

Titre: Méthodes d'imagerie de la diffusion inélastique pour guider les
Title: chirurgies mammaires conservatrices

Auteur: Sandryne David
Author:

Date: 2023

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: David, S. (2023). Méthodes d'imagerie de la diffusion inélastique pour guider les
Citation: chirurgies mammaires conservatrices [Thèse de doctorat, Polytechnique
Montréal]. PolyPublie. <https://publications.polymtl.ca/57093/>

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

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/57093/>
PolyPublie URL:

**Directeurs de
recherche:** Frédéric Leblond, & Daniel Côté
Advisors:

Programme: Génie biomédical
Program:

POLYTECHNIQUE MONTRÉAL

Affiliée à l'Université de Montréal

**Méthodes d'imagerie de la diffusion inélastique pour guider les chirurgies
mammaires conservatrices**

SANDRYNE DAVID

Institut de génie biomédical

Thèse présentée en vue de l'obtention du diplôme de *Philosophiæ Doctor*

Génie biomédical

Décembre 2023

POLYTECHNIQUE MONTRÉAL

Affiliée à l'Université de Montréal

Cette thèse intitulée :

Méthodes d'imagerie de la diffusion inélastique pour guider les chirurgies mammaires conservatrices

présentée par **Sandryne DAVID**

en vue de l'obtention du diplôme de *Philosophiæ Doctor*

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

Caroline BOUDOUX, présidente

Frédéric LEBLOND, membre et directeur de recherche

Daniel CÔTÉ, membre et codirecteur de recherche

Mai-Kim GERVAIS, membre

Jinyang LIANG, membre externe

DÉDICACE

À Camillie

REMERCIEMENTS

Le doctorat est un long processus que je n'aurais pas pu compléter seule. J'aimerais remercier tous celles et ceux qui ont contribué à la réalisation de cette thèse. Tout d'abord merci à mon directeur Frédéric Leblond pour de m'avoir offert l'opportunité de travailler sur des projets stimulants et dans un environnement aussi motivant. Merci pour tes conseils, ton mentorat et ton soutien tout au long de ces 6 années. Merci à mon co-directeur Daniel Côté pour l'amorce de ce projet.

Merci à tous nos collaborateurs qui m'ont aidé avec la dimension médicale de ce projet. Merci à Dr Meterissan pour son enthousiasme, à Dr Omeroglu et Dr Richer pour leur temps et à Mirela et Feryel pour leur générosité et le temps qu'elles ont passé à partager leurs connaissances. Merci également à tout le personnel médical.

Merci à mes collègues du LuMed Lab qui ont m'ont apporté leur aide et leur soutien morale et ont contribué à créer un sentiment d'équipe au sein du laboratoire. Un merci particulier au pâtissier en chef Esmat qui a été mon complice des deux dernières années, à Hugo qui m'a accompagné dans les études cliniques et aux irréductibles vétérans du laboratoire Trang, Katie, Nassim, Fredo, Guillaume et François sans qui rien n'aurait été possible.

Merci à mes collègues du bureau du cinquième étage de Polytechnique Pierre-Alexandre, Étienne et Oscar pour leur incroyable soutien et pour m'avoir donné envie de poursuivre au doctorat.

Un grand merci à Éliissa, ma partenaire d'écriture sans qui la rédaction de cette thèse aurait été beaucoup plus longue et triste.

Merci à mon copain et à mon consultant en informatique préféré, Yan.

Un merci tout spécial à ma famille qui m'a toujours soutenu. Merci à mes parents pour leur amour et leur soutien, merci à mon grand-père Jean de m'avoir fait visiter un laboratoire de recherche quand j'étais encore au cégep et merci ma petite sœur Camillie qui est la meilleure.

Finalement merci aux organismes de subventionnaires FRQNT, CRSNG et TransMedtech pour le support financier.

RÉSUMÉ

Les chirurgies mammaires conservatrices sont généralement recommandées pour les patientes atteintes d'un cancer du sein de stade précoce, car, combinées à la radiothérapie, elles offrent un pronostic similaire aux mastectomies – l'ablation du sein – tout en minimisant le changement d'apparence et limitant les risques de complication. Cependant, l'évaluation du succès de cette chirurgie repose sur des analyses microscopiques du spécimen de chirurgie faites quelques jours après l'opération. Ce délai fait en sorte que pour un grand nombre de patientes une seconde chirurgie est nécessaire. Cette thèse vise à proposer des techniques de détection peropératoires du cancer du sein permettant d'évaluer le succès des chirurgies en temps réel et ainsi réduire le stress et les coûts associés à une seconde opération. Le premier objectif était de valider l'utilisation de la spectroscopie Raman pour détecter le cancer à l'aide d'algorithmes d'apprentissage automatique basés sur un petit nombre de bandes spectrales. Deux études cliniques ont démontré qu'il était possible de détecter avec une grande sensibilité et spécificité le cancer de l'ovaire et de l'utérus ainsi que le cancer du sein invasif avec une sonde de spectroscopie Raman et ont permis d'identifier des biomarqueurs associés à ces cancers. Cependant, un système de sonde de spectroscopie est insuffisant pour l'utilisation clinique, car il ne permet que des mesures ponctuelles. Le second objectif était donc de valider l'utilisation d'un système d'imagerie Raman hyperspectrale à balayage par ligne. Une étude clinique menée sur 6 patientes a démontré que ce système permet de détecter des tumeurs mammaires invasives sur une surface de 1 centimètre carré. Un tel système pourrait être utilisé pour la détection de cancer du sein invasif *ex vivo* et ainsi compléter l'évaluation macroscopique des pathologistes. Finalement, une analyse d'études antérieures a révélé des biomarqueurs communs à plusieurs cancers. Ces biomarqueurs peuvent être utilisés pour différencier les tissus cancéreux des tissus sains avec seulement trois bandes spectrales. Cette découverte a mené à la réalisation du dernier objectif de cette thèse qui était la conception d'un système d'imagerie multi-spectrale permettant d'imager une bande spectrale sur 1,7 centimètre carré en quelques secondes. Une validation à partir d'un modèle animal a été effectuée. Ce système pourrait ouvrir la voie vers un examen en temps réel de la cavité chirurgicale pour la détection de cellules cancéreuses résiduelles durant les chirurgies mammaires conservatrices.

ABSTRACT

Breast-conserving surgery is generally recommended for patients with early-stage breast cancer, since combined with radiotherapy it offers a similar prognosis to mastectomy - the complete removal of the breast - while minimizing the change in appearance and limiting the risk of complications. However, evaluation of the success of this surgery relies on microscopic analysis of the surgical specimen made a few days after the operation. This delay means that many patients require a second surgery. The aim of this thesis is therefore to propose intraoperative breast cancer detection techniques that will help assessing the success of surgery in real time, thereby reducing the stress and costs associated with second operations. The first objective was to validate the use of Raman spectroscopy to detect cancer using machine learning algorithms based on a small number of spectral bands. Two clinical studies demonstrated that ovarian, uterine, and invasive breast cancer could be detected with high sensitivity and specificity using a Raman spectroscopy probe, and identified biomarkers associated with these cancers. However, a spectroscopy probe system is insufficient for clinical use, as it only allows for punctual measurements. The second objective was therefore to validate the use of a line-scan hyperspectral Raman imaging system. A clinical study carried out on 6 patients demonstrated that this system could detect invasive breast tumors over an area of 1 square centimetre. Such a system could be used to detect invasive breast cancer *ex vivo*, thus complementing macroscopic assessment made by pathologists. Finally, an analysis of previous studies revealed biomarkers common to several cancers. These biomarkers can be used to differentiate cancerous from healthy tissues with just three spectral bands. This discovery led to the final objective of this thesis; the design of a multispectral imaging system capable of imaging a spectral band over 1.7 square centimetres in a few seconds. The system was validated on an animal model. This system could pave the way for real-time examination of the surgical cavity to detect residual cancer cells during breast-conserving surgery.

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE.....	III
REMERCIEMENTS	IV
RÉSUMÉ.....	V
ABSTRACT	VI
TABLE DES MATIÈRES	VII
LISTE DES TABLEAUX.....	XII
LISTE DES FIGURES.....	XIV
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XXI
CHAPITRE 1 INTRODUCTION	1
1.1 Mise en contexte.....	1
1.2 Solutions proposées.....	2
1.3 Hypothèses et objectifs du projet de recherche	3
1.4 Organisation du document	4
CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE.....	5
2.1 Cancer du sein	5
2.1.1 Chirurgie mammaire conservatrice	7
2.1.2 Nouvelles techniques de détection	9
2.2 Interaction entre les tissus biologiques et la lumière.....	12
2.2.1 Diffusion Raman	15
2.2.2 Auto-fluorescence des tissus et spectroscopie Raman	22
2.3 L'apprentissage automatique des spectres Raman pour la détection du cancer.....	24
2.3.1 Machines à vecteurs de support	27
2.3.2 Évaluation des performances d'un modèle d'apprentissage automatique	29

2.3.3	Simplification du modèle et interprétabilité.....	31
CHAPITRE 3 DÉMARCHE SCIENTIFIQUE ET CONTRIBUTIONS.....		34
3.1	Obtenir des modèles de classification permettant de distinguer avec une grande sensibilité et spécificité les tissus sains et les tissus cancéreux à partir de quelques bandes spectrales d'un spectre Raman acquis avec un système commercial de sonde sur de spécimens de chirurgie frais.....	34
3.2	Validation de l'application des modèles de classification de spectres Raman sur des images hyperspectrales pour détecter le cancer du sein invasif	36
3.3	Développement et preuve de concept d'un système d'imagerie Multispectrale pour imager une bande spectrale	38
CHAPITRE 4 ARTICLE 1 : MULTISPECTRAL LABEL-FREE RAMAN SPECTROSCOPY CAN DETECT OVARIAN AND ENDOMETRIAL CANCER WITH HIGH ACCURACY		40
4.1	Mise en contexte de l'article	40
4.2	Abstract	42
4.3	Introduction	42
4.4	Materials and methods	44
4.4.1	Patients and histopathology analyses	44
4.4.2	Raman instrumentation, spectroscopy measurements and data pre-processing.....	46
4.4.3	Data filtering and spectral feature-selection.....	47
4.4.4	Cancer detection model training and testing	48
4.5	Results	50
4.6	Discussion and conclusion	54
4.7	Supporting information	56
4.8	Supplemental materials	56
CHAPITRE 5 ARTICLE 2: IN SITU RAMAN SPECTROSCOPY AND MACHINE LEARNING UNVEIL BIOMOLECULAR ALTERATIONS IN INVASIVE BREAST CANCER		57

5.1	Abstract	57
5.2	Introduction	58
5.3	Methods	61
5.3.1	Raman spectroscopy system.....	61
5.3.2	Patients selection	61
5.3.3	Specimen handling and ex-vivo spectroscopic measurements	62
5.3.4	Registration with optical measurements and histology labels	63
5.3.5	Data processing and labeling.....	64
5.3.6	Machine learning workflow	67
5.4	Results	68
5.4.1	Spectroscopic measurements.....	68
5.4.2	Machine learning models and biomolecular predictions.....	69
5.5	Discussion	73
5.6	Appendix: Supplemental Material	77
5.7	Acknowledgments.....	79
5.8	Conflict of Interest	79
5.9	Code, Data and Materials Availability	79
CHAPITRE 6 ARTICLE 3: MACROSCOPIC INELASTIC SCATTERING IMAGING USING A HYPERSPSCTRAL LINE-SCANNING SYSTEM IDENTIFIES INVASIVE BREAST CANCER IN LUMPECTOMY AND MASTECTOMY SPECIMENS		80
6.1	Abstract	80
6.2	Introduction	81
6.3	Methods.....	83
6.3.1	Raman spectroscopy system.....	83
6.3.2	Patients selection	84

6.3.3	Specimen handling and ex vivo spectroscopic measurements.....	85
6.3.4	Registration with optical measurements and histology labels	86
6.3.5	Data processing and exclusion criteria.....	88
6.3.6	Machine learning workflow	89
6.4	Results	90
6.4.1	Spectroscopic measurements.....	90
6.4.2	Machine learning models and biomolecular predictions.....	91
6.5	Discussion	95
6.6	Acknowledgements	96
6.7	Conflict of interest.....	97
6.8	Code, Data and Materials Availability	98
CHAPITRE 7 ARTICLE 4: TOWARDS NON-CONTACT MACROSCOPIC IMAGING OF MULTIPLE CANCERS USING MULTI-SPECTRAL INELASTIC SCATTERING DETECTION		99
7.1	Abstract	99
7.2	Letter	100
7.2.1	Funding.....	107
7.2.2	Disclosures	108
7.2.3	Code, Data and Materials Availability	108
7.3	Supplemental Material	108
CHAPITRE 8 DISCUSSION GÉNÉRALE		111
8.1	Buts de l'étude.....	111
8.2	Obtenir des modèles de classification permettant de distinguer avec une grande sensibilité et spécificité les tissus sains et les tissus cancéreux à partir de quelques bandes	

spectrales d'un spectre Raman acquis avec un système commercial de sonde sur de spécimens de chirurgie frais.....	111
8.3 Valider la détection du cancer du sein invasif sur des spécimens retirés au cours de chirurgies mammaires à l'aide de l'imagerie Raman hyperspectrale et de modèles de classification entraînés sur des spectres acquis avec la sonde de spectroscopie Raman.....	114
8.4 Effectuer le développement et réaliser une preuve de concept d'un système d'imagerie Raman multi-spectrale permettant d'imager une bande spectrale sur une surface de 2 cm ² ...	116
CHAPITRE 9 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS.....	119
RÉFÉRENCES.....	122

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1 Comparaison des résultats obtenus <i>ex vivo</i> avec différentes méthodes expérimentales d'analyse des marges de chirurgie mammaire conservatrice.	12
Tableau 2.2 Résumé des résultats obtenus par différents groupes de recherche pour la distinction des tissus mammaires cancéreux et sains <i>ex-vivo</i>	20
Tableau 2.3 Comparaison des performances de classification de différentes méthodes d'apprentissage automatique et différentes méthodes de test utilisées pour différencier des spectres Raman acquis sur des tissus sains et cancéreux. Les méthodes comparées sont: réseaux de neurones artificiels (ANN), arbres de décision (CART), réseaux de neurones convolutifs (CNN), analyse de discriminants linéaires (LDA), régression linéaire (LR), analyse des principaux composants (PCA), analyse de discriminants quadratiques (QDA), vecteurs de support machine (SVM), validation croisée sans intervention (LOOCV).	25
Tableau 2.4 Comparaison des performances de classification de différentes méthodes d'apprentissage automatique utilisées pour différencier les tissus sain et cancéreux de ganglions auxiliaires.	26
Tableau 4.1 Clinical and pathological characteristics. PIDx: patient identification number, HG: high-grade, N/A: information not available) Before any exclusion. The FIGO (International Federation of Gynecology and Obstetrics) staging system is used most often for cancers of the female reproductive organs.	44
Tableau 4.2 Pathological characteristics of tissue associated with Raman measurements before any exclusion.	45
Tableau 4.3 Most common spectral band intensities (features) utilised in the classification model. Information is provided on the spectral band location of each feature, the main molecular bonds excited and a tentative association with tissue biomolecules. The status of each band is shown in terms of its intensity being higher or lower in tissue specimens labeled as <i>cancer</i>	52
Tableau 5.1 Clinical and pathological characteristics of all patients undergoing breast surgery (std: standard deviation; NA: not available; IQR: interquartile range).	62

Tableau 5.2 Raman peaks and main corresponding vibrational bonds associated with the Raman-predicted molecular tissue content associated with the spectra in Figure 3. The bands associated with spectral features used as inputs to the classification models (Model A, Model B, Model C) are identified in the last column. A tentative molecular assignment (specific molecules and families of biomolecules) based on literature findings is shown ¹⁸³ . Legend: C-H: carbon-hydrogen single bonds, C=C: carbon-carbon double bonds (unsaturated), C-C: carbon-carbon bonds, CH ₂ : ethyl group, CH ₃ : methyl group.	66
Tableau 5.3 Demographic and clinical information of the 20 patients included in the study.....	77
Tableau 6.1 Clinical and pathological characteristics of all patients undergoing breast surgery. .	84
Tableau 7.1 Detection of four cancer types (brain, breast, lung, ovarian/endometrium) using spectral features associated with inelastic scattering spectra acquired in tissue with a single-point Raman spectroscopy system. The reported results are associated with ROC curve analyses from which the area-under-the-curve (AUC), the Sensitivity (Sens) and the Specificity (Spec) were computed.....	102

LISTE DES FIGURES

- Figure 2.1 Représentation schématique de : a) la composition du sein (Breastcancer.org, traduction libre), b) le cancer du sein canalaire in situ et le cancer du sein canalaire invasif (Breastcancer.org, traduction libre).....6
- Figure 2.2 Représentation schématique d'une marge de spécimen de résection négative et positive après une BCS (Breastcancer.org, traduction libre).....8
- Figure 2.3 Diagramme de Jablonski représentant les différentes interactions tissus lumière⁶². ..14
- Figure 2.4 Diagramme de Jablonski de la diffusion Rayleigh, Raman Stokes et anti-Stokes. 16
- Figure 2.5 Coefficient d'absorption de l'hémoglobine oxygénée, de l'hémoglobine désoxygénée, des lipides, de l'eau et de la bile de 400 à 1600 nm. Le coefficient est exprimé selon un axe logarithmique. Cette figure est reproduite de *Nachabé et al.* avec la permission de *Optica publishing group*. 17
- Figure 2.6. a) Représentation graphique de la classification SVM en deux dimensions, b) la marge devient plus grande lorsque C diminue et certains points se retrouvent à l'intérieur de la marge et c) lorsque γ diminue le nombre de points considéré dans le calcul de la frontière de décision augmente et les points inclus sont plus éloignés de la frontière. 28
- Figure 2.7: Représentation schématique de l'utilisation de la validation croisée k-fold $k = 5$ pour la sélection d'hyperparamètres. La première étape consiste à séparer l'ensemble de données en deux sous-ensembles : 80% sont alloués à l'entraînement du modèle et 20% sont réservés pour tester le modèle. Pour une combinaison d'hyperparamètres donnée, l'ensemble de données d'entraînement est divisé en 5 sous-ensembles (*folds*). 4 de ces sous-ensembles servent à entraîner un modèle et le cinquième - le sous-ensemble de validation - est utilisé pour évaluer la performance du modèle. Cette étape est répétée 5 fois, avec un ensemble de validation différent à chaque fois et 5 AUC sont calculés, un pour chaque ensemble de validation. La moyenne des 5 AUC est utilisée pour évaluer la performance de cette combinaison d'hyperparamètres. La validation croisée est répétée pour chaque combinaison d'hyperparamètres présente dans une grille. Un AUC est été calculé pour chaque combinaison et celle produisant le meilleur AUC est retenue. Le modèle final est produit en entraînant sur tout le sous-ensemble d'entraînement et la courbe ROC, l'exactitude, la sensibilité et la

spécificité sont calculées à partir du sous-ensemble de test (20% de l'ensemble de données).
30

Figure 2.8 Représentation schématique de l'application de PCA à un ensemble en deux dimensions.

Les axes x_1 et x_2 sont les *features* originaux de l'ensemble de données. Une nouvelle paire d'axes orthogonaux est calculée pour laquelle x_1' exprime la variance maximale de l'ensemble de données. Les données sont projetées sur x_1' et l'ensemble de données est maintenant exprimé en une dimension. 33

Figure 3.1 a) Schéma du système de sonde de spectroscopie Raman utilisé pour les mesures optiques de l'étude sur le cancer de l'ovaire et l'étude sur le cancer du sein et b) photographie de la sonde de spectroscopie Raman 36

Figure 3.2 Photographie du système d'imagerie Raman hyperspectral utilisé durant la deuxième étude clinique portant sur le cancer du sein. 38

Figure 3.3 Photographie du système d'imagerie Raman multi-spectrale. 39

Figure 4.1 Data analysis flowchart. A hyperparameter combination is made by randomly selecting a value for each parameter of the feature-selection (C , k , $k-n$) and the classification (C , γ) algorithms. The performance associated with a given hyperparameter combination is assessed through LOPO CV. Each patient is used individually as a validation set and the model trained on $N - 1$ patients outputs a probability of being cancer to its spectra. A ROC curve is computed using the probabilities of N patients with a corresponding AUC value. This procedure is repeated until a predetermined number of combinations to evaluate is achieved. The set of hyperparameters with the highest AUC is considered to be the final model. 49

Figure 4.2 Normal/benign and cancer spectra for: (a) ovary, (b) uterus, (c) fallopian tube & pelvic mass, and (d) omentum. Each curve represents an average spectrum. The variance (shaded area) was computed based on the number of spectra specified in the legend. The omentum spectra were excluded from the process leading to the training of a cancer detection model.
51

Figure 4.3 (a): Receiver-operating-characteristic (ROC) curve of the cancer detection model showing the location of the parameter value $\lambda = 0.46$ associated with the point closest to the upper-left corner. (b) Average *normal/benign* spectra ($n = 42$) and *cancer* spectra ($n = 28$)

retained to train the cancer detection model (top) and standardized spectra (bottom) with the seven most important Raman bands used for classification highlighted with dotted lines....51

Figure 4.4: Whisker plots for the seven most important Raman bands used for cancer detection. The distribution associated with each band is shown for normal/benign (grey) and cancer (red). 52

Figure 4.5 Cancer classification probability plotted against the percentage of cancer. Classification results for the samples with a cancer cell burden between 10% and 80% are shown inside the grayed region. Symbol color indicates the patient identification number (PIDx) and the symbol shape denotes the organ type. The dashed horizontal line represents the threshold value associated with the ROC curve in Figure 3. Data points above the threshold line ($\lambda = 0.46$) were classified in the *cancer* category. 54

Figure 4.6 Individual spectra excluded from the study due to the presence of an artefactual peak at 957 cm^{-1} for patients 3 (blue), 4 (orange) and 6 (black). 56

Figure 5.1 Schematic representation of the Raman spectroscopy hand-held probe workflow developed for surgical-guidance during breast-conserving surgery. *Ex vivo* spectroscopic measurements were made on breast surgery specimen to train machine learning models. The machine learning techniques selected the biomolecular spectral features with the most contrast between cancer and normal breast, and those features were used to train and test the cancer detection predictive models. The intent is to use those models for live *in situ* cancer detection during breast-conserving surgery. 61

Figure 5.2 Spatial registration of Raman spectroscopy measurements with histopathology: (a) Representation of the technique where a fresh specimen was initially pinned to a cardboard support placed on a guiding template in the form of a grid. The circle superposed with the specimen represents the position of the probe above the grid. (b) End result of the methodology leading to the spatial registration of all spectroscopic measurements with an H&E-stained section. Different colors were used for some of the circles to improve visualization in cases when they overlapped.....65

Figure 5.3 Spectra associated with *Normal*, *Cancer* and *Fat* measurements in breast tissue: a) average spectroscopic measurements (raw data) for each tissue category along with the

standard deviation for each spectral bin; b) average Raman spectra and standard deviation with selected bands identified with their wavenumber value. All identified bands were used for the biochemical interpretation of the data (Table 2), and a subset of those bands was used for machine learning model development. 66

Figure 5.4 Average Raman spectra and spectral features (dotted lines) used by the classification models. Classification results are expressed in term of accuracy, sensitivity, and specificity. Confusion matrices and receiver operating characteristic (ROC) curves are also shown for the three models: Model A: *Cancer* vs. non-cancer (*Normal* + *Fat*); Model B: *Cancer* vs. *Normal*, and Model C: *Cancer* vs. *Fat*. 70

Figure 5.5 Statistical distribution of the intensity of the five features used by classification models for *Fat*, *Normal* and *Cancer* spectra. Model A (*Cancer* vs. *Normal* + *Fat*) used features associated with bands at 940 cm^{-1} and 1004 cm^{-1} , Model B (*Cancer* vs. *Normal*) used bands at 940 cm^{-1} , 1004 cm^{-1} , 1129 cm^{-1} and 1155 cm^{-1} and Model C (*Cancer* vs. *Fat*) used bands at 1004 cm^{-1} and 1304 cm^{-1} . Outliers are represented by black diamonds. 71

Figure 5.6 A *Fat* detection classifier was trained from 238 spectra. It was applied on the 34 spectra that were excluded from the study because of suspected mis-labeling likely associated with spatial registration errors of Raman spectroscopy measurements with the H&E images: the 28 spectra that were labeled as *Normal* or *Cancer* were all classified as *Fat* (false negatives) and the 6 spectra that were labeled as *Fat* were classified as *Normal* or *Cancer* (false positives). 72

Figure 5.7 Raman spectra associated with the *Normal* category from the breast reduction surgery patient, compared to all other *Normal* measurements. Cancer spectra are also shown for visual comparison. The four features used in the classification models are identified with dotted lines. 73

Figure 5.8 ROC curve for the fat detection model. 77

Figure 6.1 Schematic representation of the two methods of specimen handling and ex vivo spectroscopic measurements. a) to f) For tumor larger than 1 cm. a) A sample is cut from the specimen slices and b) placed on a black coated aluminum sheet that was stuck to an expanded polystyrene foam (EPS) sheet. The margins orientation was marked on the EPS sheet and a picture was taken. c) The EPS sheet was then placed under the imaging system and

measurements were made. e) The sides of the sample were inked with different colors to indicate the margins orientation and the sample was transferred into a pathology cassette and put in formalin for fixation. f) An H&E-stained image of the sample was analysed by the pathologist and the white-light image and the picture were used to register the position of the Raman measurement on the H&E image. g) to k) For tumors smaller than 1 cm, h) the entire specimen slice is put on a black coated aluminum sheet that was stuck to an EPS sheet. The margins orientation was marked on the EPS sheet and a 3D-printed grid was placed on top without direct contact with the specimen. A picture was taken, and the pathologist indicated a square of the grid that contained interesting structures. i) The EPS sheet was placed under the imaging system and the grid was used to record the location of the measurement. The grid was carefully removed without moving the specimen slice and the Raman measurements were taken. j) The specimen slice was then transferred to another EPS sheet where it was pinned alongside the other slices of the specimen. The margins orientation was indicated on the EPS sheet, and it was placed in formalin for fixation as per standard of care. k) This resulted in an H&E-stained image of the entire specimen slice where the pathologist indicated the position of the tumor. The white-light image and the picture taken with the grid were used to register the position of the Raman measurement on the H&E image. 87

Figure 6.2 Average processed Raman spectra from breast tissue with standard deviation for each spectral bin. The spectra are classified in 3 categories: Fat – identified by Model A - and Cancer and Normal – classified by Model B after exclusion of the Fat spectra. The 5 spectral features used for classification (Model A: 940, 1004 1340 cm^{-1} and Model B: 940, 1004, 1129, 1155 cm^{-1}) are identified by vertical lines.....91

Figure 6.3 Results of imaging 8 samples. First column presented the results of microscopic analysis provided by pathologist. Second column presented the white-light image of the sample and third column the histology results cropped to correspond to the FOV of the imaging system. Fourth, fifth, sixth and seventh columns showed the intensity maps for the spectral features 940, 1004, 1129 and 1159 cm^{-1} , corresponding to the 4 spectral bands used in Model B. Eighth column presented the results of classification in 2 steps with Model A identifying all *Fat* spectra and Model B classifying the remaining spectra as *Normal* and *Cancer*.....94

Figure 6.4 Sample P3 a) classification map with Model A where pixels in purple are classified as *Cancer*, the pixel in yellow as Normal and the pixels in pink as *Fat* with spectra presenting a QF under 0.5 excluded. b) Three SNV normalized Raman spectra are presented: a spectrum of black coated aluminum, a spectrum of the border between the sample and the substrate e, and a spectrum of adipose tissues. The location of each spectrum is indicated by a cross of the same color on a). A vertical line indicates the spectral feature at 1004 cm^{-1} on b) 95

Figure 7.1 Experimental setup allowing multi-spectral detection of inelastic scattering in biological tissue: a) Schematic representation comprising epi-illumination through an excitation path formed by an optical fiber, a collimating lens (CL), a band-pass filter (BPF), a diverging lens, a dichroic mirror (DM) and a focusing lens. The light collection path includes a notch filter (NF), a filter wheel with 9 interference bandpass filters, and a CCD camera. All lenses are spherical except LH (cylindrical with curvature in the horizontal direction) and LV (cylindrical lenses with curvature in the vertical direction); b) photograph of the system demonstrating simplicity of implementation.....103

Figure 7.2 Adipose and muscle tissue spectra acquired with the hyperspectral imaging system: a) Average raw spectrum and variance across the images; b) Same but for processed spectra after background removal. The vertical dotted lines in a) correspond to the three spectral bands used in the multi-spectral system at wavenumber shifts 1407 , 1440 and 1492 cm^{-1} . Dark arrows indicated the spectral bands used in the 3-bands models reported in Table 1.....105

Figure 7.3 Porcine tissue specimen images showing the margin between adipose and muscle tissue. (a,b) White-light images acquired with the hyperspectral and multi-spectral imaging systems. (c,d) Corresponding raw Raman signal intensity images (no background subtraction) in the 1440 cm^{-1} band. (e,f) Corresponding processed images following background removal. The two systems had a different fields-of-view but otherwise approximately represent the same area on the specimen. All images are normalized to their maximum value for direct comparison of the contrast associated with both modalities. 106

Figure 7.4 Porcine tissue specimen images showing the margin between adipose and muscle tissue. (a,b) White-light images acquired with the hyperspectral and multi-spectral imaging systems. (c,d) Corresponding raw Raman signal intensity images (no background subtraction) in the 1440 cm^{-1} band. (e,f) Corresponding processed images following background removal. The

two systems had a different fields-of-view but otherwise approximately represent the same area on the specimen. All images are normalized to their maximum value for direct comparison of the contrast associated with both modalities. 108

Figure 7.5 Porcine tissue specimen images showing the margin between adipose and muscle tissue.

(a,b) White-light images acquired with the hyperspectral and multi-spectral imaging systems. (c,d) Corresponding raw Raman signal intensity images (no background subtraction) in the 1440 cm^{-1} band. (e,f) Corresponding processed images following background removal. The two systems had a different fields-of-view but otherwise approximately represent the same area on the specimen. All images are normalized to their maximum value for direct comparison of the contrast associated with both modalities. 109

Figure 7.6 Porcine tissue specimen images showing the margin between adipose and muscle tissue.

(a,b) White-light images acquired with the hyperspectral and multi-spectral imaging systems. (c,d) Corresponding raw Raman signal intensity images (no background subtraction) in the 1440 cm^{-1} band. (e,f) Corresponding processed images following background removal. The two systems had a different fields-of-view but otherwise approximately represent the same area on the specimen. All images are normalized to their maximum value for direct comparison of the contrast associated with both modalities. 109

Figure 8.1: Échantillon contenant la tumeur de 3 millimètres a) résultats d'histologie b) résultats de classification (les pixels en violet sont classifiés comme *Cancer*, les pixels en jaune comme *Normal* et les pixels en rose comme *Gras*). b) Trois spectres Raman normalisés SNV sont présentés : un spectre de tissus classifiés comme *Cancer*, un spectre dans la région de la tumeur classifié comme *Gras* et un spectre de tissus adipeux. L'emplacement de chaque spectre est indiqué par une croix de même couleur sur b). Une ligne verticale indique la bande spectrale à 1004 cm^{-1} sur b) 116

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ANN	Réseaux de neurones artificiels (<i>Artificial Neural Network</i>)
AUC	Air sous la courbe
CART	Arbres de décision (<i>Classification And Regression Tree</i>)
CCI	Carcinome canalaire infiltrant
CCIS	Carcinome canalaire <i>in situ</i>
CLI	Carcinome lobulaire infiltrant
CLIS	Carcinome lobulaire <i>in situ</i>
CNN	Réseaux de neurones convolutifs (<i>Convolutional Neural Network</i>)
CRCHUM	Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal
CUSM	Centre Universitaire de Santé de l'université McGill
CV	Validation croisée (<i>Cross Validation</i>)
FOV	Champ de vue (<i>Field of View</i>)
FT Raman	Raman par transformé de Fourier
H&E	Hématoxyline et éosine
KNN	Méthode des plus proches voisins (<i>K Nearest Neighbors</i>)
LDA	Analyse de discriminants linéaires (<i>Linear Discriminant Analysis</i>)
LOOCV	Validation croisée sans intervention (<i>Leave One Out Cross Validation</i>)
LOPO	Validation croisée sans intervention (leave-one-patient-out)
LR	Régression linéaire
micro-CT	Micro-tomodensitométrie
MNI	Institut-hôpital neurologique de Montréal
MPE	Exposition maximale admissible
OCT	Tomographie en cohérence optique

- PCA Analyse des composants principaux (*Principal Component Analysis*)
- PET Tomographie par émission de positrons
- QDA Analyse de discriminants quadratiques (*Quadratic Discriminant Analysis*)
- QF Facteur de qualité
- RBF Fonction de base radiale
- ROC Fonction d'efficacité du récepteur (*Receiver operating characteristic*)
- SERDS Spectroscopie Raman différentiel à excitation décalé
- SERS Spectroscopie Raman amplifiée de surface (*Surface-enhanced Raman spectroscopy*)
- SFDI Imagerie dans le domaine des fréquences spatiales (*Spatial Frequency Domain Imaging*)
- SNR Rapport signal sur bruit
- SORS Spectroscopie Raman spatialement décalée (*Spatially offsets Raman spectroscopy*)
- SVM Vecteurs de support machine (*Support Vectors Machine*)

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

1.1 Mise en contexte

Le cancer du sein est le cancer le plus commun chez les femmes. Au Canada, une femme sur huit en est affectée au courant de sa vie. On estime que 28 600 femmes recevront un diagnostic de cancer du sein au cours de l'année 2022[1]. La majorité des traitements prescrits pour cette pathologie impliquent une résection de la tumeur par chirurgie. En Amérique du Nord, 60 à 75 % de femmes souffrant d'un cancer de stade précoce optent pour une chirurgie mammaire conservatrice plutôt que pour la mastectomie, l'ablation chirurgicale complète du sein[2].

Ce type de chirurgie a pour avantage de minimiser le changement d'apparence de la patiente et le risque de complication. Combinée à la radiothérapie, la chirurgie mammaire conservatrice présente un taux de succès comparable à la mastectomie chez les patientes ayant une tumeur unifocale et unilatérale[3], [4]. Le succès d'une chirurgie mammaire conservatrice est défini par le retrait complet des lésions entourées d'une marge circonférentielle de tissus sains. Une marge inadéquate, c'est-à-dire contenant des cellules cancéreuses, est associée avec un plus grand risque de récurrence du cancer et donc nécessite de retirer chirurgicalement plus de tissus[5]. Actuellement, entre 15% et 20% (selon les centres) des patientes doivent subir une seconde chirurgie à cause de cellules cancéreuses détectées dans la marge par des analyses microscopiques[6]–[8]. Ces secondes interventions chirurgicales causent du stress inutile et augmentent le risque de complications liées à la chirurgie. Il existe donc un grand besoin clinique de technologies permettant de guider la chirurgie mammaire conservatrice et détecter les cellules cancéreuses en temps réel.

Plusieurs avancées technologiques ont tenté de répondre à cette problématique. Les méthodes testées incluent notamment l'ultrasonographie peropératoire[9], la spectroscopie en radiofréquence[10] et l'imagerie par fluorescence[11], [12]. Cependant, les analyses pathologiques *ex vivo* peropératoires demeurent les méthodes les plus utilisées[13].

L'objectif de ce projet de recherche est de proposer une solution pour la conception d'un système qui permettrait la détection des cellules cancéreuses résiduelles de façon peropératoire. Cette thèse se concentre donc sur la détection du cancer par spectroscopie Raman appliquée au guidage des chirurgies mammaires conservatrices.

1.2 Solutions proposées

L'évaluation des marges d'un spécimen de chirurgie mammaire conservatrice peropératoire requiert une méthode d'analyse rapide, permettant d'obtenir de l'information moléculaire sur les tissus avec une grande sensibilité. Les solutions proposées dans le cadre de ce projet reposent sur la spectroscopie Raman, une technique de spectroscopie vibrationnelle basée sur la détection de la diffusion inélastique. Les spectres Raman caractérisent le contenu moléculaire d'un échantillon par l'énergie vibrationnelle entre les atomes et fournissent l'« empreinte moléculaire » d'un échantillon. Trois solutions basées sur la spectroscopie Raman ont été proposées dans le cadre de ce projet.

La première repose sur un système commercial de sonde de spectroscopie Raman utilisant des modèles d'apprentissage automatique robustes pour distinguer les tissus cancéreux ainsi que les tissus mammaires normaux et adipeux avec une grande sensibilité et une grande spécificité. Cette méthode est limitée par le petit champ de vue de la sonde (500 microns) et n'est pas applicable cliniquement pour l'analyse des marges, mais permet de valider le potentiel de la spectroscopie Raman et de mettre en lumière les biomarqueurs Raman permettant l'identification du cancer du sein.

La deuxième solution proposée est l'utilisation peropératoire *ex vivo* d'un système d'imagerie Raman hyperspectrale. Les algorithmes d'apprentissage machine développés avec la sonde de spectroscopie sont utilisés pour classifier chaque pixel des images hyperspectrales. Ce système d'imagerie permet de détecter les tissus cancéreux sur une surface de 1 centimètre carré en quelques minutes. Cette solution permettrait de compléter l'analyse macroscopique des marges par les pathologistes afin d'offrir une plus grande sensibilité moléculaire aux tissus cancéreux.

La solution finale proposée est l'imagerie Raman multi-spectrale, une nouvelle technologie inventée en collaboration avec mon directeur de recherche. Cette technologie repose sur la découverte de biomarqueurs communs à de multiples cancers et permettant la détection du cancer avec aussi peu que 3 bandes spectrales. La méthode consiste à imager uniquement ces bandes avec un système d'imagerie Raman multi-spectrale afin de réduire le temps nécessaire à une mesure et d'augmenter la taille du champ de vue. Ce système permet d'imager une bande spectrale associée aux lipides et aux protéines sur une surface de 1,7 centimètre carré en quelques secondes. Cette

méthode d'imagerie a le potentiel d'être utilisée *in vivo* pour l'analyse de cavités chirurgicales en temps réel.

Les deux premiers systèmes décrits ont été développés par d'autres membres du groupe. Ma contribution au niveau du développement d'instrumentation fut l'invention, le design, la fabrication et la validation de la méthode d'imagerie Raman multi-spectrale.

1.3 Hypothèses et objectifs du projet de recherche

Ce projet de recherche vise à répondre à la question suivante : peut-on développer un système de détection rapide des cellules cancéreuses sur champ de vue de quelques centimètres de diamètre afin d'améliorer le pronostic des patientes subissant une chirurgie mammaire conservatrice?

Le projet se base sur 3 hypothèses scientifiques :

Hypothèse 1 : Il est possible de discriminer les tissus sains des tissus cancéreux avec une grande sensibilité et spécificité à partir de seulement quelques bandes spectrales du spectre Raman.

Hypothèse 2 : L'imagerie hyperspectrale combinée à des algorithmes d'apprentissage automatique basés sur quelques bandes spectrales permet de détecter le cancer du sein *ex vivo*

Hypothèse 3 : Il est possible d'imager le signal Raman d'une seule bande spectrale en quelques secondes sur une surface de quelques centimètres carrés

Pour répondre à ces trois hypothèses, les objectifs et les sous-objectifs suivants ont été établis :

Objectif. 1 : Obtenir des modèles de classification permettant de distinguer avec une grande sensibilité et spécificité les tissus sains et les tissus cancéreux à partir de quelques bandes spectrales d'un spectre Raman acquis avec un système commercial de sonde sur des spécimens de chirurgie frais :

Sous-Objectif 1.1 : Développer un modèle de classification unique pouvant discriminer les cellules cancéreuses des cellules saines de plusieurs organes du système reproducteur féminin à l'aide d'un nombre limité de bandes spectrales.

Sous-objectif 1.2 : Développer un modèle de classification robuste pouvant discriminer les tumeurs invasives du sein basé sur un nombre limité de bandes spectrales associées à des biomarqueurs Raman ayant une interprétation biomoléculaire.

Objectif 2 : Valider la détection du cancer du sein invasif sur des spécimens retirés au cours de chirurgies mammaires à l'aide de l'imagerie Raman hyperspectrale et de modèles de classification entraînés sur des spectres acquis avec la sonde de spectroscopie Raman.

Objectif 3 : Effectuer le développement et réaliser une preuve de concept d'un système d'imagerie Raman multi-spectrale permettant d'imager une bande spectrale sur une surface de 2 cm^2 :

Sous-objectif 3.1 : Développer le système d'imagerie ainsi que la méthode de traitement de signal permettant d'isoler le signal Raman de la fluorescence des tissus.

Sous-objectif 3.2 : Tester le système en imageant des échantillons biologiques et comparer le signal obtenu avec le système d'imagerie Raman hyperspectral.

1.4 Organisation du document

Cette thèse par articles présente, au chapitre 2, une revue de littérature permettant de définir les concepts liés à la chirurgie mammaire conservatrice et la spectroscopie Raman. Le chapitre 3 détaille ensuite la méthodologie du projet, en précisant le lien entre les objectifs de recherche, les travaux réalisés et les articles publiés. Le chapitre 4 présente un article publié dans la revue *Journal of Biophotonics* portant sur les résultats d'une étude menée sur des patientes atteintes de cancer de l'ovaire et de l'utérus. Le chapitre 5 présente un article publié dans le *Journal of Biomedical Optics* résultant d'un projet réalisé sur des spécimens provenant de 20 patientes atteintes de cancer du sein. Le chapitre 6 présente un article soumis dans le *Journal of Biomedical Optics* résultant d'une étude clinique portant sur la détection du cancer du sein avec un système d'imagerie Raman hyperspectral. Le chapitre 7 présente le développement d'un appareil d'imagerie Raman multi-spectrale ayant mené à la soumission d'un article dans le journal *Optics Letters*. Le chapitre 8 discute de l'impact de chaque article dans le contexte de mes travaux de recherches et de l'avancement du domaine scientifique. Une analyse est également présentée en discutant de certains choix scientifiques qui ont été faits, des limites à considérer lors du développement de systèmes pour guider la chirurgie. Finalement, au chapitre 9, une série de recommandations sont proposées pour la poursuite de ces travaux de recherche.

CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE

2.1 Cancer du sein

Le sein est constitué de tissus glandulaires, graisseux et fibreux disposés sur les muscles pectoraux de la paroi thoracique. Les tissus glandulaires contiennent les lobules qui sont les glandes responsables de la production du lait et les canaux qui en permettent le passage. La Figure 2.1 a) présente un schéma de la composition du sein. Le cancer du sein est hétérogène et comprend plusieurs sous-types[14].

Le cancer *in situ* est un stade précoce de la maladie au cours duquel la tumeur est confinée à l'endroit où l'amorce de processus oncogéniques a été initiée. Lorsque le cancer est localisé dans les canaux de lactation, il est appelé carcinome canalaire. La Figure 2.1 b) illustre la différence entre un carcinome canalaire *in situ* et un cancer infiltré. Les carcinomes canaux *in situ* (CCIS) sont non mortels, mais augmentent le risque de développement d'un cancer invasif. Les CCIS représentent 25 % des cancers détectés par mammographie aux États-Unis et sont les cancers *in situ* les plus communs[15]. Le traitement habituel pour ce type de cancer est la chirurgie conservatrice pouvant être suivie de radiothérapie[16]. Lorsqu'un cancer est localisé dans les lobules, on parle de carcinome lobulaire. Le carcinome lobulaire *in situ* (CLIS), comme le CCIS, n'est pas un cancer invasif, mais augmente de 7 à 12 fois le risque de développer un cancer invasif sur 10 ans [17][2]. Le CLIS représente 1 à 2 % des cancers du sein et 15 à 20 % des cancers *in situ*[18]. Le traitement recommandé pour ce type de cancer est simplement une surveillance accrue pour le cancer du sein[19].

