p. 1-27.

[62] K. a. Antonio et Z. D. Schultz, « Advances in biomedical raman microscopy », *Anal. Chem.*, vol. 86, nº 1, p. 30-46, 2014.

[63] L. S. R. Spectrometers, « Performance Comparisons of Conventional and Line-Focused Surface Raman Spectrometers », *Appl. Spectrosc.*, vol. 55, nº 6, p. 767-773, 2001.

[64] S. Schlücker, M. D. Schaeberle, S. W. Huffman, et I. W. Levin, « Raman microspectroscopy: A comparison of point, line, and wide-field imaging methodologies », *Anal. Chem.*, vol. 75, nº 16, p. 4312-4318, 2003.

[65] J. Hutchings, C. Kendall, B. Smith, N. Shepherd, H. Barr, et N. Stone, « The potential for histological screening using a combination of rapid Raman mapping and principal component analysis », vol. 103, nº 1, p. 91-103, 2009.

[66] S. Stewart, R. J. Priore, M. P. Nelson, et P. J. Treado, « Raman Imaging », *Annu. Rev. Anal. Chem.*, vol. 5, nº 6, p. 337-360, 2012.

[67] J. Qi et W. Shih, « Performance of line-scan Raman microscopy for high- throughput chemical imaging of cell population », *Appl. Opt.*, vol. 53, nº 13, p. 2881-2885, 2014.

[68] G. J. Puppels, M. Grond, et J. Greve, « Direct Imaging Raman Microscope Based on Tunable Wavelength Excitation and Narrow-Band Emission Detection », *appli*, vol. 47, n° 8, p. 1256-1267, 1993.

[69] S. J. Woltman, G. D. Jay, et G. P. Crawford, « Liquid-crystal materials find a new order in biomedical applications », *Nat. Mater.*, vol. 6, p. 929-938, 2007.

[70] H. R. Morris, C. C. Hoyt, P. Miller, et P. J. Treado, « Liquid Crystal Tunable Filter Raman Chemical Imaging », *Appl. Spectrosc.*, vol. 50, n° 6, p. 805-811, 1996.

[71] P. Colarussoa, A. Whitleyb, I. W. Levin, E. N. Lewisa, et C. Court, « Raman Microscopy and Imaging of Inorganic and Biological Materials with Liquid Crystal Tunable Filters », dans *Proc SPIE, Biomedical application of Raman spectroscopy*, 1999, vol. 3608, p. 139-145.

[72] Z. Meng, G. I. Petrov, et V. V Yakovlev, « Pure electrical , highly-efficient and sidelobe free coherent Raman spectroscopy using acousto-optics tunable filter (AOTF) », *Sci. Rep.*, vol. 6, n° 20017, p. 1-7, 2016.

[73] P. J. Treado, I. R. A. W. Levin, et E. N. E. L. Lewis, « rapid communication High-Fidelity Raman Imaging Spectrometry : A Rapid Method Using an Acousto-optic Tunable Filter », *Appl. Spectrosc.*, vol. 46, n° 8, p. 1211-1216, 1992.

[74] B. Boldrini, W. Kessler, K. Rebner, et R. W. Kessler, « Hyperspectral imaging : a review of best practice , performance and pitfalls for in-line and on-line applications », *J. near infrared Spectrosc.*, vol. 20, n° 5, p. 483-508, 2012.

[75] H. Sato, T. Tanaka, T. Ikeda, S. Wada, H. Tashiro, et Y. Ozaki, « Biomedical applications of a new portable Raman imaging probe », *J. Mol. Struct.*, vol. 598, n° 1, p. 93-96, oct. 2001.

[76] S. Murugkar, B. Smith, P. Srivastava, A. Moica, M. Naji, C. Brideau, P. K. Stys, et H. Anis, « Miniaturized multimodal CARS microscope based on MEMS scanning and a single laser source », *Opt. Express*, vol. 18, n° 23, p. 23796-23804, 2010.

[77] E. Schmälzlin, B. Moralejo, M. Rutowska, A. Monreal-Ibero, C. Sandin, N. Tarcea, J. Popp, et M. M. Roth, « Raman imaging with a fiber-coupled multichannel spectrograph », *Sensors (Switzerland)*, vol. 14, n° 11, p. 21968-21980, 2014.

[78] S. Tfaili, C. Gobinet, J.-F. Angiboust, M. Manfait, et O. Piot, « Raman Microimaging Using a Novel Multifiber-Based Device: A Feasibility Study on Pharmaceutical Tablets », *Int. J. Spectrosc.*, vol. 2012, p. 1-5, 2012.

[79] A. D. Gift, J. Y. Ma, K. S. Haber, B. L. McClain, et D. Ben-Amotz, « Near-infrared Raman imaging microscope based on fiber-bundle image compression », *J. Raman Spectrosc.*, vol. 30, n° 9, p. 757-765, 1999.

[80] M. Brückner, K. Becker, J. Popp, et T. Frosch, « Analytica Chimica Acta Fiber array based hyperspectral Raman imaging for chemical selective analysis of malaria-infected red blood cells », *Anal. Chim. Acta*, vol. 894, p. 76-84, 2015.

[81] R. D. Smith, M. P. Nelson, et P. J. Treado, « Raman Chemical Imaging Using Flexible Fiberscope Technology », dans *Proc SPIE, Spectral Imaging: instrumentation, applications and Analysys*, 2000, vol. 3920, p. 14-20.

[82] P. J. Treado, scott A. Keitzer, M. P. Nelson, et R. D. Smith, « CHEMICAL IMAGING FIBERSCOPE », US 7,551,821 B2, 2009.