Le carcinome canalaire infiltrant (CCI), aussi appelé carcinome infiltrant sans type spécial, est le type de cancer du sein le plus commun, représentant 70% à 80% des cancers invasifs du sein[20]. Les carcinomes lobulaires infiltrants (CLI) quant à eux comptent pour 5 à 15% des cas de cancer du sein[21], [22].

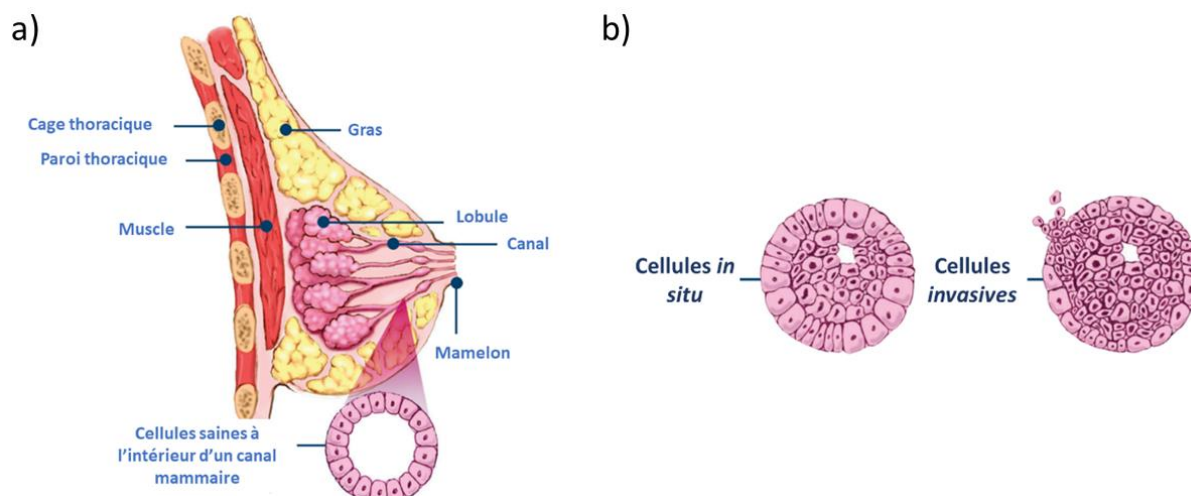


Figure 2.1 Représentation schématique de : a) la composition du sein (Breastcancer.org, traduction libre), b) le cancer du sein canalaire in situ et le cancer du sein canalaire invasif (Breastcancer.org, traduction libre)

Parmi les types de cancers invasifs moins courants, on retrouve le carcinome mixte canalaire et le carcinome lobulaire (3 à 5% des tumeurs). Ce type de cancer montre généralement un pronostic moins favorable que les cancers CCI ou CLI ayant tous deux des caractéristiques similaires[23]. Il existe également d'autres formes de cancer du sein, comme les carcinomes mucineux, qui représentent 7% des cas de cancer du sein et qui prend forme dans la mucine (composante principale du mucus)[24]. D'autres types de cancer du sein plus rares incluent le carcinome tubulaire (1 à 2 % des cancers du sein invasifs)[25], le carcinome médullaire (moins de 5 % des cancers du sein invasifs)[26], le carcinome papillaire (0,5 % des cancers du sein)[27], et le carcinome micro papillaire (0.9–2% des cancers du seins)[28], [29]. Le cancer du sein peut également toucher les hommes, mais ceux-ci représentent moins de 1% des cas [2].

Pour tous les types de cancers du sein, le traitement recommandé varie en fonction du stade. La stadification permet de décrire le cancer et d'en établir l'étendue. La stadification du cancer TNM se base sur la taille de la tumeur principale (T), la présence et l'étendue de l'atteinte des ganglions lymphatiques régionaux (N), et la présence de métastases distantes (M). Les médecins utilisent la stadification TNM pour définir un stade global variant de 0 à IV, 0 étant un carcinome *in situ* et IV propagation métastatique[30]. Le choix du traitement dépend également du sous-type de cancer. La classification la plus courante des sous-types est établie selon l'expressions des récepteurs d'œstrogène (ER α), de progestérone (PR) et du facteur de croissance épidermique humain 2

(HER2)[31]. Les options de traitements peuvent inclure une chirurgie (chirurgie mammaire conservatrice ou mastectomie), la radiothérapie, la chimiothérapie et la thérapie endocrinienne[19].

2.1.1 Chirurgie mammaire conservatrice

La chirurgie mammaire conservatrice permet de minimiser le changement d'apparence du sein et ainsi de minimiser l'impact sur l'image corporelle et la sexualité des patientes. De plus, puisque cette chirurgie est plus courte et retire moins de tissus que la mastectomie - l'ablation chirurgicale complète du sein - il y a moins de risques de complications pendant et après l'opération. Plusieurs études ont démontré que le taux de survie à long terme des patientes ayant un carcinome unilatéral et unifocal – suite à une chirurgie mammaire conservatrice suivie d'un traitement par radiation – est le même que suite à une mastectomie[3], [4], [32], [33]. La chirurgie mammaire conservatrice est donc un traitement à privilégier pour les femmes atteintes d'un cancer du sein de stade précoce[34].

La procédure peut être effectuée sous anesthésie locale ou générale. Une petite incision est pratiquée sur le sein, près de l'emplacement de la tumeur, et le chirurgien peut ainsi retirer la masse cancéreuse. Il est également possible de retirer les ganglions lymphatiques sous le bras, s'il est soupçonné que le cancer s'y soit répandu[35]. Selon la conférence de consensus de Milan en 2005, la chirurgie mammaire conservatrice est définie comme : « l'élimination complète de l'anomalie mammaire avec une marge concentrique de tissus sains environnants, pratiquée d'une manière esthétiquement acceptable et habituellement suivie d'une thérapie par radiation» (traduction libre)[36].

Les carcinomes *in situ* ne sont généralement pas visibles ou palpables[37]. Les méthodes actuellement disponibles pour faciliter les chirurgies mammaires conservatrices des tumeurs dites non palpables consistent à injecter un marqueur (qui peut être un fils[38], une bille de métal radioactif[39] ou un colloïde radioactif[40]) au centre de la lésion avant la chirurgie en se guidant avec des rayons X ou des ultrasons. Ces méthodes nécessitent de déplacer les patientes dans le département de radiologie avant la chirurgie pour injecter les marqueurs[41]-[42], [43].

Suite à la chirurgie, le spécimen de chirurgie est envoyé en pathologie où sa marge est évaluée. La marge d'un spécimen de chirurgie est la couche circonférentielle de tissu sain à sa surface. Le succès de l'opération est déterminé par la nature de la marge. Une marge positive est définie par la

présence de cellules cancéreuses à la surface du spécimen indiquant que la tumeur n'est pas adéquatement entourée d'une couche de tissus sain[37]. La Figure 2.2 illustre la différence entre une marge positive et une marge négative. Une marge positive est associée à un plus grand risque de récurrence du cancer et il est donc recommandé que le chirurgien retire plus de tissus si une marge positive est détectée[9]. Plusieurs études discutent de l'importance d'évaluer une profondeur de marge, c'est-à-dire une certaine épaisseur de tissus sains séparant la surface du spécimen et les cellules cancéreuses, mais le consensus sur lignes directrices sur les marges publié par SSO-ASTRO indique qu'il n'y a pas de réel bénéfice à avoir une marge plus large[44].

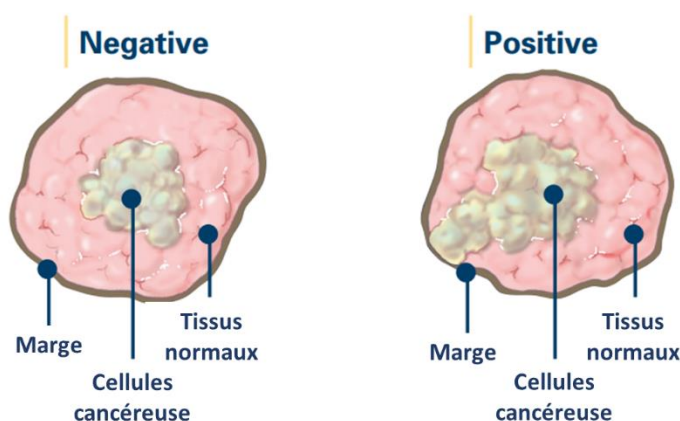


Figure 2.2 Représentation schématique d'une marge de spécimen de résection négative et positive après une BCS (Breastcancer.org, traduction libre)

L'analyse des marges est donc critique pour garantir le succès des chirurgies mammaires conservatrices. Les méthodes d'analyse peropératoires disponibles actuellement sont les méthodes d'analyses macroscopiques ou histologiques réalisées par des pathologistes. La plus simple est l'examen macroscopique du spécimen. Durant cet examen, l'orientation du spécimen est prise en note, ainsi que ses dimensions. Le spécimen est ensuite couvert d'encre noire et est coupé en tranche de 3 à 5 mm d'épaisseur. La lésion observée est décrite (sa taille, sa consistance, son patron de croissance, la présence de tissu nécrosé). Aussi, la distance entre la marge (indiquée par l'encre) et la lésion est mesurée. Si la masse est proche ou touche la marge, une réexcision immédiate de la marge est recommandée. Cependant, l'examen macroscopique ne donne pas une analyse exacte des marges dans 25% des cas[45]. La plupart des chirurgiens demandent seulement l'analyse pathologique macroscopique. Des méthodes d'analyses histologiques peropératoires sont aussi

utilisées pour améliorer l'identification des marges positives, incluant la cytologie de préparation tactile ou l'analyse des sections congelées. Ces méthodes consistent à trancher le spécimen avec une épaisseur de quelques microns et rapidement le congeler afin de permettre la préparation d'échantillons beaucoup plus rapidement que l'histopathologie traditionnelle[42]. Ces méthodes sont cependant limitées par la faible qualité des sections, par le besoin d'avoir l'équipement et l'expertise nécessaires et par les coûts supplémentaires impliqués[46].

Le statut définitif de la marge n'est cependant déterminé que par l'analyse histopathologique. Après l'analyse macroscopique, la tumeur ainsi que les marges (en particulier celle proche de la tumeur) et les tissus fibreux sont échantillonnés et mis dans des cassettes de pathologie pour être fixés (avec du formol), intégrés dans la paraffine et colorés. Les pathologistes examinent ensuite microscopiquement tous les échantillons. Le nombre de sections examinées dépend de l'étendue de la lésion et de la taille du spécimen. S'il le spécimen contient un carcinome *in situ*, il est examiné microscopiquement en entier. L'analyse histopathologique est le standard pour évaluer les marges, mais les analyses ne sont faites que quelques jours après la chirurgie[37].

Ceci mène à l'un des plus grands problèmes liés à la chirurgie mammaire conservatrice. En effet, entre 15 et 20 % des patientes ont besoin de chirurgies supplémentaires après qu'une marge inadéquate ait été révélée par les analyses microscopiques[47]–[49]. *Jeevan et al* ont mené une étude sur 55 297 patientes et ont démontré que 18% des patientes atteintes d'un cancer invasif et 30% des patientes atteintes d'un cancer *in situ* subissaient une seconde (et parfois même une troisième) chirurgie[50]. Ces chirurgies peuvent causer un retard dans les traitements adjuvants et, selon certaines études, être associées à un plus grand nombre de récurrences[51]–[53]. Les secondes chirurgies ajoutent également un stress inutile aux patientes, retardent leur guérison et représentent une pression financière supplémentaire pour le système de santé[54].

Il existe donc un grand besoin pour une technique d'analyse des marges peropératoires pour les chirurgies mammaires conservatrices.

2.1.2 Nouvelles techniques de détection

Au vu de la problématique, le potentiel de différentes techniques d'imagerie a été évalué. L'objectif est de développer une technique qui permet une analyse rapide de la nature cellulaire, structurale

et/ou moléculaire de la cavité chirurgicale *in vivo* afin de guider la prise de décision en temps réel en salle d'opération ou d'imager l'entièreté de la surface du spécimen de chirurgie *ex vivo*.

La technique d'analyse *in vivo* la plus utilisée est l'ultrason. Une étude a été menée sur 225 patientes visant à localiser les lésions non palpables à l'aide d'une sonde d'ultrason durant la chirurgie. Les marges étaient évaluées ensuite à l'aide d'analyse pathologique macroscopique. Cette méthode est plus couramment utilisée comme alternative à la localisation par fils pour localiser les tumeurs non palpables *in vivo* (démontrant une sensibilité de presque 100% à détecter les lésions non palpables[55])[56]. Une étude sur l'utilisation de l'ultrasonographie pour l'analyse des marges par Eggemann *et al* a comparé l'ultrason à l'histopathologie pour l'identification des marges de spécimens *ex vivo*. Les résultats ont montré une sensibilité de 48% et une spécificité de 99%[57], la technique étant limitée par le manque de spécificité moléculaire pour l'analyse de marges[42].

Une sonde de spectroscopie en radiofréquences (basée sur la différence de diffusion électromagnétique, de réflectance et d'absorbance) appelée *Marginprobe* est maintenant approuvée aux États-Unis pour l'évaluation des marges peropératoire. L'évaluation de la sensibilité et de la spécificité qui a été publiée est de 70%[58], expliquant en partie pourquoi l'outil est associé à un grand nombre de faux positifs. Son utilisation n'est généralement pas recommandée dans les centres où le taux de secondes chirurgies n'est pas particulièrement élevé (moins de 40%)[42].

L'imagerie par fluorescence induite a également été testée *in vivo*. Deux sondes d'imagerie ont été testées avec différents colorants injectés par intraveineuse quelques heures avant la chirurgie. Une étude a été menée sur 35 patientes auxquelles avait été injecté le colorant *indocyanine green* (ICG), menant à une sensibilité de 100% et une spécificité de 60%[11]. La sonde de LuminCell Imaging System, a également été testée au cours d'une étude impliquant 45 patients et la sensibilité et spécificité observées étaient respectivement de 100% et de 73 %[12].

Le Tableau 2.1 résume plusieurs études effectuées avec différentes techniques d'imagerie *ex vivo* présenté ci-dessous. Le tableau indique le nombre de patients impliqués ainsi que la sensibilité et la spécificité obtenues. Le tableau indique également si la méthode permet une analyse du spécimen complet (imagerie en champ large) et si la méthode peut être appliquée *in vivo*.

L'utilisation des rayons X est courante pour le diagnostic du cancer du sein et des applications utilisant cette méthode pour guider les chirurgies ont également été explorées. Il a été reporté que

le contraste observé entre les tissus adipeux et tumoraux est grand, mais que celui entre les tissus fibreux, les tissus glandulaires et les tissus tumoraux est plus faible menant à une faible sensibilité[59]. Un appareil d'analyse portable utilisant la spectroscopie de bioimpédance électrique, une méthode basée sur les propriétés diélectriques des tissus, a été développé commercialement. Cette technique permet des mesures rapides et est facile d'utilisation, mais manque de spécificité moléculaire[60]. La spectroscopie de réflectance diffuse (ou spectroscopie de diffusion élastique) a permis d'imager en champ large des tissus grâce à un système portable utilisant plusieurs fibres optiques[61]. La sensibilité rapportée pour le cancer du sein reste cependant faible[62]. La tomographie par cohérence optique (OCT) est une méthode d'imagerie qui permet d'obtenir une image des structures à quelques millimètres sous la surface des tissus en exploitant la différence de diffusion dans les tumeurs par rapport aux tissus adipeux. Le récent développement de méthodes de détection automatisée des tumeurs à partir d'images d'OCT avec une grande sensibilité pourrait faciliter l'intégration de la méthode en milieu clinique[63]. Cependant, la méthode pourrait être limitée par la similitude entre les structures des tissus cancéreux, fibreux et glandulaires[64].

Les méthodes présentées précédemment permettent l'analyse d'une petite surface de la cavité chirurgicale ou du spécimen *ex vivo*. D'autres méthodes d'imagerie ont aussi été proposées afin de pouvoir imager un spécimen de chirurgie en entier. La tomographie photoacoustique utilise les tissus adipeux et l'hémoglobine comme agent de contraste pour la détection de tumeurs. Cependant, cette technique présente une très faible sensibilité pour la distinction des tumeurs et des tissus fibreux ou glandulaires[65]. L'imagerie dans le domaine des fréquences spatiales (SFDI) utilise une projection de patrons lumineux dans le proche infrarouge pour évaluer les propriétés optiques des tissus. Une sonde portable a été développée pour des applications *in vivo* et la méthode est rapide par rapport à d'autres techniques d'imagerie, mais ne fournit pas d'informations sur la nature moléculaire de l'échantillon[66], [67]. L'imagerie par fluorescence sans injection de fluorophores, aussi appelée auto-fluorescence, combinée avec la spectroscopie de réflectance diffuse, a démontré un potentiel de détection du cancer avec une sensibilité et une spécificité élevée[68], [69]. La tomographie par émission de positrons (PET) permet d'imager en 3 dimensions les tissus après injection d'un agent radioactif et de mesurer l'activité métabolique. Cette méthode d'imagerie a permis d'identifier le cancer du sein avec une grande sensibilité et spécificité. La tomographie par

émission de positron est cependant la seule méthode présentée au Tableau 2.1 à requérir l'injection d'un agent de contraste[70].

Pour obtenir une résolution spatiale plus élevée, de nouvelles méthodes d'imagerie microscopique peropératoire ont également été proposées. La microscopie avec excitation de surface UV (MUSE) utilise la lumière UV pour exciter les fluorophores à la surface d'un échantillon et produire des images à haute résolution. La méthode ne nécessite pas de fixation, mais un colorant fluorescent, et permet d'obtenir des images plus rapidement que les méthodes de pathologies traditionnelles[71], [72]. La microscopie non linéaire quant à elle fournit une résolution, un contraste et des informations moléculaires supérieurs, mais elle est plus lente, plus complexe et plus coûteuse que les approches pathologiques traditionnelles[73].

Les techniques d'imagerie optique semblent généralement plus prometteuses, car elles permettent l'obtention d'information plus rapidement. Les techniques à privilégier sont celles permettant une analyse complète des marges, donc une imagerie en grand champ, c'est-à-dire à l'échelle de plusieurs centimètres. Les techniques permettant d'imager les tissus *in vivo* présentent également un avantage, car elles permettent au chirurgien de retirer immédiatement l'endroit exact où se trouvent les cellules cancéreuses et éliminent ainsi la nécessité de corréler les sites de tumeur trouvés sur le spécimen excisé avec le site de tumeur dans la cavité chirurgicale.

Tableau 2.1 Comparaison des résultats obtenus *ex vivo* avec différentes méthodes expérimentales d'analyse des marges de chirurgie mammaire conservatrice.

Techniques d'imagerie	Nombre de patients	Sensibilité (%)	Spécificité (%)	Possibilité d'utilisation <i>in vivo</i>	Large champ
Rayon X [59]	90	47	75		X
Ultrason spécimen entier [74]	132	44	94	X	X
Tomographie par émission de positrons (PET)[70]	109	95	87		X
Spectroscopie de bio-impédance électrique[60]	63	87	76	X	
Imagerie photoacoustique[65]	12	100	75		X

Imagerie dans le domaine des fréquences spatiales (SFDI) [66]	47	79	93	X	X
Auto-fluorescence [75]	5	100	97	X	X
Microscopie non-linéaire[73]	50	95	93		
Microscopie avec excitation de surface UV (MUSE)[72]	47	82	79		X
Spectroscopie par réflectance diffuse [62]	24	67-69	79-85	X	
Tomographie en cohérence optique (OCT)[63]	49	89	71	X	X

Selon le Tableau 2.1 les techniques les plus prometteuses seraient le SFDI et l'imagerie de la fluorescence intrinsèque des tissus (c.-à-d., auto-fluorescence). Cependant, l'auto-fluorescence n'offre que des informations que sur la présence de fluorophores endogènes et le SFDI sur les propriétés optiques des tissus, ce qui limite leur impact en tant qu'outil servant à la prise de décision dans un contexte clinique.

2.2 Interaction entre les tissus biologiques et la lumière

Les tissus biologiques peuvent être caractérisés par les niveaux d'énergie des nuages électroniques des molécules qui les composent. Lorsque ces molécules sont excitées par des photons, la distribution énergétique des électrons est modifiée. Le diagramme de Jablonski, tel que présenté à la Figure 2.3, est un outil permettant de représenter les niveaux d'énergie électroniques (S_0, S_1, S_2, T_1, etc), vibrationnels ($S_{0k}, S_{0m}, S_{0n}, etc$) ou rotationnels (non traité dans ce chapitre) d'un atome ou d'une molécule[76]. Les flèches dans le diagramme représentent les transitions entre des niveaux d'énergie. Les flèches de couleur représentent des transitions radiatives – qui causent l'émission de photons – et les flèches noires pointillées représentent des transitions non radiatives – qui n'engendrent pas de photons. Les états sont arrangés par énergie vibrationnelle et par multiplicité de spin. Les états singulets – pour lesquels les électrons sont paillés – sont dénotés par S et les triplets – pour lesquels les électrons sont non paillés - par T . L'état fondamental est l'état singulet S_0 [77].

L'absorption est le processus de transfert d'énergie entre la lumière et la matière durant lequel un photon est enlevé du champ de radiation pour contribuer à l'excitation d'un atome. Pour que

l'absorption d'un photon par une molécule se produise, l'énergie incidente du photon $h\nu$ doit correspondre à l'écart d'énergie entre l'état fondamental S_0 de la molécule et son état excité S_1 tel que $S_1 - S_0 = h\nu$. Lorsque la molécule absorbe le photon, l'électron est promu à un niveau électronique supérieur, possédant la même multiplicité de spin, dans une transition nécessitant entre 10^{-14} et 10^{-15} s. Une fois l'électron excité à un niveau d'énergie supérieur, il peut retourner au niveau d'énergie fondamentale par émission ou par transition non radiative. L'émission correspond à la diminution du niveau d'énergie qui résulte en la création d'un photon d'énergie égale à la différence d'énergie entre le niveau initial et le niveau final ($S_1 - S_0 = h\nu$). L'émission à la suite d'une absorption est dite stimulée, mais elle peut également être spontanée, c'est-à-dire sans radiation requise pour stimuler le processus. L'autre possibilité pour la désexcitation de la molécule est une transition sans l'émission d'un photon. La première forme de transition non radiative est la relaxation vibrationnelle qui permet à la molécule de passer d'un niveau vibrationnel excité (S_{1n}, S_{1m} , etc.) au niveau vibrationnel le plus bas (S_{1k}). Le temps de vie de la molécule excitée avant de redescende jusqu'à l'état vibrationnel le plus bas est entre 10^{-12} et 10^{-14} s. Une autre transition non radiative, la conversion interne, permet à la molécule de passer d'un état électronique excité (S_1 ou S_2) à un état électronique inférieur. Pour cela, il faut qu'il y ait un chevauchement entre les niveaux vibrationnels inférieurs de l'état excité et les niveaux supérieurs de l'état final. L'énergie perdue dans la transition est simplement convertie en chaleur et la durée de 10^{-12} s.[78].

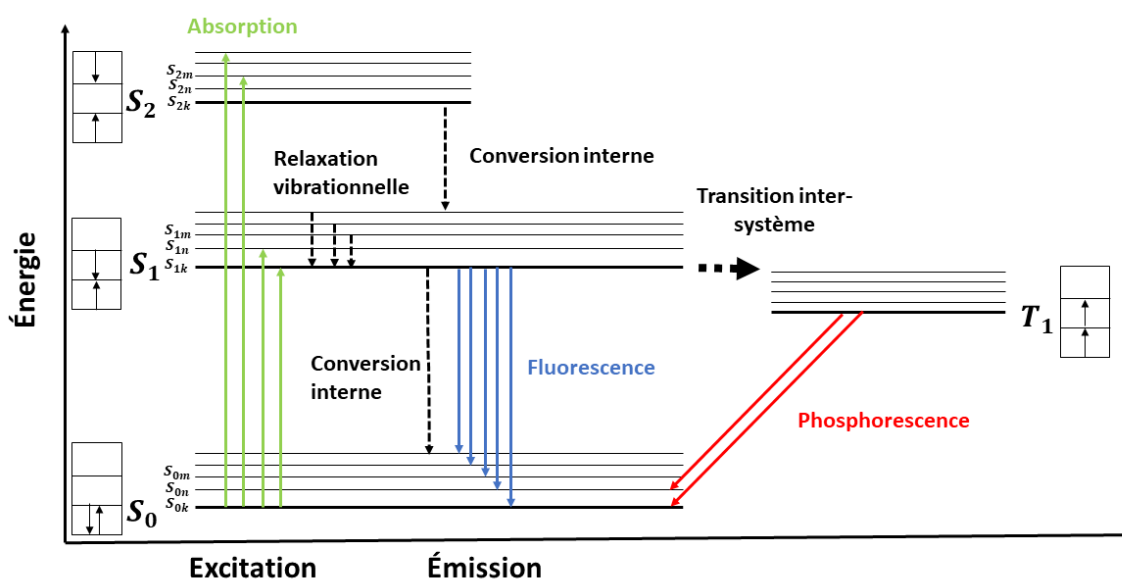


Figure 2.3 Diagramme de Jablonski représentant les différentes interactions tissus lumière[76].

La fluorescence est un processus de relaxation radiative par lequel une molécule émet un photon d'énergie inférieure à celui absorbé. Suite à un événement d'absorption, la molécule se trouve dans un niveau d'énergie électronique excité et dans un niveau d'énergie vibrationnelle excité (S_{1n} , S_{1m} , etc.). Cette énergie vibrationnelle est perdue par relaxation vibrationnelle. La fluorescence permet la relaxation de la molécule vers l'état électronique fondamental par l'émission d'un photon. Ce processus dépend de la relaxation vibrationnelle, son temps de vie est donc plus grand que l'émission, typiquement supérieur à 10^{-10} s pour les fluorophores endogène[78], [79].

La phosphorescence est une transition radiative dépendante de transitions intersystème. Les transitions intersystème sont des processus de transition entre des états n'ayant pas la même multiplicité de spin (S et T). Ces transitions se produisent lorsque les états vibrationnels de l'état singulet excité chevauchent les niveaux vibrationnels de l'état triplet inférieur en énergie. Elles permettent d'atteindre les états triplets qui ne seraient pas accessibles par transition à partir de S_0 dû au principe d'exclusion de Pauli. Comme ces transitions sont moins probables, elles prennent plus de temps soit environ 10^{-8} s. Une fois l'électron dans l'état triplet, il doit émettre un photon, par phosphorescence, pour redescendre à l'état fondamental. Cependant, ce phénomène implique un changement d'état de spin interdit. C'est pourquoi cette transition radiative prend plus de temps que les autres transitions radiatives (de quelques secondes à quelques heures)[78].

Finalement, la diffusion est un phénomène non résonnant, c'est-à-dire que le photon n'a pas l'énergie nécessaire pour une transition entre deux niveaux d'énergie. La diffusion ne cause pas de transition de niveaux d'énergie, mais plutôt une oscillation du nuage électronique de la molécule. Ces oscillations sont suivies par la réémission du photon[80]. Le temps de vie de la diffusion est de l'ordre de 10^{-14} s[81]. Plus de détails seront fournis au chapitre 2.2.1

2.2.1 Diffusion Raman

La Figure 2.4 illustre le diagramme de Jablonski pour 3 procédés de diffusion qui seront décrits dans cette section. Lorsqu'une molécule se trouvant dans l'état initial S_0 est excitée par un photon d'énergie $E = h\nu_0$ ne permettant pas l'absorption ($h\nu_0 < S_1 - S_0$) la molécule est excitée à un niveau d'énergie dit virtuel. L'énergie de l'état virtuel est déterminée par la fréquence de la lumière incidente. L'électron ne pouvant pas demeurer dans un état virtuel, il émet un photon et retourne à son état électronique initial. Dans la plupart des cas, l'électron retourne également à son niveau vibrationnel initial, ce qui entraîne l'émission d'un photon d'énergie $E = h\nu_0$. On parle alors de

diffusion Rayleigh et il s'agit de diffusion élastique, car le photon émis à la même énergie que le photon absorbé[76], [80].

La majorité des photons sont diffusés de manière élastique, mais environ un photon sur 10^6 – 10^7 est diffusé de manière inélastique, selon la nature moléculaire et structurale du matériau avec lequel la lumière interagit. La lumière provenant de la diffusion inélastique est d'énergie $h\nu_0 \pm \Delta h\nu$. Ce décalage en énergie est appelé décalage Raman (*Raman shift*) et correspond à l'excitation des niveaux de vibrations de la molécule[82]. Si après avoir été excitée dans un niveau virtuel la molécule revient à un état d'énergie vibrationnelle plus élevé que celui de départ, l'énergie du photon émis est alors $E = E_0 - E_n = h\nu_0 - h\nu_n$ et est inférieure à celle du photon incident. Il s'agit de la diffusion Raman Stokes (voir Figure 2.4). Si, au contraire, la molécule revient dans un état vibrationnel inférieur à celui de départ, l'énergie du photon émis sera $E = E_0 + E_k = h\nu_0 + h\nu_k$ et sera supérieure à celle du photon incident. On parle alors dans ce cas de diffusion Raman anti-Stokes. La diffusion Raman Stokes est plus probable que la diffusion anti-Stokes, car la probabilité que la molécule se trouve dans son état fondamental est plus grande que celle de se trouver dans un état vibrationnel excité[76], [80].

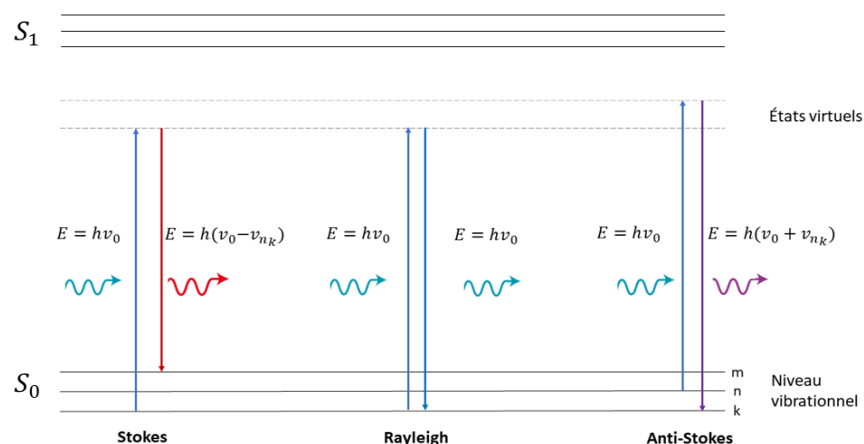


Figure 2.4 Digramme de Jablonski de la diffusion Rayleigh, Raman Stokes et anti-Stokes.

La spectroscopie Raman se base sur l'analyse de la différence d'énergie entre la lumière incidente et la lumière réémise par la matière et permet d'obtenir rapidement de l'information sur la nature moléculaire d'un échantillon. Le spectre Raman d'une molécule représente tous les modes vibrationnels permis et donc actifs en ce qui a trait à l'effet Raman. Plusieurs molécules présentes

dans les échantillons biologiques, comme les protéines, les acides aminés aromatiques, les lipides et les acides nucléiques sont actifs en Raman[82].

2.2.1.1 Spectroscopie Raman et chirurgie

L'utilisation de la spectroscopie Raman pour des applications biomédicales nécessite de bien sélectionner la longueur d'onde utilisée pour l'excitation. En effet, la probabilité de transition entre les différents états des molécules, que ce soit pour l'absorption ou la diffusion, n'est pas la même pour tout le spectre. La section efficace de la diffusion Raman est inversement proportionnelle à λ^4 ce qui pourrait inciter à choisir une longueur d'onde d'excitation près de l'ultraviolet. Cependant, la fluorescence intrinsèque de certaines biomolécules augmente également avec la longueur d'onde, menant à une diminution du rapport entre le signal Raman et la fluorescence. De plus, les spectres d'absorption pour les principaux composants des tissus biologiques (voir Figure 2.5) montrent que la région du spectre située entre 700 et 1400 nm permet de minimiser l'absorption dans le tissu[83]. Cette région du spectre se nomme la fenêtre thérapeutique. Un point isobestique de l'hémoglobine, c'est-à-dire la longueur d'onde à laquelle l'hémoglobine oxygénée et non oxygénée ont la même absorption se trouve également dans cette région, à 800 nm[84]. Cette région du spectre permet aussi de minimiser les dommages des tissus exposés au laser[85]. C'est une des raisons pour laquelle la spectroscopie Raman, pour des applications biomédicales, utilise généralement un laser émettant dans le proche infrarouge[86].

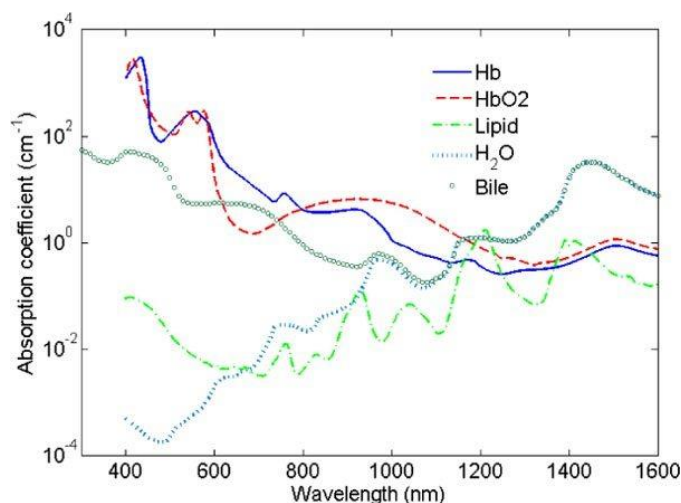


Figure 2.5 Coefficient d'absorption de l'hémoglobine oxygénée, de l'hémoglobine désoxygénée, des lipides, de l'eau et de la bile de 400 à 1600 nm. Le coefficient est exprimé

selon un axe logarithmique. Cette figure est reproduite de *Nachabé et al.* avec la permission de *Optica publishing group*.

Pour l'analyse des spectres Raman, on utilise le décalage Raman, la différence d'énergie entre la lumière émise et détectée, exprimé en cm^{-1} . Le calcul pour obtenir cette mesure est :

$$E = \frac{1}{\lambda_{excitation}} - \frac{1}{\lambda_{detection}}. \quad (2.1)$$

La région appelée *fingerprint* est définie comme la région allant de 500 à 2000 cm^{-1} et contient le signal Raman de la majorité des molécules organiques. C'est la région qui est le plus souvent exploitée dans les applications biomédicales. La région *high-wavenumber* située entre 2400 et 3800 cm^{-1} contient également une forte signature Raman et est utilisée dans certaines applications, particulièrement pour évaluer le contenu en eau d'un échantillon. La détection du signal Raman de cette région à l'aide de systèmes fibrés tire par exemple avantage de l'absence de signal Raman de la silice dans cette région du spectre[87]–[89].

Des applications de la spectroscopie Raman pour la détection du cancer durant les chirurgies ont été développées depuis les 30 dernières années[90]. Le développement de sondes de fibres optiques, servant à illuminer les tissus et à collecter la lumière détectée, a permis l'application clinique de la spectroscopie Raman *in vivo*. Ces sondes peuvent être insérées dans des endoscopes ou être utilisées pour analyser la surface d'organes durant des chirurgies ouvertes. Des études ont ainsi été menées sur le cancer du cerveau[91]–[93], du sein[94], de la vessie[95], de la prostate[96], du cervix[97], du colon[98], du poumon[99], [100], de la gorge[101], de la peau[102] et gastro-intestinal[103]–[105].

2.2.1.2 Spectroscopie Raman et cancer du sein

Plusieurs études ont été faites avec pour objectif l'analyse des marges d'une chirurgie mammaire conservatrice. Le Tableau 2.2 résume les résultats de 7 études *ex-vivo* testant différentes modalités de spectroscopie Raman appliquées au cancer du sein. Toutes les méthodes listées ci-dessous ont permis de distinguer des tissus cancéreux avec une sensibilité et une spécificité supérieure à 80%.

La technique la plus simple est la spectroscopie Raman spontanée. Deux groupes, Kong et al[106] et Koya et al[107], ont évalué le potentiel d'appareils commerciaux de microspectroscopie Raman en menant une étude sur des échantillons congelés provenant de chirurgie. La grande sensibilité et

la spécificité obtenues indiquent le potentiel de la spectroscopie Raman, particulièrement pour la détection des CCIS, cependant le système utilisé ne se prête pas à une utilisation *in-vivo* et le temps d'imagerie d'une section de 5 x 5 mm² est d'une vingtaine de minutes. Une autre étude menée par Haka et al[108] utilise cette fois une sonde de spectroscopie composée de fibres optiques plus adaptée à de potentielles applications *in-vivo*. Cette étude a permis de classifier des échantillons congelés cancéreux et sains provenant de biopsies et de chirurgies de réduction mammaire avec une grande sensibilité et spécificité.

Afin d'améliorer le rapport signal sur bruit (*signal-to-noise ratio* : *SNR*) des spectres Raman, l'utilisation de la spectroscopie Raman par transformé de Fourier (FT-Raman) sur les tissus mammaires a été investiguée. Cette technique permet d'utiliser une longueur d'onde d'excitation de 1064 nm, plus élevés qu'en spectroscopie Raman spontanée. Cette longueur d'onde fournit aux tissus moins d'énergie que le seuil requis pour les processus de fluorescence et permet ainsi de réduire son impact sur le signal (voir chapitre 2.2.2). Moreno et al. ont réalisé une étude visant à distinguer les tissus normaux des tissus cancéreux et des lésions bénignes comme les fibroadénomes. L'analyse des biomarqueurs Raman après analyse des composants principaux (PCA) a démontré que la majorité des changements observés dans les spectres étaient liés aux bandes amides I et III (protéines), aux lipides et aux acides aminés (cytosine, guanine et cystéine)[109].

Un autre groupe a étudié l'utilisation du SERS (*Surface-enhanced Raman spectroscopy*) pour améliorer le rapport signal sur bruit des mesures de cancer du sein. Le SERS se base sur l'amplification du signal Raman par l'excitation localisée de résonances plasmoniques de surface, généralement à l'aide de nanostructures de métaux, incluant l'or, l'argent ou le cuivre. Wang et al[110] ont démontré qu'appliquer localement des nanoparticules sur la surface d'un spécimen de chirurgie permet d'imager différents biomarqueurs préférentiellement associés au cancer du sein. La méthode d'imagerie par balayage utilisée n'est pas applicable *in vivo* mais elle permet d'imager *ex-vivo* une marge en 15 minutes ce qui est comparable aux méthodes de pathologie peropératoire[110][111].

Le SORS (*Spacial-offset Raman Spectroscopy*) est une technique qui permet d'obtenir un signal Raman provenant des couches inférieures du tissu en décalant spatialement la source d'excitation et le système de détection des photons. Keller et al. ont démontré que cette technique peut être

utilisée pour connaître la profondeur d'une tumeur dans un spécimen de chirurgie mammaire conservatrice jusqu'à 2 mm sous la surface[112].

Pour imager rapidement une large surface, Shipp et al. ont proposé une méthode de spectroscopie multimodale combinant la spectroscopie Raman et l'imagerie de l'auto-fluorescence. L'intérêt de cette technique est d'obtenir de l'information moléculaire sur une surface plus large (4 x 6.5 cm²). L'information spatiale fournie par l'auto-fluorescence est utilisée pour cibler des localisations sur l'échantillon où faire des mesures Raman et obtenir de l'information spectrale. Ces résultats sont très prometteurs, car pour chaque marge les mesures prennent entre 12 et 24 minutes ce qui est comparable aux méthodes de pathologie peropératoire[113].

Tableau 2.2 Résumé des résultats obtenus par différents groupes de recherche pour la distinction des tissus mammaires cancéreux et sains *ex-vivo*.

	Technique	Spécimens	Nb de patients	Sensibilité (%)	Spécificité (%)
Koya et al, 2020 [107]	Micro-spectroscopie	Échantillon de chirurgie congelé	44	93	85
Kong et al, 2014 [106]	Micro-spectroscopie	Échantillons de chirurgie congelés	60	95	96
Haka et al 2005	Sonde de spectroscopie	Échantillon de biopsie et réduction mammaire congelé	58	94	96
Moreno et al, 2010 [109]	FT-Raman	Échantillons de chirurgie congelés	37	96	97
Wang et al, 2014 [110]	SERS	Échantillon frais de chirurgie	29	89	92
Keller et al, 2011 [112]	SORS	Échantillon congelé	≥ 35	85	96
Shipp et al, 2018[113]	Spectroscopie Multi-Modal	Échantillon congelé de mastectomie	107	95	82

Les résultats obtenus pour ces études sont très prometteurs quant à la possibilité de classifier les tissus avec la spectroscopie Raman. Il est cependant à noter que la majorité des études analysent des spécimens congelés, ce qui peut faire varier les propriétés optiques de ceux-ci, et donc la qualité des spectres Raman, particulièrement si le coefficient de diffusion change[114]. Il serait donc

nécessaire de tester la détection de tissus tumoraux avec une méthodologie plus proche du contexte peropératoire.

Une étude a été menée *in vivo* durant des chirurgies mammaires conservatrices par Haka et al. avec une sonde de spectroscopie. L'étude incluait 9 patientes et 30 spectres Raman. Peu de conclusions peuvent être tirées de cette étude, car un seul spectre a été acquis sur des tissus cancéreux (CCIS), mais elle démontre tout de même la forte similitude entre les spectres acquis *in vivo* et *ex vivo* et confirme la présence des principaux biomarqueurs du cancer du sein dans les spectres *in vivo*[94].

Une autre étude utilisant une sonde de spectroscopie Raman a été menée par Horsnell et al., cette fois pour évaluer la nature de ganglions lymphatiques auxiliaires. L'étude incluait 20 patientes et a obtenu une sensibilité de 92 % et une spécificité de 100 % sur des échantillons congelés[115]. Ces résultats sont particulièrement intéressants, car ils semblent indiquer qu'il est possible d'utiliser la spectroscopie Raman pour détecter le cancer à la fois dans les tissus mammaires et dans les ganglions lymphatiques, qui sont parfois également retirés pendant les chirurgies mammaires conservatrices.

2.2.1.3 Spectroscopie Raman en grand champ

L'une des plus importantes limitations de la spectroscopie Raman est qu'elle ne permet que de mesurer une très petite surface. Cela est particulièrement problématique lorsqu'il s'agit de guider des chirurgies, car évaluer une marge avec seulement des mesures ponctuelles ne permet pas une véritable évaluation. Différentes approches ont été envisagées pour surmonter cette limitation.

Le balayage spatial par point, qui consiste –comme son nom l'indique– à balayer l'image point par point, permet de reconstruire une image hyperspectrale un pixel à la fois. Cette technique a été utilisée pour analyser des lignées de cellules épithéliales mammaires avec une grande résolution spectrale. Cependant, le champ de vue est limité par l'objectif et n'est généralement que de quelques millimètres[116]. Le balayage spatial par ligne consiste en une technique similaire et comporte également les mêmes limitations, mais permet de réduire le temps nécessaire à une mesure en balayant une ligne au complet plutôt qu'un point[117]. Cette méthode offre généralement une grande résolution spectrale, mais une résolution spatiale limitée par le nombre de points ou de lignes acquis.

Le balayage spectral est également une technique permettant de reconstruire des images hyperspectrales. Pour cela, plusieurs images prises à différentes longueurs d'onde sont combinées. Ces différentes images peuvent être obtenues en illuminant l'échantillon à différentes longueurs d'onde avec un laser accordable ou en modifiant la longueur d'onde de détection avec un filtre optique accordable (acousto-optique, cristaux liquides) ou simplement avec plusieurs filtres optiques interférentiels différents. Cette technique a pour avantage d'offrir une meilleure résolution spatiale, cependant sa résolution spectrale est limitée par le nombre d'images spectrales acquises [118]. Cette technique est fréquemment utilisée pour la spectroscopie proche infrarouge, car elle ne nécessite généralement pas une grande résolution spectrale. Elle possède beaucoup d'applications dans l'industrie pharmaceutique, entre autres pour mesurer l'uniformité des comprimés de médicaments[119].

2.2.2 Auto-fluorescence des tissus et spectroscopie Raman

La fluorescence est un phénomène de relaxation radiative décrit au chapitre 2.1. Le terme auto-fluorescence est utilisé en imagerie pour désigner la fluorescence endogène – résultante de fluorophores naturellement présents dans les tissus – par opposition à la fluorescence exogène résultante de l'injection de molécule fluorescente comme des fluorophores à bases de porphyrine. Les fluorophores biologiques naturellement présents dans les tissus incluent généralement l'élastine, le collagène, la pyrimidine, l'adénine dinucléotide et la flavine[120].

La fluorescence est un phénomène concurrent de la diffusion inélastique dans la région anti-Stokes et son signal est généralement plus élevé. C'est pourquoi le retrait du signal lié à la fluorescence des tissus est l'un des défis majeurs en spectroscopie Raman. À cet effet, des méthodes instrumentales et numériques ont été développées.

Les méthodes les plus utilisées sont les méthodes numériques basées sur la morphologie du signal de fluorescence, car elles ne requièrent aucune modification du montage ni étape additionnelle à la prise de mesures. La technique la plus répandue, à cause de sa simplicité, est l'ajustement polynomial. Le spectre de la fluorescence peut être mathématiquement modélisé par une fonction polynomiale de degrés 4 à 6. Cette fonction est ensuite soustraite au spectre Raman brute. Le défaut de l'ajustement polynomial est qu'il est dépendant de la plage spectrale et de l'ordre du polynôme choisi. En effet, un polynôme d'ordre trop élevé peut englober certaines bandes Raman importantes dans le signal de fluorescence résiduel[121]. La méthode des dérivées permet également d'isoler

la contribution de la diffusion Raman en utilisant la dérivée du spectre. En effet, la dérivée de la fluorescence est toujours beaucoup plus petite que celle du signal Raman. Cependant, cette méthode tend à accentuer les bruits de haute fréquence[122], [123]. Un autre algorithme basé sur le traitement morphologique des spectres et développé par le LuMedLab, appelé *BubbleFill*, consiste à remplir l'espace situé sous le spectre avec des bulles de plus en plus petites jusqu'à une taille préétablie. Des tests effectués avec différents spectres de référence démontrent de meilleures performances que les algorithmes d'ajustement polynomial traditionnel[124].

Un exemple de méthode instrumentale utilisée pour retirer la fluorescence est la spectroscopie Raman différentielle à excitation décalée (*shifted excitation Raman difference spectroscopy*, SERDS). Cette technique consiste à mesurer deux spectres d'un même échantillon avec deux longueurs d'onde d'excitation décalées de quelques nanomètres et de les soustraire pour obtenir la différentielle du spectre Raman. La fluorescence est peu dépendante de petites variations de la longueur d'onde d'excitation alors que le spectre Raman est décalé en fonction de la longueur d'onde. L'avantage de cette méthode est qu'elle produit des spectres avec un niveau de bruit minimal. De plus, toutes les analyses peuvent être faites à partir de la différentielle du spectre et donc aucun traitement de données supplémentaire n'est nécessaire [125][126].

L'utilisation de la détection interférométrique temporisée a aussi été investiguée. Cette méthode est fondée sur une synchronisation très précise entre la source d'excitation (un laser pulsé) et la source de détection. La diffusion Raman se produisant plus rapidement que la fluorescence (10^{-14} s vs 10^{-6} s), le détecteur est ainsi capable de collecter le signal Raman émis durant un court pulse du laser pendant que la fluorescence n'est pas encore émise[127]. Cette technique nécessite de l'équipement particulier et est considérée plus dispendieuse[128].

L'utilisation d'un laser à 1064 nm permet également de limiter la fluorescence des tissus, car elle ne fournit pas l'énergie nécessaire pour la transition entre le niveau électronique fondamental et le premier niveau excité pour la plupart des fluorophores ce qui empêche le phénomène de fluorescence. Cependant, l'intensité de la diffusion Raman est proportionnelle à l'inverse de la longueur d'onde à la quatre ($1/\lambda^4$). Ces lasers produisent donc peu de diffusion inélastique. C'est pourquoi cette méthode est généralement utilisée pour des échantillons ayant intrinsèquement un fort signal Raman et avec une méthode comme la spectroscopie par transformé de Fourier qui permet d'amplifier le rapport signal sur bruit[129].

2.3 L'apprentissage automatique des spectres Raman pour la détection du cancer

Le cancer a des empreintes biochimiques caractéristiques pouvant être capturées par la spectroscopie Raman. Cependant, un spectre Raman contient une énorme quantité d'information difficile à interpréter. Cette complexité a limité l'application de la spectroscopie Raman à des problèmes cliniques. L'apprentissage automatique permet d'interpréter les spectres Raman en relation avec une pathologie[130]. Les techniques les plus couramment employées dans ce but sont les méthodes de classification par apprentissage supervisé. L'apprentissage supervisé est défini par l'utilisation d'un ensemble de données étiquetées. Dans le cas des outils de diagnostics cliniques, ces étiquettes sont fournies par le standard clinique, généralement l'analyse histopathologique et parfois des marqueurs moléculaires détectés par des méthodes d'immunohistochimie

La performance d'algorithmes d'apprentissage automatique peut être évaluée selon deux axes : l'axe puissance et expressivité et l'axe interprétabilité. L'axe de puissance et l'expressivité défini d'abord le pouvoir qu'a le modèle d'être exacte – par exemple une régression linéaire ne fonctionne que pour un problème séparé linéairement alors que la méthode des plus proches voisins peut permettre des séparations de forme arbitraire – mais aussi la sensibilité du modèle au surapprentissage. Le surapprentissage (ou *overfitting*) est défini comme la création d'un modèle de classification qui correspond trop précisément à l'ensemble de données sur lequel il a été entraîné et n'est pas généralisable à de nouvelles données. Le second axe, l'interprétabilité, est la capacité à fournir des explications sur la classification. Par exemple, l'apprentissage en profondeur (ou *deep learning*) est un outil de classification très puissant, mais il est difficile d'interpréter le modèle obtenu et tirer des conclusions sur la nature physique du problème. Par contraste, lors d'une régression linéaire les plus grands coefficients sont attribués aux aspects des spectres (*features*) ayant le plus d'importance dans la classification, ce qui permet d'évaluer la pertinence des informations fournies. Pour le développement d'un outil clinique, il est important de considérer ces deux axes et il peut parfois être judicieux de perdre en exactitude pour obtenir un modèle plus facilement interprétable basé sur des biomarqueurs connus[131]. Un autre axe habituellement important lorsqu'il est question d'apprentissage automatique est le temps de calcul que requière la méthode choisie. Cet axe ne sera pas développé dans cette thèse, car le nombre de spectres Raman inclus dans les ensembles de données liées à des études cliniques est généralement limité.

Les méthodes d'apprentissage les plus courantes sont la régression linéaire (LR), la régression logistique, la méthode des plus proches voisins (k-NN), les arbres de décision (CART), les vecteurs de support machine (SVM), l'analyse de discriminants linéaires (LDA), l'analyse de discriminants quadratiques (QDA), l'analyse de discriminants de moindre carré (PLS-DA) et l'analyse des principaux composants (PCA)[130].

Le Tableau 2.3 compare différentes méthodes de classification pour différentes études portant sur la détection du cancer à l'aide de spectroscopie Raman. Toutes ces méthodes ont permis d'identifier divers types de cancer avec une sensibilité et une spécificité allant de 70 à 99 %.

Tableau 2.3 Comparaison des performances de classification de différentes méthodes d'apprentissage automatique et différentes méthodes de test utilisées pour différencier des spectres Raman acquis sur des tissus sains et cancéreux. Les méthodes comparées sont: réseaux de neurones artificiels (ANN), arbres de décision (CART), réseaux de neurones convolutifs (CNN), analyse de discriminants linéaires (LDA), régression linéaire (LR), analyse des principaux composants (PCA), analyse de discriminants quadratiques (QDA), vecteurs de support machine (SVM), validation croisée sans intervention (LOOCV).

Algorithme d'apprentissage	Méthode de validation	Tissus	Nb patients	Sensibilité	Spécificité
ANN [132]	LOOCV	Peau	222	94	98
CART [133]	Ensemble Indépendant	Estomac	53	94.2	98.6
CNN[134]	Single split	Sein	88	89	90
LDA [135]	LOOCV	Estomac	44	95	90
LR [136]	LOOCV	Sein	58	94	96
PCA-LDA[137]	LOOCV	Colorectal	10	73	86
QDA [109]	Aucun	Sein	34	99	98
SVM [138]	LOOCV	Colorectal	59	99	99
SVM[139]	LOOCV	Rein	77	92	93

La méthode la plus courante dans la littérature semble être l'analyse des composants principaux combinée à l'analyse du discriminant linéaire (PCA-LDA)[130]. LDA est une technique classique de réduction dimensionnelle supervisée qui maximise la séparabilité d'un ensemble de données

un sous-espace dont la dimensionalité est plus petite que le nombre de données disponibles. LDA se démarque par sa simplicité et par sa capacité à classifier des problèmes à plus de deux classes et donner de meilleures prédictions pour des petits ensembles de données que d'autres modèles de classification linéaire comme LR[140]. Cependant cette méthode a une tendance au surentrainement et est susceptible à des problèmes liés à la réversibilité de la matrice de covariance utilisée pour calculer la séparabilité de l'ensemble. Ces problèmes peuvent survenir lorsque le nombre de dimensions (*features*) est supérieur au nombre de données, ce qui est souvent le cas des applications cliniques de la spectroscopie Raman[141], [142]. La méthode de réduction de dimensionnalité PCA (décrite section 2.3.3) permet de réguler la LDA et contourner ces problèmes en exécutant une réduction de dimensionnalité préliminaire[143]. Cependant, ces deux méthodes créent de nouvelles *features* et limite ainsi l'interprétabilité du modèle et augmente le risque d'une contribution du bruit du spectre à la classification.

Le Tableau 2.3 montre également les résultats d'études évaluant le potentiel de l'apprentissage profond (*Deep Learning*). L'apprentissage profond est défini comme un modèle basé sur une architecture de réseaux neuronaux et inclue les réseaux de neurones artificiels (ANN) et les réseaux de neurones convolutifs (CNN). L'utilisation de ces méthodes a en général pour objectif d'éliminer la nécessité du traitement de signal complexe[144], [145]. Cependant, ces modèles sont prompts au surentrainement et leur interprétabilité est beaucoup plus limitée que les modèles d'apprentissage traditionnels.

Une étude menée en 2010 a comparé l'efficacité de différentes méthodes pour la détection de cellules cancéreuses dans les ganglions auxiliaires dans le cadre de chirurgie de cancer du sein. Cette étude, menée sur 43 échantillons *ex vivo*, obtient, après validation croisée sans intervention (LOOCV), les résultats présentés au Tableau 2.2. L'étude conclut que la méthode SVM, avec un noyau de fonction de base radiale (RBF), est plus appropriée pour cette problématique que les méthodes algébriques classiques comme LDA et PLS-DA [146].

Tableau 2.4 Comparaison des performances de classification de différentes méthodes d'apprentissage automatique utilisées pour différencier les tissus sain et cancéreux de ganglions auxiliaires.

Méthode	Sensibilité (%)	Spécificité (%)
SVM (linéaire)	100	90

SVM (polynomial)	100	99
RBFSVM	100	100
LDA	100	92
PLS-DA	100	94

Bien que certains algorithmes présentent d'excellents résultats, aucun consensus n'a été atteint quant à quel algorithme performe le mieux pour classifier des spectres Raman en général. Puisque SVM produit de bons résultats pour la problématique étudiée et est utilisé de plus en plus fréquemment par de nombreux groupes, ce sera le seul modèle présenté en détails dans ce travail.

2.3.1 Machines à vecteurs de support

Les machines à vecteurs de support (SVM) sont un algorithme de classification par apprentissage supervisé généralement apprécié pour le peu de puissance de calcul requis et les possibilités d'optimisation du modèle par choix d'hyperparamètres appropriés. Les SVM permettent de trouver un hyperplan de N -dimension, où N est le nombre de *features* (par exemple, l'intensité d'une des bandes d'un spectre Raman) de l'ensemble de données, qui sépare un ensemble de données en deux classes. Les vecteurs de support sont les données de la classe X les plus rapprochées de la classe Y . Pour trouver la meilleure frontière de décision, l'algorithme utilise ces vecteurs de support et trouve l'hyperplan qui maximise la distance totale entre la frontière de décision et les vecteurs de support, appelée la marge. La Figure 2.5 a) illustre le fonctionnement des SVM lorsqu'appliqués à un problème en deux dimensions[131]. Dans le cas de la classification de spectres Raman, chaque point d'intensité du spectre Raman correspond à une dimension (*feature*) du modèle, l'hyperplan recherché peut donc avoir plusieurs jusqu'à plusieurs centaines de dimensions.

Deux hyperparamètres peuvent être ajustés pour améliorer les performances du modèle SVM : C et γ . C est une constante inversement proportionnelle à la marge entre les données de chaque classe. Une valeur de C plus grande donne une marge plus petite. Ceci permet d'indiquer à l'algorithme à quel point éviter les points mal classifiés. En utilisant un C plus petit et en obtenant une plus grande marge, le classificateur devient plus flexible et commet plus d'erreurs de classification, mais est moins susceptible au surentrainement (voir Figure 2.6 b)). γ est inversement proportionnel à la distance entre l'hyperplan et les données qui sont incluses dans le calcul de la frontière de décision. Si γ est trop grand le rayon de la zone d'influence des vecteurs de support n'inclue que le vecteur

lui-même et il y aura surentrainement. Un petit γ mène à un modèle générique similaire à un modèle linéaire qui ne capture pas bien la distribution de l'ensemble de données[147] (voir Figure 2.6 c)).

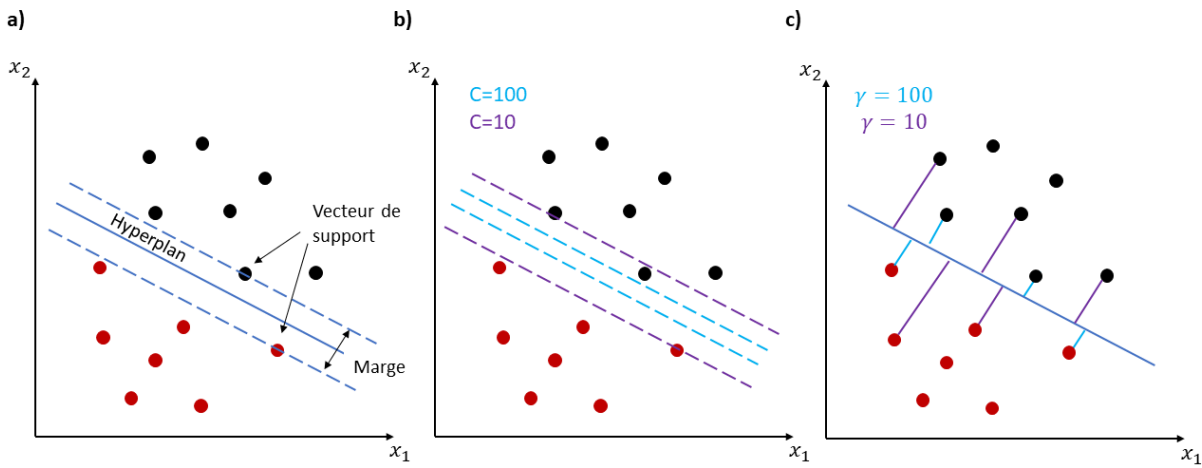


Figure 2.6. a) Représentation graphique de la classification SVM en deux dimensions, b) la marge devient plus grande lorsque C diminue et certains points se retrouvent à l'intérieur de la marge et c) lorsque γ diminue le nombre de points considéré dans le calcul de la frontière de décision augmente et les points inclus sont plus éloignés de la frontière.

Il n'y a pas de règle pour choisir les hyperparamètres cependant il est important de savoir que de la même façon qu'un modèle peut être surentrainé, le choix des hyperparamètres peut également être trop spécifique aux données d'entraînement et ne pas se généraliser à de nouvelles données. Ce phénomène est appelé surentrainement du deuxième niveau d'inférence[148]. C'est pourquoi la manière habituelle pour la sélection des hyperparamètres consiste à tester plusieurs combinaisons via une grille de recherche avec une méthode de test qui applique ces valeurs d'hyperparamètres et obtient des métriques de performance pour différentes parties de l'ensemble de données. Ces méthodes de test seront décrites à la section 2.3.2.

Tous les problèmes ne s'expriment pas nécessairement de façon optimale par une séparation linéaire. Pour classer un problème non linéaire, le noyau de la fonction peut être utilisé pour exprimer le problème dans une dimensionnalité supérieure dans laquelle il est linéaire. Les noyaux les plus courants sont linéaires, polynomiaux et RBF[147].

2.3.2 Évaluation des performances d'un modèle d'apprentissage automatique

La performance d'un modèle de classification est généralement évaluée à l'aide de l'aire sous la courbe de la fonction d'efficacité du récepteur (courbe ROC) aussi appelé AUC. Cette fonction est une mesure du nombre de vrais positifs en fonction du nombre de faux positifs selon le choix de seuil de classification. Le résultat de AUC varie entre 0 et 1 et un résultat de 0.5 est associé à une classification aléatoire. Différentes méthodes de tests permettent d'évaluer les performances d'un modèle en tenant compte du risque de surentrainement et de la capacité du modèle à être généralisé à de nouvelles données. L'idée générale est de tester le modèle sur des données n'ayant pas été utilisées pour l'entraînement et capturer toute la variance de l'ensemble de données. La validation croisée (*k-fold* ou LOOCV), le Bootstrapping et l'ensemble indépendant en sont des exemples de méthodes de tests pouvant être utilisés[130], [131], [147].

La méthode la plus couramment utilisée est *k-fold* validation. Cette méthode consiste à séparer l'ensemble de données en *k* sous-ensembles – aussi appelé *fold*. Un modèle est entraîné sur *k-1* sous-ensemble alors qu'un sous-ensemble est réservé pour évaluer les performances du modèle - c'est-à-dire que le modèle génère des prédictions pour ce sous-ensemble qui sont comparées aux étiquettes associées pour générer un AUC. Ce processus est répété *k* fois avec un sous-ensemble de validation différent à chaque fois. La performance du modèle est évaluée par la moyenne des *k* AUC calculés.

Cette technique peut être utilisée pour la sélection des hyperparamètres comme mentionné au chapitre 2.3.1. La Figure 2.4 présente un exemple d'utilisation de la validation croisée 5-folds pour la sélection des hyperparamètres d'un modèle[149].

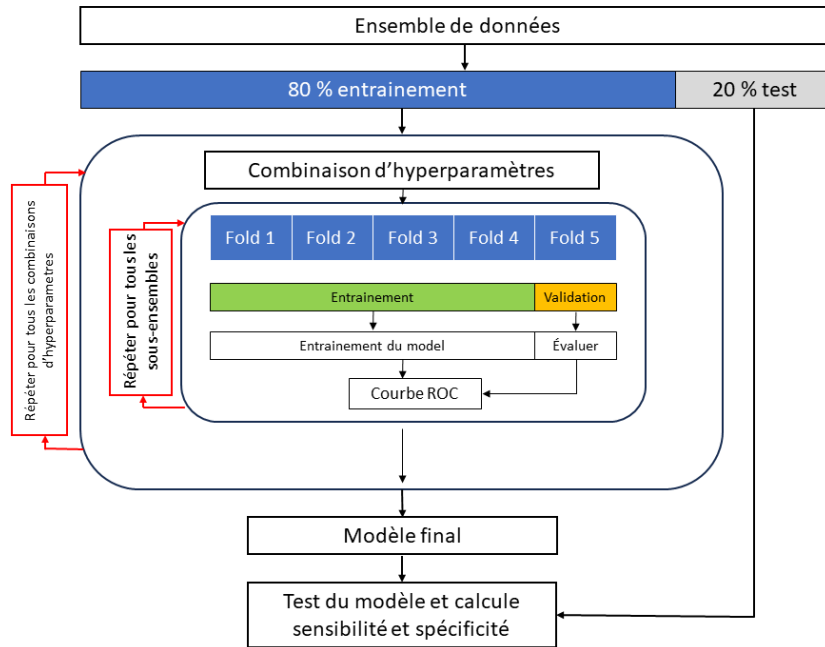


Figure 2.7: Représentation schématique de l'utilisation de la validation croisée k-fold $k = 5$ pour la sélection d'hyperparamètres. La première étape consiste à séparer l'ensemble de données en deux sous-ensembles : 80% sont alloués à l'entraînement du modèle et 20% sont réservés pour tester le modèle. Pour une combinaison d'hyperparamètres donnée, l'ensemble de données d'entraînement est divisé en 5 sous-ensembles (*folds*). 4 de ces sous-ensembles servent à entraîner un modèle et le cinquième - le sous-ensemble de validation - est utilisé pour évaluer la performance du modèle. Cette étape est répétée 5 fois, avec un ensemble de validation différent à chaque fois et 5 AUC sont calculés, un pour chaque ensemble de validation. La moyenne des 5 AUC est utilisée pour évaluer la performance de cette combinaison d'hyperparamètres. La validation croisée est répétée pour chaque combinaison d'hyperparamètres présente dans une grille. Un AUC est été calculé pour chaque combinaison et celle produisant le meilleur AUC est retenue. Le modèle final est produit en entraînant sur tout le sous-ensemble d'entraînement et la courbe ROC, l'exactitude, la sensibilité et la spécificité sont calculées à partir du sous-ensemble de test (20% de l'ensemble de données).

La validation croisée sans intervention (LOOCV) fonctionne de façon très similaire, mais plutôt que de séparer de façon aléatoire l'ensemble de données en un nombre arbitraire, k est le nombre d'exemples de l'ensemble de données. Lorsqu'utilisé pour classifier des problèmes cliniques, LOOCV peut être utilisé sous la forme où k est égal au nombre de patients et le modèle est ainsi

testé tour à tour sur chaque ensemble de données provenant d'un même patient. C'est une méthode privilégiée lorsque l'ensemble de données est petit, car il permet de réduire la variance de l'estimation de la performance, mais le temps de calcul requis est plus élevé[150].

2.3.3 Simplification du modèle et interprétabilité

Le nombre de points d'intensité d'un spectre Raman utilisé comme *features* étant généralement près de mille, lorsque le nombre de spectres présent dans l'ensemble de données est significativement inférieur à ce chiffre, la classification des spectres Raman devient un problème de haute dimensionnalité. Dans ce cas, beaucoup de *features* sont non pertinentes ou redondantes. Le fléau de la dimensionnalité est une expression utilisée pour décrire les problèmes de classification survenant lorsque le nombre de dimensions (*features*) est très grand par rapport au nombre d'exemples (données). Ces problèmes peuvent être affectés par la rareté des données, c'est-à-dire que l'ensemble de données ne contient pas toutes les combinaisons *features* et donc le modèle classifie mal les combinaisons moins fréquentes. Un autre impact de la haute dimensionnalité d'un problème est que la distance entre les données dans l'espace croît avec la dimension rendant l'ensemble de données clairsemé. Dans le cas des modèles de classification par SVM, cela se traduit par l'utilisation d'une grande partie des points de comme vecteurs de support[151]. Le phénomène d'Hughes survient lorsque l'exactitude du modèle décroît avec le nombre de dimensions ajouté au problème[152]. Bien que le SVM ait été considéré indépendant de l'effet de Hughes[153], une étude sur des données hyperspectrales a démontré une décroissance de l'exactitude de la classification avec l'augmentation du nombre de dimensions. Cette même étude a également démontré que même lorsque le nombre de données est élevé l'augmentation de la dimensionnalité détériore la classification[154].

Puisqu'il est généralement long et coûteux d'augmenter le nombre de données d'un ensemble, il est nécessaire d'utiliser des méthodes permettant de réduire le nombre de *features*, généralement par la régularisation ou par réduction de dimensionnalité.

Les méthodes de régularisations les plus courantes sont les régressions Ridge ou Lasso consiste à ajouter à la fonction coût de base de l'algorithme de classification (la différence au carré entre les étiquettes y et les prédictions $f(x)$) un terme de régularisation associé aux coefficients de la fonction $f(x)$ (voir équation 2.2). Selon ce terme la fonction de coût sera minimale lorsque la valeur d'un grand nombre de coefficients est très faible et il devient plus pénalisant d'utiliser des *features* peu

corrélés pour surentrainner le modèle. Le coefficient accordé à une *feature* devient ainsi une mesure de son importance et les *features* peuvent être ordonnées selon leur pertinence. Cette méthode permet d'éviter l'utilisation de coefficients négatifs et positifs pour annuler des *features* corrélés non pertinents.

$$\underbrace{\sum_{i=1}^{N_{\text{entraînement}}} (y_i - f(x_i))^2}_{\text{Fonction de coût}} + \alpha \underbrace{\sum_{j=1}^{n_{\text{features}}} |a_j|}_{\text{Terme de régularisation}} \quad (2.2)$$

La réduction de Lasso (*Least Absolute Shrinkage and Selection Operator*) minimise la somme de la valeur absolue des coefficients (équation 2.2). Cette méthode permet d'obtenir un plus grand nombre de coefficients égal à 0. Les combinaisons d'hyperparamètres de la régularisation sont généralement choisies par une méthode de test similaire à celles décrites à la section 2.3.2.

La méthode de réduction de dimensionnalité la plus utilisée est l'analyse des principaux composants (PCA). Elle se base sur la création d'un nouveau système d'axes orthogonaux appelé composants principaux qui est choisi en fonction de la distribution des données de sorte à pouvoir éliminer les axes offrant le moins de variances et ainsi réduire la dimensionnalité du problème (voir Figure 2.8). Contrairement à des approches de régularisation qui utilise les *features* originales, les approches de réduction dimensionnelle comme PCA transforment les *features*. Ceci rend cette méthode moins adaptée aux problématiques cliniques, car elle limite l'interprétabilité du modèle.

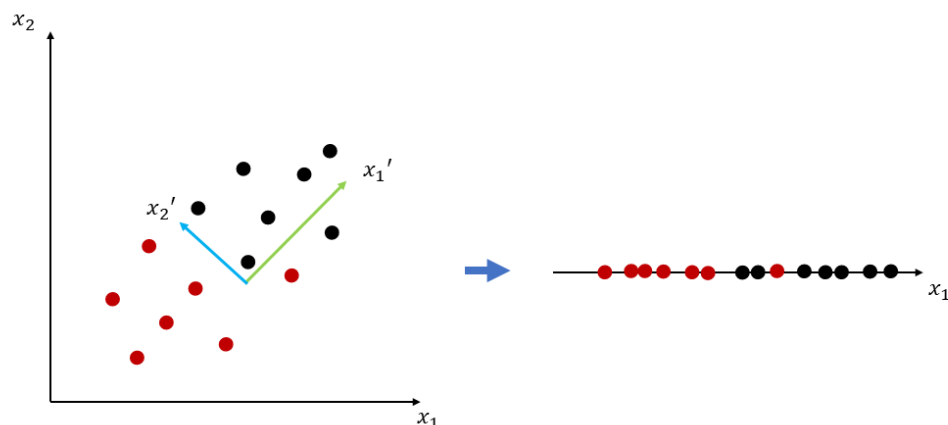


Figure 2.8 Représentation schématique de l'application de PCA à un ensemble en deux dimensions. Les axes x_1 et x_2 sont les *features* originaux de l'ensemble de données. Une nouvelle paire d'axes orthogonaux est calculée pour laquelle x_1' exprime la variance maximale de l'ensemble de données. Les données sont projetées sur x_1' et l'ensemble de données est maintenant exprimé en une dimension.

La réduction du nombre de *features* est une étape cruciale lors de la classification de spectre Raman, car c'est ce qui permet une meilleure interprétabilité du modèle et l'association de la classification à des biomarqueurs connus. Elle permet aussi d'éviter le surentrainement ou l'entraînement du modèle sur du bruit, particulièrement si l'étude comporte peu de patients ou si la méthodologie de la prise de mesure peut entraîner un biais.

CHAPITRE 3 DÉMARCHE SCIENTIFIQUE ET CONTRIBUTIONS

Ce travail résulte de la collaboration entre le LuMed Lab, dirigé par Frédéric Leblond (Polytechnique, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM)), du département de chirurgie et de pathologie de l'hôpital d'Ottawa, du département de chirurgie et de pathologie du Centre Universitaire de Santé de l'université McGill (CUSM) et de l'Institut-hôpital neurologique de Montréal (MNI). La démarche scientifique peut être divisée en trois étapes selon les trois objectifs du projet:

3.1 Obtenir des modèles de classification permettant de distinguer avec une grande sensibilité et spécificité les tissus sains et les tissus cancéreux à partir de quelques bandes spectrales d'un spectre Raman acquis avec un système commercial de sonde sur des spécimens de chirurgie frais.

Le premier objectif du projet était d'établir une preuve de concept sur l'utilisation de la spectroscopie Raman pour la détection d'un cancer à partir de seulement quelques bandes spectrales afin de valider l'approche multi-spectrale.

Deux études cliniques ayant mené à deux articles sont incluses dans ce chapitre. Une première étude a évalué la détection du cancer de l'ovaire et de ces métastases avec la spectroscopie Raman. Le but était de valider la classification de tissus sain et cancéreux de plusieurs organes du système reproducteur féminin avec moins d'une dizaine de bandes spectrales.

À cette fin, une étude a été menée à l'Hôpital d'Ottawa. Neuf patientes atteintes de cancer de l'ovaire ou de l'endomètre subissant une chirurgie cytoréductive ont été recrutées. En raison du stade avancé de la plupart des cancers de l'ovaire au moment du diagnostic et du potentiel de micrométastases dans tout l'appareil reproducteur, les patientes atteintes du cancer de l'endomètre ont été incluses dans cette étude pour diversifier l'ensemble de données. Des mesures Raman *ex-vivo* de tissus réséqués ont été acquises dans l'heure suivant la chirurgie. Un système de sonde de spectroscopie Raman développé par Reveal Surgical (précédemment ODS Medical) illustré à la figure 3.1 a été utilisé. Ces mesures ont été utilisées pour développer un modèle d'apprentissage automatique permettant d'identifier des tissus cancéreux sur de multiples organes du système reproducteur féminin. Le modèle a été développé avec la méthode de classification SVM et la méthode de régulation de régression Lasso. Les hyperparamètres du modèle ont été choisis afin

que le nombre de bandes spectrales maximales incluses soit égal ou inférieur à 10 afin de minimiser la possibilité du surapprentissage.

L'article intitulé « *Multispectral label-free Raman spectroscopy can detect ovarian and endometrial cancer with high accuracy* » a été publié dans *Journal of Biophotonics* (facteur d'impact 2.8) et porte sur la détection du cancer de l'ovaire et de l'utérus *ex-vivo*. La diversité des tissus impliqués dans cette problématique offre une démonstration intéressante de la méthode multi-spectrale. Les défis rencontrés lors de cette preuve de concept en milieu clinique, et les solutions développées, constituent une expérience précieuse pour le reste du projet de recherche.

Ma contribution à cet article fut la prise des mesures optiques *ex-vivo* à l'hôpital d'Ottawa en collaboration avec Jean-Philippe Tremblay (Reveal Surgical), Kelly Aubertin (postdoctorat, LuMed Lab) and Manijeh Daneshmand (pathologiste, Hôpital d'Ottawa). J'ai également procédé au traitement préliminaire des données brutes et à la création d'étiquettes pour la classification des données. Le traitement final des données a été fait en collaboration avec Frédérick Dallaire (postdoctorat, LuMed Lab) et la classification des données a été effectuée en collaboration avec Arthur Plante (postdoctorat, LuMed Lab). Je suis également la principale contributrice à la rédaction de l'article.

Le second sous-objectif visait la création d'un modèle de classification pouvant discriminer les tumeurs invasives du sein avec une grande sensibilité et spécificité en se basant sur un petit nombre de bandes spectrales associées à des biomarqueurs connus. La seconde étude visait à atteindre ce sous-objectif.

Cette étude a été menée au Centre hospitalier universitaire de santé McGill (CUSM) sur 20 patientes atteintes d'un cancer du sein invasif et subissant une chirurgie mammaire. Des mesures Raman ont été acquises sur des échantillons provenant de spécimens de chirurgie avec la sonde de spectroscopie Raman de Reveal Surgical (Figure 3.1) dans l'heure suivant la chirurgie. Les mesures optiques ont ensuite été associées avec un diagnostic de références obtenu grâce à l'histopathologie. Les mesures prises avec la sonde de spectroscopie Raman ont été utilisées pour entraîner et valider des modèles d'apprentissage machine SVM permettant de distinguer les tissus adipeux, normaux et cancéreux. Une contrainte était appliquée à ces modèles afin de garantir que le nombre de bandes spectrales inclus soit inférieur à 10.

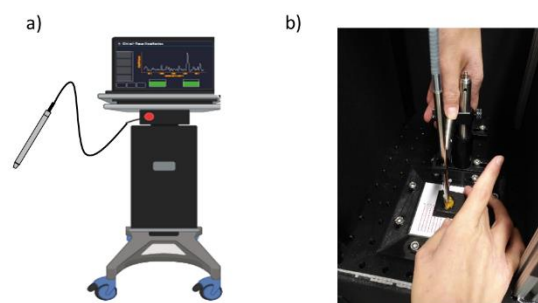


Figure 3.1 a) Schéma du système de sonde de spectroscopie Raman utilisé pour les mesures optiques de l'étude sur le cancer de l'ovaire et l'étude sur le cancer du sein et b) photographie de la sonde de spectroscopie Raman

L'article « *In situ Raman spectroscopy and machine learning unveil biomolecular alterations in invasive breast cancer* » publié dans *Journal of Biomedical Optics* (facteur d'impact 3.8) présente les résultats issus de la deuxième étude clinique. Ma contribution a été la création du protocole de mesures, la rédaction de tous les documents liés à l'approbation du projet par le comité éthique du centre hospitalier, la prise des mesures optiques au CUSM, la création de la méthode de recalage spatial des mesures par rapport aux résultats d'histopathologie servant d'étalon standard et la création d'étiquettes pour la classification à partir d'images d'histopathologie. L'analyse macroscopique des tissus a été effectuée par Dr Atilla Omeroglu (pathologiste, CUSM) et l'analyse des résultats d'histopathologie par Dr Feryel Azzi (pathologiste, CHUM). Le traitement des données et l'entraînement des modèles de classification ont été faits en collaboration avec Frédérick Dallaire (postdoctorat, Lumed Lab). Le recrutement des patientes a été fait par Trang Tran (associée de recherche, LuMed Lab). J'ai contribué majoritairement à la rédaction de l'article.

3.2 Validation de l'application des modèles de classification de spectres Raman sur des images hyperspectrales pour détecter le cancer du sein invasif

Les mesures prises avec la sonde de spectroscopie Raman ne couvraient que 500 microns et sont donc insuffisantes pour déterminer la nature des marges de l'échantillon de façon pratique durant la chirurgie. Une seconde étude clinique a donc été menée au CUSM pour tester l'utilisation du système d'imagerie Raman hyperspectral présenté à la Figure 3.3 pour la détection du cancer du sein invasif. Ce système permettait d'imager les tissus sur une surface de 11 x 9 millimètres grâce

à une méthode de balayage spatial par ligne. La résolution spatiale était de 250 microns (mesurée à partir d'une mire de résolution 1951 USAF) et la résolution spectrale de 6 cm^{-1} (mesurée à partir de la largeur d'une bande de CaCO_3). Contrairement au système de sonde de spectroscopie Raman, pour lequel une mesure résultait en un seul spectre Raman, chaque image hyperspectrale contenait 1068 spectres Raman. Pour cette étude, six patientes atteintes d'un cancer du sein invasif ont été recrutées. Les mesures ont été acquises sur des échantillons dans l'heure suivant une chirurgie mammaire conservatrice ou une mastectomie. Les mesures optiques étaient ensuite associées avec un diagnostic de références obtenu grâce à l'histopathologie. Le diagnostic a été comparé avec la classification des tissus obtenue avec les modèles SVM développés à partir des mesures acquises avec la sonde de spectroscopie Raman durant l'étude décrite au chapitre 3.1.

Les résultats de la seconde étude clinique ont été présentés dans un article intitulé «*Macroscopic inelastic scattering imaging using a hyperspectral line scanning system identifies invasive breast cancer in lumpectomy and mastectomy specimens*» soumis dans *Journal of Biomedical Optics*. Ma contribution a été la création du protocole de mesure en milieu hospitalier, la création de la méthode de recalage spatial des mesures par rapport aux résultats d'histopathologie servant d'étalon standard, la création d'étiquettes pour la classification à partir d'image d'histopathologie et le traitement des données Raman. La rédaction des documents nécessaires à l'approbation du projet par le comité éthique du centre hospitalier a été faite en collaboration avec Myriam Mahfoud (associé de recherche, LuMed Lab). La prise de mesures au CUSM a été faite en collaboration avec Hugo Taverro (étudiant à la maîtrise, LuMed Lab) et le recrutement des patients a été effectué par Trang Tran (associé de recherche LuMed Lab). L'application de modèles de classification a été faite en collaboration avec Frédérick Dallaire (postdoctorat, Lumed Lab). L'analyse macroscopique des échantillons et les résultats d'histopathologie ont été faits par Dr Lara Richer (pathologiste, CUSM). Le recrutement des patientes a été fait par Trang Tran (associée de recherche, LuMed Lab). J'ai contribué majoritairement à la rédaction de l'article.



Figure 3.2 Photographie du système d'imagerie Raman hyperspectral utilisé durant la deuxième étude clinique portant sur le cancer du sein.

3.3 Développement et preuve de concept d'un système d'imagerie Multispectrale pour imager une bande spectrale

Les mesures prises avec le système d'imagerie Raman hyperspectral couvraient une surface d'un centimètre carré et le temps d'intégration était de plusieurs minutes ce qui est trop long pour être cliniquement viable *in vivo*. L'objectif final de ce projet de recherche était donc de proposer un nouveau système d'imagerie Raman capable de détecter des tissus cancéreux sur une large surface et en un temps de moins de quelques secondes. Cependant, une telle méthode n'est réalisable que si la détection du cancer ne nécessite pas l'acquisition du spectre entier. Pour évaluer le potentiel d'un sous-ensemble de bandes spectrales à détecter les tissus cancéreux, une analyse rétrospective de quatre ensembles de données Raman acquis avec le système de sonde de spectroscopie (Figure 3.1) a été réalisée. Les deux ensembles de données résultant des études présentées au chapitre 3.1 ont été inclus dans cette analyse. Un ensemble de données provenant d'une étude multicentrique durant laquelle des spectres Raman ont été acquis *in vivo* chez 67 patients subissant des chirurgies pour des tumeurs au cerveau (glioblastome, méningiome et métastases) a également été inclus. Le dernier ensemble de données inclus provenait d'une étude menée sur 10 patientes atteintes d'un cancer du poumon durant laquelle les spectres Raman avaient été acquis *ex vivo*. Un groupe de 7 bandes spectrales ayant été identifiées comme biomarqueurs Raman dans les quatre publications originales a été sélectionné. Afin d'évaluer leur potentiel, les performances de classification (en termes de sensibilité, spécificité et aire sous la courbe (*AUC*) de la courbe ROC (*receiver-operating-characteristic*)) des modèles de classification basés sur une seule de ces bandes

spectrales ont été calculées. Pour chaque type de cancer, les trois bandes spectrales montrant les meilleures performances de classification ont été retenues. Un total de 4 bandes spectrales a été retenu et deux bandes spectrales étaient communes aux quatre types de cancer. De nouveaux modèles de classification SVM basés sur uniquement 3 bandes spectrales ont été créés. Les performances de classification obtenues ont été comparées aux résultats de classification rapportés dans les publications originales. Un système d'imagerie Raman multi-spectrale a été développé pour mesurer l'intensité d'une bande spectrale identifiée comme un biomarqueur commun aux quatre types de cancer (Figure 3.3). Une méthode de traitement des images multi-spectrales a été mise au point et le système a été testé sur un modèle animal. Les images résultantes ont été comparées à celles obtenues avec le système d'imagerie Raman hyperspectral pour les mêmes échantillons.

L'article « *Towards Non-contact Macroscopic Imaging Raman of Multiple Cancers Using Multi-Spectral Inelastic Scattering Detection* » soumis dans *Optics Letter* (facteur d'impact 3.7) présente les résultats de ce projet. Ma contribution à cette publication consiste à la conception du système d'imagerie Raman multi-spectrale en collaboration avec la compagnie *Photon etc* et Nassim Ksantini (associé de recherche, LuMed Lab), le développement de la méthode de traitement d'images multi-spectrales, la prise de mesures avec les systèmes d'imagerie Raman hyperspectral et multi-spectral, le traitement des images multi-spectrales et hyperspectrales. Je suis également la contributrice majoritaire de la rédaction de l'article. L'analyse rétrospective des données de cancer a été réalisée par Frédérik Dallaire (postdoctorant, LuMed Lab).

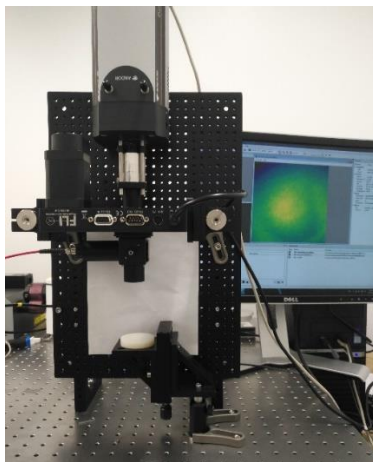


Figure 3.3 Photographie du système d'imagerie Raman multi-spectrale.

CHAPITRE 4 ARTICLE 1 : MULTISPECTRAL LABEL-FREE RAMAN SPECTROSCOPY CAN DETECT OVARIAN AND ENDOMETRIAL CANCER WITH HIGH ACCURACY

Sandryne David^{1,2}, Arthur Plante^{1,2}, Frédérick Dallaire^{1,2}, Jean-Philippe Tremblay¹, Guillaume Sheehy^{1,2}, Elizabeth Macdonald^{3,4}, Laura Forrest^{3,4}, Manijeh Daneshmand^{3,5}, Dominique Trudel², Brian C. Wilson⁶, Laura Hopkins⁷, Sangeeta Murugkar⁸, Barbara Vanderhyden^{3,4}, Frédéric Leblond^{1,2}

¹Department of Engineering Physics, Polytechnique Montreal, Montreal, Quebec, Canada.

²Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Montreal, Quebec, Canada

³Cancer Therapeutics Program, Ottawa Hospital Research Institute (OHRI), Ottawa, Ontario, Canada

⁴Department of Cellular and Molecular Medicine, University of Ottawa, Ottawa, Ontario, Canada

⁵Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of Ottawa, Ottawa, Ontario, Canada

⁶Department of Medical Biophysics, University of Toronto and Princess Margaret Cancer Centre/University Health Network Toronto, Ontario, Canada

⁷Department of Obstetrics and Gynecology, University of Ottawa and The Ottawa Hospital, Ottawa, Ontario, Canada

⁸Department of Physics, Carlton University, Ottawa, Canada

**Publié dans
Journal of Biophotonics,
26 novembre 2021**

4.1 Mise en contexte de l'article

Dû à sa prévalence et à l'absence de dépistage, le cancer de l'ovaire est le cinquième cancer le plus mortel chez les femmes en Amérique du Nord[155]. Aux États-Unis il représente 2.5% des cancers et 5% des décès liés au cancer[155]. Le pronostic négatif associé au cancer de l'ovaire est dû au fait que la plupart des cas sont diagnostiqués au stade III (51%) ou IV (29%). Dans le cas de stades aussi avancés, la survie sur 5 ans entre 2007 et 2013 était de 42 % (stade III) et 26 % (stade IV)[155].

Le type de cancer de l'ovaire le plus commun est le carcinome épithélial de l'ovaire qui représente 90% des cas[155]. Il existe également des tumeurs ovariennes non épithéliales, généralement moins agressives. Les tumeurs des cellules germinales et des cordons sexuels forment la majorité des carcinomes non épithéliaux. Les autres cancers de l'ovaire non épithéliaux incluent le carcinome à petites cellules et le sarcome ovarien. Il existe également des tumeurs non cancéreuses comme les adénofibromes[156].