[83] L. V. Doronina-Amitonova, I. V. Fedotov, A. B. Fedotov, et A. M. Zheltikov, « High-resolution wide-field Raman imaging through a fiber bundle », *Appl. Phys. Lett.*, vol. 102, n° 16, p. 1-4, 2013.

[84] H. Lim, V. M. Murukeshan, H. Lim, et V. Matham, « Spatial-scanning hyperspectral imaging probe for bio-imaging applications », *Rev. Sci. Instrum.*, vol. 33707, n° 87, p. 1-7, 2016.

[85] S. Cheng, J. J. Rico-jimenez, J. Jabbour, B. Malik, K. C. Maitland, J. Wright, Y. L. Cheng, et J. A. Jo, « Flexible endoscope for continuous in vivo multispectral fluorescence lifetime imaging », *Opt. Lett.*, vol. 38, n° 9, p. 1515-1517, 2013.

[86] S. Wachsmann-Hogiu, T. Weeks, et Thomas Huser, « Chemical analysis in vivo and in vitro by Raman spectroscopy- from single cells to humans », *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 20, n° 1, p. 63-73, 2011.

[87] M. B. Fenn, P. Xanthopoulos, G. Pyrgiotakis, S. R. Grobmyer, P. M. Pardalos, et L. L. Hench, « Raman spectroscopy for clinical oncology », *Adv. Opt. Technol.*, vol. 2011, 2011.

[88] L. A. Austin, S. Osseiran, et C. L. Evans, « Raman Technologies in Cancer Diagnostics », *Analyst*, vol. 141, n° 2, p. 476-503, 2015.

[89] H. Search, C. Journals, A. Contact, M. Iopscience, et I. P. Address, « Propects for in vivo Raman Spectroscopy », *Phys. Med. Biol.*, vol. 45, n° 2, p. R1-59, 2000.

[90] I. Pence et A. Mahadevan-jansen, « Clinical instrumentation and applications of Raman spectroscopy », *Chem. Soc. Rev.*, vol. 45, n° 7, p. 1958-1979, 2016.

[91] H. Lui, J. Zhao, D. McLean, et H. Zeng, « Real-time raman spectroscopy for in vivo skin cancer diagnosis », *Cancer Res.*, vol. 72, n° 10, p. 2491-2500, 2012.

[92] M. A. Short, S. Lam, A. M. Mcwilliams, et D. N. Ionescu, « Using Laser Raman Spectroscopy to Reduce False Positives of Autofluorescence Bronchoscopies A Pilot Study », *J. Thorac. Oncol.*, vol. 6, n° 7, p. 1206-1214, 2011.

[93] J. Wang, K. Lin, W. Zheng, K. Y. Ho, M. Teh, et K. G. Yeoh, « Simultaneous fingerprint and high- wavenumber fiber-optic Raman spectroscopy improves in vivo diagnosis of esophageal squamous cell carcinoma at endoscopy », *Sci. Rep.*, vol. 9, n° 4, p. 333-42, 2015.

[94] M. S. Bergholt et K. Lin, « Characterizing variability in in vivo Raman spectra of different anatomical locations in the upper gastrointestinal Characterizing variability in in vivo Raman spectra », *J. Biomed. Opt.*, vol. 16, n° 3, p. 037033-(1-10), 2011.

[95] S. Duraipandian, W. Zheng, J. Ng, A. Ilancheran, et Z. Huang, « Simultaneous Fingerprint and High-Wavenumber Confocal Raman Spectroscopy Enhances Early Detection of Cervical Precancer In Vivo », *Anal. Chem.*, vol. 84, n° 14, p. 5913-5919, 2012.

[96] M. S. Bergholt, K. Lin, J. Wang, W. Zheng, H. Xu, Q. Huang, J. Ren, K. Y. Ho, M. Teh, S. Srivastava, B. Wong, K. G. Yeoh, et Z. Huang, « Simultaneous fingerprint and high-wavenumber fiber-optic Raman spectroscopy enhances real-time in vivo diagnosis of adenomatous polyps during colonoscopy », *J. Biophotonics*, vol. 342, n° 4, p. 333-342, 2016.

[97] M. Jermyn, J. Desroches, J. Mercier, S.-A. Karl, M. C. Guiot, F. Leblond, et K. Petrecca, « Raman spectroscopy detects distant invasive brain cancer cells centimeters beyond MRI capability in humans », *Biomed. Opt. Express*, vol. 7, n° 12, p. 247-248, 2016.

[98] M. Ji, D. a. Orringer, C. W. Freudiger, S. Ramkissoon, 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, et X. S. Xie, « Rapid, Label-Free Detection of Brain Tumors with Stimulated Raman Scattering Microscopy », *Sci. Transl. Med.*, vol. 5, n° 201, p. 201ra119-201ra119, 2013.

[99] K. St-arnaud, K. Aubertin, M. Strupler, M. Jermyn, K. Petrecca, D. Trdel, et F. Leblond, « Wide-field spontaneous Raman spectroscopy imaging system for biological tissue interrogation », *Opt. Lett.*, vol. 41, n° 20, p. 4692-4695, 2016.

[100] J. Zakrzewski et K. Didona, « Advances in hyperspectral imaging technologies for multichannel fiber sensing », dans *Proc SPIE, Fiber Optic Sensors and Applications VI*, 2009, vol. 7316, p. 73160O.

[101] B. D. Beier et A. J. Berger, « Method for automated background subtraction from Raman spectra containing known contaminants † », *Analyst*, vol. 134, n° 6, p. 1198-1202, 2009.

[102] W. Duch et N. Jankowski, « Survey of Neural Transfer Functions », *Neural Comput. Surv.*, vol. 2, n° 6, p. 163-212, 1999.