Pour tous types de cancers de l'ovaire, le traitement est généralement le même : chirurgie cytoréductive suivie de chimiothérapie postopératoire[157]. La chirurgie joue un rôle

particulièrement important, ayant pour objectif le diagnostic, la stadification du cancer, la cytoréduction et le traitement palliatif[158]. Le principal type de chirurgie de cytoréduction est la laparotomie, une procédure qualifiée d'ouverte avec une incision permettant d'observer plusieurs organes. Des techniques moins invasives, comme la laparoscopie, sont également étudiées pour des stades moins avancés[159]. Comme le cancer de l'ovaire se propage rapidement, la chirurgie implique généralement une hystérectomie (retrait complet de l'utérus), une salpingo-ovariectomie bilatérale (retrait des ovaires et des trompes de Fallope), omentectomie (retrait de la couche de tissus adipeux recouvrant l'intestin appelé omentum) et le retrait de tout autre tissu cancéreux visible ou palpable[158].

Une technique des détections des métastases permettrait d'améliorer les résultats de chirurgies à plusieurs niveaux. Premièrement la cytoréduction a pour objectif est le retrait complet de la tumeur principale et des métastases[160]. Une augmentation de la cytoréduction totale est directement associée à une augmentation du temps de survie médian[161]. Une étude a démontré que seulement 50% des métastases diaphragmatiques et 45 % des métastases dans l'omentum sont visible ou palpable[162] ce qui compromet la capacité des chirurgiens à les retirer adéquatement. Une technique permettant une meilleure détection des métastases *in vivo* pourrait donc contribuer à fournir une cytoréduction plus complète. Deuxièmement, une technique de détection peropératoire *in vivo* pourrait permettre une meilleure stadification des patientes. En effet dans le cas de patientes de stade précoce, les chirurgiens peuvent soit procédé une stadification chirurgicale optimale menant à un retrait de tissues non nécessaire qui augmentant les risques de complications, soit procéder à un retrait inadéquat des tumeurs et devoir soumettre la patiente à une seconde chirurgie une fois les résultats d'histologie obtenus[163]. Des études ont démontré l'existence du risque associé à la sous-stadification des patientes[164], [165] et également que la tendance de la maladie à se répandre dans la partie supérieure de l'abdomen peut compromettre la stadification[162]. Un outil peropératoire permettant la détection des tissus cancéreux sur des organes variés pourrait donc permettre une meilleure stadification et ainsi mener à un choix de traitement plus approprié[166].

4.2 Abstract

Up to 70% of ovarian cancer patients are diagnosed with advanced-stage disease and the degree of cytoreduction is an important survival prognostic factor. The aim of this study was to evaluate if Raman spectroscopy could detect cancer from different organs within the abdominopelvic region, including the ovaries. A Raman spectroscopy probe was used to interrogate specimens from a cohort of nine patients undergoing cytoreductive surgery, including four ovarian cancer patients and three patients with endometrial cancer. A feature selection algorithm was developed to determine which spectral bands contributed to cancer detection and a machine-learning model was trained. The model could detect cancer using only eight spectral bands. The receiver-operating-characteristic curve had an area-under-the-curve of 0.96, corresponding to an accuracy, a sensitivity and a specificity of 90%, 93% and 88%, respectively. These results provide evidence multispectral Raman spectroscopy could be developed to detect ovarian cancer intraoperatively.

Keywords: fluorescence; machine-learning; oncology; ovarian cancer; Raman spectroscopy; signal processing; surgery; tissue optics

4.3 Introduction

Ovarian cancer is the fifth deadliest cancer amongst women in North America, accounting for 2.5% of all cancers and 5% of all cancer-related deaths [155]. Because symptoms usually appear late after disease onset, up to 70% of patients are diagnosed with advanced disease that has overall poor prognosis [167]. The most common subtype is high-grade serous carcinoma which can originate from the ovaries or fallopian tubes. Regardless of the origin, the standard treatment has been generally the same: cytoreductive surgery and postoperative chemotherapy [157]. The main type of cytoreductive surgery is laparotomy where as much tumor tissue is removed as possible from the abdominal and pelvic cavities. Cytoreduction may involve a total hysterectomy (removal of the uterus), bilateral salpingo-oophorectomy (removal of the ovaries and fallopian tubes), omentectomy (removal of the flap of adipose tissue covering the bowel) and removal of any other cancerous tissue that is visible and/or palpable within the abdomen. Specimens are collected during cytoreduction that are later analyzed by a pathologist to confirm diagnosis and determine the disease stage.

Cytoreductive surgery is a local treatment aimed at removing all localized tumors, but ovarian cancer often involves micro-metastases that have spread to other organs beyond the ovaries. Hence, systemic treatment (e.g. carboplatin/paclitaxel chemotherapy combination) may be used either before (neoadjuvant) or after surgery. Following surgery and chemotherapy, patients undergo physical examination, cancer antigen 125 blood test and radiological imaging to evaluate treatment efficacy. If no signs of cancer are detected the patient is considered to be in complete clinical remission. However, micro-metastases are not always detectable using current techniques, leading to cancer recurrence and repeat surgeries. Clinical studies demonstrated that the number and size of residual tumors post-surgery is an important factor affecting overall survival. Bristow *et al.* performed a meta-analysis on the survival effect of maximal cytoreduction in 6885 ovarian cancer patients and found that each 10% increase in maximal cytoreduction was associated with a 5.5% increase in median survival time [168]. Another study found a relative survival hazard ratio of 1.2 for residual disease of 0-2 cm and 2.4 for >2 cm [169].

Intraoperative optical technologies have been developed to detect ovarian cancer, including *in vivo* fluorescence imaging using various tumor-targeted and non-toxic fluorophores [170]. The near-infrared marker OTL38 was tested in 12 patients undergoing cytoreductive surgery, comparing intraoperative images with histopathology. A total of 83 fluorescent lesions were resected, of which 62 were confirmed malignant (true positives) and 2 false negative lesions were observed [171]. In a different approach, differentiation of tumor from normal ovarian tissue has been studied by Fourier transform infrared Raman spectroscopy in 20 formalin-fixed ovarian samples [172]. Raman spectroscopy has also been used to classify 15 fresh ovarian samples, with high sensitivity (75%) and specificity (75%) [173]. Other studies involving cervix, which can be involved in ovarian cancer cytoreductive surgery, demonstrated >99% sensitivity and specificity using Raman spectroscopy [174].

Here, a hand-held single-point Raman spectroscopy probe was used for the first time to detect cancer within organs of the female reproductive system. The measurements were made on fresh tissue immediately after cytoreductive surgery and included measurements on cancer specimens from the ovaries and the fallopian tubes. Because of the widespread dissemination of most ovarian cancers at diagnosis and the potential for micro-metastases throughout the reproductive tract, samples from the uterus (endometrial cancer) were included to ensure the detection of cancer could include other reproductive tract cancers.

4.4 Materials and methods

4.4.1 Patients and histopathology analyses

Nine patients diagnosed with ovarian cancer ($n = 4$) or endometrial cancer ($n = 3$), benign mucinous cystadenofibroma ($n = 1$) and one non-disclosed diagnosis were recruited at the Ottawa Hospital (**Table 1**) under an institutionally-approved protocol (#20170541-01H). Information relating to age, diagnosis and treatment for patient 7 is not presented in the table. This is because that patient agreed to the use of her tissues but did not consent to any personal information being shared as part of the study. The eight spectra associated with that patient were nonetheless retained as part of this study. Each patient was scheduled for laparotomy (cytoreductive surgery) to remove all visible and/or palpable tumors located in any of the following tissue/organs: ovary, uterus, omentum, fallopian tubes. On or before the day of surgery, a member of the medical team obtained patient consent and fresh specimens were resected by the surgeon (L.H.) and made available through the Ottawa Ovarian Cancer Tissue Bank.

Tableau 4.1 Clinical and pathological characteristics. PIDx: patient identification number, HG: high-grade, N/A: information not available) Before any exclusion. The FIGO (International Federation of Gynecology and Obstetrics) staging system is used most often for cancers of the female reproductive organs.

PIDx	Age	Diagnosis	Chemotherapy	Grade	FIGO Stage	Organ (# of spectra)
1	82	Endometrial Endometrioid Adenocarcinoma	None	1	I	Ovary (4) Omentum (1) Fallopian tube (1) Uterus (1)
2	63	Mucinous cystadenofibroma	None	N/A	N/A	Ovary (4) Omentum (4)
3	59	Endometrial High Grade Serous Adenocarcinoma	Carboplatin/Taxol	HG	IIIA	Ovary (13) Omentum (8) Uterus (9) Pelvic mass (5)
4	56	Endometrial High Grade Serous Adenocarcinoma	None	HG	IA	Omentum (4) Uterus (12)
5	64	High Grade Serous Carcinoma of Fallopian Tube Origin	Neoadjuvant Carboplatin/Taxol	HG	IIIC	Ovary (3) Omentum (9) Fallopian tube (2)
6	78	High Grade Serous Carcinoma of Fallopian Tube Origin	Neoadjuvant Carboplatin/Taxol	HG	IIIC	Omentum (8) Uterus (8)
7	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	Uterus (8)

8	76	High Grade Serous Ovarian Carcinoma	Carboplatin/Taxol	HG	N/A	Omentum (2)
9	57	High Grade Serous Ovarian Carcinoma	Carboplatin/Taxol	HG	IIB	Ovary (9) Omentum (6) Uterus (4)

Point spectroscopy measurements were made at multiple locations on 27 resected specimens (on average 5 measurement per specimen) from 9 patients (between 1 and 6 specimens per patient). For each probe measurement, a tissue sample was biopsied at the location of the measurement. This resulted in 125 Raman spectra, each associated with a sample that was subsequently examined by the pathologist (M.D.). Microscopic histology analyses were performed following formalin fixing and paraffin embedding to determine if the sample was cancer or benign/normal. All measurements were annotated with a metric for tumor-cell burden, corresponding to the density of cancer cells detected by the pathologist on tissue sections stained with hematoxylin and eosin (H&E), divided into four groups: 0–10%, 11–50%, 51–79%, 80–100% (**Table 2**). Specifically, the pathologist selected three regions within each tissue section under x10 magnification. Tumor cells were counted in each region under x40 magnification, and the average tumor-cell burden over all regions was calculated.

Tableau 4.2 Pathological characteristics of tissue associated with Raman measurements before any exclusion.

% of cancer cells	# of spectra (% of dataset)	Organs	# of spectra per organ
80-100%	38 (30.4%)	Ovary	15
		Omentum	5
		Uterus	15
		Pelvic mass	3
51-79%	4 (3.2%)	Omentum	2
11-50%	11 (8.8%)	Ovary	4
		Omentum	6
		Pelvic	2
0-10%	72 (57.6%)	Ovary	14
		Omentum	29
		Uterus	27

4.4.2 Raman instrumentation, spectroscopy measurements and data pre-processing

Measurements were made using a hand-held single-point Raman spectroscopy probe system [93][91]. This used a 785 nm laser (500 mW, Innovative Photonic Solutions, NJ, USA) source coupled to a fiberoptic probe (EmVision, FL, USA) detecting re-emitted light through nine fibers arranged circumferentially around the source fiber. Spectral detection was achieved over the wavenumber shift range 381-1653 cm^{-1} with an average spectral resolution of 2 cm^{-1} using an imaging spectrometer comprising a diffraction grating, a 100 μm slit and a cooled CCD camera (Newton model, Andor). Prior to tissue interrogation with the probe, each specimen was placed on an aluminum slide to minimize background signals. The probe tip was then placed in gentle contact with the specimen and spectra collected under minimal ambient lighting.

A total of 125 measurements were made across 9 patients and 5 organ types. Each measurement consisted of the following sequence: i) a spectrum acquired with the laser turned off to subtract dark noise and background light contributions, ii) 20 spectra acquired at the same location with the laser turned on at a power of 100 mW. For each probe measurement site, the pathologist took a $\sim 2 \text{ mm}^3$ biopsy sample that was placed in a cassette for formalin fixing and paraffin embedding. All measurements and tissue processing steps were completed within 1 hour after resection of all specimens.

The following data pre-processing steps were applied to each measurement: 1) averaging of the 20 repeat spectra to increase overall signal-to-noise ratio (SNR)[175], 2) subtraction of the background spectrum acquired with the laser turned off, 3) normalization to remove the instrument response using a spectrum from a NIST Raman standard (SRM 2214), 4) x-axis (wavenumber shift) calibration based on a Raman spectrum acquired on a powder of acetaminophen, 5) removal of background contributions (e.g. tissue fluorescence) using a custom background removal algorithm, and 6) standard normal variate (SNV) normalization[116].

4.4.3 Data filtering and spectral feature-selection

Ten measurements were excluded from the analysis from patients 3, 4 and 6 (4 in omentum, 6 in uterus) due to the presence of a peak at 957 cm^{-1} that dominated the spectra (**Figure S1**). The origin of this peak is unknown but was hypothesized to come from unintended extraneous light. One other spectrum (fallopian tube) was excluded because of an ambiguous pathology report preventing the assignment of a tissue type.

The remaining dataset ($n = 114$ spectra) was pre-filtered for input to a cancer detection machine-learning model: only the *pure cancer* (80-100% cancer cell density) and *normal/benign* (0-10%) spectra were preserved for model training and validation. Moreover, all spectra collected in omentum ($n = 38$) were removed, for two reasons. First, there was an insufficient number of cancer spectra in this tissue type to train a cancer detection model. In fact, after removing the omentum spectra with the 957 cm^{-1} artefact, there were only 2 *pure cancer* and 18 *normal/benign* spectra in the omentum category. Second, omentum comprises mainly adipose tissue whose spectrum is markedly different from all other tissue types in this study. As a result, including the omentum spectra would have biased the classification results.

This left 70 training spectra: 42 in *normal/benign* and 28 in *pure cancer*. The remaining spectra belonged to a more uncertain category (11-79% density of cancer cells, $n = 6$ excluding omentum). Those spectra were kept aside as a holdout set to preliminarily evaluate the model performance on a completely independent dataset.

Each spectrum consisted of >1000 individual spectral bands. Because of the relatively small number of patients and samples, a feature-selection algorithm was applied to reduce the dimensionality of the dataset and limit the likelihood of data overfitting during model training [176]. This dimensional reduction was achieved using a linear support vector machine (SVM) with a regularization by Lasso regression, in which individual statistical weights were assigned to each feature. This statistical weight acted as a surrogate for feature relevance, in effect quantifying the ability of each feature to capture inter-class variations and allowed less important bands to be discarded [177][176]. Features were then ranked according to their weight and only a subset was retained for model training.

The feature-selection process involved three optimisation parameters, each impacting which bands were selected and how many were retained for predictive model building. First, the hyperparameter C controlled the feature weights and was varied between 10^{-6} and 10^{-4} . Higher values of C imposed less constraints, leaving more features with larger weights in the final set. Secondly, to avoid selecting highly-correlated features, a k -neighbour (labeled k - n) threshold was varied between 0 and 20 cm^{-1} . This meant that all features within k - $n\text{ cm}^{-1}$ of each other were removed. Finally, the total number of features was limited by the hyperparameter k which was varied between 2 and 10. The algorithm was applied each time a model was trained. As described in section 2.4, this was done multiple times, that is, for every cross-validation (CV) fold during model training (**Figure 1**). The feature set used for different folds varied, although the most important features always remained the same.

4.4.4 Cancer detection model training and testing

The classification model training (*normal/benign* versus *pure cancer*) method was an SVM with a Gaussian kernel with two hyperparameters: C and γ . The regularization parameter C corresponded to a penalty term that was varied between 0.001 and 1 and the kernel coefficient γ , which represented the variance of the Gaussian kernel, ranged from $5 \cdot 10^{-5}$ to $5 \cdot 10^{-2}$. The SVM classifier considers the class imbalance of the dataset by assigning a higher cost to misclassifying cancer spectra than for *normal/benign* spectra. This is done via a fixed class weight parameter equal to 0.37 for *normal/benign* spectra ($n = 42$) and 0.63 for cancer spectra ($n = 28$). Prior to training, all retained features were normalised so that their intensity had a mean of zero and unit variance across the entire dataset. A grid search method was used to determine the combination of hyperparameters producing the classification model with optimal performance in distinguishing between *normal/benign* and *pure cancer*.

A leave-one-patient-out (LOPO) cross-validation (CV) procedure was used to assess the classification performance for each hyperparameter combination (**Figure 1**). In this approach all spectra from one patient were used as a validation set, while all remaining spectra were used to train a model. Applying the resulting model to the validation set resulted in a *classification probability* between 0 and 1 for each spectrum, corresponding to the degree of association to either category: values closer to 0 showed preferential association with the *normal/benign* category, while values closer to 1 showed an association to *pure cancer*. This procedure was repeated until all

patients were used as a validation set and all pre-selected combinations of hyperparameters were considered.

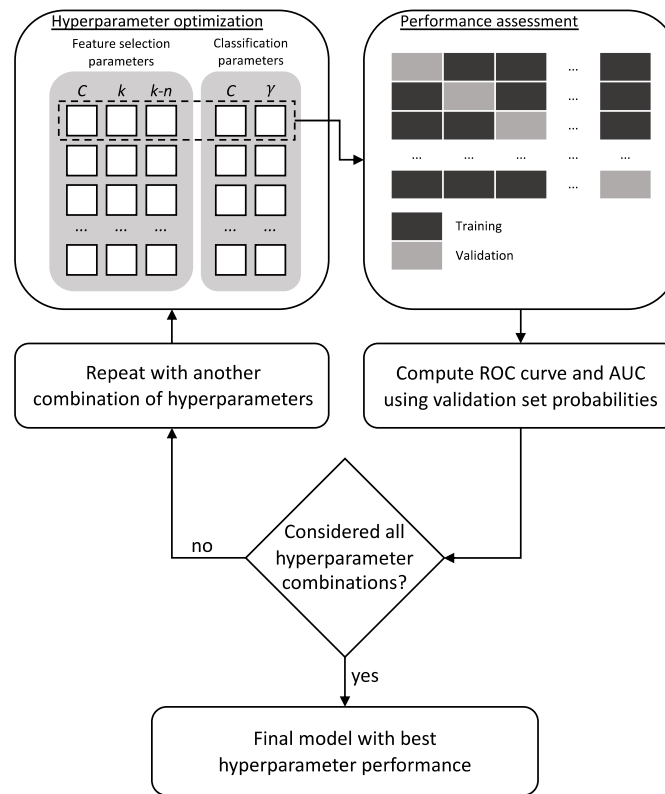


Figure 4.1 Data analysis flowchart. A hyperparameter combination is made by randomly selecting a value for each parameter of the feature-selection (C , k , $k-n$) and the classification (C , γ) algorithms. The performance associated with a given hyperparameter combination is assessed through LOPO CV. Each patient is used individually as a validation set and the model trained on $N - 1$ patients outputs a probability of being cancer to its spectra. A ROC curve is computed using the probabilities of N patients with a corresponding AUC value. This procedure is repeated until a predetermined number of combinations to evaluate is achieved. The set of hyperparameters with the highest AUC is considered to be the final model.

Model performance was assessed based on the area-under-the-curve (AUC) of a receiver-operating-characteristic (ROC) curve, from which values for accuracy, sensitivity and specificity were computed. The ROC curve was computed by comparing the classification probabilities from

the validation sets to their pathology labels. All samples associated with a probability $>\lambda$ ($0 \leq \lambda \leq 1$) were assigned to *cancer*, otherwise they were associated with the *normal/benign* category. Different values of the parameter λ correspond to different points on the ROC curve. Results were reported only for the *final* model in which the hyperparameters yielded the highest AUC value. Reported accuracy, sensitivity and specificity corresponded to the ROC curve point (λ -value) with the smallest distance to the upper left corner of the curve.

4.5 Results

The processed spectroscopic signals (Raman spectra) showed the relative contribution of Raman-active molecular bonds between *normal/benign* and *pure cancer* tissue in ovaries, uterus, fallopian tubes and omentum (**Figure 2**). The averaged spectra associated with the 70 measurements retained for the development of the machine-learning model resulted in a ROC curve with AUC = 0.96, corresponding to an accuracy, a sensitivity and a specificity of 90%, 93% and 88%, respectively. The model was associated with a point on the ROC curve corresponding to a parameter value along the curve (point closest to the upper left corner) of $\lambda = 0.46$ (**Figure 3[a]**). This model had $C = 10^{-4}$ and $k-n = 12 \text{ cm}^{-1}$, which resulted in 8 spectral features being retained for the model training phase. The parameters C and γ for the classification algorithm were 5 and $5 \cdot 10^{-4}$, respectively.

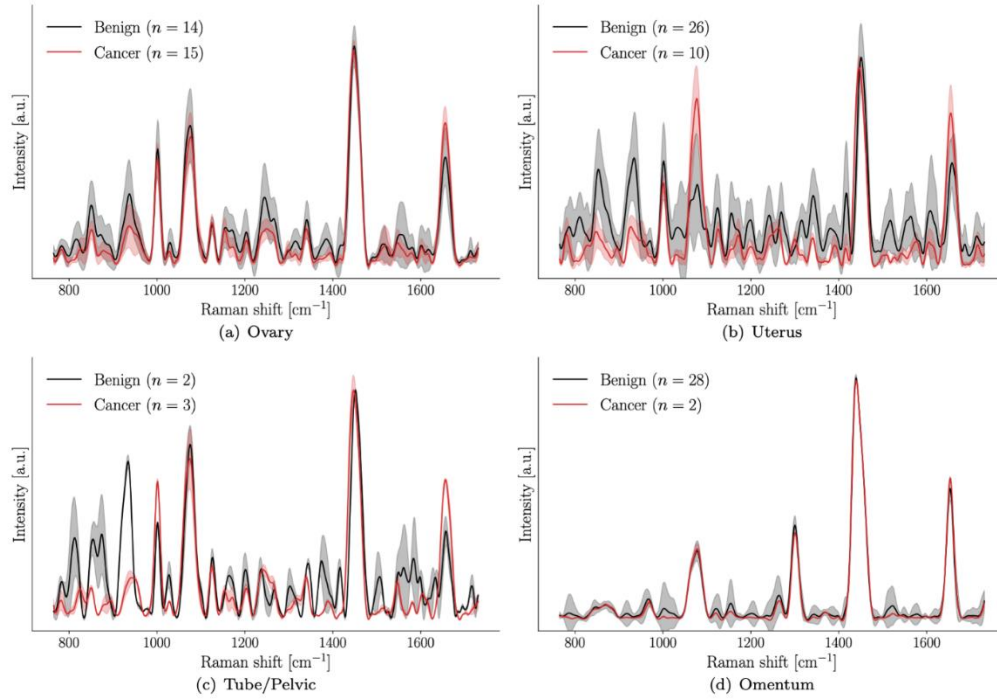


Figure 4.2 Normal/benign and cancer spectra for: (a) ovary, (b) uterus, (c) fallopian tube & pelvic mass, and (d) omentum. Each curve represents an average spectrum. The variance (shaded area) was computed based on the number of spectra specified in the legend. The omentum spectra were excluded from the process leading to the training of a cancer detection model.

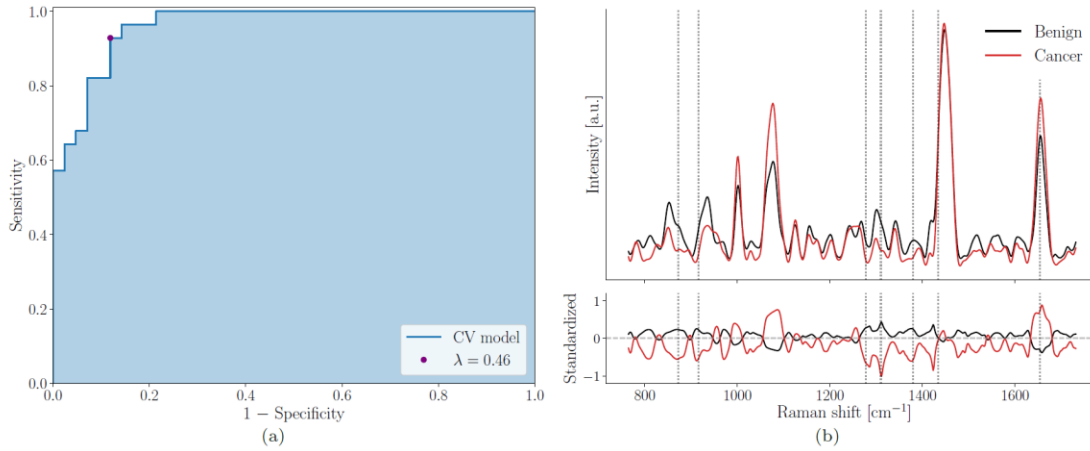


Figure 4.3 (a): Receiver-operating-characteristic (ROC) curve of the cancer detection model showing the location of the parameter value $\lambda = 0.46$ associated with the point closest to the upper-left corner. (b) Average *normal/benign* spectra ($n = 42$) and *cancer* spectra ($n = 28$) retained to train the cancer detection model (top) and standardized spectra (bottom) with the seven most important Raman bands used for classification highlighted with dotted lines.

Multiple models were created with different combinations of hyperparameters, and an even larger number of models resulted from all folds during the CV process. Overall, seven spectral bands were consistently associated with high weights during model training and cross-validation. The intensity of those spectral bands was represented using Whisker plots, visually demonstrating separability of the two classes (**Figure 4**). In these plots, the lower and upper hinges corresponded to the first and third quartiles (25th and 75th percentiles, respectively), while the upper whisker extended from the hinge to the largest value no further than $1.5 \times \text{IQR}$, where IQR is the interquartile range, that is, the distance between the first and third quartiles. The horizontal line showed the median value. Outlying points, extending outside the whiskers, were represented as individual points. All seven features were present in the set used as part of the optimal cancer detection model (dotted lines in **Figure 3[b]**). Those features were associated to specific vibrational modes and a tentative assignment made to groups of biomolecules (**Table 3**). Each band was either predominantly under-expressed or over-expressed in the *pure cancer* category.

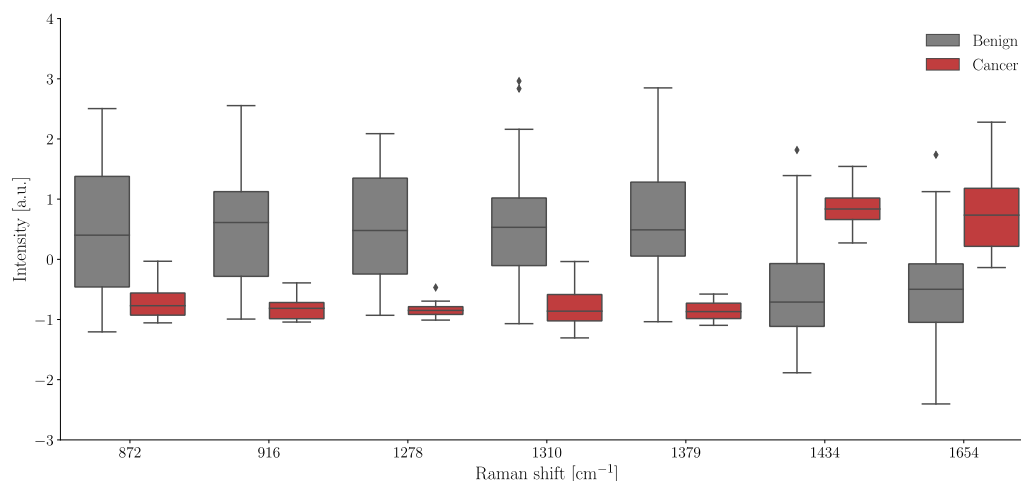


Figure 4.4: Whisker plots for the seven most important Raman bands used for cancer detection. The distribution associated with each band is shown for normal/benign (grey) and cancer (red).

Tableau 4.3 Most common spectral band intensities (features) utilised in the classification model. Information is provided on the spectral band location of each feature, the main molecular bonds

excited and a tentative association with tissue biomolecules. The status of each band is shown in terms of its intensity being higher or lower in tissue specimens labeled as *cancer*.

Spectral location (cm ⁻¹)	Peak center (cm ⁻¹)	Status in cancer specimens	Vibrational modes	Biomolecules
872	870–874	Lower	C–C stretching	Collagen, Protein (tryptophan)
916	935–937	Higher	C–C stretching	Protein (proline, valine, α -helix)
1278	1268–1272	Lower	C–N stretch (Amide III)	Protein (α -helix)
1310	1300	Lower	CH ₂ twisting mode	Lipid
1379	1379	Lower	δ CH ₃ symmetric	Lipid
1434	1442–1449	Higher	CH ₂ bend and deformation	Protein, Lipid
1654	1648–1661	Higher	C=O stretch, C=C stretch (Amide I)	Protein (α -helix), Lipid

The classification probability, which quantifies the preferential association with either *normal/benign* or *pure cancer*, was plotted against the percentage of cancer cells for each of the non-omentum measurements (**Figure 4**). To investigate potential classification biases, data points for different patients were displayed with different colors and different organ sites were represented by markers of different geometrical shapes. Although model training did not involve the spectra with cancer-cell burden between 10% and 80% (6 in total, excluding omentum), the eight retained spectral features were extracted from those measurements and the cancer detection model applied to this hold-out set. Of the six spectra, the two that had either a cancer-cell burden >50% (uterus) or <30% (pelvic) were classified correctly as *cancer* or *normal/benign*, respectively. However, of the remaining four spectra (all with 40% cancer-cell burden), only 2 showed a stronger association to the *cancer* category than to the *normal/benign* category.

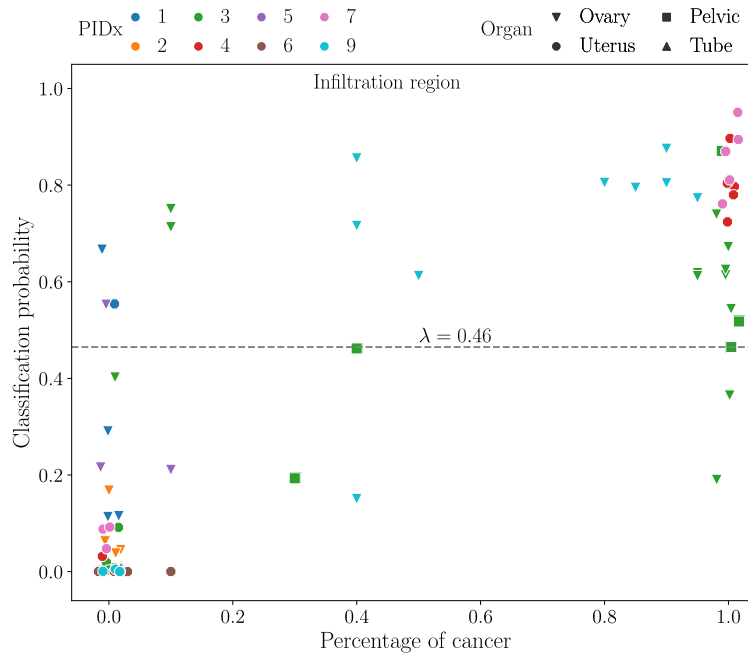


Figure 4.5 Cancer classification probability plotted against the percentage of cancer. Classification results for the samples with a cancer cell burden between 10% and 80% are shown inside the grayed region. Symbol color indicates the patient identification number (PIDx) and the symbol shape denotes the organ type. The dashed horizontal line represents the threshold value associated with the ROC curve in Figure 3. Data points above the threshold line ($\lambda = 0.46$) were classified in the *cancer* category.

4.6 Discussion and conclusion

Although promising, the results obtained in this initial study are insufficient to determine whether or not Raman spectroscopy could be applied in a real-world context to guide the resection of cancer in organs of the female reproductive system. An inherent limitation of the study is the small size of the dataset from which the classification model was built. However, every effort was made to ensure that the machine-learning approach of choice reduced the likelihood of overfitting the data, including the use of CV and reducing the dimensionality of the input data vector to avoid the so-called machine-learning *curse of dimensionality*. Here, this meant ensuring that the model training was achieved using a small subset of pre-selected features (spectral band intensities), which resulted in the model being trained and validated using a limited number of support vectors.

A potential pitfall in developing predictive models, especially for small datasets, is the risk that the model will predict class affiliations based on spectral features unrelated to biomolecular factors associated with the disease of interest, in this case the presence of cancer cells and collateral biochemical/structural changes. This was especially difficult here given the limited number of patients and the highly complex environment associated with multiple different tissue types. For example: an unbalanced dataset, either in terms of the number of samples predominantly coming from a few specific organ types or from a subset of patients, could have biased the results by introducing confounding factors. A sign of such biases would be instances where a significantly larger fraction of *correctly* classified measurements would be associated only with a specific organ type. However, the model presented here avoided this pitfall: for example, the classification for patients (#3, #4, #6 and #7) and organ types (ovaries, uterus) that contained both *normal/benign* and *cancer* spectra showed that the model performed equally well for either label. This suggests that the model has the potential to generalize well to new patients for these two organ sites, since it does not make associations between pathology labels and patients, and between labels and organ type.

There were three instances where both *normal/benign* and *pure cancer* spectra were well-balanced for a given patient, namely patients 4, 6 and 7. For those patients, spectra with both labels were classified correctly in all cases: 11/11 for patient 4, 4/4 for patient 6, and 8/8 for patient 7. However, since there were no *normal/benign* fallopian tube nor pelvic mass there was no way to test whether or not the model would be able to classify new spectra for these two organs. Moreover, since all spectra from pelvic mass (here likely metastasis associated with ovarian cancer cells) and fallopian tube were successfully classified, this suggested that the model learned from ovarian and uterus spectra due to the similarities between the spectra associated with those organs.

A potential confound factor that was not taken into consideration in the machine learning process was whether or not patients received neoadjuvant chemotherapy. This can be important since the administration of drugs could affect the tissue Raman signature. Out of the nine patients included in the study, only patients 5 and 6 received chemotherapy treatment before surgery. Although further analyses would be warranted on a larger cohort of patients, the results presented here suggest neoadjuvant treatment did not impact the ability of Raman spectroscopy to detect cancer. This is because a LOPO CV approach was used to train the cancer detection model, which included instances where either patient 5 or 6 were left out during a CV fold.

In conclusion, the work presented here suggests that cancer could be detected using Raman spectroscopy in organs from the female reproductive system with high accuracy using only 8 spectral bands. Single-point detection with a fiberoptic system risks significant under-sampling during cytoreductive surgery because of the large surface areas to be interrogated. However, the fact only a small number of spectral bands was required may open the door to wide-field multi-spectral (rather than hyper-spectral) imaging. For this, background subtraction, primarily from the tissue autofluorescence, will be challenging. Background removal typically relies on the relatively smooth fluorescence background spectrum compared to sharper Raman features, by utilizing hyperspectral detection combined with polynomial curve fitting. However, other techniques are currently being developed that could allow single bands to be imaged, for example, early-photon time-gated detection to isolate non-resonant from resonant phenomena, i.e. Raman scattering from fluorescence[178].

4.7 Supporting information

Additional supporting information may be found in the online version of the article at the publisher's website.

4.8 Supplemental materials

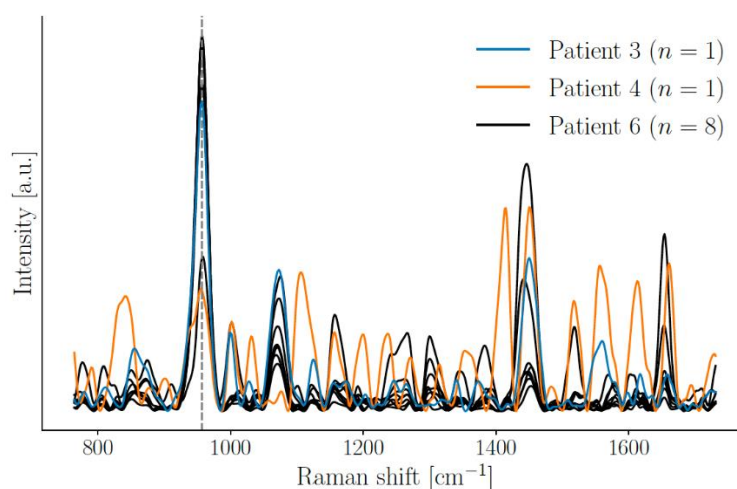


Figure 4.6 Individual spectra excluded from the study due to the presence of an artefactual peak at 957 cm^{-1} for patients 3 (blue), 4 (orange) and 6 (black).

CHAPITRE 5 ARTICLE 2: *IN SITU* RAMAN SPECTROSCOPY AND MACHINE LEARNING UNVEIL BIOMOLECULAR ALTERATIONS IN INVASIVE BREAST CANCER

Sandryne David,^{a,b} Trang Tran,^{a,b} Frédérick Dallaire,^{a,b} Guillaume Sheehy,^{a,b} Feryel Azzi^b, Dominique Trudel^{b,e,f}, Francine Tremblay^d, Atilla Omeroglu^c, Frédéric Leblond,^{a,b,e*} Sarkis Meterissian^{d*}

^aDepartment of Engineering Physics, Polytechnique Montréal, 2500 chemin de Polytechnique, Montreal, Quebec, Canada

^bCentre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

^cDepartment of Pathology, McGill University Health Center (MUHC), Montreal, Quebec, Canada

^dDepartment of Surgery, McGill University Health Center (MUHC), Montreal, Qc, Canada

^eInstitut du cancer de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

^fDepartment of Pathology and Cellular Biology, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

Publié dans
Journal of Biomedical Optics
30 mars 2023

5.1 Abstract

Significance: As many as 60% of patients with early-stage breast cancer undergo breast-conserving surgery. Of those, 20-35% need a second surgery because of incomplete resection of the lesions. A technology allowing in situ detection of cancer could reduce re-excision procedure rates and improve patient survival.

Aim: Raman spectroscopy was used to measure the spectral fingerprint of normal breast and cancer tissue ex-vivo. The aim was to build a machine learning model and to identify the biomolecular bands that allow one to detect invasive breast cancer.

Approach: The system was used to interrogate specimens from 20 patients undergoing lumpectomy, mastectomy, or breast reduction surgery. This resulted in 238 ex-vivo measurements spatially registered with standard histology classifying tissue as cancer, normal or fat. A technique based on support vector machines led to the development of predictive models and their performance was quantified using a receiver-operating-characteristic analysis.

Results: Raman spectroscopy combined with machine learning detected normal breast from ductal or lobular invasive cancer with a sensitivity of 93% and a specificity of 95%. This was achieved using a model based on only two spectral bands, including the peaks associated with C-C stretching

of proteins around 940 cm^{-1} and the symmetric ring breathing at 1004 cm^{-1} associated with phenylalanine.

Conclusions: Detection of cancer on the margins of surgically resected breast specimen is feasible with Raman spectroscopy.

Keywords: Raman spectroscopy, breast cancer, breast-conserving surgery, machine learning, tissue optics, support vector machines, biochemistry

5.2 Introduction

Breast cancer is the most diagnosed cancer worldwide. It accounted for 1 in 8 cancer diagnoses and 685,000 deaths in 2020[179], [180]. It is the leading cause of cancer mortality in women and may affect men in rare cases[179][181]. Early diagnosis and effective treatment are critical factors for survival[182]. Ductal carcinoma is the most common type of breast cancer, and it originates in epithelial cells lining the interior of the ducts that carry milk from glands to the nipple. Lobular carcinoma, the second most common breast cancer type, originates from cells within the lobules which are groups of glands connected to the duct. These carcinomas may be *in situ* or invasive[183]. *In situ* cancers have not grown into surrounding tissues, whereas invasive cancer cells have initiated molecular processes allowing them to spread beyond the tissue of origin[183]. There are two major types of *in situ* breast cancers: ductal carcinoma *in situ* and lobular carcinoma *in situ*[2].

The most common breast imaging modality is x-ray mammography, generally followed by a biopsy and an histopathology analysis to assess cancer type[184]. Adjuvant therapies are available to treat breast cancer (e.g. immunotherapy, chemotherapy) but standard of care involves surgical excision of the tumor followed by radiotherapy. Surgical options include breast-conserving surgery, mastectomy, and lymph nodes resection. Breast-conserving surgery is the recommended treatment for early-stage patients. The aim of this procedure is to excise cancer with a margin of normal tissue surrounding the tumor. For early-stage patients, long-term outcomes of breast-conserving surgery are equivalent to mastectomy if clear margins are obtained[4].

The success of breast-conserving surgery therefore involves the complete removal of malignant tissue, including a circumferential margin of normal tissue surrounding the tumor. Because the presence of cancer cells on the margin is associated with a greater risk of cancer recurrence,

specimen margins assessment by a pathologist can be required during a procedure to inform surgeons if more tissue needs to be removed. However, despite intraoperative pathological evaluation and radiological analyses, for up to 20-35% of cases positive margins are missed, resulting in the need for a second surgery[47], [185]. Re-excision procedures lead to additional costs, patient anxiety and an increased risk of post-surgical complications, highlighting the need for new intraoperative surgical guidance techniques.

Multiple emerging imaging techniques were developed for live *in situ* intra-operative breast tissue examination. Ultra-sound imaging was used to visualize structural tissue features and has proved an effective, rapid and low-cost margins assessment technique[74]. Radiofrequency spectroscopy, which is based on differences in scattering, reflectance, and absorbance, was designed for hand-held use and has shown promises for intraoperative margins detection[58]. Impedance spectroscopy imaging, which relies on detecting dielectric tissue properties, was also developed as a portable handheld imaging device allowing rapid scanning[186]. Although these techniques showed promise, breast cancer studies conducted using them showed levels of sensitivity and specificity that may limit their potential to reduce re-excision rates following breast-conserving surgery. Fiber-optics systems were also developed for intra-operative use relying on diffuse reflectance spectroscopy[62] and optical coherence tomography[187]. Other methods were used for *ex vivo* whole-specimen interrogation. Photoacoustic tomography used fat and hemoglobin as sources of contrast, leading to high-chemical selectivity but limited specificity to distinguish connective tissue and tumor[65]. Spatial frequency domain imaging identified pathology subtypes based on the optical contrast provided by elastic scattering[66] while other studies used either fluorescence lifetime imaging[75] or tissue autofluorescence combined with diffuse reflectance spectroscopy[68].

Microscopy techniques were developed for breast tissue studies with an emphasis on oncology. Those methods had a more limited field of view when compared to the *in situ* and *ex vivo* whole-specimen methods, but they were able to reveal more subtle structural and/or biochemical at high spatial resolution, with the enticing prospect to replace –or at least complement– standard histopathology analyses relying on staining techniques using dyes such as hematoxylin and eosin (H&E). A microscopic imaging approach based on ultra-violet surface excitation imaged tissue fluorophores without the requirement for tissue fixing, embedding and sectioning[188]. Light-sheet microscopy provided rapid, non-destructive, slide-free 2D and 3D imaging with the same level of

detail as standard histopathology methods[189]. Other microscopy techniques relied on non-linear optical contrast to provide high resolution molecular images [73]·[190]·[191].

Raman spectroscopy showed potential for breast cancer detection. Macroscopic inelastic scattering point measurements[136] and Raman micro-spectroscopy[106]·[192] in biopsy specimens demonstrated the technique can be used to detect cancer. Raman spectroscopy studies by our group also showed potential for *in situ* intraoperative cancer detection of other pathologies, including brain[193]·[92]·[91], ovaries[194] and prostate[96]·[195]·[87]·[196].

This work presents the results of a study that led to the acquisition of an *ex vivo* Raman spectroscopy dataset in human breast, including normal tissue and invasive ductal or lobular carcinoma. The study was designed to allow machine learning models to be developed based on the intrinsic macroscopic optical signature of multiple forms of tissue to distinguish invasive breast cancer from normal breast. The study also provided an assessment whether the classification models can shed light on specific biomolecular features of breast cancer using Raman spectroscopy, and whether the approach showed potential for surgical guidance in breast-conserving surgery to reduce re-excision procedure rates. A Raman spectroscopy single point probe system was used on fresh *ex vivo* specimens to train the cancer detection models but the intent is to use those same models for live *in situ* cancer detection during surgical procedures (Figure 1).

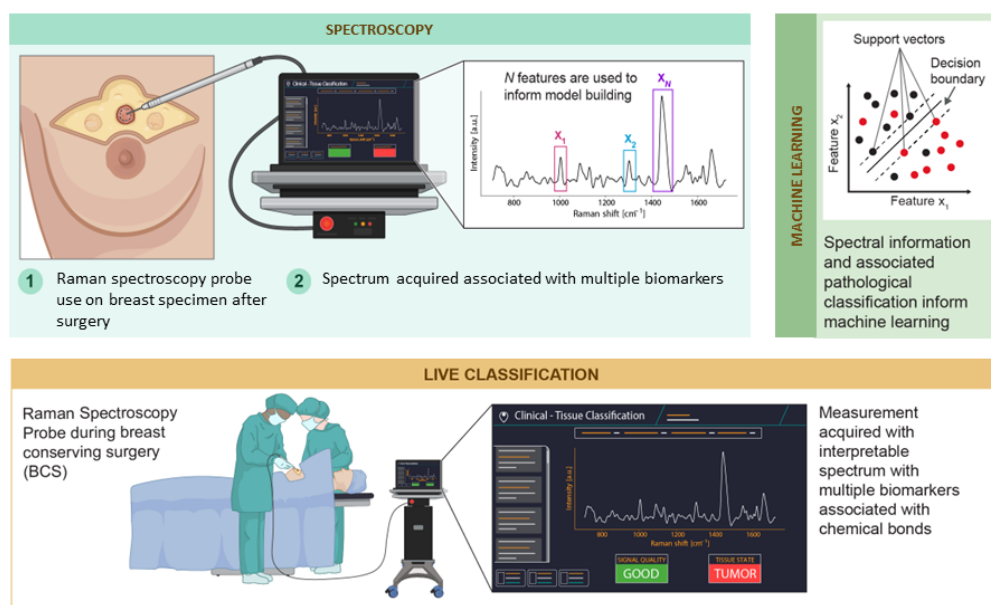


Figure 5.1 Schematic representation of the Raman spectroscopy hand-held probe workflow developed for surgical-guidance during breast-conserving surgery. *Ex vivo* spectroscopic measurements were made on breast surgery specimen to train machine learning models. The machine learning techniques selected the biomolecular spectral features with the most contrast between cancer and normal breast, and those features were used to train and test the cancer detection predictive models. The intent is to use those models for live *in situ* cancer detection during breast-conserving surgery.

5.3 Methods

5.3.1 Raman spectroscopy system

Measurements were made using an intra-operative hand-held single-point Raman spectroscopy probe system manufactured by the company Reveal Surgical (Montreal, Canada). The fiber-optics probe design of similar systems was presented elsewhere[91], [93]. Briefly, it integrates ten fiber-optics of 100 μm diameter core. Of these fibers, nine were used for light detection and a central fiber was used for tissue excitation. A band-pass filter covered the tip of the excitation fiber, allowing illumination centered around 785 nm, and a high-pass filter was used for the collection fibers. The probe was connected to a 785 nm laser and a spectrometer with high sensitivity at wavelengths ranging from 800 nm to 900 nm, with an average resolution of 1.8 cm^{-1} across the spectral detection domain. A converging lens at the tip of the probe ensured contact measurements interrogated a spot size of diameter $\sim 0.5\text{ mm}$. The system was controlled by a proprietary software (Reveal Surgical, Montreal, Canada) that allowed acquisition parameters to be set by the user, including laser power, exposure time per spectrum, and number of repeated measurements (i.e., accumulations) at each point.

5.3.2 Patients selection

About 20 patients were recruited for this study. Of those, 19 underwent breast surgery (lumpectomy or mastectomy) following a diagnosis of invasive breast cancer (lobular or ductal) and one patient underwent breast reduction surgery. For that patient, spectroscopic measurements were made from a breast in which no tumor was radiologically detectable. However, the patient was diagnosed with breast cancer associated with a tumor detected in the contralateral breast. All patients recruited in

the study were undergoing breast surgery for the first time, did not have neoadjuvant therapy, had a cancer grade inferior to 4, and had a tumor larger than 1 cm.

Patient specimens were utilized to build an *ex vivo* dataset of Raman spectroscopy measurements combined with histopathological and clinical data. Informed consent was obtained before the patient underwent surgery (McGill University Health Center Ethics Committees, approval number 2021-5997). Clinical data available included age, tumor type, tumor size and Nottingham histologic score. Patient demographic details are provided in Table 1 (see also Table 3 for demographic details on each patients). The breast reduction surgery patient was recruited with the intention to acquire more measurements in healthy tissue to ensure a more balanced dataset.

Tableau 5.1 Clinical and pathological characteristics of all patients undergoing breast surgery (std: standard deviation; NA: not available; IQR: interquartile range).

# Patient	20
Median age (years $\pm$ IQR)	67 $\pm$ 14
Type of surgery	
Breast-conserving surgery	16
Mastectomy	4
Breast reduction surgery	1
# of patients per tumor type	
Invasive ductal carcinoma	13
Invasive lobular carcinoma	3
Invasive mammary not otherwise specified (NOS)	2
No tumor	1
NA	1
Tumor size average (cm)	2.5
Nottingham histologic score # patient	
1	2
2	10
3	6
No tumor	1
NA	1

5.3.3 Specimen handling and ex-vivo spectroscopic measurements

Twenty breast specimens (one per patient) were extracted by the surgeons (either S.M. or F.T.). The specimens were weighed, measured, and marked with ink, following institutional standards. They were then cut in serial slices of ~5 mm thickness. For each specimen, two smaller samples were cut from two different slices. Those samples were selected by the pathologist (A.O.) based

on visual inspection with the objective of having one sample containing cancer cells and one sample mostly composed of healthy tissue. The samples were fixed on a cardboard support using two pins and a photograph was taken. The support was placed on a grid template and the Raman spectroscopy probe was fixed above the center of the grid (Figure 2 a)). Before each measurement, the cardboard support was moved to a different location on the template. The x - y position with respect to the lower right corner of the cardboard support was recorded for each measurement.

The laser power of the system was set at value that resulted in 100 mW being delivered to the tissue surface. The number of repeat measurements per point (accumulations) was fixed at $N = 10$ and the exposure time per spectrum ranged from 0.1 to 4 s, including dark noise (background) measurements made with the laser off. The exposure time was adjusted to ensure a raw signal intensity above 60% of the sensor dynamical range while avoiding saturation. All measurements were acquired within a one-hour timeframe after surgical excision and the size of the samples was limited to $\sim 2 \text{ cm}^2$ to preserve the integrity of the specimen and the tumor for margin evaluation, as part of the regular post-surgery clinical diagnostic workflow. The size limitation and the time constrain limited the number of independent Raman measurements to –on average– 10 per sample (i.e., 20 per patient). After spectroscopic measurements, the samples were fixed in formalin, embedded in paraffin, and sectioned in 3 to 10 microns histological sections. They were then stained with H&E as per institutional standards, resulting in one stained image for each sample.

5.3.4 Registration with optical measurements and histology labels

A four-step methodology was developed leading to spatial registration of all Raman spectroscopy measurements with corresponding locations on the H&E images using the Inkscape software (Inkscape's Contributors). First, macroscopic photographs of the breast sample on the cardboard support (Figure 2 a)) were taken. Second, the H&E images were superposed to the photograph and rotated to ensure the contours of the stained tissue sections matched as much as possible the contours seen on the photograph. Irregularities in the specimen shape were used as geometrical landmarks guiding this spatial registration process. Visible structures, including blood vessels and regions with high adipose content, were also used as tissue-based fiducial markers to ensure an accurate superposition of the photographs with the H&E images. Third, a numerical version of the registration grid was superposed to the H&E image, and it was used to pinpoint the location of every spectroscopic measurement. Fourth, each measurement location was annotated with a 3 mm

diameter circle. The size of that circle was set to be two times larger when compared to the tip of the probe, accounting for potential spatial registration inaccuracies associated with sample deformations. As exemplified in Figure 2 b), this led to images where colored circles indicated measurement locations superposed with the H&E images. Different colors were used for some of the circles to improve visualization in cases when they overlapped.

The resulting images were analyzed by pathologists (D.T., F.A.) to determine which types of cells were contained within each circled region. Cells were classified into three categories: 1. *Cancer* (tumor cells, tumor stroma or necrosis); 2. *Normal*: either normal breast (connective tissue, stroma, fibroblast, collagen) or breast parenchyma (ducts and lobules); 3. *Fat* (adipose cells). The number of cells from each category was counted and the percentage of *Cancer*, *Normal* or *Fat* cells within each circle were computed. A measurement was labelled as *Cancer* if the percentage of cancer cells was equal or superior to 80%, *Normal* if the percentage of normal cells was equal or superior to 80%, and *Fat* if the percentage of adipose cells was equal or superior to 70%. All measurements that did not fit into one of the 3 classes were excluded.

5.3.5 Data processing and labeling

The data processing steps preceding the production of machine learning models led to the extraction of the inelastic scattering signature, for each measurement, from background contributions, including intrinsic tissue fluorescence[128]. Spectral pre-processing included the following steps: 1) averaging of the $N = 10$ repeat spectra to increase overall signal-to-noise ratio, 2) averaging and subtraction of background spectra acquired with the laser turned off between measurements, 3) normalization with a NIST Raman standard (SRM 2214) to correct for the instrument response, 4) x-axis (wavenumber shift) calibration based on a Raman spectrum acquired on polycarbonate, 5) removal of background signals using the custom background removal algorithm BubbleFill[124], and 6) standard normal variate (SNV) normalization.

A quantitative quality factor metric (between 0 and 1) was then computed from each resulting spectrum. It provided a statistical assessment of the likelihood the SNV-normalized signal is associated with tissue Raman peaks or stochastic noise.[175] Spectra with a quality factor metric inferior to 0.6 were excluded as they did not always clearly show the all the ubiquitous Raman peaks encountered in biological tissue (e.g. amide bands for protein-rich tissue). All spectra were then visually inspected individually to qualitatively identify any glaring labeling errors, here mostly

based on the fact adipose tissue Raman spectra have spectral features that are dramatically different when compared to protein-rich tissue. For example, pure fat does not contain phenylalanine and as a result does not present a visually detectable peak at 1004 cm^{-1} . Spectra labeled as *Cancer* or *Normal* that were associated with clearly identifiable fat spectra were removed from the dataset, as well as spectra identified as *Fat* that did not show the expected biomolecular features associated with proteins. All remaining spectra were then plotted along with the standard deviation for each of the following groups: *Normal*, *Cancer*, *Fat*. The average spectrum associated with the normal breast measurements of the breast reduction surgery patient was also plotted against all other normal spectra and the cancer spectra (Figure 7).

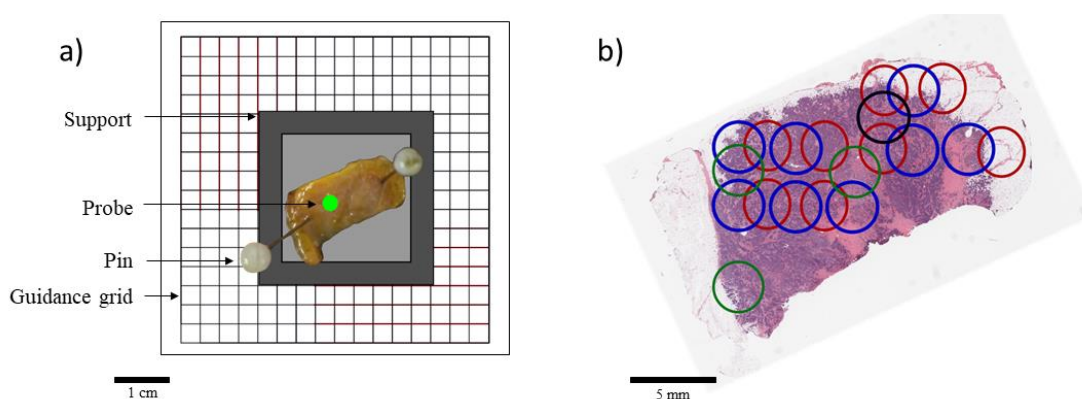


Figure 5.2 Spatial registration of Raman spectroscopy measurements with histopathology: (a) Representation of the technique where a fresh specimen was initially pinned to a cardboard support placed on a guiding template in the form of a grid. The circle superposed with the specimen represents the position of the probe above the grid. (b) End result of the methodology leading to the spatial registration of all spectroscopic measurements with an H&E-stained section. Different colors were used for some of the circles to improve visualization in cases when they overlapped.

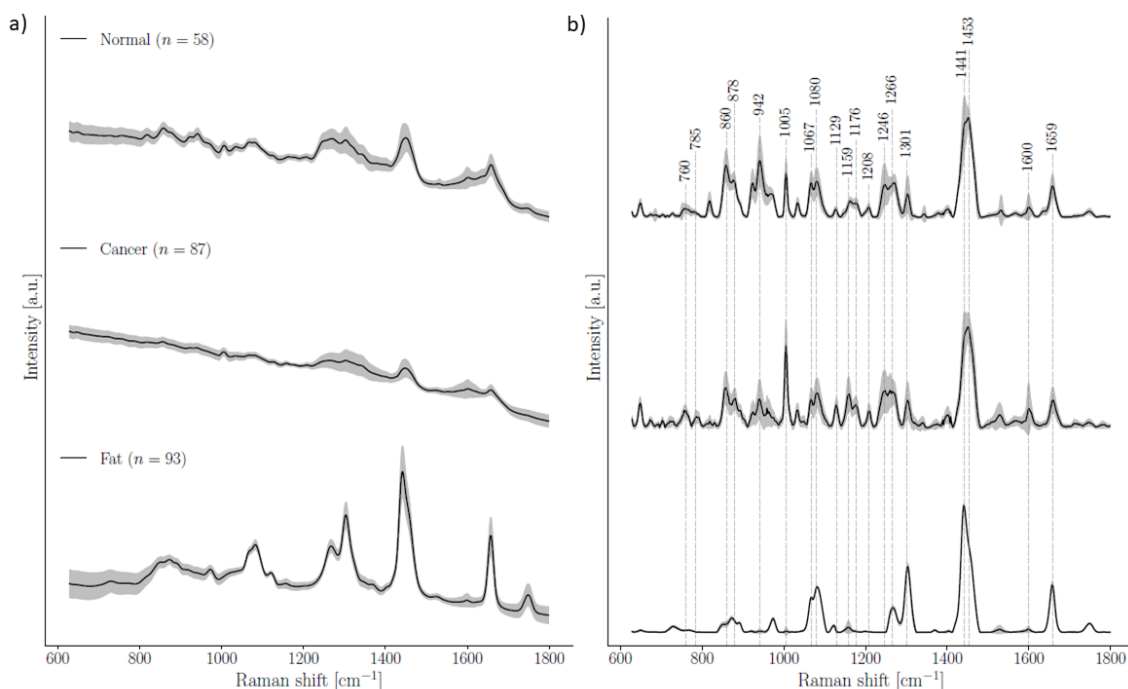


Figure 5.3 Spectra associated with *Normal*, *Cancer* and *Fat* measurements in breast tissue: a) average spectroscopic measurements (raw data) for each tissue category along with the standard deviation for each spectral bin; b) average Raman spectra and standard deviation with selected bands identified with their wavenumber value. All identified bands were used for the biochemical interpretation of the data (Table 2), and a subset of those bands was used for machine learning model development.

Tableau 5.2 Raman peaks and main corresponding vibrational bonds associated with the Raman-predicted molecular tissue content associated with the spectra in Figure 3. The bands associated with spectral features used as inputs to the classification models (Model A, Model B, Model C) are identified in the last column. A tentative molecular assignment (specific molecules and families of biomolecules) based on literature findings is shown[197]. Legend: C-H: carbon-hydrogen single bonds, C=C: carbon-carbon double bonds (unsaturated), C-C: carbon-carbon bonds, CH₂: ethyl group, CH₃: methyl group.

Peak center (cm ⁻¹)	Main vibrational modes	Tentative biomolecular assignment	Classification models
760	Ring breathing tryptophan	Proteins	-
785	cytosine; U, T, C (ring breathing modes in the DNA/RNA bases)	DNA/RNA	-

937-942	C-C stretching	Proteins (collagen)	A, B
1004	C-C stretching	Proteins (Phenylalanine, collagen)	A, B, C
1129	acyl backbone in lipid	Lipids	B
1159	C-C/C-N stretching (proteins)	Proteins	B
1176	C-H bending tyrosine, cytosine, guanine	DNA/RNA	-
1208	ring breathing modes of the DNA/RNA bases, phenylalanine	DNA/RNA, Proteins (phenylalanine, Amide III)	-
1246, 1266	Amide III	Proteins	-
1301-1304	C-H vibration	Lipids	C
1600	C=C	Proteins (Phenylalanine)	-

5.3.6 Machine learning workflow

A machine learning workflow was applied to develop three different models: *Cancer vs. Normal + Fat* (model A), *Cancer vs. Normal* (model B) and *Cancer vs. Fat* (model C). Due to the small size of the dataset and to minimize the risk of over-fitting the data, the first step of the machine learning workflow consisted of dimensionally reducing the number of features per spectra to <10 for each model. This dimensional reduction procedure was done using a linear support vector machine (SVM) with a regularization by Lasso regression, in which individual statistical weights were assigned to each feature. This statistical weight acted as a surrogate for feature relevance, in effect quantifying the ability of each feature to capture inter-class variations and allowed less important bands to be discarded[176][177]. Features were then ranked according to their weight and boxplots were produced to show the statistical distribution of spectral intensity for all features that were retained to produce the machine learning models (Table 2, Figure 5).

The classification models training process involved SVM with a linear kernel and a regularization parameter C . This hyperparameter, that varied between 10^{-3} and 1, controlled the penalty for errors in the training process and reduced the risk of overfitting the data. The SVM algorithm also considered the class imbalance for all datasets by setting a higher cost γ to misclassified spectra from the least populated class[177]. A grid search method was used to optimize both hyperparameters C and γ , and a five-fold cross-validation procedure was performed to assess classification performances. The five-fold cross validation took the training dataset and randomly split it in five equal-size groups. Then, five models were created with the same hyperparameters.

Each model was trained on four groups and tested on the remaining one. The average of the performance of the five classifiers performance was used to assess predictive performance[131]. During the cross-validation phase, data from the same patient were never used in both the training and testing sets.

The technique returned, for each measurement, a posterior probability $0 \leq p \leq 1$ that a measurement was classified within one of two classes. A receiver-operating-characteristic (ROC) curve was computed by comparing this posterior probability p with a parameter λ ($0 \leq \lambda \leq 1$). All observations associated by the classifier were assigned the label 1 when $p \geq \lambda$ or assigned the label 0 if otherwise. Different values of the parameter λ corresponded to different points of the ROC curve. Sensitivity and specificity were computed by comparing the label assigned by the model to the label given by the histopathology analysis for every measurement. Results were reported for the optimized hyperparameters only, yielding the highest area-under-curve (AUC) value. The final optimized model, with reported accuracy, sensitivity, and specificity, corresponded to the ROC curve point with the smallest distance to the upper left corner of the curve (x-axis: 1 – specificity, y-axis: sensitivity).

5.4 Results

5.4.1 Spectroscopic measurements

Application of the Raman spectroscopy measurement protocol resulted in 388 spectroscopic measurements with co-located histopathology analyses. Of those, 58 spectra were excluded because of visibly low spectral quality, non-tissue-related artifacts (e.g. from residual ambient light, Raman peaks from the cardboard substrate) or a quality factor lower than 0.6. Moreover, 58 measurements were excluded because they did not qualify for association with either the *Normal*, *Cancer* or *Fat* categories. Further, 34 spectra were excluded due to suspected labeling errors based on visual inspection comparing measured spectra with the known Raman signature of adipose tissue. Of those, 28 that were labeled as *Normal*, or *Cancer* were excluded because the spectra were identical to fat spectra. The remaining six spectra, that were labeled as *Fat*, were excluded because they showed clearly visible spectral features associated with protein-rich tissue. The final dataset was composed of 238 measurements: 58 were labeled as *Normal*, 87 as *Cancer* and 93 as *Fat*. The raw and processed average measurements for each tissue category, along with the signal variance

associated with each spectral bin, are shown in Fig. 3a) and Fig. 3b), respectively. Selected bands of interest are identified in Fig. 3b) and their biochemical interpretation is provided in Table 2.

5.4.2 Machine learning models and biomolecular predictions

A classification model (Model A) was trained to distinguish between the *Cancer* and non-cancer (*Fat* + *Normal*) spectra, from 238 measurements (87 *Cancer* spectra, 58 *Normal* spectra and 93 *Fat* spectra). This yielded an accuracy of 94%, a sensitivity of 93% and a specificity of 95%. The ROC curve for this model is shown in Figure 4 a) and it is associated with an AUC of 0.98. These results were achieved using a model trained using only two spectral features, namely the peaks mostly associated with C-C stretching of proteins around 940 cm^{-1} and the symmetric aromatic ring breathing at 1004 cm^{-1} that is associated with the presence of phenylalanine. A classification model (Model B) was also trained to distinguish *Cancer* from *Normal* spectra from 145 measurements (87 *Cancer* spectra and 58 *Normal* spectra). This model had an accuracy of 91%, a sensitivity of 92%, a specificity of 90% and an AUC of 0.96 based on 4 spectral features (Figure 4 b)). Those features corresponded to the same features as Model A, plus a peak associated with C-C skeletal stretching from proteins, lipids and carbohydrates (1129 cm^{-1}) and a band around 1157 cm^{-1} associated with C-C/C-N skeletal stretching from proteins. Model C was developed to detect *Cancer* from *Fat* based on 180 Raman measurements (87 *Cancer* spectra and 93 *Fat* spectra). It performed with an accuracy of 98%, a sensitivity 97% and a specificity 98%, with an AUC of almost 1 (Figure 4 c)). This model required two spectral features, namely the 1004 cm^{-1} peak and the CH_2/CH_3 twisting deformation band at $1301\text{-}1304\text{ cm}^{-1}$.

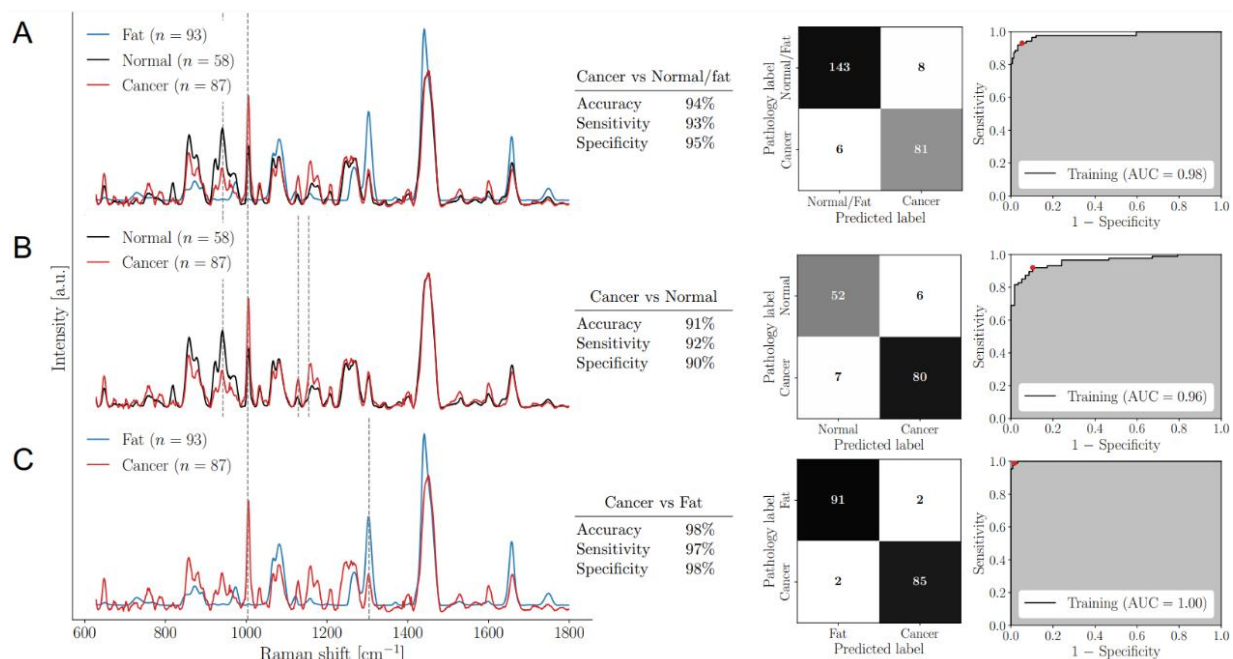


Figure 5.4 Average Raman spectra and spectral features (dotted lines) used by the classification models. Classification results are expressed in term of accuracy, sensitivity, and specificity. Confusion matrices and receiver operating characteristic (ROC) curves are also shown for the three models: Model A: *Cancer* vs. non-cancer (*Normal* + *Fat*); Model B: *Cancer* vs. *Normal*, and Model C: *Cancer* vs. *Fat*.

The spectral features that were used by the machine learning models are shown in Table 2 along with their associated vibrational bonds and a tentative assignment with biomolecules based on the literature. Figure 5 shows the statistical distribution of these bands in the form of boxplots. The median (second quartile, Q2), first quartile (Q1) and third quartile (Q3) were clearly distinct for the two features used in model A (940 cm^{-1} and 1004 cm^{-1}). Q1, Q2 and Q3 were also well separated for *Cancer* and *Normal* tissue features associated with model B (940 cm^{-1} , 1004 cm^{-1} , 1129 cm^{-1} and 1155 cm^{-1}) as well as for *Cancer* and *Fat* for the features used in model C (1004 cm^{-1} and 1304 cm^{-1}).

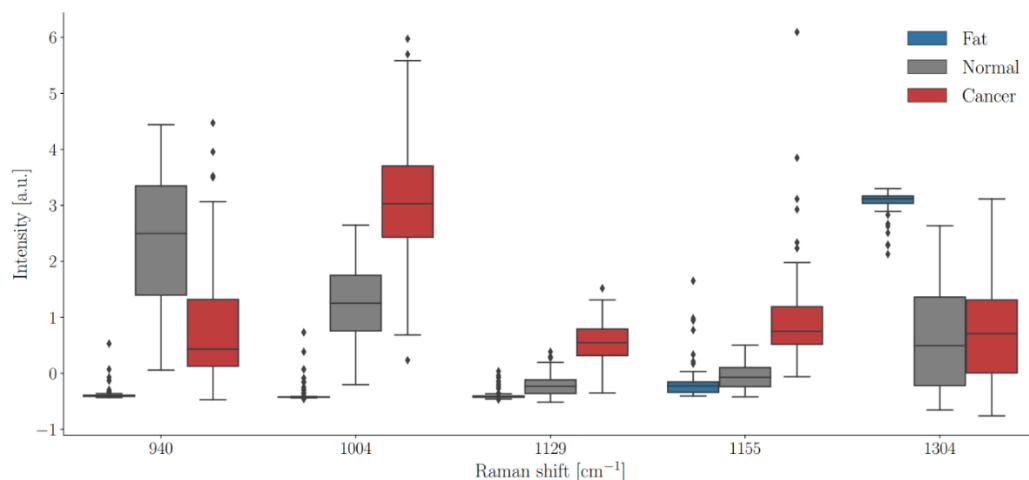


Figure 5.5 Statistical distribution of the intensity of the five features used by classification models for *Fat*, *Normal* and *Cancer* spectra. Model A (*Cancer* vs. *Normal* + *Fat*) used features associated with bands at 940 cm^{-1} and 1004 cm^{-1} , Model B (*Cancer* vs. *Normal*) used bands at 940 cm^{-1} , 1004 cm^{-1} , 1129 cm^{-1} and 1155 cm^{-1} and Model C (*Cancer* vs. *Fat*) used bands at 1004 cm^{-1} and 1304 cm^{-1} . Outliers are represented by black diamonds.

A fourth model was trained to distinguish *Fat* from all other tissue types (*Normal* + *Cancer*) from 238 spectra (Figure 6), resulting in an almost perfect AUC of 1 with specificity and sensitivity >98% (Figure 8). This model was used to test whether the exclusion criteria leading to the rejection of suspected mis-labeled samples (28 labeled as *Normal* or *Cancer*, 6 spectra labeled as *Fat*) was justified. The model was directly applied to those 34 spectra and predicted, in all cases, that the histology labels were inconsistent with the measured Raman signature. Specifically, the model predicted that all 28 *Normal* or *Cancer* spectra were actually *Fat*, and that all 6 *Fat* spectra were actually *Normal* or *Cancer*.

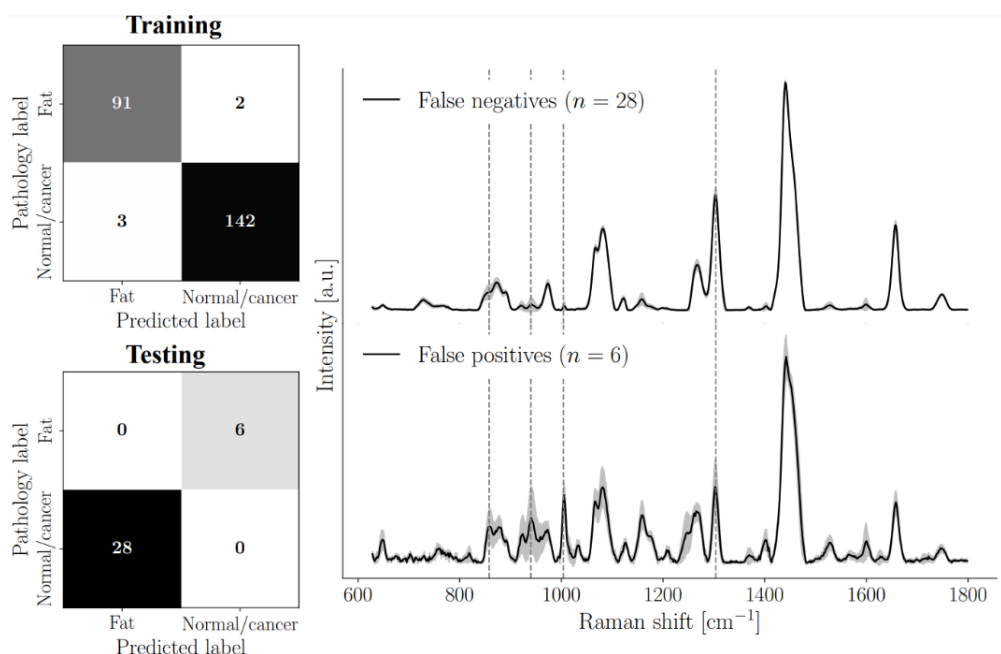


Figure 5.6 A *Fat* detection classifier was trained from 238 spectra. It was applied on the 34 spectra that were excluded from the study because of suspected mis-labeling likely associated with spatial registration errors of Raman spectroscopy measurements with the H&E images: the 28 spectra that were labeled as *Normal* or *Cancer* were all classified as *Fat* (false negatives) and the 6 spectra that were labeled as *Fat* were classified as *Normal* or *Cancer* (false positives).

In this study, more than 30% of all *Normal* measurements were associated with the breast conserving surgery patient, which could have led to classification biases. However, Figure 7 qualitatively shows that the average normal spectrum from the breast conserving surgery patient ($n = 18$ spectra) was similar to the average spectrum associated to all other normal spectra in the dataset ($n = 40$). More importantly, the average spectra associated with the *Normal* category matched perfectly for the Raman bands used to train Models A, B and C (Table 2), providing strong evidence no bias resulted from including a larger proportion of *Normal* measurements from the same patient.

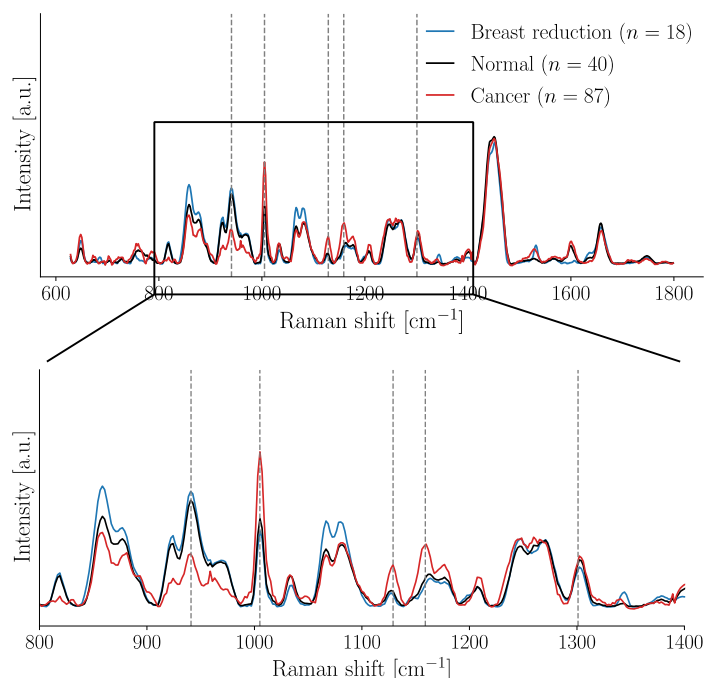


Figure 5.7 Raman spectra associated with the *Normal* category from the breast reduction surgery patient, compared to all other *Normal* measurements. Cancer spectra are also shown for visual comparison. The four features used in the classification models are identified with dotted lines.

5.5 Discussion

This work demonstrated that it is possible to develop low complexity machine learning models with the ability to distinguish invasive breast cancer from healthy tissue. Here, the term *low complexity* means that all machine learning models were trained using only a few spectral features, each associated with known biomolecular vibrational modes. The resulting models are thus easily interpretable, a trait that could lower barriers to clinical adoption. This is important since the use of a small number of features reduces the burden imposed by the requirement for large datasets, a common issue encountered in biomedical applications of machine learning. Indeed, the confidence in estimated model performances achieved through cross-validation approaches is always higher when the number of features used during the model training phase is significantly smaller when compared to the number of training instances. In this work, 238 measurements from 20 patients were available for predictive modeling, and <5 spectral bands were used. This meant that the number of data types used for learning was lower than 5%, therefore much smaller than rule-of-thumb values recommended in machine learning, i.e., usually around 20-25%.

Another important aspect of this work was that significant efforts were made to ensure the trends associated with all retained Raman spectral features reflected –with high confidence– the actual nature of the tissue. This was achieved by ensuring model training and validation were done only using Raman measurements associated with high spectral quality and for which the spatial registration with histology analysis could be trusted. In fact, data selection was done to mitigate the limited reliability associated with the gold standard of histology used to assign labels to each measurement.

For those data points excluded from the machine learning model development process, the registration of the Raman measurements with the H&E-stained images resulted in labeling errors when assigning spectra to either the *Cancer*, *Normal* or *Fat* category. One cause of error was the change in shape between the specimen photograph and the H&E-stained image of the corresponding tissue section. The samples were compressed and rotated before being processed and stained, which sometimes made superposing the photograph with the H&E images difficult. Also, the specimen thickness was 1 cm or more and was sectioned in a 3 to 5 microns section before staining. Therefore, the surface on which the Raman measurements were acquired could be different than that located on the stained tissue sections. This source of inaccuracy was mitigated by having the location of each measurement marked on the H&E-stained image by a 3 mm diameter area that was significantly larger than the tissue area sampled with the Raman spectroscopy probe. Data points where the number of cells from the same category was too low (cancer: < 80%, normal: < 80% and fat: < 70%) within this 3 mm diameter area were also excluded. A more reliable spatial registration method between the gold standard of histology and the measurements would highly reduce the number of non-usable spectra that needed to be excluded in this study.

Using well-justified data point rejection criteria led to a smaller dataset, albeit associated with spectra having low inter-patient and intra-specimen variance. This allowed a clear biomolecular interpretation of the key Raman-predicted biomolecular differentiators between healthy and cancer tissue. The only feature present in all three models was the 1004 cm^{-1} peak corresponding to the aromatic amino acid phenylalanine. Other groups such as Zuniga et al. also obtained a sharp peak at the same Raman shift in breast cancer tissue[198]. Compared to normal and adipose tissues, cancerous tissues had an increase of intensity at the phenylalanine peak. This was also confirmed by the increase of the peak at 1600 cm^{-1} which could also be associated with phenylalanine (Figure 4 b)). Gebrekidan et al. and Contorno et al. also found similar results of higher content in

phenylalanine in breast tumor tissues[126], [199]. They hypothesized that this increase could be caused by the fact phenylalanine is the precursor of substances with mutagenic, genotoxic, and carcinogenic properties and that overexpression may be suggestive of the cancer pathogenesis.

The DNA/RNA peaks at 785 cm^{-1} , 1176 cm^{-1} , 1208 cm^{-1} , and the proteins peaks at 760 cm^{-1} , 1159 cm^{-1} were higher in breast tumor tissue. Many studies have confirmed genetic alterations in breast cancer disease[200][201]. Specifically, the peaks at 785 cm^{-1} and 1176 cm^{-1} correspond to vibrational modes of cytosine and several studies have found the implication of spontaneous and enzyme-catalyzed deamination of DNA cytosine bases [202]. Similar findings of enhanced peaks of Amide III (peaks at 1246 cm^{-1} and 1266 cm^{-1}) have been reported in a study by Liu et al.[203]. Interestingly, Bitar et al.[204] found that there were differences in the secondary structure of proteins of breast tissues that could differentiate subtypes of malignant lesions. In addition, they found that collagen content could be used to quantify the degree of pathogenicity of breast cancer.

The two peaks at 1129 cm^{-1} and 1301 cm^{-1} corresponding to lipids were also enhanced in the breast cancer tissues compare to breast normal tissues. However, during the past years, our laboratory work in other pathologies has shown that most tumors have a lower intensity for peaks associated with lipids compared to normal tissues[96][205]. Lipid metabolism in tumor cells has been widely studied, their biosynthesis is tightly related to signaling pathway. Li et al found a decrease in lipids and have suggested that tumors share a common phenotype of uncontrolled cell proliferation and, therefore, they consume large amounts of lipids[206]. However, more recent studies have found a specific type of increase in lipids in breast tumor tissues: the unsaturated fatty acid. In 2016, Sixian You et al. observed an increase of polyunsaturated fatty acids in the human breast cancer tissues[207]. Brozek-Pluska et al. (2019) also confirms the poly unsaturated fatty acid important increase in these malignant tissues[208]. They have cautioned that disturbed ratio content of unsaturated and saturated lipids seems to be the marker of pathogenesis and not only the increase of polysaturated fatty acid. Further investigations would be needed to determine the different Raman spectra of polyunsaturated and monosaturated fatty acids composition in breast cancer.

Another tentative hypothesis is that while the band at 1129 cm^{-1} is solely associated with lipids, the band of 1128 cm^{-1} is however assigned to C-N stretching (proteins), C-O stretching (carbohydrates), and lipid transconformation. The contribution of proteins in cancer tissues adding to the presence of carbohydrates of the 1128 cm^{-1} band might have contributed to the upshifting of

1129 cm^{-1} . All in all, lipids band assignments should be taken cautiously in breast cancer tissues. While there are contradictory findings about the increase or decrease of lipids in literature and among Raman spectroscopy work in breast cancer, the future work should be focusing on clarifying the roles of the lipids contribution in its malignancy. One way to do it would be to study the lipid phenotype of breast cancer cells and its metastatic spread. For example, Nieva et al.[209] reported in 2014 the ability of Raman micro-spectroscopy to achieve rapid lipid profiling of breast cancer cells and therefore, distinguish metastatic ability from malignancy.

The intended use of the Raman spectroscopy system presented in this study is live surgical guidance during breast-conserving surgery. However, the measurement times that were reported ranged from 1 s to 40 s for $N = 10$ repeat measurements. Such large tissue interrogation times could impact practical use during surgical procedures. However, the data pre-processing and machine learning workflow used to produce the predictive models were re-applied on the subset of measurements associated with $N = 5$ and $N = 1$ accumulations, to assess potential degradation in performance associated with limited interrogation times. Interestingly, the accuracy and AUC of the ROC curve for those new models were essentially unchanged for $N = 5$, and they were associated with limited changes for $N = 1$. For example, for $N = 1$ the accuracy and AUC of the *Cancer* versus *Normal* model was 88% and 0.89, compared to 91% and 0.97 for $N = 10$. This implies that high levels of predictive accuracy could still be reached when lowering the range of measurement times to 0.1 to 4s rather than 1 to 40s.

Other practical concerns relate with the maximal permissible exposure (MPE) to tissue as set by ANSI standards for research laboratory laser safety[85]. The MPE for skin is 1.6 W/cm^2 for a single pulse of duration $<10\text{s}$, and 0.3 W/cm^2 for a pulse duration $>10\text{s}$. The measurements in this work led to energy densities of 50 W/cm^2 for $N = 10$, or 5 W/cm^2 for $N = 1$. For practical intra-operative use, reducing the number of accumulations to $N = 1$ would thus bring the delivered light dosage to a maximum of 5 W/cm^2 , i.e., close to the skin MPE value of 1.6 W/cm^2 . It should be noted that those MPE values do not correspond to absolute thresholds beyond which damage to tissue will necessarily result. For example, none of the specimens in which Raman spectroscopy measurements were made presented morphological alterations (as assessed based on histology analyses) suggestive of heat-generated tissue damage. Future clinical applications using Raman spectroscopy in breast-conserving surgery will require detailed analyses to be done to determine

acceptable photo-diagnostic levels, which will likely be significantly larger than the current MPE values set for skin.

Although the results presented here are very promising, work needs to be done to bring Raman spectroscopy in operating rooms for breast-conserving surgery guidance. For example, single-point measurements may not provide information sufficiently rapidly for surgeons to influence intraoperative decisions. This is because inspection of surgical cavities with large surface areas are expected in most cases, making successive single points of millimeter-sized areas unlikely to make the approach clinically deployable. To solve this problem, our group developed a handheld macroscopic Raman spectroscopy imaging instrument, specifically adapted for surgical guidance applications in breast oncology[210], [211] This system demonstrated hyperspectral detection of the fingerprint Raman signal over an area of 1 cm^2 , and classification model transferability across different biomedical Raman spectroscopy instruments was demonstrated, included with the Raman imaging system and the single-point probes[96]. In the future, the classification models built in this study will therefore be used with the Raman imaging system for further studies in breast cancer[211].

5.6 Appendix: Supplemental Material

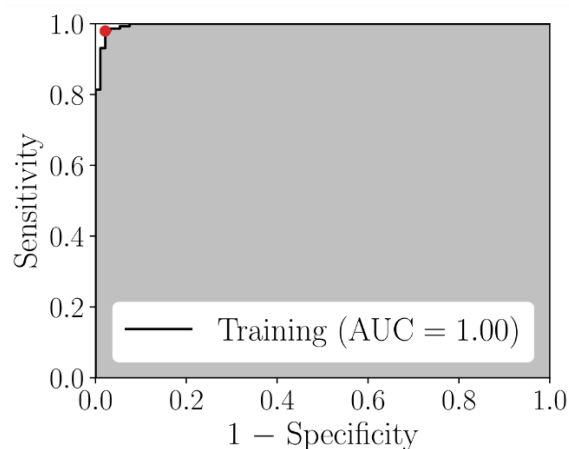


Figure 5.8 ROC curve for the fat detection model.

Tableau 5.3 Demographic and clinical information of the 20 patients included in the study.

Age	Surgery type	Tumor size (cm)	Invasive cancer type	NoS	Tissue type (before data selection)
-----	--------------	-----------------	----------------------	-----	-------------------------------------

55	Partial Mastectomy	2.1	Ductal	3	Fat (7) Cancer (6)
52	Partial Mastectomy	1.2	Ductal	2	Fat (8)
82	Partial Mastectomy	2.1	Ductal	2	Fat (8) Cancer (14)
77	Partial Mastectomy	2.2	Ductal	1	Fat (2) Cancer (16) Normal (4)
67	Partial Mastectomy	2.2	Mammary	3	Fat (8) Cancer (14)
77	Mastectomy	4 and 1	Lobular	2	Fat (6) Cancer (8)
60	Lumpectomy	2.8	Ductal	3	Fat (1) Cancer (8) Normal (8)
50	Mastectomy	3 and 2	Ductal	3	Fat (15) Cancer (16) Normal (10)
60	Lumpectomy	1.6	Ductal	2	Fat (6) Cancer (7)
67	Mastectomy	1	Ductal	1	Fat (1) Cancer (2) Normal (2)
61	Lumpectomy	NA	NA	NA	Fat (12) Cancer (10)
76	Needle Localized Lumpectomy	1.3	Ductal	2	Cancer (6)
56	Mastectomy	NA	Mammary	2	Fat (1) Cancer (11) Normal (9)
78	Mastectomy	2 and 1.5	Lobular	2	Fat (4) Cancer (5) Normal (1)
67	Segmental Mastectomy	1.1	Ductal	2	Fat (6) Cancer (3)
68	Segmental Mastectomy	3.2	Ductal	3	Fat (5) Cancer (9)
70	Lumpectomy	3	Ductal	2	Fat (3) Cancer (5) Normal (25)
58	Lumpectomy	2.2	Lobular	3	Fat (4) Cancer (2)
54	Lumpectomy	1 cm	Ductal	2	Fat (3) Cancer (5) Normal (1)
NA	Breast reduction	Absent	Absent	NA	Fat (2) Normal (20)

5.7 Acknowledgments

This work is supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) Alliance grant program, Reveal Surgical, the NSERC Discovery Grant program and the TransMedTech Institute. SD was supported by NSERC. DT receives salary support from the FRQS (Clinical Research Scholar, Junior 2). The CRCHUM receives support from the FRQS. Access to Dr. Feryel Azzi's expertise is possible thanks to the TransMedTech Institute and its primary funding partner, the Canada First Research Excellence Fund.

5.8 Conflict of Interest

Frederic Leblond is co-founder of ODS Medical (now Reveal Surgical) formed in 2015 to commercialize a Raman spectroscopy system for neurosurgical and prostate surgery applications. He has ownership and patents in the company.

5.9 Code, Data and Materials Availability

The data and materials information that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

CHAPITRE 6 ARTICLE 3: MACROSCOPIC INELASTIC SCATTERING IMAGING USING A HYPERSPECTRAL LINE- SCANNING SYSTEM IDENTIFIES INVASIVE BREAST CANCER IN LUMPECTOMY AND MASTECTOMY SPECIMENS

Sandryne David,^{a,b} Hugo Tavera^{a,b} Trang, Tran^{a,b}, Frédérick Dallaire,^{a,b} François Daoust,^{a,b}, Francine Tremblay^d, Lara Richer^c, Sarkis Meterissian,^{d*} Frédéric Leblond,^{a,b,e*}

^aDepartment of Engineering Physics, Polytechnique Montréal, 2500 chemin de Polytechnique, Montreal, Quebec, Canada

^bCentre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

^cDepartment of Pathology, McGill University Health Center (MUHC), Montreal, Quebec, Canada

^dDepartment of Surgery, McGill University Health Center (MUHC), Montreal, Quebec, Canada

^eInstitut du cancer de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

**Soumis dans
Journal of Biomedical Optics
08 novembre 2023**

6.1 Abstract

Significance: As many as 75% of patients with early-stage breast cancer undergo breast-conserving surgery. Of those, 20-35% need a second surgery because of incomplete tumor resection only discovered days after surgery. An intraoperative imaging technology allowing cancer detection on the margins of breast specimens could reduce re-excision procedure rates and improve patient survival.

Aim: To develop an experimental protocol using hyperspectral line-scanning Raman spectroscopy to image fresh breast specimens from cancer patients. The objective of the study was to determine whether macroscopic specimen images could be produced to distinguish invasive breast cancer from normal tissue structures.

Approach: The hyperspectral inelastic scattering imaging instrument was used to interrogate 8 specimens from 6 patients undergoing breast cancer surgery. Machine learning models trained with a different system (David et al., JBO, 28, 3, 036009-036009 [2023]) to distinguish cancer from normal breast structures were used to produce tissue maps with a field-of-view of 1 centimeter-squared classifying each pixel as either cancer, adipose or other normal structures. The predictive model results were directly compared with spatially correlated histology maps of the specimens.

Results: Four of the hyperspectral images interrogated specimens associated with areas containing cancer cells that were correctly identified by the new ex vivo pathology technique. The images associated with the remaining four specimens had no histologically detectable cancer cells and this was also correctly predicted by the instrument.

Conclusions: This study showed the potential of hyperspectral Raman imaging as a new intraoperative breast cancer margin assessment that could help surgeons improve cosmesis and reduce the number of breast cancer surgery repeat procedures.

Keywords: Raman spectroscopy, breast cancer, breast-conserving surgery, machine learning, biomedical imaging, tissue optics, support vector machines, biochemistry

6.2 Introduction

Breast cancer is the most diagnosed cancer worldwide and the deadliest cancer in women[179]. The most common breast cancer types are ductal carcinoma (“no special type”) and lobular carcinoma. Ductal carcinoma originates in epithelial cells of the ducts carrying milk in the breast while lobular carcinoma originates from cells of the lobules that constitute the glands producing milk. Both of these carcinomas can be *in situ* or invasive [183]. *In situ* cancers are still contained in their structure of origin, while invasive cancer cells have spread into surrounding tissues[183]. Mucinous carcinoma is a rare type of invasive breast cancer which account for 2% of all breast carcinoma and is characterized by neoplastic epithelial cells floating within extracellular mucin[212]. Regardless of the cancer histotype the standard of care involves surgical excision of the tumor followed by radiotherapy. Surgical options include breast-conserving surgery also known as lumpectomy, mastectomy (complete ablation of the breast), and the resection of lymph nodes. Breast-conserving surgery presents the advantage of minimizing the change in appearance of the breast and the risk of complications while having the same long-time survival rate as mastectomy for patients having a tumor under 2 cm (largest dimension of the tumor)[3], [4], [32]. The success of breast conserving surgery is defined as the complete removal of the lesional breast tissue with a surrounding margin of normal tissue[36]. Since a positive margin (i.e., cancer cells on the surface of the surgical specimen) is associated with a higher risk of cancer recurrence, extended tissue resection is required when positive margins are detected[9]. This is important because 20-40% of all breast-conserving surgery procedures result in margins with residual

disease[213]. Because the definitive margin status is only assessed post-operatively, patients with positive margins require a second operation which leads to additional costs, patient anxiety, and an increased risk of post-surgical complications. In the United States alone, there are 26,550 re-excisions annually, costing approximately \$125M [54].

A limited number of methods were tested for *in vivo* breast tissue assessment. Ultrasound imaging was used intraoperatively but is limited in sensitivity due to a lack of molecular specificity[9], [42]. The Margin Probe from Dune Medical, which relies on electrical impedance measurements, is the only other *in vivo* imaging method that is FDA-approved. However, both its sensitivity and specificity are low at only around 70%[214]. Fluorescence imaging was also tested *in vivo* with indocyanine green (ICG), resulting in a specificity of 60%. The use of LUM015 (Lumicell, MA, USA), a protease-activatable fluorescent agent, resulted in a cancer detection specificity of 73 % [11], [12].

To increase sensitivity and molecular specificity, optical methods have also been developed to for *ex vivo* specimen interrogation. Whole-specimen optical imaging techniques include photoacoustic, acousto-optics, spatial frequency domain imaging (SFDI) [65][66], X-ray[59] and fluorescence imaging [68][75]. Single-point and microscopic optical imaging methods include elastic scattering and diffuse reflectance spectroscopy [62], bio-impedance spectroscopy[186], microscopy with ultraviolet (UV) surface excitation (MUSE) [188], light-sheet microscopy [189], non-linear microscopy [73][190][191], optical coherence tomography [187] and Raman spectroscopy (RS) [109], [111], [112], [115], [215]. However, these methods are limited by prohibitive imaging times or small surfaces of detection.

Our group previously published a paper on the use of a Raman spectroscopy point probe system to detect invasive breast cancer *ex vivo*[216]. The system was used to interrogate fresh surgical specimens from 20 patients undergoing breast-conserving surgery, mastectomy or breast reduction surgery. This resulted in 238 measurements spatially registered with standard histology classifying tissue as *Cancer*, *Normal*, or *Fat*. A technique based on support vector machines (SVM) led to the development of predictive models, and their performance was quantified using a receiver-operating-characteristic (ROC) analysis. Our technology was able to detect invasive breast cancer with a sensitivity of 93% and a specificity of 95%, showing the feasibility of detection of cancer using Raman spectroscopy. The classification model used a limited number of spectral features,

emphasizing the importance of the protein band at 940 cm^{-1} and the phenylalanine band at 1004 cm^{-1} for breast cancer detection.

However, Raman spectroscopy technologies have several hurdles to overcome before being integrated for real-world use to guide breast-conserving surgery. In particular, the field of view (FOV) of the probe system was limited to 500 micrometers, which is incompatible with specimen margin assessment within clinically relevant timeframes. Our research group then developed a Raman imaging system to address this issue. The instrument has the same spectral domain and resolution as the probe with a FOV in the form of square with sides of 1 centimeter. The system is a line-scanning device collecting hyperspectral data over 42×40 pixels, resulting in 1,680 spectra per image. Our group demonstrated the system's ability to detect margins between different tissue types in biological material, showing its potential for intraoperative machine-learning-based molecular tissue margins characterization[210], [211]. The system is flexible and can either be used *in vivo* or *ex vivo* for specimen analyses.

This work presents the results of a study that led to the acquisition of *ex vivo* Raman imaging datasets of human breast specimens, including normal tissue and invasive cancer. The dataset was acquired with the hyperspectral line-scanning Raman system. This study used the machine learning classification models developed in the previous study with the single-point probe to detect invasive breast carcinoma. The point probe models were directly applied to each pixel of the imaging system to form images. This study assesses whether Raman hyperspectral imaging can detect specific biomolecular features of breast cancer, and whether the approach has potential for surgical guidance in breast-conserving surgery to reduce re-excision procedure rates.

6.3 Methods

6.3.1 Raman spectroscopy system

Measurements were made using a macroscopic Raman spectroscopy imaging system for which details were provided elsewhere[210]. Briefly, the excitation branch of the Raman line scanning system was composed of a laser centered at 785 nm providing a line-shaped laser excitation and a white light source with illumination between 400 and 700 nm. The laser and the white light source were conveyed through an excitation fiber bundle onto the sample. The Raman signal and the reflected white light were collected by the collection fiber bundle and separated by a dichroic

mirror through a galvanometer-based system designed for scanning the tissue surface. An imaging spectrometer generated hyperspectral Raman images and a RGB (red-green-blue) camera was used to collect the white light images. The spatial resolution of the hyperspectral images was 250 μm and the spectral resolution was 6 cm^{-1} . The Raman spectra were acquired in the fingerprint region from 400 to 1900 cm^{-1} . The measurements were made in non-contact mode at a working distance of 40 mm from the specimen. The field-of-view (FOV) of both the Raman hyperspectral images and the white light images was 1 cm^2 . The system was controlled using a custom software that allowed acquisition parameters to be set by the user, including laser power, exposure time per line, and number of repeated measurements for each image[210].

6.3.2 Patients selection

Six patients who underwent breast surgery (lumpectomy or mastectomy) following a diagnosis of invasive breast carcinoma (ductal or mucinous) were recruited for this study. All patients recruited in the study were women undergoing breast surgery for the first time. The patients had not received neoadjuvant therapy and had a cancer grade inferior to 4.

Fresh patient specimens were utilized to build an *ex vivo* dataset of Raman hyperspectral images combined with histopathological and clinical data. Informed consent was obtained before each patient underwent surgery (McGill University Health Center Ethics Committees, approval number 2021-7940). Clinical data available included age, tumor type, and tumor size. Patient demographic details are provided in Table 1 (see also Table 2 for demographic details for each patient). Each tumor size was characterized by its largest dimension measured by the pathologist at the time of intraoperative consultation.

Tableau 6.1 Clinical and pathological characteristics of all patients undergoing breast surgery.

# Patient	6
Type of surgery	
Breast-conserving surgery	4
Mastectomy	2
# of patients per tumor type	
Invasive ductal carcinoma	5
Invasive mucinous carcinoma	1
Tumor size average (standard deviation)	2.4 cm (0.9 cm)

6.3.3 Specimen handling and ex vivo spectroscopic measurements

Six breast specimens (one per patient) were extracted by the surgeons (either S.M. or F.T.) were labeled P1 to P6. For two of the patients, two samples were images (labeled S1 and S2), resulting in 8 samples being analyzed. The specimens were weighed, measured, inked, and sliced into 5 mm sections, as per institutional protocols.

Raman imaging measurements and spatial registration with histology were made based on two methods, depending on the size of the tumor. One method was used for the cases where the largest dimension of tumor, measured *ex vivo* by the pathologist, was superior to one centimeter. For those cases, it was possible to cut the specimen without compromising the microscopic margin evaluation and the regular post-surgery clinical diagnostic workflow. A second method was used in cases where the largest dimension of the tumor was inferior to one centimeter. A different method was then required since the specimen slices could not be cut without compromising the diagnosis.

For tumors larger than 1 cm, one or two samples were cut from different slices (Fig. 1a). Those samples were selected by the pathologist (L.R.) based on visual inspection with the objective of having, whenever possible, cancer, fat, and normal breast tissue for each patient. The samples were placed on a black-coated aluminum sheet disposed on an expanded polystyrene (EPS) foam sheet. The orientation of the sample relative to the margins of the specimen (superior, inferior, posterior, and anterior) was noted on the EPS sheet and a photograph was taken (Fig. 1b). The EPS sheet was then placed under the imaging probe and a white light measurement was taken before initiating the Raman imaging sequence (Fig. 1c).

For tumors smaller than 1 cm, the entire slice was left intact (Fig 1g). A slice selected by the pathologist after visual inspection of the specimen was placed on a black-coated aluminum sheet. The slice was then placed on an EPS sheet and a note was made of the orientation of the margins. A custom 3D-printed guiding grid, for which all squares were the size of the system FOV, was created. The grid was then placed on top of the slice – without contact with the tissues– and a photograph was taken (Fig 1h)). The pathologist indicated which square of the grid contained tumor tissues. The EPS sheet was placed under the imaging probe and aligned so the square of the grid selected could be imaged. The selected square was noted, and the grid was carefully removed without moving the slice. A white light measurement was taken before initiating the Raman imaging sequence (Fig 1i)).

For both methods, the laser power was set at maximum, resulting in approximately 500 mW being delivered to the tissue surface over a line of width 350 micrometers. The line was scanned over the entire FOV, with each acquisition associated with 3 repeat measurements that were subsequently averaged to maximize signal-to-noise ratio. The only exception was for the fifth patient where the time allocated for acquisition was limited. Therefore, for that patient the number of repeat measurements was set to one. Acquisition time was set at 10 s per line (40 lines, for a total of 20 minutes when doing 3 repeat measurements). The exposure time was selected to respect the one-hour timeframe imposed by the pathologist after surgical excision to avoid tissue degradation that could compromise diagnostic accuracy.

After spectroscopic measurements, the orientation of the margins was marked by inking with different colors on each side of the sample. The samples were then placed into a pathology cassette (tumors larger than 1 cm, Fig. 1e)). The specimen slices were all pinned to a new EPS sheet with the orientation of the margins written on it (tumors smaller than 1 cm, Fig 1j)) as per standard of care. All tissues were then fixed in 10% neutral buffered formalin, embedded in paraffin, and sectioned into slides. They were then stained with hematoxylin and eosin (H&E) as per institutional standards, resulting in one stained image for each sample or one stained image for the entire slice if the tumor was smaller than one centimeter (Fig. 1f) and 2k)).

Digitized slides were reviewed by a pathologist (L.R.), who classified the tissue into three categories: 1. *Cancer* (tumor cells, tumor stroma or necrosis); 2. *Normal*: either normal breast (connective tissue, stroma, fibroblast, collagen) or breast parenchyma (ducts and lobules); 3. *Fat* (adipose cells). The area containing cancerous cells were annotated by the pathologist.

6.3.4 Registration with optical measurements and histology labels

Two three-step methodologies were developed to register spatially the histology images to the Raman hyperspectral images. For tumors larger than 1 cm: 1) the H&E-stained images were superposed to the photograph of the sample and rotated to ensure the contours of the stained tissue sections matched as much as possible the contours seen in the photograph. The colored ink marking the margin orientation on the samples, as well as the irregularities associated with its shape, were used as geometrical landmarks guiding the spatial registration; 2) the white light image taken with the system (Fig. 1f)) was superposed to the picture of the sample with the margins annotated (Fig 1. b)). Again, margin orientation and visible structures, including blood vessels and regions with

high adipose content, were used as tissue-based fiducial markers to ensure an accurate superposition of the white-light image with the picture. 3) The histopathology image was then cut to fit the size of the white-light image and rotated 90 degrees to compensate for the difference in orientation between white-light images and Raman hyperspectral images. The resulting images were then comparable to the Raman hyperspectral image.

For tumors smaller than 1 cm for which a whole specimen slice was imaged: 1) the H&E-stained images were superposed to the photograph of the specimen slice with the guidance grid (Fig 1 h)) and rotated to ensure the contours of the stained tissue sections matched as much as possible the contours seen on the photograph. 2) The white-light image taken with the system and representing the FOV of the system (Fig. 1k)) was superposed to the picture and aligned with the corresponding square of the grid. 3) was identical to the third step for tumors over 1 cm.

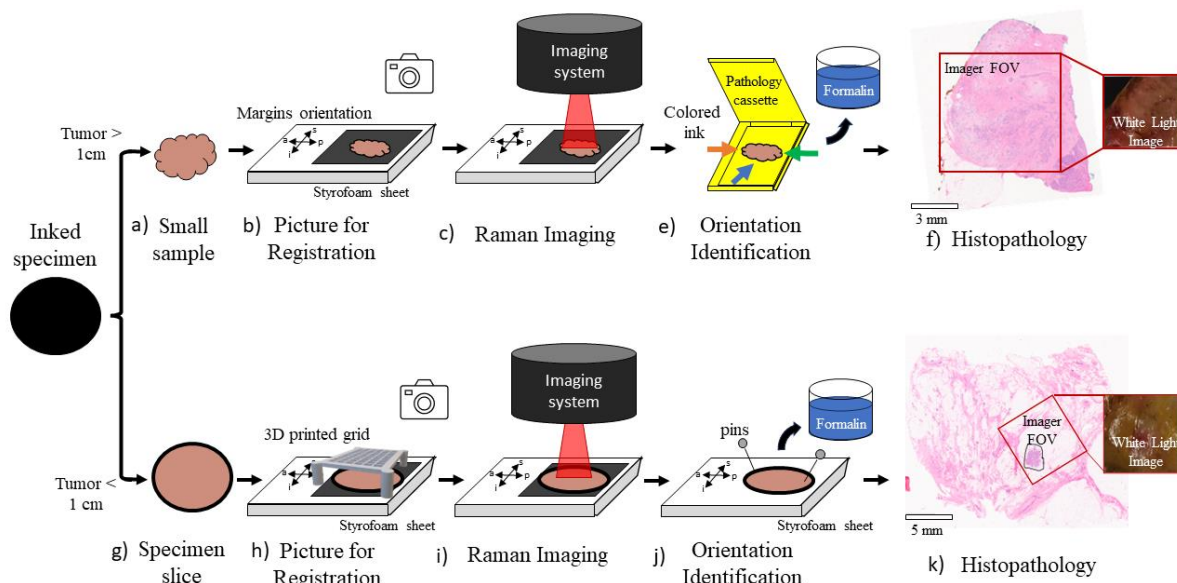


Figure 6.1 Schematic representation of the two methods of specimen handling and ex vivo spectroscopic measurements. a) to f) For tumor larger than 1 cm. a) A sample is cut from the specimen slices and b) placed on a black coated aluminum sheet that was stuck to an expanded polystyrene foam (EPS) sheet. The margins orientation was marked on the EPS sheet and a picture was taken. c) The EPS sheet was then placed under the imaging system and measurements were made. e) The sides of the sample were inked with different colors to indicate the margins orientation and the sample was transferred into a pathology cassette and put in formalin for fixation. f) An H&E-stained image of the sample was analysed by the pathologist

and the white-light image and the picture were used to register the position of the Raman measurement on the H&E image. g) to k) For tumors smaller than 1 cm, h) the entire specimen slice is put on a black coated aluminum sheet that was stuck to an EPS sheet. The margins orientation was marked on the EPS sheet and a 3D-printed grid was placed on top without direct contact with the specimen. A picture was taken, and the pathologist indicated a square of the grid that contained interesting structures. i) The EPS sheet was placed under the imaging system and the grid was used to record the location of the measurement. The grid was carefully removed without moving the specimen slice and the Raman measurements were taken. j) The specimen slice was then transferred to another EPS sheet where it was pinned alongside the other slices of the specimen. The margins orientation was indicated on the EPS sheet, and it was placed in formalin for fixation as per standard of care. k) This resulted in an H&E-stained image of the entire specimen slice where the pathologist indicated the position of the tumor. The white-light image and the picture taken with the grid were used to register the position of the Raman measurement on the H&E image.

6.3.5 Data processing and exclusion criteria

The data processing steps preceding the application of machine learning led to the extraction of the inelastic scattering signature for each spectrum within the hyperspectral images. Background sources of signal non-specific to tissue Raman scattering, e.g. intrinsic fluorescence from tissue biomolecules[128]. Spectral pre-processing included the following steps: 1) median filter to each spectrum to eliminate cosmic ray events, 2) σ -axis (wavenumber shift) calibration based on a Raman spectrum acquired in acetaminophen, 3) normalization with a NIST Raman standard (SRM 2214) to correct for the instrument response, 4) removal of background signals using the custom algorithm BubbleFill[124], and 5) removal of the background signal from the chromatic triplet of the system by subtracting an image acquire with nothing in focus, with a large integration time[217], 6) standard normal variate (SNV) normalization. The five first columns of the hyperspectral images were excluded. The NIST standard being used to correct the instrument response was smaller than the FOV of the system, therefore the correction could not be correctly performed for a small portion of the hyperspectral image.

A quantitative quality factor metric (with a maximum value of 1) was computed for each spectrum of the image. It provided a statistical assessment of the likelihood the SNV-normalized signal is

associated with tissue Raman peaks or stochastic noise.[175] Spectra with a quality factor metric inferior to 0.5 were excluded from the images.

6.3.6 Machine learning workflow

A previous study was conducted involving 20 patients undergoing breast surgery[216]. A Raman spectroscopy point probe system was used to measure the spectral fingerprint of normal breast and cancer tissue *ex vivo*. Overall, 238 Raman spectra were acquired in that study consisting of 238 measurements associated with adipose tissue, 87 with cancer and 93 with non-fat normal breast structures. This dataset was used to train classifiers using support vector machines (SVM) engineering to distinguish fat from normal structures, as well as to detect cancer out of non-fat normal breast tissue. Dimensional reduction was performed to ensure the models used only a small number of specific biochemically interpretable spectral bands for classification. This also reduced the likelihood of overfitting and increased the model potential to generalize well to new data.

Two models trained on breast tissue spectra acquired with the point probe system were chosen for this study. The first model, Model A, distinguished *Fat* tissue from non-*Fat* tissue (either *Normal* or *Cancer*) and was based on 3 spectral features centered at 940, 1004 and 1304 cm^{-1} . The second model, Model B, classified *Cancer* versus *Normal* tissue (excluding *Fat* data) and required 4 spectral features centered 940, 1004, 1129, and 1155 cm^{-1} . Those SVM models were directly applied to each of the spectra composing the hyperspectral images acquired with the line-scanning system over 8 breast specimens. Model A and B returned, for each spectrum, a posterior probability $0 \leq p \leq 1$ that the spectrum belonged to one given class. To obtain predictions from these probabilities, a threshold of classification was needed. This threshold was chosen to optimize sensitivity and specificity during the previous study. A prediction was then obtained for the class of each spectrum (i.e., each pixel) composing the hyperspectral images.

The classification of the hyperspectral images was done in two steps. First, Model A was applied to all spectra to identify *Fat* spectra with the hyperspectral images. Then, Model B was applied to the spectra identified as non-*Fat* to classify them as either *Cancer* or *Normal*. The results of the classification were expressed through classification maps where each pixel corresponded to the tissue class predicted. Because of this two steps method, the threshold of classification for Model A to classify a spectrum as *Fat* was increased to maximize sensitivity. This meant that less spectra were classified as *Fat* since the spectra needed a higher probability p to belong to the *Fat* class to

be classify as such. This limited the number of spectra falsely identified as *Fat*. Increasing the threshold minimally affected the classification performances on the original dataset (initially sensitivity/specificity were 96/99% and after increasing the threshold it was 100/95%). Adipose spectra not classified as *Fat* were classified as *Normal* which does not impact possible clinical applications as both *Normal* and *Fat* tissues are view as healthy tissues by pathologists and surgeons.

6.4 Results

6.4.1 Spectroscopic measurements

Application of the Raman imaging protocol resulted in 8 hyperspectral images from 6 patients with co-located histopathology analyses. A total of 11,520 spectra was acquired. After the exclusion of the spectra presenting a quality factor inferior to 0.5, a total of 8,020 spectra remained.

Classification sequentially used Model A and Model B to split the dataset into 3 categories *Fat* ($n = 6,008$ spectra), *Normal* ($n = 1,137$) and *Cancer* ($n = 875$). Figure 2 presents the average processed spectra for each category and the standard deviation associated with each spectral bin. The spectral features used for tissue classification by the SVM models are highlighted in the figure. Standard deviation for *Fat* spectra is smaller than *Normal* and *Cancer*, probably due to large number of spectra and higher signal-to-noise ratio in *Fat* spectra in general.

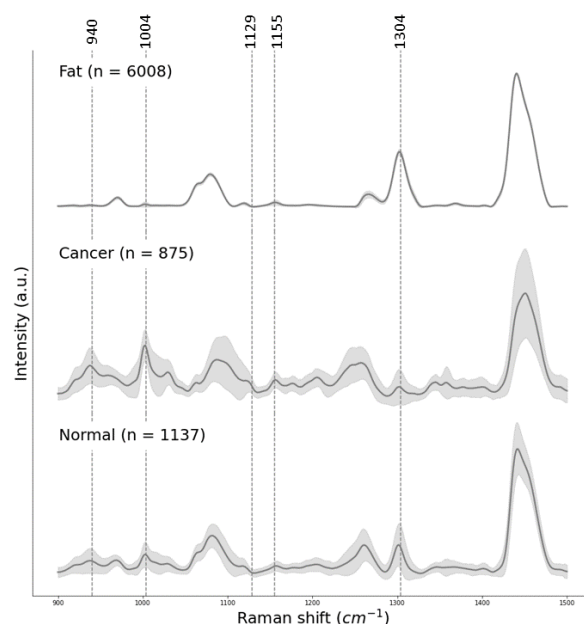


Figure 6.2 Average processed Raman spectra from breast tissue with standard deviation for each spectral bin. The spectra are classified in 3 categories: Fat – identified by Model A - and Cancer and Normal – classified by Model B after exclusion of the Fat spectra. The 5 spectral features used for classification (Model A: 940, 1004 1340 cm^{-1} and Model B: 940, 1004, 1129, 1155 cm^{-1}) are identified by vertical lines.

6.4.2 Machine learning models and biomolecular predictions

Figure 3 presents classification results for all 8 samples considered in this study. Each row corresponds to a different sample, each labeled according to a patient number and a sample number, if there was more than one sample per patient. An annotation is provided in the figure (first column) of the microscopic analysis results provided by pathologist to establish the main tissue constituents other than adipose. In cases where only adipose tissue could be detected by the pathologist, the label *Fat* was used. The second column in Fig. 2 shows the photograph of the sample region that was imaged with the Raman imaging system, while the third column shows the corresponding histology image (stains: hematoxylin & eosin [H&E]) cropped to match the FOV of the Raman system. The fourth, fifth, sixth and seventh columns show the intensity maps for the spectral features 940, 1004, 1129 and 1159 cm^{-1} . These bands correspond to the spectral features included in Model B trained to detect cancer from single-point Raman spectroscopy measurements. The Raman band images were normalized to ensure they are represented on the same colormap to

ensure relative intensity could be compared across all samples. The last column in the figure shows the results of the classification for each spectrum as *Fat*, *Normal* or *Cancer*. The spectra with a quality factor under 0.5 were excluded from the classification maps.

The first 4 samples shown in Fig. 3 (P1-S1, P2, P4-S1, P5) contained cancer cells. The histology for P4 showed that the sample was entirely composed of invasive mucinous carcinoma albeit with lower cellularity in the lower part of the image when compared to the upper area. The Raman models predicted that all pixels with $QF > 0.5$ were *Cancer*. However, the spectral quality of the image was very low for this specimen and only 3% of all spectra remained after exclusion based on the QF. The histology for P2 showed that half of the sample was constituted of invasive ductal carcinoma and the other half was adipose tissue. Model A identified adipose structures in a manner that was consistent with histology. Model B predicted 74% of the remaining spectra belonged to the *Cancer* category, providing an overall agreement with histology.

As shown by the photograph of the sample, P2 was not large enough to fill the FOV of the imaging system. Spectra taken on regions where there was no biological sample (i.e., the black-coated aluminum substrate) were mostly excluded from classification due to low QF. However, spectra taken on the edge of the sample contained tissue signal and traces of black-coated aluminum Raman signal. Classification results showed that spectra surrounding the adipose region were classified as *Normal* instead of *Fat*. This was due to the contamination of the adipose signal by the aluminum signal that contains spectral features around 1004 cm^{-1} . This issue appears in all the samples that were not large enough to fill the entire FOV of the system (P2, P1-S1, P4-S2, P3, and P1-S2). The effect of this signal contamination is illustrated by Fig 4. Spectra between the tumor and the adipose region were also classified as *Normal* and their Raman signal presented contributions from both adipose tissues and tumor. Indeed, the intensity map of the 1004 cm^{-1} spectral feature showed a progressive transition of the intensity of the feature between the tumor and the adipose region.

For P1-S1, histology showed the sample contained invasive ductal carcinoma with high cellularity in the upper part of the image and adipose tissue in the upper right corner of the image. Model A correctly identified a *Fat* region in the same region as the one shown by histology. 62% of the remaining spectra were classified as *Cancer* by Model B. P5 contained a tumor of 3 mm size that was an invasive ductal carcinoma surrounded by adipose tissue and normal breast tissues. Most of

the spectra were classified as *Fat* except for a small region in the bottom of the image that appeared to correspond to the tumor seen on histology, here slightly shifted to the left. After the exclusion of the *Fat* spectra, Model B classified 21% of spectra as *Cancer* (34 spectra). The intensity map of the 1004 cm^{-1} showed a content in phenylalanine band for the entire tumor region similar to the one seen for P4, P2 and P1-S1. The content in proteins expressed by the 1155 cm^{-1} also appeared comparable to the other tumors.

The last 4 samples (P4-S2, P6, P3, P1-S2) contained no cancer cells. P4-S2 contained adipose and other normal breast tissue structures. Predictions of the models for that sample were consistent with histology, with most of the spectra being classified as *Normal* or *Fat*, and less than 1 % of all pixels classified as *Cancer*. The 8 spectra on the edge of the sample classified as *Cancer* contained a mix of *Normal* and aluminum signal which resulted in a higher spectral feature around 1004 cm^{-1} (see Fig 4). The two other spectra classified as *Cancer* had similar spectral features as *Normal* spectra with a phenylalanine peak slightly higher. P6 contained mostly adipose tissue and a thin strip associated with other normal breast tissue structures. Model A classified 80% of all spectra as *Fat*, with all other spectra being classified as *Normal*. The histology for P3 showed mostly adipose and other normal breast tissue. The white light image of that specimen also showed residual black ink used for margins identification by the pathologist. This led to the exclusion of most of the spectra in the upper left part of the image based on low QF. Most of the remaining pixels for that sample were classified as *Fat*. Histology for P1-S2 showed adipose and normal breast tissues. Most of the pixels in that image were classified as *Fat*.

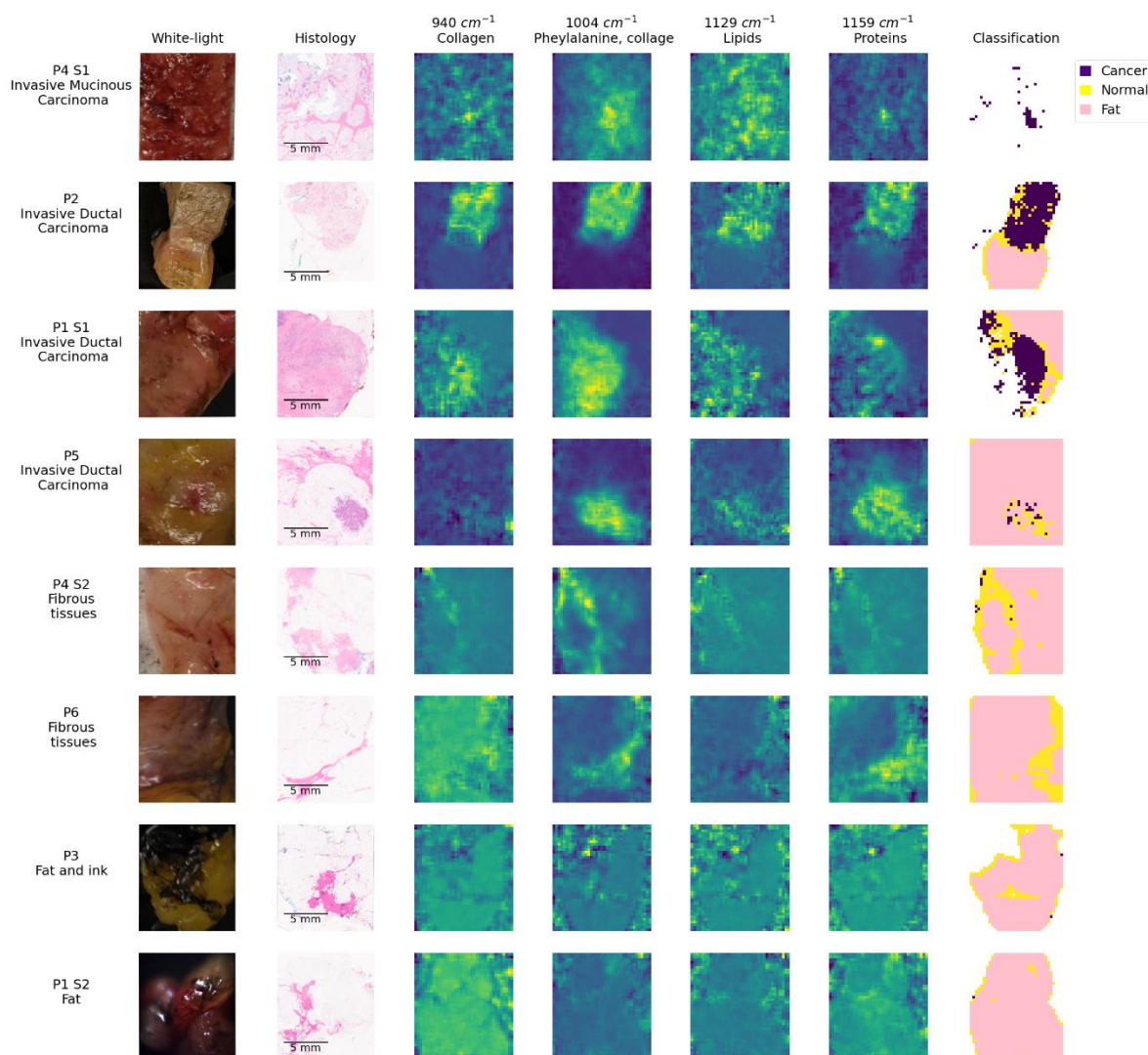


Figure 6.3 Results of imaging 8 samples. First column presented the results of microscopic analysis provided by pathologist. Second column presented the white-light image of the sample and third column the histology results cropped to correspond to the FOV of the imaging system. Fourth, fifth, sixth and seventh columns showed the intensity maps for the spectral features 940, 1004, 1129 and 1159 cm^{-1} , corresponding to the 4 spectral bands used in Model B. Eighth column presented the results of classification in 2 steps with Model A identifying all *Fat* spectra and Model B classifying the remaining spectra as *Normal* and *Cancer*.

As previously mentioned P2, P3, P4 S2, P3, and P1 S2 did not fill the entire FOV of the system and Figure 3 showed that the spectra at the border between the samples and the substrate were misclassified as *Normal* or *Cancer*. This was attributed to the contamination of the Raman signal by spectral features from the black-coated aluminum substrate, particularly around 1004 cm^{-1} .

Figure 4 presents the impact of aluminum signal on the sample P1 S2. Figure 4b) shows a spectrum of black-coated aluminum (excluded from the classification due to low QF), a spectrum taken on the edge of the sample and a spectrum of adipose tissues. The location of each spectrum is indicated by a cross on the classification results (Fig 4a)). Figure 4b) shows an aluminum spectral feature around 1004 cm^{-1} that is present in the spectrum acquired on the edge of the sample, leading to the *Normal* classification. Raman signal contamination by black ink was also observed on P3 and the region with black ink were also classified as *Normal*. The samples P1 S2, P3, and P4 S2 also showed spectra classified as *Cancer* on the edge of the samples where there was contamination by aluminum signal.

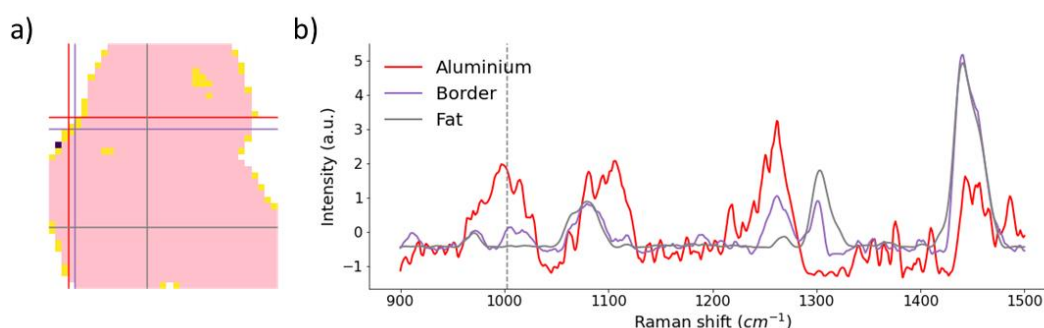


Figure 6.4 Sample P3 a) classification map with Model A where pixels in purple are classified as *Cancer*, the pixel in yellow as *Normal* and the pixels in pink as *Fat* with spectra presenting a QF under 0.5 excluded. b) Three SNV normalized Raman spectra are presented: a spectrum of black coated aluminum, a spectrum of the border between the sample and the substrate e, and a spectrum of adipose tissues. The location of each spectrum is indicated by a cross of the same color on a). A vertical line indicates the spectral feature at 1004 cm^{-1} on b)

6.5 Discussion

This work demonstrated the potential of applying low complexity machine learning models on hyperspectral Raman images acquired with a line-scanning macroscopic Raman spectroscopy imaging system to distinguish invasive breast cancer from healthy tissues. It also showed that to perform this task it is feasible to use models trained using spectra acquired a different system, i.e., a single-point Raman spectroscopy system. Using two models developed from an ex vivo dataset acquired with the point probe, four tumors of different size and type were identified on the images from the hyperspectral imaging system when using the predictive models. The overwhelming

majority of image pixels associated with samples that were identified as healthy breast tissues by the pathologist were classified as non-*Cancer*.

However, not all spectra classifications reflected the histology results. Certain factors limited this project, as per example the potential misclassification of pixels where there were multiple contributors to the signal. The aluminum substrate was shown to contaminate the regions on the edges of the sample. There was also contamination of the signal of tumors by adipose tissues in proximity. Indeed, pixels between a *Cancer* region and a *Fat* region tended to be classified as *Normal* because they contained signal of both types of tissues. This could explain why the 3 millimeters tumor in P5 surrounded by adipose tissues was partially classified as *Normal*.

The accuracy of histopathology as a gold-standard depended on the accuracy of the superposition between the Raman hyperspectral images and the histology maps. This was limited by the change in shape between the specimen photograph and the H&E-stained image of the corresponding tissue section. The samples were manipulated and rotated before being processed and stained, which sometimes made superposing the photograph with the H&E images difficult. This was particularly the case for samples composed of mostly adipose tissues since they did not retain their form as well as others. The specimen thickness was 5 mm or more at imaging and was sectioned in a 3 to 5 μm section before staining. Therefore, the surface on which the Raman measurements were acquired could be different than that of the stained tissue sections.

Another limitation of the study was the small number of samples used to test the classification models. There were two types of tumors included in the study, invasive ductal carcinoma, and mucinous carcinoma. The latter was not present in the original training dataset and was nevertheless correctly classified as *Cancer*. Invasive lobular carcinomas, included in the previous training dataset, were absent from the hyperspectral dataset, limiting the diversity of pathologies in this study.

Other practical limitations relate to the maximal permissible exposure (MPE) for skin as set by ANSI standards for research laboratory laser safety (ANSI Z136.1-2014 American National Standard for Safe Use of Lasers). For a total light exposure duration of 10 s and more, MPE for skin is 0.3 W/cm^2 . To respect this guideline, the laser power used with this system should not be higher than 400 mW when computed for hazard evaluation (c.-à-d., 3.5-mm diameter limiting aperture) while the power deliver at the surface of the tissues in this study was a little under 500

mW. However, it should be noted that those skin MPE values do not correspond to absolute thresholds beyond which tissue damage will necessarily result in breast tissue. For example, no morphological alterations were observed during histology analyses of the specimens in which Raman spectroscopy measurements were made, suggesting that no heat-generated tissue damage was made. More work will be required to determine acceptable photodiagnostic exposure levels in breast tissues and will likely be significantly larger than the current MPE values set for skin.

The total measurement time was 20 minutes per sample. This is too long for intraoperative clinical applications in which multiple measurements would be required to assess margins. However, measurement time could be lowered by taking one acquisition instead of 3, as was done for P5, bringing the integration time to less than 7 minutes. This would allow for multiple measurements in approximately the same timeframe (20-30 minutes) as an intraoperative consultation by pathology[218].

This project showed the potential of line scanning hyperspectral Raman imaging to provide intraoperative molecular analysis of ex-vivo breast-conserving surgery specimens. This could be an important complement to gross margin evaluation and would offer a wide-field alternative to microscopic imaging methods like frozen section techniques.

6.6 Acknowledgements

This work is supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) Alliance grant program, Reveal Surgical, the NSERC Discovery Grant program and the TransMedTech Institute. SD was supported by NSERC. DT receives salary support from the FRQS (Clinical Research Scholar, Junior 2). The CRCHUM receives support from the FRQS. Access to Dr. Feryel Azzi's expertise is possible thanks to the TransMedTech Institute and its primary

6.7 Conflict of interest

Frederic Leblond is co-founder of ODS Medical (now Reveal Surgical) formed in 2015 to commercialize a Raman spectroscopy system for neurosurgical and prostate surgery applications. He has ownership and patents in the company.

6.8 Code, Data and Materials Availability

The data and materials information that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

CHAPITRE 7 ARTICLE 4: TOWARD NON-CONTACT MACROSCOPIC IMAGING OF MULTIPLE CANCERS USING MULTI-SPECTRAL INELASTIC SCATTERING DETECTION

Sandryne David,^{a,b} Nassim Ksantini, ^{a,b} Frédéric Dallaire,^{a,b} Katherine Ember, ^{a,b} François Daoust,^{a,b} Guillaume Sheehy,^{a,b} Costas G. Hadjipanayis,^{c,d} Kevin Petrecca,^e Brian C. Wilson,^f Frédéric Leblond,^{b,g,*}

^aDepartment of Engineering Physics, Polytechnique Montréal, Montreal, Québec, Canada.

^bCentre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Montréal, Quebec, Canada

^cMount Sinai Hospital, New York, NY, USA

^dUniversity of Pittsburgh Medical Center, Pittsburgh, PA, USA

^eMontreal Neurological Institute-Hospital, McGill University, Montreal, Canada

^fPrincess Margaret Cancer Center-University Health Network/University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada

^gInstitut du cancer de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

**Soumis dans
Optic Letters
14 novembre 2023**

7.1 Abstract

In situ spontaneous Raman spectroscopy at sub-millimeter detection scales has been reported previously to guide tumor resection. However, single-point spectroscopy is limited in its ability to sample whole surgical margins rapidly and avoid under-sampling. A retrospective analysis of Raman spectroscopy datasets acquired on four cancer types has shown that the spectral bands around 1004, 1302, 1440, and 1657 cm^{-1} were common cancer biomarkers. Linear SVM classification models were developed to detect cancer with only 3 spectral bands and showed a sensibility and specificity close to the one obtained with the original classification. These results led to the development of a multi-spectral imaging system that has the capability to map a Raman biomarker, over a $>2 \text{ cm}^2$ field-of-view. A proof-of-principle study is presented imaging the wavenumber band centered at 1440 cm^{-1} associated lipids and proteins in porcine tissues. Wide-field single-band imaging was achieved in ~ 5 seconds and preliminarily demonstrated the identification of distinct tissue regions. This study paves the way for the development of a new Raman imaging technique that is rapid, label-free, and wide-field.

7.2 Letter

Recent advances have shown *in situ* single-point intraoperative measurements at millimeter scales can be achieved within a few seconds[91], [219]. To date, practical intraoperative Raman spectroscopy applications were developed mostly using single-point detection mode. Those included brain tumor surgery guidance[92], bronchoscopy[220], colorectal endoscopy[208], skin lesion screening[221], breast cancer surgery[94], [216], and prostate biopsy guidance[222]. If attainable, *in vivo* wide-field Raman imaging at macroscopic scales (centimeter-size field-of-view) could complement, and possibly even replace, *in vivo* imaging of fluorescence markers, including indocyanine green[223] and fluorescein[224]. However, achieving wide-field Raman imaging on par with fluorescence molecular imaging would, in principle, require one spectrum to be detected in every imaged pixel. This is simply not practical since *whole* Raman spectra typically comprise hundreds of individual spectral bins, leading to imaging times of several minutes even for a modest –sub-centimeter-size– field-of-view. For example, our group developed a hyperspectral line-scanning system that imaged adipose-muscle tissue margins in porcine specimens in less than 5 minutes across a 1 cm² field-of-view[210]. Clinical studies with that system demonstrated high accuracy pixelized cancer detection could be achieved in invasive breast carcinoma[225] within timescales of the order of 15 minutes. This makes these techniques –although highly sensitive and specific to cancer– more appropriate for *ex vivo* intraoperative margins assessment than for live surgical guidance.

The prospect of detecting inelastic scattering contrast *in vivo* in real-time remains enticing. However, this could only be feasible if tumor tissue detection did not require *whole* spectra to be acquired, but rather only a subset of Raman biomarkers. To assess the potential use of a subset of spectral features for cancer detection, we performed a retrospective analysis of four published tissue datasets from our group where a single-point Raman spectroscopy instrument was used. One dataset was from a multicentric study where *in vivo* brain tumor Raman spectra were acquired (glioblastoma, meningioma, metastases) in 67 patients undergoing surgery (565 spectra in cancer, 420 in normal brain)[226]. The three other studies included spectra acquired with the same type of instrument albeit *ex vivo* in tissue specimens: 20 invasive breast cancer patients (87 spectra in cancer, 151 in normal breast tissue structures[216], 10 lung cancer patients (97 spectra in cancer, 100 in normal lung tissue[227], 9 patients with either ovarian or endometrial cancer (28 spectra in

cancer, 42 in normal tissue)[194]. The machine learning cancer detection models published for each application had sensitivity/specificity of 87%/95% for brain, 93%/95% for breast, 94%/80% for lung, and 93%/88% for ovarian/endometrium (Table 1).

Spectra for all datasets were pre-processed, including dark noise correction, x-axis wavenumber calibration, y-axis calibration correction (instrument response function normalization), removal of cosmic rays and non-Raman background (e.g., endogenous tissue fluorescence), and Standard Normal Variate (SNV) normalization[228]. Based on our experience with human tissue Raman spectra, 7 spectral regions were selected that had both a clear biomolecular interpretation and contained either one or two visually distinguishable peaks. For each feature, a spectral band of width ranging from 10 cm^{-1} to 15 cm^{-1} was selected.

A receiver-operating-characteristic (ROC) analysis was performed for each of the 7 spectral features, establishing its individual tumor detection potential. The sensitivity/specificity and the area-under-the-curve (AUC) of the ROC curve were reported for the four bands associated with the highest performance characteristics (Table 1). Two bands were common to all cancer types: I) the spectral band centered at 1440 cm^{-1} that is associated with the overlapping of several lipids (CH_2 and CH_3 bend and deformation)[229] and proteins (C-H)[230], II) the spectral band centred at 1004 cm^{-1} that is usually assigned with phenylalanine[230]. The spectral band centered at 1657 cm^{-1} , associated with lipids (C=C stretch) and proteins (Amid I)[229], [230], was a strong biomarker for lung cancer and ovarian/endometrial cancer, but not for brain and breast cancer. The spectral band centered at 1302 cm^{-1} , associated with lipids (saturated bonds CH_2 and C-H vibration) as well as the amide III of proteins [197], [229], [230], was an effective biomarker for brain and breast cancer, but not for lung and ovarian/endometrial cancer.

Following the analysis based on individual Raman bands, a more complex support vector machines (SVM) model was trained and validated –for each cancer type– using only the three bands with the most predictive power. This led to a sensitivity/specificity (AUC) of 82%/91% (0.90) for brain, 92%/91% (0.96) for breast, 94%/80% (0.84) for lung, and 93%/85% (0.90) for ovarian/endometrium (Table 1). The quantitative similarity of those results with those already published –relying on automated spectral features extraction (dimensional reduction) and SVM modeling based on <15 features[194]– demonstrates that there exist Raman cancer biomarkers common to different cancer types. This puts in sharp focus the fact *whole* spectra may not always

be required when developing Raman-based biomedical tissue optics applications. However, this finding can only be of practical relevance if methods are developed allowing individual bands to be isolated/detected without the requirement for *whole* spectra to be acquired. No such technique exists and current numeric methods rely on curve fitting approaches to isolate low-frequency (in cm^{-1} space) contributions (i.e., fluorescence background) from the Raman signal of interest that is associated with higher frequency contributions[128].

Tableau 7.1 Detection of four cancer types (brain, breast, lung, ovarian/endometrium) using spectral features associated with inelastic scattering spectra acquired in tissue with a single-point Raman spectroscopy system. The reported results are associated with ROC curve analyses from which the area-under-the-curve (AUC), the Sensitivity (Sens) and the Specificity (Spec) were computed.

Model/Features	Brain Sens/Spec (AUC)	Breast Sens/Spec (AUC)	Lung Sens/Spec (AUC)	Ovarian/ endometrium Sens/Spec (AUC)
SVM (<15 features)	87/95 % (0.94)[226]	93/95 % (0.98) [216]	94/80 % (0.83)[227]	93/88 % (0.96)[194]
Single band 1440 cm^{-1}	86/77 % (0.86)	89/70 % (0.82)	90/67 % (0.81)	93/46 % (0.50)
Single band 1004 cm^{-1}	73/87 % (0.86)	82/96 % (0.96)	76/50 % (0.60)	78/52 % (0.62)
Single band 1657 cm^{-1}	-	-	95/79 % (0.88)	56/93 % (0.85)
Single band 1302 cm^{-1}	75/72 % (0.77)	83/69 % (0.78)	-	-
SVM 3-bands	82/91 % (0.90)	92/91 % (0.96)	94/80 % (0.84)	93/85 % (0.90)

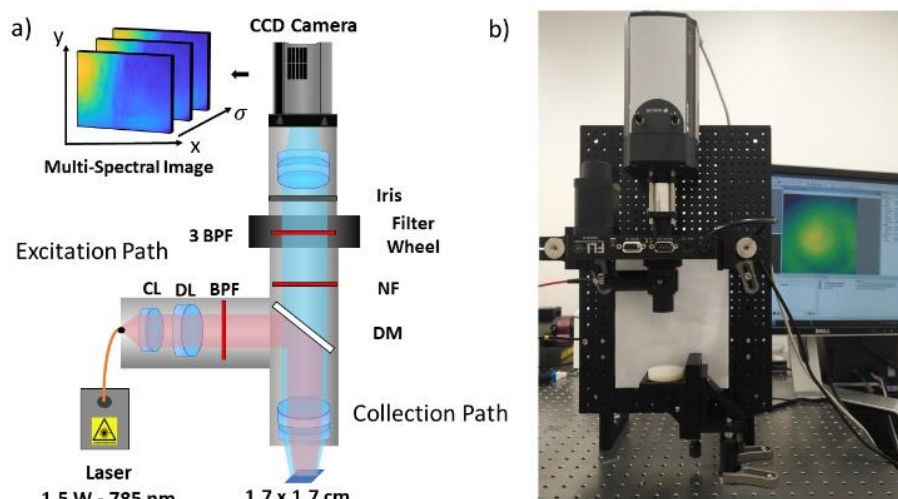


Figure 7.1 Experimental setup allowing multi-spectral detection of inelastic scattering in biological tissue: a) Schematic representation comprising epi-illumination through an excitation path formed by an optical fiber, a collimating lens (CL), a band-pass filter (BPF), a diverging lens, a dichroic mirror (DM) and a focusing lens. The light collection path includes a notch filter (NF), a filter wheel with 9 interference bandpass filters, and a CCD camera. All lenses are spherical except LH (cylindrical with curvature in the horizontal direction) and LV (cylindrical lenses with curvature in the vertical direction); b) photograph of the system demonstrating simplicity of implementation.

Here, we present –for the first time– a proof-of-principle study demonstrating that an epi-illumination multi-spectral imaging system can be used to image individual Raman bands macroscopically over a large field-of-view (Fig. 1). Specifically, we demonstrate that the inelastic scattering signal from the band around 1440 cm^{-1} can be isolated from background fluorescence from images acquired at only 3 wavelengths. The system comprises a 1.5 W wavelength-stabilized 785 nm laser (Innovative Photonic Solutions, NJ, USA) with $< 2\text{ nm}$ bandwidth. The light source is coupled to a $1,500\text{ }\mu\text{m}$ core 0.5 NA (numerical aperture) optical fiber. The light from the fiber passes through a beam-expander lens, a collimation lens, an optical density (OD) 6 bandpass filter with central wavelength 785 nm and 167 nm bandwidth (Semrock, NY, USA), a dichroic mirror, and, finally, a lens allowing to control the beam spot size on the specimen. Back-scattered light is collected through the same focusing lens and the dichroic mirror prior to detection through an OD 6 high-pass filter with $>785\text{ nm}$ cut-off (ThorLabs, NJ, USA), a motorized filter wheel (Finger

Lakes Instrumentation, NY, USA) that can hold up to 9 band-pass filters and a CCD camera (Andor IKON M, Oxford Instruments, MA, USA). The camera has 1024 x 1024 pixels of 13 μm width, 5 MHz pixel readout and it was cooled to -64°C . The filters were selected to ensure that the band around 1440 cm^{-1} could be resolved, including minima to the left and right of the peak. Specifically, three OD 6 band-pass interference filters with 0.8 nm bandwidth were used with central wavelengths corresponding to wavenumber shifts (from 785 nm) of 1407, 1440 and 1492 cm^{-1} . The 2.1 cm^2 field-of-view comprised, after 16x16 binning to decrease photonic noise, 64x64 pixels with a spatial resolution of 225 μm .

Four porcine specimens were imaged that had a 1 cm thickness with grossly flat faces and a visually detectable margin between adipose and muscle tissue. Both the multi-spectral system and the line-scanning hyperspectral Raman system were independently used to acquire images of the same region-of-interest[210]. The hyperspectral images were considered the gold standard to be used as validation for the Raman biomarker images produced with the multi-spectral system. The hyperspectral system had a field-of-view of 1 cm^2 with 40 x 37 pixels, a spatial resolution of 250 μm and a spectral resolution of 6 cm^{-1} . The tissue specimens were placed onto an Aluminum surface to minimize inelastic scattering background interference. Images were acquired over a region that showed a distinct margin between adipose and muscle tissue. Figure 2 shows, for one of the four specimens, the raw (Fig. 2a) and processed SNV-normalized spectra (Fig. 2b) averaged over the whole image, along with the standard deviation for each spectral bin. The bandpass filters selected to be included in the wheel of the multi-spectral system were centered at $\sigma_1 = 1407\text{ cm}^{-1}$, $\sigma_3 = 1492\text{ cm}^{-1}$ (minimum Raman activity) and $\sigma_2 = 1440\text{ cm}^{-1}$.

A measurement with the multi-spectral system consisted of images at all 3 wavenumbers σ_i , $i = 1, 2, 3$. Each measurement was labeled $I_{raw}(x, y, \sigma_i)$, where x and y correspond to spatial coordinates on the specimen. The total imaging time was approximately 5 s for all bands. Dark noise measurements (laser turned off), labeled $B(x, y, \sigma_i)$, were also made for each wavenumber. Two other imaging sequences were made for calibration of the spatial and spectral responses of the instrument. The spatial response was determined using a Nylon-66 sample with high spatial uniformity (labeled $E_{x,y}(x, y, \sigma_i)$), while the spectral response calibration utilized a NIST SRM 2214 Raman calibration standard (labeled $E_\sigma(\sigma_i)$), imaging at each wavenumber and computing an average intensity value across the image. The spectral response, $E_\sigma(\sigma_i)$, was then computed by

dividing the resulting scalar intensity value at each wavenumber by the value with the NIST standard.

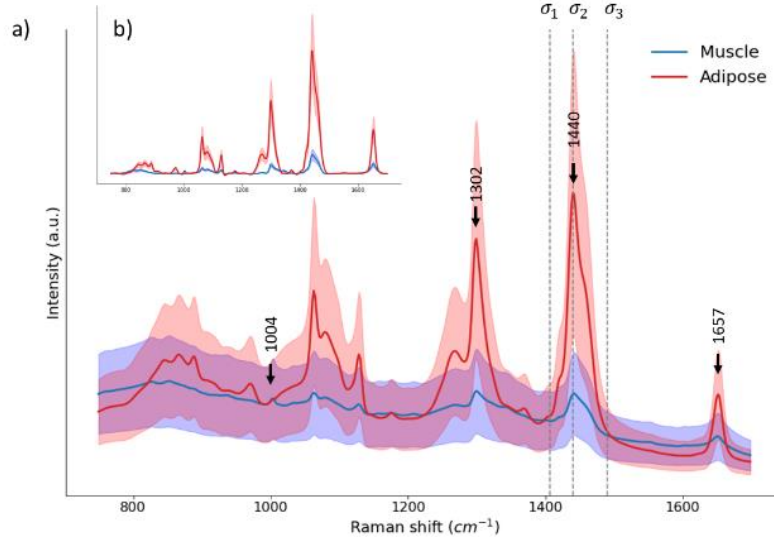


Figure 7.2 Adipose and muscle tissue spectra acquired with the hyperspectral imaging system: a) Average raw spectrum and variance across the images; b) Same but for processed spectra after background removal. The vertical dotted lines in a) correspond to the three spectral bands used in the multi-spectral system at wavenumber shifts 1407, 1440 and 1492 cm^{-1} . Dark arrows indicated the spectral bands used in the 3-bands models reported in Table 1.

Measurements acquired with the multi-spectral system can be modeled using the equation:

$$I_{\text{raw}}(x, y, \sigma_i) = E_{x,y}(x, y, \sigma_i) \cdot E_{\lambda}(\sigma_i) \cdot [B(x, y, \sigma_i) + I(x, y, \sigma_i)], \quad (7.1)$$

where the quantity

$$I(x, y, \sigma_i) = D(x, y, \sigma_i) + R(x, y, \sigma_i) \quad (7.2)$$

is the sum of inelastic scattering, $R(x, y, \sigma_i)$, and background, $D(x, y, \sigma_i)$, that includes the endogenous tissue fluorescence. Isolating $I(x, y, \sigma_i)$ at each measured wavenumber was then achieved by normalizing the raw images by the Nylon and the NIST measurements.

In Raman spectroscopy, disentangling inelastic scattering from other background sources relies on acquiring *whole* spectra, followed by applying a curve-fitting algorithm to remove low-frequency contributions (in wavenumber space) [121], [228] (Fig. 2). This has the effect of isolating the

higher frequency information associated with the molecular vibrational bonds. By comparison, in multi-spectral Raman spectroscopy, we propose to isolate inelastic scattering through direct subtraction of the background contributions measured away from the Raman band of interest. Here, this was achieved by applying the following formula to retrieve the inelastic scattering contribution at 1440 cm^{-1} under the hypothesis that the off-band Raman contributions are negligible at $\sigma_1 = 1407\text{ cm}^{-1}$ and $\sigma_3 = 1492\text{ cm}^{-1}$:

$$R(x, y, 1440\text{ cm}^{-1}) = I(x, y, 1440\text{ cm}^{-1}) - \frac{[I(x, y, 1492\text{ cm}^{-1}) + I(x, y, 1407\text{ cm}^{-1})]}{2}. \quad (7.3)$$

Figure 3 shows the results for one tissue specimen obtained with both imaging systems: See Supplemental material (Figures S1-S3) for the other specimens. The corresponding white-light images for the hyperspectral system (Fig. 3a) and the multi-spectral system (Fig. 3b) both show the same adipose-muscle margin. Images are also shown representing the raw intensity at 1440 cm^{-1} for the hyperspectral (Fig. 3c) and multi-spectral (Fig. 3d) systems, after dark-noise subtraction as well as spatial and spectral calibrations. Fluorescence background removal was then applied to those images. For the hyperspectral system, this was achieved by applying the custom algorithm *BubbleFill* to every spectrum within the image (Fig. 3e)[228], and for the multi-spectral system by applying Eq. (3) (Fig 3f)). All images were normalized to their maximum value, with a color scale ranging from 0 to 1 to allow direct comparison of the detection contrast.

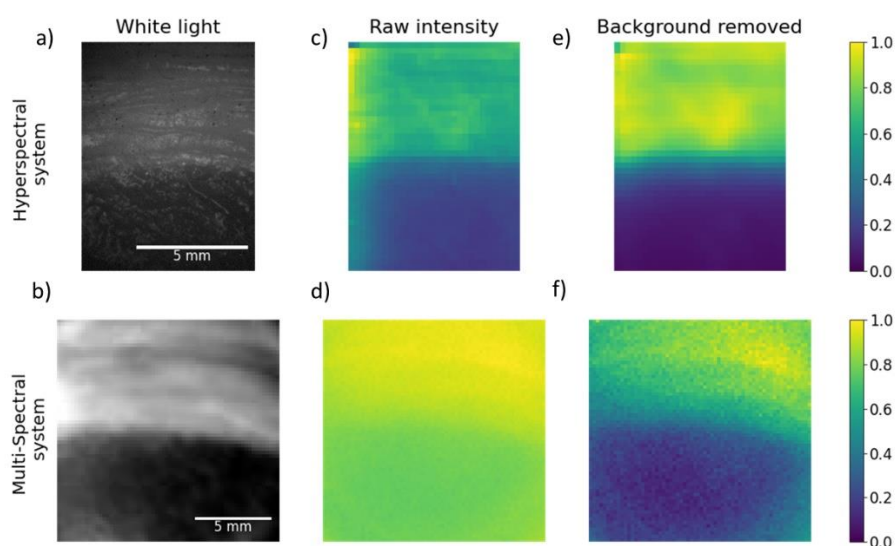


Figure 7.3 Porcine tissue specimen images showing the margin between adipose and muscle tissue. (a,b) White-light images acquired with the hyperspectral and multi-spectral imaging

systems. (c,d) Corresponding raw Raman signal intensity images (no background subtraction) in the 1440 cm^{-1} band. (e,f) Corresponding processed images following background removal. The two systems had a different fields-of-view but otherwise approximately represent the same area on the specimen. All images are normalized to their maximum value for direct comparison of the contrast associated with both modalities.

The resulting images for all specimens showed contrast levels at the adipose/muscle margin for the 1440 cm^{-1} biomarker that were consistent between the two imaging systems, demonstrating the ability of the multi-spectral system to isolate the inelastic scattering component associated with a single Raman band.

Being able to image the 1440 cm^{-1} biomarker has shown great potential for cancer detection as it yielded, by itself, ROC curves with an AUC above 0.80 for brain cancer, breast cancer and lung cancer. Two additional spectral bands could easily be imaged without any change to the system since the filter wheel can hold up to 9 filters. This would theoretically allow for the use of 3-band classification model to be used for cancer detection consistent with the bands presented in Table 1.

These results are preliminary, and more work should be done to demonstrate the capacity of the system to image cancer, however this work shows the potential for the next generation of Raman-based surgical guidance systems to in the form of rapid multi- or even single-band wide-field imaging. Combined with the finding of common Raman biomarkers of cancer, this could open the door for generalizable cancer imaging tools based on inelastic scattering.

7.2.1 Funding

This work is supported by Reveal Surgical, the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) Alliance grant program, the NSERC Discovery Grant program and the TransMedTech Institute

7.2.2 Disclosures

The authors declare no conflicts of interest.

7.2.3 Code, Data and Materials Availability

The data and materials supporting the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

7.3 Supplemental Material

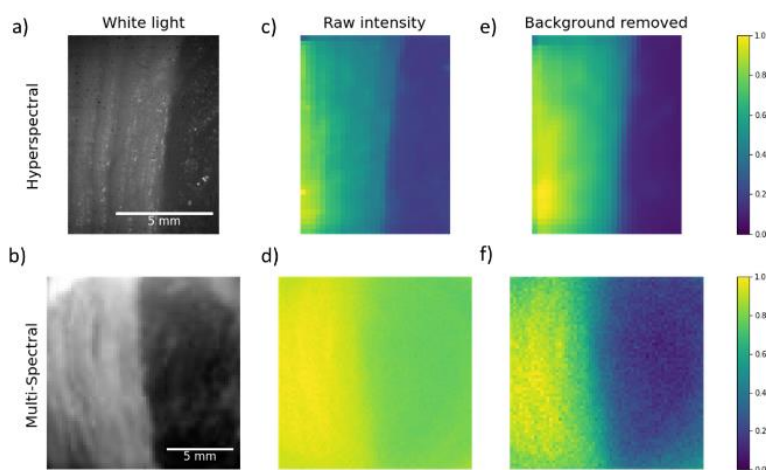


Figure 7.4 Porcine tissue specimen images showing the margin between adipose and muscle tissue. (a,b) White-light images acquired with the hyperspectral and multi-spectral imaging systems. (c,d) Corresponding raw Raman signal intensity images (no background subtraction) in the 1440 cm^{-1} band. (e,f) Corresponding processed images following background removal. The two systems had a different fields-of-view but otherwise approximately represent the same area on the specimen. All images are normalized to their maximum value for direct comparison of the contrast associated with both modalities.

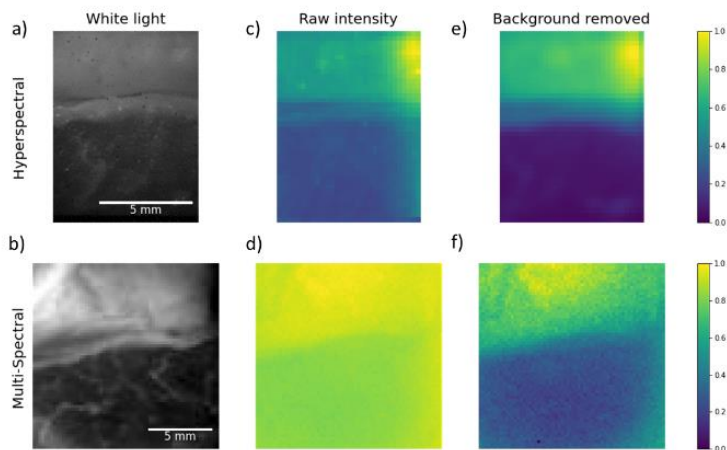


Figure 7.5 Porcine tissue specimen images showing the margin between adipose and muscle tissue. (a,b) White-light images acquired with the hyperspectral and multi-spectral imaging systems. (c,d) Corresponding raw Raman signal intensity images (no background subtraction) in the 1440 cm^{-1} band. (e,f) Corresponding processed images following background removal. The two systems had a different fields-of-view but otherwise approximately represent the same area on the specimen. All images are normalized to their maximum value for direct comparison of the contrast associated with both modalities.

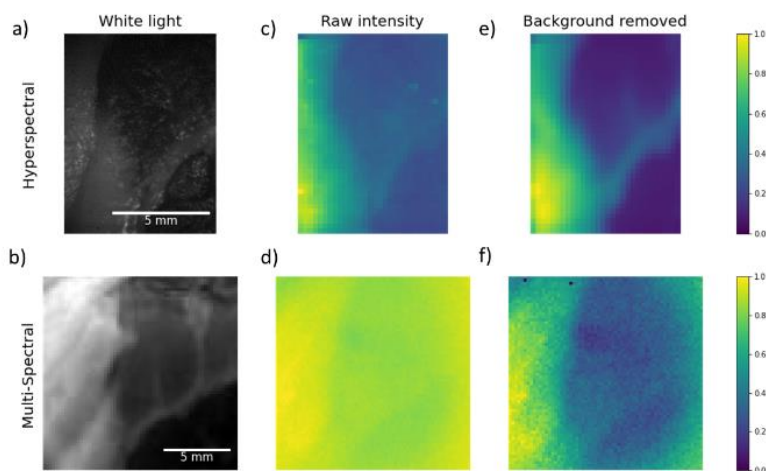


Figure 7.6 Porcine tissue specimen images showing the margin between adipose and muscle tissue. (a,b) White-light images acquired with the hyperspectral and multi-spectral imaging systems. (c,d) Corresponding raw Raman signal intensity images (no background subtraction) in the 1440 cm^{-1} band. (e,f) Corresponding processed images following background removal. The two systems had a different fields-of-view but otherwise approximately represent the same area

on the specimen. All images are normalized to their maximum value for direct comparison of the contrast associated with both modalities.

CHAPITRE 8 DISCUSSION GÉNÉRALE

8.1 Buts de l'étude

L'analyse peropératoire des marges durant les chirurgies mammaires conservatrices est une problématique clinique nécessitant un outil d'analyses des tissus en temps réel. L'objectif est de garantir une marge chirurgicale négative avant la fin de la procédure chirurgicale. Pour cela, il faut pouvoir offrir une méthode de détection avec une grande sensibilité et spécificité qui perturbe minimalement les procédures cliniques. Les techniques basées sur la spectroscopie Raman sont très prometteuses, car elles permettent une analyse moléculaire et ne nécessitent l'injection d'aucun agent de contraste. Cependant, ce grand potentiel est limité par le faible signal de la diffusion Raman – relatif aux autres mécanismes de contrastes endogènes – et la difficulté d'obtenir des images sur une large surface (imagerie macroscopique) en moins de quelques minutes.

Le projet de recherche présenté dans cette thèse portait donc sur le développement de nouvelles méthodes d'analyse des marges de chirurgies mammaires conservatrices. Cette thèse a mené au développement de modèles de classification permettant de détecter le cancer avec une grande sensibilité et spécificité à l'aide de seulement quelques bandes spectrales à partir de mesures spectroscopiques ponctuelles ou d'images Raman hyperspectrales. À partir des conclusions tirées de ces résultats, un système d'imagerie Raman multi-spectrale a été développé permettant d'imager une seule bande spectrale sur une surface de plus 2 cm² en quelques secondes.

8.2 Obtenir des modèles de classification permettant de distinguer avec une grande sensibilité et spécificité les tissus sains et les tissus cancéreux à partir de quelques bandes spectrales d'un spectre Raman acquis avec un système commercial de sonde sur des spécimens de chirurgie frais

Le premier objectif du projet était de démontrer la capacité de la spectroscopie Raman à discriminer le cancer dans un contexte clinique, et ce à partir d'un nombre réduit de bandes spectrales. Le but d'une telle démonstration était d'illustrer la grande quantité d'information moléculaire contenue

dans le spectre Raman, de lier la classification à des biomarqueurs connus des cliniciens et d'ouvrir la voie à l'imagerie Raman multi-spectrale. Les études présentées aux chapitres 4 et 5 ont atteint cet objectif.

La première étude avait pour objectif la détection du cancer de l'ovaire et ses métastases (chapitre 4) a été développée à partir de mesures Raman *ex vivo* sur 9 patientes atteintes de cancer de l'ovaire ou de l'utérus a été menée à l'Hôpital d'Ottawa. Les échantillons cancéreux ont été identifiés avec une sensibilité de 93% et une spécificité de 88%. Le modèle utilisait 7 bandes spectrales.

Ce travail a mis en lumière certains défis liés aux mesures Raman *ex vivo* et a permis de développer des solutions adaptées pour la suite du projet. Premièrement, malgré les valeurs élevées de sensibilité et spécificité du modèle de classification, le nombre de patients et le nombre de spectres demeuraient trop réduits pour garantir sa généralisation à de nouvelles données. Deuxièmement, la méthode utilisée pour obtenir des résultats histologiques était sous-optimale. En effet, pour chaque mesure, un petit échantillon devait être coupé du spécimen de chirurgie à l'endroit exact de la prise de mesure. Trois problèmes sont survenus dû à cette méthode. Premièrement, l'étude nécessitait la présence constante de la pathologiste, ce qui a limité le nombre de cas. Ensuite, il n'était pas toujours facile d'être exact en ce qui a trait à la localisation des sites de mesure à réséquer et, finalement, l'échantillon obtenu contenait souvent plusieurs types de tissus rendant la création d'étiquette de classification fiable difficile. Ce dernier point fut mitigé en excluant tous les spectres contenant plus de 10% de cellules cancéreuses ou moins de 80 %.

Une analyse des données en collaboration avec une pathologiste a été effectuée, révélant que les spectres Raman provenant de l'omentum, une couche de tissus épithéliale qui tapisse l'abdomen et le pelvis, devaient être traités séparément des tissus sains provenant d'organes du système reproducteur. En effet, le signal Raman marquait une forte présence de tissus adipeux et était très différent de celui provenant d'autres organes. De plus, seulement 2 mesures provenant de l'omentum contenaient des cellules cancéreuses. Cette conclusion a aussi influencé l'étude de détection du cancer du sein et il a été décidé de traiter les tissus adipeux et les tissus mammaires normaux (parenchyme mammaire et tissu conjonctif) comme deux classes séparées.

Ces conclusions ont mené au protocole de la deuxième étude visant le développement d'un modèle de classification robuste pour discriminer les tumeurs invasives du sein (chapitre 5).

Des mesures Raman ont été acquises sur des spécimens *ex vivo* provenant de 20 patientes ayant une tumeur invasive du sein. Toutes les patientes ont été traitées au CUSM. Le modèle de classification a discriminé les tissus cancéreux des tissus mammaires normaux et adipeux avec une sensibilité de 93% et une spécificité de 95%. Ce modèle n'utilisait que 2 bandes spectrales liées à des biomarqueurs connus, soit la phénylalanine et les protéines (principalement le collagène).

Le nombre de patientes visées pour cette étude était initialement de 54. Ce chiffre avait été établi à partir d'une analyse de puissance statistique, faite à priori avec le logiciel G*Power. L'effet de taille avait été estimé à 1, en se basant sur la moyenne et l'écart types des pics de 1004 et 1440 cm^{-1} de spectres Raman provenant d'études menées sur d'autre types de cancers[193], [231]. Ces calculs avaient révélé que 27 patients par classes permettaient d'obtenir une puissance statistique de $1 - \beta = 95\%$ avec une valeur α de 0.05. Le nombre de patientes a cependant été un problème au cours de cette étude, bien que le recrutement des patientes se soit déroulé sur 14 mois. En effet, les critères de sélection des patientes choisies, à savoir un grade inférieur à 4, une absence de traitement néoadjuvant et une tumeur invasive de plus d'un centimètre de diamètre, ont limité le nombre de patientes admissibles. Le pathologiste devait également évaluer pour chaque spécimen de chirurgie s'il était possible de couper un échantillon sans risquer de compromettre le diagnostic, ce qui a forcé l'exclusion de nombreux patients ayant déjà consenti à l'étude. Dû à ces difficultés et aux changements d'horaires des chirurgies liés à la pandémie, seulement 20 des 52 patientes recrutées et ayant consenti au projet de recherche ont pu être incluses dans l'étude. Cependant, une analyse de puissance statistique à posteriori basé sur la moyenne et l'écart-type la bande de 1004 cm^{-1} (phénylalanine) des tissus mammaires sains et cancéreux a démontré que l'effet de taille pour cette étude était de 2.6. Cette nouvelle valeur garantit, avec 20 patientes, une puissance statistique de plus de 95% ce qui correspond à la confiance statistique dans notre capacité de rejeter l'hypothèse nulle, c'est-à-dire à démontrer que les mesures des biomarqueurs des spectres cancéreux sont différentes de celles des spectres associés à des tissus sains.

Le recalage spatial des mesures Raman avec les résultats d'histologie a été un des défis majeurs de ce projet. Les échantillons de tumeurs ne pouvant pas être coupés et le pathologiste n'étant pas disponible pour toute la durée des mesures, une approche différente à celle utilisée pour l'étude sur le cancer de l'ovaire a dû être envisagée. L'objectif était d'obtenir la position exacte de chaque mesure Raman relative à l'échantillon. Le prototype de recalage spatial développé permettait d'avoir une position relative à un support et d'utiliser une photographie pour situer ces mesures par

rapport à l'échantillon. Cependant, l'exactitude des étiquettes de classification était entièrement dépendante du recalage entre cette photographie et l'image d'histologie. Pour certains échantillons, il était difficile de faire correspondre l'orientation de l'histologie avec celle de la photographie. De plus il n'était pas toujours possible de savoir si l'échantillon avait été renversé sur lui-même au moment des analyses pathologiques. Pour régler ce problème, vers la fin de l'étude, il a été décidé que de l'encre de couleur serait ajoutée sur les côtés de l'échantillon après la prise des mesures Raman. L'encre demeure visible sur les images d'histopathologie et facilite son orientation par rapport aux images photographiques des spécimens. Cette stratégie a également été utilisée pendant l'étude clinique portant sur la détection du cancer du sein par imagerie Raman hyperspectrale. Plusieurs méthodes ont été utilisées pour mitiger l'incertitude liée à l'étiquetage des données à partir des résultats d'histopathologie, notamment, les données associées à des positions où plusieurs types de tissus étaient présents étaient exclues. Cette méthode a résulté à une exclusion de 15% des spectres de l'ensemble de données.

La prévalence élevée des spectres de tissus adipeux comparée à celle des autres types de tissu s'est rapidement avérée être un problème durant l'étude de cancer du sein. Comme il a été soulevé dans l'étude portant sur le cancer de l'ovaire, les spectres de tissus adipeux diffèrent beaucoup des spectres de tissus du parenchyme mammaire, des tissus conjonctifs et des tumeurs. Le signal de diffusion inélastique provenant des tissus adipeux est plus important que celui des autres tissus ce qui se traduit par un facteur de qualité spectrale (QF) plus élevé pour ces spectres (le QF moyen est de 0.81 ± 0.01 pour les spectres adipeux, 0.7 ± 0.05 pour les spectres de tissus normaux non adipeux, et 0.68 ± 0.05 pour les spectres de cancer). Il était donc important d'inclure plus de tissus sains non adipeux pour s'assurer que les modèles ne classifient pas tous les spectres de tissus non adipeux comme du cancer. C'est pourquoi une patiente subissant une chirurgie mammaire réductrice a été recrutée pour l'étude.

L'effet des sous-types de cancer du sein sur la classification des tissus n'a pas été évalué, puisque nous n'avions pas accès à ces informations au moment de l'étude.

8.3 Valider la détection du cancer du sein invasif sur des spécimens retirés au cours de chirurgies mammaires à l'aide de l'imagerie

Raman hyperspectrale et de modèles de classification entraînés sur des spectres acquis avec la sonde de spectroscopie Raman.

Le second objectif de ce projet était de tester la détection du cancer du sein invasif à l'aide de l'imagerie Raman hyperspectrale et l'application des modèles de classification développés à partir des spectres Raman acquis avec la sonde de spectroscopie sur des images hyperspectrales. L'étude présentée au chapitre 6 a atteint cet objectif. Une cohorte de 6 patientes fut recrutée et 8 images hyperspectrales furent acquises. Quatre tumeurs de différentes tailles furent identifiées sur les images. L'écrasante majorité des pixels d'image associés aux échantillons de tissus mammaires sains furent classés comme non cancéreux.

Le très petit nombre de patientes a rendu difficile de tirer des conclusions de cette étude. Ce petit nombre était dû en partie à la difficulté de trouver des patientes satisfaisant tous les critères de recrutement. Pour tenter de pallier ce problème, une nouvelle méthode de recalage spatiale a été développée. Cette méthode éliminait la nécessité de couper un échantillon de la tumeur et a ainsi permis d'inclure dans l'étude des patientes ayant une tumeur de moins d'un centimètre de diamètre. Cependant, les limites de temps sur la durée totale de l'étude et de disponibilité de la pathologiste ont rendu impossible l'inclusion de plus de patientes.

La tumeur dont la plus grande dimension était de seulement 3 mm a été identifiée par une moins de spectres classifiés comme cancéreux que les plus grosses tumeurs. Cependant, la Figure 8.2 montre que les spectres mal classifiés présentaient également une bande spectrale de phénylalanine associée au cancer. La différence entre les spectres de la région identifiée comme tumeur (Figure 8.2 a)) qui étaient classifiés comme *Cancer* et *Gras* était minime. Il est possible que, le signal Raman du gras étant nettement plus élevé que celui du cancer, le signal provenant de petites structures cancéreuses ait été masqué par le signal des tissus adipeux diffusant de région voisine de l'échantillon ou des couches inférieures du tissu. Si plus de données sont acquises, il serait également pertinent de développer un modèle SVM avec des hyperparamètres spécifiques aux mesures acquises avec le système d'imagerie hyperspectral, mais les bandes spectrales sélectionnées à partir de l'ensemble de données de la sonde de spectroscopie.

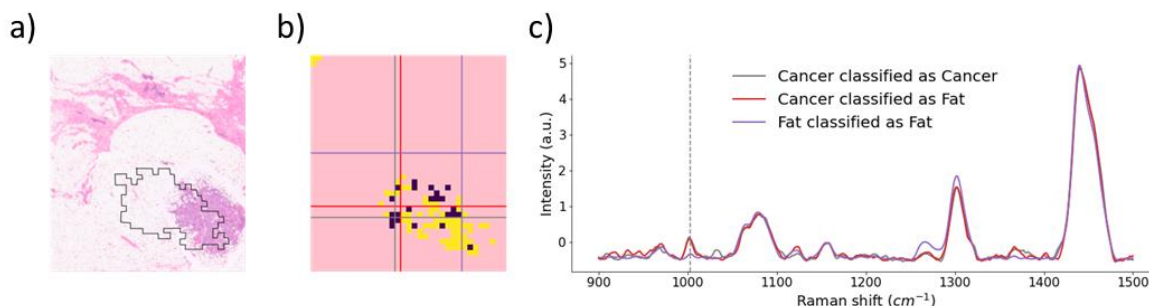


Figure 8.1: Échantillon contenant la tumeur de 3 millimètres a) résultats d'histologie b) résultats de classification (les pixels en violet sont classifiés comme *Cancer*, les pixels en jaune comme *Normal* et les pixels en rose comme *Gras*). b) Trois spectres Raman normalisés SNV sont présentés : un spectre de tissus classifiés comme *Cancer*, un spectre dans la région de la tumeur classifié comme *Gras* et un spectre de tissus adipeux. L'emplacement de chaque spectre est indiqué par une croix de même couleur sur b). Une ligne verticale indique la bande spectrale à 1004 cm^{-1} sur b)

Le temps d'intégration était également très élevé pour ces mesures avec un temps total de 20 minutes par échantillon. Cependant, ce temps d'intégration est obtenu en faisant 3 acquisitions consécutives par échantillon et il serait possible de ne faire qu'une acquisition par mesure. C'est ce qui a été fait pour la cinquième patiente et les facteurs de qualité des spectres de cette image étaient tous au-dessus de 0.5. Il pourrait également être envisagé de n'imager qu'une ligne sur deux lors de l'acquisition. L'image obtenue aurait ainsi une résolution de 20×42 au lieu de 40×42 , mais le temps d'acquisition serait divisé par deux. Il faudrait cependant évaluer si certaines structures cancéreuses plus petites risqueraient de ne pas être détectées si la résolution spectrale est diminuée.

8.4 Effectuer le développement et réaliser une preuve de concept d'un système d'imagerie Raman multi-spectrale permettant d'imager une bande spectrale sur une surface de 2 cm^2

Le dernier objectif de ce projet était de réaliser une première preuve de concept de l'imagerie Raman multi-spectrale. L'idée derrière cette méthode était d'imager individuellement quelques bandes Raman et d'obtenir suffisamment d'information moléculaire pour détecter le cancer. Une étude rétrospective a été effectuée sur quatre ensembles de spectres Raman acquis durant quatre études

cliniques différentes. Les données des deux études présentées aux chapitres 4 et 5 ont été incluses ainsi que les résultats d'une étude *in vivo* menée sur des patientes atteintes de différentes formes de cancer du cerveau et d'une étude *ex vivo* sur le cancer du poumon. Cela a permis de recenser les bandes spectrales indicatrices de cancer pour chaque ensemble de données et d'évaluer leur performance de classification individuellement. Il a ainsi été démontré que deux bandes spectrales étaient des biomarqueurs communs aux quatre types de cancer. De plus, des modèles de classifications basés uniquement sur les 3 bandes spectrales ayant les meilleures performances de classification individuelles performaient similairement aux modèles originellement publiés. Cette analyse a démontré le potentiel de l'imagerie multi-spectrale pour la détection du cancer. Ces résultats ont mené au développement d'un système permettant d'imager une bande spectrale sur une surface de 2.1 cm^2 en moins de 5 secondes. La preuve de concept a été réalisée avec la bande spectrale centrée à 1440 cm^{-1} . Afin de valider cette approche, le signal Raman obtenu a été comparé à celui obtenu pour les mêmes échantillons avec le système d'imagerie Raman hyperspectrale.

Avant le retrait du signal de fond (majoritairement causé par la fluorescence) la différence entre le signal de la partie adipeuse de l'échantillon et la partie fibreuse de l'échantillon à 1440 cm^{-1} observé avec le système multi-spectral était nettement moins élevé que celui observé avec le système hyperspectral (Figure 7.3 c) et d)). Le bruit de fond produit par le muscle et le gras étant similaire (voir Figure 7.2), la différence de signal entre les deux régions observées sur les images hyperspectrales venait majoritairement de la contribution de la diffusion inélastique. La contribution de la diffusion inélastique par rapport au bruit de fond pourrait être plus importante dans l'image hyperspectrale. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cela, par exemple les mesures prises avec le système hyperspectral ayant un plus grand temps d'intégration, le phénomène de *photo-bleaching* des fluorophores endogènes devait être plus important[232]. La densité de puissance était également plus grande sur les mesures hyperspectrales augmentant le rapport signal sur bruit de la diffusion. Il est aussi possible qu'il y ait eu des contributions d'autres signaux parasites dans les images multi-spectrales. D'autres variations des conditions expérimentales pourraient également avoir influencé les résultats. Cependant, le ratio entre le signal du muscle et du gras des images multi-spectrales augmentait après la soustraction du signal de fond et était similaire à celui observé sur les images hyperspectrales, ce qui indiquait que la méthode de soustraction des bandes a isolé avec succès la contribution de la diffusion inélastique.

Le rapport signal sur bruit défini comme :

$$\frac{\text{Signal Raman}}{\text{Signal Raman} + \text{Bruit de fond}} \quad (8.1)$$

(représenté par le ratio entre l'intensité de la Figure 7f) et 7d)) était significativement plus élevé avec le système d'imagerie hyperspectral. En effet, le rapport signal sur bruit du muscle/gras était de $65 \pm 12 / 142 \pm 10$ pour l'imagerie hyperspectrale et de $25 \pm 9 / 38 \pm 13$ pour l'imagerie multi-spectrale. Cela indique que lorsque la contribution du signal de fond était retirée avec la méthode de soustraction des bandes, une partie de la contribution de la diffusion inélastique est également perdue. Cela pourrait être dû à l'hypothèse affirmant que la contribution de la diffusion inélastique mesurée par les deux filtres situés de part et d'autre de la bande de 1440 cm^{-1} est nulle. En effet dû à la résolution spectrale des filtres optiques, il est probable que ces mesures incluent une partie signal de diffusion inélastique provenant du pic. Des filtres bande-passantes avec une largeur à mi-hauteur plus petite pourraient régler ce problème.

Le grand avantage de ce système est sa flexibilité. En effet, un ajout ou un changement de filtres optiques pourrait facilement être fait pour modifier les biomarqueurs imagés et un changement des composantes optiques permettrait de modifier le champ de vue du système.

CHAPITRE 9 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

Le travail de recherche effectué au cours de cette thèse portait principalement sur le développement d'outils pour la détection du cancer du sein peropératoire. Le chapitre 6 explore la possibilité d'utiliser l'imagerie Raman hyperspectrale pour analyser les marges des spécimens de chirurgie *ex vivo*. Les chapitres 4, 5 et 7 démontrent qu'il existe un petit nombre de bandes spectrales permettant la détection du cancer avec une grande sensibilité et spécificité et le chapitre 7 offre une preuve de concept d'une nouvelle méthode d'imagerie Raman multi-spectrale pour imager individuellement une bande spectrale. Ce travail ouvre les portes à de nouvelles applications cliniques de la spectroscopie Raman.

D'un point de vue clinique, le problème majeur de l'analyse des marges pendant une chirurgie mammaire conservatrice est la détection des carcinomes canauxaires *in situ* (CCIS). En effet, ces cancers ne sont pas visibles à l'œil nu par les pathologistes et sont responsables de la plupart des marges positives détectées après la chirurgie[233], [234]. Cependant, il n'a pas été possible de démontrer que la spectroscopie Raman permet de détecter les carcinomes *in situ*. Cela vient du fait que les mesures *ex vivo* qui ont été effectuées avec le système de sonde de spectroscopie et avec le système d'imagerie hyperspectrale étaient guidées par des pathologistes et ceux-ci ne pouvaient pas nous indiquer la location de carcinomes *in situ* sur les tranches de spécimen à cause de leur petite taille. Les carcinomes canauxaires *in situ* étant un aspect primordial du problème clinique, une prochaine étude devrait être effectuée pour valider la capacité de la spectroscopie Raman à les détecter. Deux options sont envisageables. Premièrement, des mesures pourraient être acquises *ex vivo* sur des échantillons provenant de biopsies par forage sous guidage stéréotaxique avec le système de sonde de spectroscopie. Une autre option serait d'imager toute une tranche de spécimen provenant de patientes pour lesquelles l'imagerie préopératoire a indiqué la présence de carcinomes *in situ*. Le recrutement des patientes serait ici crucial, car il faudrait que le spécimen soit suffisamment petit pour qu'une tranche soit imagée dans son entièreté par imagerie Raman hyperspectrale tout en respectant le temps alloué. Cette méthode semble moins prometteuse, car il est probable que plusieurs acquisitions sur plusieurs patientes soient nécessaires avant d'obtenir des mesures Raman sur un CCIS.

Une seconde problématique est la validation de la détection du cancer du sein *in vivo*. En effet, il n'est pas possible d'affirmer que les spectres de tissus mammaires acquis *in vivo* seront

comparables à ceux acquis *ex vivo* à cause de la différence de température et de vascularité. Une preuve de concept *in vivo* est donc nécessaire pour s'en assurer. Cependant, une telle étude *in vivo* présente un défi majeur. En effet, le but d'une chirurgie du cancer du sein est de contenir entièrement les cellules cancéreuses à l'intérieur du spécimen de chirurgie de sorte que ni les marges extérieures du spécimen ni le lit de la tumeur ne contiennent de cellules cancéreuses. Cela signifie qu'obtenir des mesures Raman de tissus cancer du sein *in vivo* risque d'être difficile. Bien que différentes études démontrent qu'entre 25-30% des patientes présentent au moins une marge positive[45], [47], [48], il est probable que la grande majorité des spectres Raman acquis *in vivo* durant des chirurgies mammaires conservatrices seront acquis sur des tissus normaux et adipeux. L'introduction d'une sonde de spectroscopie Raman dans une aiguille de biopsie pourrait être une solution pour acquérir des spectres de cancer *in vivo* durant les biopsies. Une telle procédure a déjà été réalisée pour les biopsies du cancer du cerveau[235] et de la prostate[96].

Les travaux présentés dans cette thèse soulèvent également la question de la place de l'imagerie Raman hyperspectrale dans la problématique clinique. Contrairement au système d'imagerie Raman multi-spectrale, il n'est pas facile de modifier le système hyperspectral pour augmenter le champ de vue ou pour réduire le temps d'intégration. Ces contraintes font peut-être de ce système un outil plus adapté aux analyses *ex vivo*. En effet, il est possible d'envisager une version de ce système utilisé en salle de pathologie pour imager une ou deux marges suspectes durant la chirurgie à la demande du chirurgien. L'utilisation *ex vivo* de ce système réduirait les contraintes (respect du MPE et flexibilité de la sonde) imposées au système et permettrait son utilisation en tant qu'outils d'analyse à grande spécificité moléculaire. Une version de ce système pourrait être conçue spécifiquement les applications *ex vivo*, sans la sonde et la matrice de fibre de 1 mètre. Ce nouveau design limiterait les pertes au niveau de l'excitation et de la collection.

En ce qui concerne le système d'imagerie Raman multi-spectrale, il a démontré un fort potentiel comme outils de détection, mais plusieurs ajustements restent nécessaires. Le design devrait être revu afin de s'assurer d'isoler complètement le système de la lumière ambiante. Un filtre passe-bande plus étroit devrait être ajouté au chemin d'illumination afin de s'assurer que l'échantillon est illuminé uniquement par un signal à 785 nm. L'alignement des composantes devrait également être revu. Une correction devrait être apportée pour les cas où les échantillons ne sont pas parfaitement plats. Deux options sont disponibles : une correction du signal par une mesure acquise en réflectance ou l'ajout d'un « nez » au système afin de créer un contact avec l'échantillon. Cette

dernière méthode est plus simple, mais présente le désavantage de limiter le champ de vue du système. Ce système pourrait également être installé sur un bras similaire aux microscopes chirurgicaux pour pouvoir être utilisé plus facilement en salle de chirurgie.

Finalement, il serait pertinent d'imager les bandes spectrales de 1004 cm^{-1} et 1302 cm^{-1} . En effet il a été démontré au chapitre 7 qu'une classification des tissus basée sur ces bandes permettrait d'obtenir des performances proches de celles présentées au chapitre 5. Cependant, la bande de phénylalanine (1004 cm^{-1}) est beaucoup plus étroite et sera sans doute plus difficile à imager. Des filtres optiques de bande passante plus étroite et de densité optique plus élevée pourraient être nécessaires.

Ce système pourrait aussi être utilisé en adéquation avec la sonde de spectroscopie Raman. Le système d'imagerie Raman multi-spectrale pourrait servir à interroger une grande zone de la cavité chirurgicale et identifier les zones potentiellement cancéreuses. La sonde de spectroscopie Raman pourrait ensuite être utilisée pour confirmer ou infirmer la présence de cancer dans cette zone.

L'originalité de ce projet vient de l'effort qui a été fait pour que les mesures *ex vivo* soient prises dans un contexte aussi près que possible des conditions *in vivo* peropératoires, de l'effort fait pour simplifier les modèles de classification et aussi par la qualité des résultats de classifications obtenus. L'utilisation d'un système hyperspectral pour la détection du cancer du sein est également une nouveauté. L'utilisation de deux mesures Raman de part et d'autre d'un pic Raman est nouvelle et le système d'imagerie Raman multi-spectrale est unique à ce projet.

RÉFÉRENCES

- [1] Canadian Cancer Society, “Canadian Cancer Society’s Advisory Committee on Cancer Statistics,” *Can. Cancer Stat.* 2017, 2017, doi: 0835-2976.
- [2] E. M. Ward *et al.*, “Cancer statistics: Breast cancer in situ,” *CA. Cancer J. Clin.*, 2015, doi: 10.3322/caac.21321.
- [3] U. Veronesi *et al.*, “Twenty-year follow-up of a randomized study comparing breast-conserving surgery with radical mastectomy for early breast cancer,” *N. Engl. J. Med.*, 2002, doi: 10.1056/NEJMoa020989.
- [4] A. A. Onitilo, J. M. Engel, R. V. Stankowski, and S. A. R. Doi, “Survival comparisons for breast conserving surgery and mastectomy revisited: Community experience and the role of radiation therapy,” *Clin. Med. Res.*, vol. 13, no. 2, pp. 65–73, 2015, doi: 10.3121/cmr.2014.1245.
- [5] S. J. Schnitt *et al.*, “The relationship between microscopic margins of resection and the risk of local recurrence in patients with breast cancer treated with breast-conserving surgery and radiation therapy,” *Cancer*, 1994, doi: 10.1002/1097-0142(19940915)74:6<1746::AID-CNCR2820740617>3.0.CO;2-Y.
- [6] A. Philpott, J. Wong, K. Elder, A. Gorelik, G. B. Mann, and A. Skandarajah, “Factors influencing reoperation following breast-conserving surgery.,” *ANZ J. Surg.*, vol. 88, no. 9, pp. 922–927, Sep. 2018, doi: 10.1111/ans.14467.
- [7] F. Tamburelli *et al.*, “Reoperation rate after breast conserving surgery as quality indicator in breast cancer treatment: A reappraisal,” *Breast*, vol. 53, pp. 181–188, Oct. 2020, doi: 10.1016/j.breast.2020.07.008.
- [8] M. De la Flor, C. Delgado, S. Martínez, M. Arenas, M. Gómez, and R. Reig, “Rate of effect of surgical margins after breast conserving surgery and estimation of direct costs.,” *Cir. Esp.*, vol. 100, no. 11, pp. 702–708, Nov. 2022, doi: 10.1016/j.cireng.2021.07.016.
- [9] D. Aziz *et al.*, “The role of reexcision for positive margins in optimizing local disease control after breast-conserving surgery for cancer,” *Breast J.*, vol. 12, no. 4, pp. 331–337, 2006, doi: 10.1111/j.1075-122X.2006.00271.x.

- [10] M. Thill, “MarginProbe®: Intraoperative margin assessment during breast conserving surgery by using radiofrequency spectroscopy,” *Expert Rev. Med. Devices*, vol. 10, no. 3, pp. 301–315, 2013, doi: 10.1586/erd.13.5.
- [11] F. C. Pop *et al.*, “Absence of residual fluorescence in the surgical bed at near-infrared fluorescence imaging predicts negative margins at final pathology in patients treated with breast-conserving surgery for breast cancer,” *Eur. J. Surg. Oncol.*, vol. 47, no. 2, pp. 269–275, 2021, doi: 10.1016/j.ejso.2020.09.036.
- [12] B. L. Smith *et al.*, “Feasibility Study of a Novel Protease-Activated Fluorescent Imaging System for Real-Time, Intraoperative Detection of Residual Breast Cancer in Breast Conserving Surgery,” *Ann. Surg. Oncol.*, vol. 27, no. 6, pp. 1854–1861, 2020, doi: 10.1245/s10434-019-08158-1.
- [13] B. W. Maloney, D. M. McClatchy, B. W. Pogue, K. D. Paulsen, W. A. Wells, and R. J. Barth, “Review of methods for intraoperative margin detection for breast conserving surgery,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 23, no. 10, p. 1, 2018, doi: 10.1117/1.jbo.23.10.100901.
- [14] H. P. Sinn and H. Kreipe, “A brief overview of the WHO classification of breast tumors, 4th edition, focusing on issues and updates from the 3rd edition,” *Breast Care*, vol. 8, no. 2, pp. 149–154, 2013, doi: 10.1159/000350774.
- [15] V. L. Ernster *et al.*, “Detection of Ductal Carcinoma In Situ in Women Undergoing Screening Mammography,” vol. 94, no. 20, 2002.
- [16] G. F. Schwartz, “The current treatment of ductal carcinoma in situ,” *Breast J.*, 2001, doi: 10.1046/j.1524-4741.2001.22057.x.
- [17] F. W. Foote and F. W. Stewart, “Lobular Carcinoma In Situ: A Rare Form of Mammary Cancer,” *CA. Cancer J. Clin.*, 1982, doi: 10.3322/canjclin.32.4.234.
- [18] M. Moran and B. G. Haffty, “Lobular carcinoma in situ as a component of breast cancer: The long- term outcome in patients treated with breast-conservation therapy,” *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 1998, doi: 10.1016/S0360-3016(97)00573-7.
- [19] K. L. Maughan, M. A. Lutterbie, and P. S. Ham, “Treatment of breast cancer,” *Am. Fam. Physician*, vol. 81, no. 11, pp. 1339–1346, 2010, doi: 10.1056/nejm199810013391407.

- [20] A. García-Fernández *et al.*, “Comparative Long-term Study of a Large Series of Patients with Invasive Ductal Carcinoma and Invasive Lobular Carcinoma. Loco-Regional Recurrence, Metastasis, and Survival,” *Breast J.*, vol. 21, no. 5, pp. 533–537, Sep. 2015, doi: <https://doi.org/10.1111/tbj.12455>.
- [21] J. A. Mouabbi, A. Hassan, B. Lim, G. N. Hortobagyi, D. Tripathy, and R. M. Layman, “Invasive lobular carcinoma: an understudied emergent subtype of breast cancer,” *Breast Cancer Res. Treat.*, vol. 193, no. 2, pp. 253–264, 2022, doi: 10.1007/s10549-022-06572-w.
- [22] L. Dossus and P. R. Benusiglio, “Lobular breast cancer: Incidence and genetic and non-genetic risk factors,” *Breast Cancer Res.*, vol. 17, no. 1, pp. 1–8, 2015, doi: 10.1186/s13058-015-0546-7.
- [23] D. P. Arps, P. Healy, L. Zhao, C. G. Kleer, and J. C. Pang, “Invasive ductal carcinoma with lobular features: a comparison study to invasive ductal and invasive lobular carcinomas of the breast,” *Breast Cancer Res. Treat.*, vol. 138, no. 3, pp. 719–726, Apr. 2013, doi: 10.1007/s10549-013-2493-2.
- [24] M. P. Budzik, M. M. Fudalej, and A. M. Badowska-Kozakiewicz, “Histopathological analysis of mucinous breast cancer subtypes and comparison with invasive carcinoma of no special type,” *Sci. Rep.*, vol. 11, no. 1, p. 5770, 2021, doi: 10.1038/s41598-021-85309-z.
- [25] F. Limaïem and M. Mlika, “Tubular breast carcinoma,” 2019.
- [26] J. Huober *et al.*, “Prognosis of medullary breast cancer: analysis of 13 International Breast Cancer Study Group (IBCSG) trials,” *Ann. Oncol.*, vol. 23, no. 11, pp. 2843–2851, 2012, doi: <https://doi.org/10.1093/annonc/mds105>.
- [27] S. K. Pal *et al.*, “Papillary carcinoma of the breast: an overview,” *Breast Cancer Res. Treat.*, vol. 122, no. 3, pp. 637–645, Aug. 2010, doi: 10.1007/s10549-010-0961-5.
- [28] Y.-L. Yang, B.-B. Liu, X. Zhang, and L. Fu, “Invasive micropapillary carcinoma of the breast: an update,” *Arch. Pathol. Lab. Med.*, vol. 140, no. 8, pp. 799–805, 2016.
- [29] G. K. Malhotra, X. Zhao, H. Band, and V. Band, “Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers,” *Cancer Biol. Ther.*, vol. 10, no. 10, pp. 955–960, Nov. 2010, doi: 10.4161/cbt.10.10.13879.

- [30] S. E. Singletary and J. L. Connolly, “Breast cancer staging: working with the sixth edition of the AJCC Cancer Staging Manual,” *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 56, no. 1, pp. 37–47, 2006.
- [31] E. Orrantia-Borunda, P. Anchondo-Nuñez, L. E. Acuña-Aguilar, F. O. Gómez-Valles, and C. A. Ramírez-Valdespino, “Subtypes of breast cancer,” *Breast Cancer [Internet]*, 2022.
- [32] N. Johns and J. M. Dixon, “Should patients with early breast cancer still be offered the choice of breast conserving surgery or mastectomy?,” *Eur. J. Surg. Oncol.*, vol. 42, no. 11, pp. 1636–1641, 2016, doi: 10.1016/j.ejso.2016.08.016.
- [33] M. Blichert-Toft *et al.*, “Long-term results of breast conserving surgery vs. mastectomy for early stage invasive breast cancer: 20-year follow-up of the Danish randomized DBCG-82TM protocol,” *Acta Oncol. (Madr.)*, vol. 47, no. 4, pp. 672–681, 2008.
- [34] J. Fajdic, D. Djurovic, N. Gotovac, and Z. Hrgovic, “Criteria and procedures for breast conserving surgery,” *Acta Inform. Medica*, vol. 21, no. 1, pp. 16–19, 2013, doi: 10.5455/aim.2013.21.16-19.
- [35] L. M. Apantaku, “Breast-conserving surgery for breast cancer,” *Am. Fam. Physician*, vol. 66, no. 12, pp. 2271–2278, 2002.
- [36] G. F. Schwartz *et al.*, “Consensus Conference on Breast Conservation,” *Semin. Breast Dis.*, 2007, doi: 10.1053/j.sembd.2007.10.005.
- [37] S. C. Lester, *Manual of surgical pathology: expert consult*. 2010.
- [38] S. Hartmann, T. Reimer, B. Gerber, J. Stubert, B. Stengel, and A. Stachs, “Wire localization of clip-marked axillary lymph nodes in breast cancer patients treated with primary systemic therapy,” *Eur. J. Surg. Oncol.*, vol. 44, no. 9, pp. 1307–1311, 2018.
- [39] H. H. J. Ferreira, C. Daruich de Souza, and M. E. C. M. Rostelato, “Radioactive Seed Localization for Conservative Surgery of Nonpalpable Breast Cancer: Recommendations for Technology Implantation Program,” *Int. J. Surg. Protoc.*, vol. 26, no. 1, pp. 94–106, 2022, doi: 10.29337/ijsp.182.
- [40] D. K. V Chung, “Rolling out radioguided occult lesion localisation for breast tumours,” *J. Med. Radiat. Sci.*, vol. 62, no. 1, pp. 1–2, Mar. 2015, doi: 10.1002/jmrs.94.
- [41] D. O. Jeffries, L. A. Dossett, and J. M. Jorns, “Localization for breast surgery the next

- generation,” *Arch. Pathol. Lab. Med.*, vol. 141, no. 10, pp. 1324–1329, 2017, doi: 10.5858/arpa.2017-0214-RA.
- [42] R. J. Gray, B. A. Pockaj, E. Garvey, and S. Blair, “Intraoperative margin management in breast-conserving surgery: a systematic review of the literature,” *Ann. Surg. Oncol.*, vol. 25, pp. 18–27, 2018.
- [43] M. J. Homer, T. J. Smith, and H. Safaii, “Prebiopsy needle localization: methods, problems, and expected results,” *Radiol. Clin. North Am.*, vol. 30, no. 1, pp. 139–153, 1992.
- [44] M. S. Moran, “SSO-ASTRO Consensus Guideline on Margins for Breast- Conserving Surgery with Whole Breast Irradiation in Stage I and II Invasive Breast Cancer,” vol. 10, no. 9, pp. 1319–1327, 2016, doi: 10.1097/JTO.0000000000000607.Safety.
- [45] G. C. Balch, S. K. Mithani, J. F. Simpson, M. C. Kelley, J. Gwin, and K. Bland, “Accuracy of intraoperative gross examination of surgical margin status in women undergoing partial mastectomy for breast malignancy,” *Am. Surg.*, 2005.
- [46] M. Bakhshandeh, O. Tutuncuoglu, G. Fischer, and S. Masood, “Use of Imprint Cytology for Assessment of Surgical Margins in Lumpectomy Specimens of Breast Cancer Patients,” *Diagn. Cytopathol.*, vol. 36, no. 4, pp. 245–251, 2008, doi: 10.1002/dc.
- [47] F. J. Fleming, A. D. K. Hill, E. W. Mc Dermott, A. O’Doherty, N. J. O’Higgins, and C. M. Quinn, “Intraoperative margin assessment and re-excision rate in breast conserving surgery,” *Eur. J. Surg. Oncol.*, 2004, doi: 10.1016/j.ejso.2003.11.008.
- [48] P. J. Lovrics *et al.*, “The relationship between surgical factors and margin status after breast-conservation surgery for early stage breast cancer,” *Am. J. Surg.*, 2009, doi: 10.1016/j.amjsurg.2008.03.007.
- [49] J. Landercasper, E. Whitacre, A. C. Degnim, and M. Al-Hamadani, “Reasons for Re-Excision After Lumpectomy for Breast Cancer: Insight from the American Society of Breast Surgeons MasterySM Database,” *Ann. Surg. Oncol.*, vol. 21, no. 10, pp. 3185–3191, 2014, doi: 10.1245/s10434-014-3905-1.
- [50] R. Jeevan *et al.*, “Reoperation rates after breast conserving surgery for breast cancer among women in England: Retrospective study of hospital episode statistics,” *BMJ*, vol. 345, no. 7869, pp. 1–9, 2012, doi: 10.1136/bmj.e4505.

- [51] T. S. Menes, P. I. Tartter, I. Bleiweiss, J. H. Godbold, A. Estabrook, and S. R. Smith, “The Consequence of Multiple Re-Excisions to Obtain Clear Lumpectomy Margins in Breast Cancer Patients,” *Ann. Surg. Oncol.*, vol. 12, no. 11, pp. 881–885, 2005, doi: 10.1245/ASO.2005.03.021.
- [52] N. B. Kouzminova, S. Aggarwal, A. Aggarwal, M. D. Allo, and A. Y. Lin, “Impact of initial surgical margins and residual cancer upon re-excision on outcome of patients with localized breast cancer,” *Am. J. Surg.*, vol. 198, no. 6, pp. 771–780, 2009, doi: <https://doi.org/10.1016/j.amjsurg.2009.05.027>.
- [53] R. G. Pleijhuis, M. Graafland, J. de Vries, J. Bart, J. S. de Jong, and 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, no. 10, pp. 2717–2730, 2009, doi: 10.1245/s10434-009-0609-z.
- [54] D. Arora, S. Hasan, E. Male, R. Abid, C. Ord, and E. Dauway, “Cost analysis of re-excisions for breast conserving surgery in Central Texas,” *J. Clin. Oncol.*, 2015, doi: 10.1200/jco.2015.33.15_suppl.e11534.
- [55] M. Ramos *et al.*, “Ultrasound-guided excision combined with intraoperative assessment of gross macroscopic margins decreases the rate of reoperations for non-palpable invasive breast cancer,” *Breast*, vol. 22, no. 4, pp. 520–524, 2013, doi: 10.1016/j.breast.2012.10.006.
- [56] R. J. Gray, B. A. Pockaj, E. Garvey, and S. Blair, “Intraoperative Margin Management in Breast-Conserving Surgery: A Systematic Review of the Literature,” *Ann. Surg. Oncol.*, vol. 25, no. 1, pp. 18–27, 2018, doi: 10.1245/s10434-016-5756-4.
- [57] H. Eggemann, T. Ignatov, S. D. Costa, and A. Ignatov, “Accuracy of ultrasound-guided breast-conserving surgery in the determination of adequate surgical margins,” *Breast Cancer Res. Treat.*, vol. 145, no. 1, pp. 129–136, 2014, doi: 10.1007/s10549-014-2932-8.
- [58] M. Thill, “MarginProbe®: Intraoperative margin assessment during breast conserving surgery by using radiofrequency spectroscopy,” *Expert Rev. Med. Devices*, 2013, doi: 10.1586/erd.13.5.
- [59] A. B. Chagpar *et al.*, “A randomized, controlled trial of cavity shave margins in breast cancer,” *N. Engl. J. Med.*, 2015, doi: 10.1056/NEJMoa1504473.

- [60] J. M. Dixon *et al.*, “Intra-operative assessment of excised breast tumour margins using ClearEdge imaging device,” *Eur. J. Surg. Oncol.*, 2016, doi: 10.1016/j.ejso.2016.07.141.
- [61] L. G. Wilke *et al.*, “Rapid noninvasive optical imaging of tissue composition in breast tumor margins,” *Am. J. Surg.*, vol. 198, no. 4, pp. 566–574, Oct. 2009, doi: 10.1016/j.amjsurg.2009.06.018.
- [62] I. J. Bigio *et al.*, “Diagnosis of breast cancer using elastic-scattering spectroscopy: preliminary clinical results,” *J. Biomed. Opt.*, 2000, doi: 10.1117/1.429990.
- [63] X. Yao, Y. Gan, E. Chang, H. Hibshoosh, S. Feldman, and C. Hendon, “Visualization and tissue classification of human breast cancer images using ultrahigh-resolution OCT,” *Lasers Surg. Med.*, vol. 49, no. 3, pp. 258–269, Mar. 2017, doi: 10.1002/lsm.22654.
- [64] A. M. Zysk *et al.*, “Intraoperative Assessment of Final Margins with a Handheld Optical Imaging Probe During Breast-Conserving Surgery May Reduce the Reoperation Rate: Results of a Multicenter Study,” *Ann. Surg. Oncol.*, 2015, doi: 10.1245/s10434-015-4665-2.
- [65] R. Li *et al.*, “Assessing breast tumor margin by multispectral photoacoustic tomography,” *Biomed. Opt. Express*, 2015, doi: 10.1364/boe.6.001273.
- [66] A. M. Laughney *et al.*, “Spectral discrimination of breast pathologies in situ using spatial frequency domain imaging,” *Breast Cancer Res.*, 2013, doi: 10.1186/bcr3455.
- [67] C. M. Robbins, J. Yang, J. F. Antaki, and J. M. Kainerstorfer, “Hand-held multi-wavelength spatial frequency domain imaging for breast cancer imaging,” in *Optical Tomography and Spectroscopy of Tissue XIII*, 2019, vol. 10874, pp. 94–100.
- [68] M. D. Keller *et al.*, “Autofluorescence and diffuse reflectance spectroscopy and spectral imaging for breast surgical margin analysis,” *Lasers Surg. Med.*, 2010, doi: 10.1002/lsm.20865.
- [69] R. Nachabé *et al.*, “Diagnosis of breast cancer using diffuse optical spectroscopy from 500 to 1600 nm: comparison of classification methods,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 16, no. 8, p. 87010, 2011.
- [70] J. E. Kalinyak, W. A. Berg, K. Schilling, and K. S. Madsen, “Breast cancer detection using

- high-resolution breast PET compared to whole-body PET or PET/CT,” *New England Journal of Medicine*, vol. 360, no. 15, pp. 1550–1551, 2009, doi: 10.1056/NEJMe0902377.
- [71] W. Xie *et al.*, “Microscopy with ultraviolet surface excitation for wide-area pathology of breast surgical margins,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 24, no. 2, p. 26501, 2019.
- [72] T. Lu *et al.*, “Rapid assessment of breast tumor margins using deep ultraviolet fluorescence scanning microscopy,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 25, no. 12, p. 126501, 2020.
- [73] Y. K. Tao *et al.*, “Assessment of breast pathologies using nonlinear microscopy,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2014, doi: 10.1073/pnas.1416955111.
- [74] M. Moschetta *et al.*, “Role of specimen us for predicting resection margin status in breast conserving therapy,” *G. di Chir.*, 2015, doi: 10.11138/gchir/2015.36.5.201.
- [75] J. E. Phipps, D. Gorpas, J. Unger, M. Darrow, R. J. Bold, and L. Marcu, “Automated detection of breast cancer in resected specimens with fluorescence lifetime imaging,” *Phys. Med. Biol.*, 2018, doi: 10.1088/1361-6560/aa983a.
- [76] C. Boudoux, *Fundamentals of biomedical optics*. 2017.
- [77] T. Schweizer, H. Kubach, and T. Koch, “Investigations to characterize the interactions of light radiation, engine operating media and fluorescence tracers for the use of qualitative light-induced fluorescence in engine systems,” *Automot. Engine Technol.*, vol. 6, no. 3–4, pp. 275–287, 2021, doi: 10.1007/s41104-021-00092-3.
- [78] M. A. Omary and H. H. Patterson, “Luminescence, Theory,” J. C. Lindon, G. E. Tranter, and D. W. B. T.-E. of S. and S. (Third E. Koppenaal, Eds. Oxford: Academic Press, 2017, pp. 636–653.
- [79] M. Y. Berezin and S. Achilefu, “Fluorescence lifetime measurements and biological imaging,” *Chem. Rev.*, vol. 110, no. 5, pp. 2641–2684, May 2010, doi: 10.1021/cr900343z.
- [80] D. L. Andrews, *Rayleigh scattering and raman effect, theory*, 3rd ed. Elsevier Ltd., 2016.
- [81] V. K. Sharma, V. Kanchana, M. K. Gupta, and R. Mittal, “Scattering lifetime and high figure of merit in CsAgO predicted by methods beyond relaxation time approximation,” *J. Phys. Condens. Matter*, vol. 34, no. 29, May 2022, doi: 10.1088/1361-648X/ac6e1e.
- [82] D. A. Long, *The Raman effect: a unified treatment of the theory of Raman scattering by*

molecules. 2002. 2002.

- [83] P. Taroni, A. Pifferi, A. Torricelli, D. Comelli, and R. Cubeddu, “In vivo absorption and scattering spectroscopy of biological tissues,” *Photochem. Photobiol. Sci.*, vol. 2, no. 2, pp. 124–129, 2003.
- [84] M. Ehler, “Principal component model of multispectral data for near real-time skin chromophore mapping,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 15, no. 4, p. 046007, 2010, doi: 10.1117/1.3463010.
- [85] B. Sams, “American National Standard,” *SMPTE J.*, vol. 95, no. 5, pp. 601–602, 2012, doi: 10.5594/j17740.
- [86] S. L. Jacques, “Quick analysis of optical spectra to quantify epidermal melanin and papillary dermal blood content of skin,” *J. Biophotonics*, 2015, doi: 10.1002/jbio.201400103.
- [87] K. Aubertin *et al.*, “Combining high wavenumber and fingerprint Raman spectroscopy for the detection of prostate cancer during radical prostatectomy,” *Biomed. Opt. Express*, 2018, doi: 10.1364/boe.9.004294.
- [88] S. Yang, “High-Wavenumber Raman Analysis,” *Recent Dev. At. Force Microsc. Raman Spectrosc. Mater. Charact.*, p. 103, 2021.
- [89] S. Koljenović *et al.*, “Tissue characterization using high wave number Raman spectroscopy,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 10, no. 3, p. 031116, 2005, doi: 10.1117/1.1922307.
- [90] I. P. Santos *et al.*, “Raman spectroscopy for cancer detection and cancer surgery guidance: Translation to the clinics,” *Analyst*. 2017, doi: 10.1039/c7an00957g.
- [91] M. Jermyn *et al.*, “Intraoperative brain cancer detection with Raman spectroscopy in humans,” *Sci. Transl. Med.*, 2015, doi: 10.1126/scitranslmed.aaa2384.
- [92] M. Jermyn *et al.*, “Highly accurate detection of cancer in situ with intraoperative, label-free, multimodal optical spectroscopy,” *Cancer Res.*, 2017, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-0668.
- [93] J. Desroches *et al.*, “Development and first in-human use of a Raman spectroscopy guidance system integrated with a brain biopsy needle,” *Journal of Biophotonics*. 2019, doi: 10.1002/jbio.201800396.

- [94] A. S. Haka *et al.*, “In vivo Margin Assessment during Partial Mastectomy Breast Surgery Using Raman Spectroscopy,” no. 6, pp. 3317–3323, 2006, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2815.
- [95] R. O. P. Draga *et al.*, “In vivo bladder cancer diagnosis by high-volume Raman spectroscopy,” *Anal. Chem.*, vol. 82, no. 14, pp. 5993–5999, Jul. 2010, doi: 10.1021/ac100448p.
- [96] F. Picot *et al.*, “Image-guided Raman spectroscopy navigation system to improve transperineal prostate cancer detection. Part 1: Raman spectroscopy fiber-optics system and in situ tissue characterization,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 27, no. 09, pp. 1–26, 2022, doi: 10.1117/1.jbo.27.9.095003.
- [97] E. M. Kanter *et al.*, “Multiclass discrimination of cervical precancers using Raman spectroscopy,” *J. Raman Spectrosc.*, vol. 40, no. 2, pp. 205–211, Feb. 2009, doi: 10.1002/jrs.2108.
- [98] M. S. Bergholt *et al.*, “Simultaneous fingerprint and high-wavenumber fiber-optic Raman spectroscopy enhances real-time in vivo diagnosis of adenomatous polyps during colonoscopy,” *J. Biophotonics*, vol. 9, no. 4, pp. 333–342, 2016, doi: 10.1002/jbio.201400141.
- [99] H. C. McGregor *et al.*, “Real-time endoscopic Raman spectroscopy for in vivo early lung cancer detection,” *J. Biophotonics*, vol. 10, no. 1, pp. 98–110, 2017.
- [100] H. C. McGregor, M. A. Short, S. Lam, T. Shaipanich, E. L. Beaudoin, and H. Zeng, “Development and in vivo test of a miniature Raman probe for early cancer detection in the peripheral lung. *J Biophotonics*. 2018; p. e201800055.” .
- [101] H. Krishna, S. K. Majumder, P. Chaturvedi, M. Sidramesh, and P. K. Gupta, “In vivo Raman spectroscopy for detection of oral neoplasia: a pilot clinical study,” *J. Biophotonics*, vol. 7, no. 9, pp. 690–702, 2014.
- [102] J. Schleusener *et al.*, “In vivo study for the discrimination of cancerous and normal skin using fibre probe-based Raman spectroscopy,” *Exp. Dermatol.*, vol. 24, no. 10, pp. 767–772, 2015.
- [103] J. Wang *et al.*, “Comparative study of the endoscope-based bevelled and volume fiber-optic

- Raman probes for optical diagnosis of gastric dysplasia in vivo at endoscopy,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 407, pp. 8303–8310, 2015.
- [104] M. S. Bergholt *et al.*, “Real-time depth-resolved fiber optic Raman endoscopy for in vivo diagnosis of gastric precancer,” in *Biomedical Vibrational Spectroscopy VI: Advances in Research and Industry*, 2014, vol. 8939, pp. 108–112.
- [105] M. S. Bergholt *et al.*, “Fiber-optic Raman spectroscopy probes gastric carcinogenesis in vivo at endoscopy,” *J. Biophotonics*, vol. 6, no. 1, pp. 49–59, 2013.
- [106] K. Kong, F. Zaabar, E. Rakha, I. Ellis, A. Koloydenko, and I. Notingher, “Towards intra-operative diagnosis of tumours during breast conserving surgery by selective-sampling Raman micro-spectroscopy,” *Phys. Med. Biol.*, 2014, doi: 10.1088/0031-9155/59/20/6141.
- [107] G. Thomas *et al.*, “Evaluating feasibility of an automated 3-dimensional scanner using Raman spectroscopy for intraoperative breast margin assessment,” *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–14, 2017, doi: 10.1038/s41598-017-13237-y.
- [108] A. S. Haka, K. E. Shafer-Peltier, M. Fitzmaurice, J. Crowe, R. R. Dasari, and M. S. Feld, “Diagnosing breast cancer by using Raman spectroscopy,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, no. 35, pp. 12371–12376, 2005, doi: 10.1073/pnas.0501390102.
- [109] M. Moreno *et al.*, “Raman spectroscopy study of breast disease,” *Theor. Chem. Acc.*, vol. 125, no. 3–6, pp. 329–334, 2010, doi: 10.1007/s00214-009-0698-6.
- [110] Y. Wang *et al.*, “Raman-encoded molecular imaging with topically applied SERS nanoparticles for intraoperative guidance of lumpectomy,” *Cancer Res.*, vol. 77, no. 16, pp. 4506–4516, 2017, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-0709.
- [111] Y. Wang *et al.*, “Quantitative molecular phenotyping with topically applied SERS nanoparticles for intraoperative guidance of breast cancer lumpectomy,” no. January, pp. 1–12, 2016, doi: 10.1038/srep21242.
- [112] M. D. Keller *et al.*, “Development of a spatially offset Raman spectroscopy probe for breast tumor surgical margin evaluation Development of a spatially offset Raman spectroscopy probe for breast tumor surgical margin evaluation,” doi: 10.1117/1.3600708.
- [113] D. W. Shipp, E. A. Rakha, A. A. Koloydenko, R. D. Macmillan, and I. O. Ellis, “Intra-

- operative spectroscopic assessment of surgical margins during breast conserving surgery,” pp. 1–14, 2018.
- [114] C. Reble, I. Gersonde, C. A. Lieber, and J. Helfmann, “Influence of tissue absorption and scattering on the depth dependent sensitivity of Raman fiber probes investigated by Monte Carlo simulations,” *Biomed. Opt. Express*, 2011, doi: 10.1364/boe.2.000520.
- [115] J. Horsnell *et al.*, “Raman spectroscopy — A new method for the intra-operative assessment of axillary lymph nodes †,” vol. 19, pp. 3042–3047, 2010, doi: 10.1039/c0an00527d.
- [116] C. Yu, E. Gestl, K. Eckert, D. Allara, and J. Irudayaraj, “Characterization of human breast epithelial cells by confocal Raman microspectroscopy,” *Cancer Detect. Prev.*, vol. 30, no. 6, pp. 515–522, 2006, doi: 10.1016/j.cdp.2006.10.007.
- [117] J. Ramsey, S. Ranganathan, R. L. McCreery, and J. Zhao, “Performance comparisons of conventional and line-focused surface Raman spectrometers,” *Appl. Spectrosc.*, vol. 55, no. 6, pp. 767–773, 2001, doi: 10.1366/0003702011952460.
- [118] B. Boldrini, W. Kessler, K. Rebner, and 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, no. 5, pp. 483–508, 2012, doi: 10.1255/1003.
- [119] E. N. Lewis, J. W. Schoppelrei, L. Makein, L. H. Kidder, and E. Lee, *Near-Infrared Chemical Imaging for Product and Process Understanding*. 2010.
- [120] M. Monici, “Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications,” *Biotechnol. Annu. Rev.*, vol. 11, no. SUPPL., pp. 227–256, 2005, doi: 10.1016/S1387-2656(05)11007-2.
- [121] J. Zhao, H. Lui, D. I. Mclean, and H. Zeng, “Automated autofluorescence background subtraction algorithm for biomedical raman spectroscopy,” *Appl. Spectrosc.*, vol. 61, no. 11, pp. 1225–1232, 2007, doi: 10.1366/000370207782597003.
- [122] G. Schulze, A. Jirasek, M. L. Marcia, A. Lim, R. F. B. Turner, and M. W. Blades, “Investigation of selected baseline removal techniques as candidates for automated implementation,” *Appl. Spectrosc.*, vol. 59, no. 5, pp. 545–574, 2005.
- [123] M. N. Leger and A. G. Ryder, “Comparison of Derivative Preprocessing and Automated

- Polynomial Baseline Correction Method for Classification and Quantification of Narcotics in Solid Mixtures,” *Appl. Spectrosc.*, vol. 60, no. 2, pp. 182–193, 2006, [Online]. Available: <https://opg.optica.org/as/abstract.cfm?URI=as-60-2-182>.
- [124] G. Sheehy, F. Picot, F. Dallaire, K. Ember, T. Nguyen, and F. Leblond, “Open-sourced Raman spectroscopy data processing package implementing a novel baseline removal algorithm validated from multiple datasets acquired in human tissue and biofluids,” *J. Biomed. Opt.*, 2023.
- [125] A. P. Shreve, N. J. Cherepy, and R. A. Mathies, “Effective Rejection of Fluorescence Interference in Raman Spectroscopy Using a Shifted Excitation Difference Technique,” *Appl. Spectrosc.*, vol. 46, no. 4, pp. 707–711, 1992, doi: 10.1366/0003702924125122.
- [126] M. T. Gebrekidan, C. Knipfer, F. Stelzle, J. Popp, S. Will, and A. Braeuer, “A shifted-excitation Raman difference spectroscopy (SERDS) evaluation strategy for the efficient isolation of Raman spectra from extreme fluorescence interference,” *J. Raman Spectrosc.*, vol. 47, no. 2, pp. 198–209, 2016, doi: 10.1002/jrs.4775.
- [127] S. Dochow *et al.*, “Classification of Raman spectra of single cells with autofluorescence suppression by wavelength modulated excitation,” *Anal. Methods*, vol. 5, no. 18, pp. 4608–4614, 2013, doi: 10.1039/c3ay40193f.
- [128] D. Wei, S. Chen, and Q. Liu, “Review of fluorescence suppression techniques in Raman spectroscopy,” *Applied Spectroscopy Reviews*. 2015, doi: 10.1080/05704928.2014.999936.
- [129] B. Chase, “BNIX Chase,” vol. 59, 1987.
- [130] N. Blake, R. Gaifulina, L. D. Griffin, I. M. Bell, and G. M. H. Thomas, “Machine Learning of Raman Spectroscopy Data for Classifying Cancers: A Review of the Recent Literature,” *Diagnostics*, vol. 12, no. 6, pp. 1–21, 2022, doi: 10.3390/diagnostics12061491.
- [131] S. S. Skiena, *The Data Science Design Manual*. 2017.
- [132] S. Sigurdsson, P. A. Philipsen, L. K. Hansen, J. Larsen, M. Gniadecka, and H. Christian Wulf, “Detection of skin cancer by classification of Raman spectra,” *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. 51, no. 10, pp. 1784–1793, 2004, doi: 10.1109/TBME.2004.831538.
- [133] S. K. Teh, W. Zheng, K. Y. Ho, M. Teh, K. G. Yeoh, and Z. Huang, “Diagnosis of gastric

- cancer using near-infrared Raman spectroscopy and classification and regression tree techniques,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 13, no. 3, p. 034013, 2008, doi: 10.1117/1.2939406.
- [134] S. K. Koya *et al.*, “Accurate identification of breast cancer margins in microenvironments of ex-vivo basal and luminal breast cancer tissues using Raman spectroscopy,” *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, vol. 151, no. May, 2020, doi: 10.1016/j.prostaglandins.2020.106475.
- [135] S. K. Teh, W. Zheng, K. Y. Ho, M. Teh, K. G. Yeoh, and Z. Huang, “Diagnostic potential of near-infrared Raman spectroscopy in the stomach: Differentiating dysplasia from normal tissue,” *Br. J. Cancer*, vol. 98, no. 2, pp. 457–465, 2008, doi: 10.1038/sj.bjc.6604176.
- [136] A. S. Haka, K. E. Shafer-Peltier, M. Fitzmaurice, J. Crowe, R. R. Dasari, and M. S. Feld, “Diagnosing breast cancer by using Raman spectroscopy,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, no. 35, pp. 12371–12376, 2005, doi: 10.1073/pnas.0501390102.
- [137] W. Liu, Z. Sun, J. Chen, and C. Jing, “Raman Spectroscopy in Colorectal Cancer Diagnostics: Comparison of PCA-LDA and PLS-DA Models,” *J. Spectrosc.*, vol. 2016, p. 1603609, 2016, doi: 10.1155/2016/1603609.
- [138] E. Widjaja, W. Zheng, and Z. Huang, “Classification of colonic tissues using near-infrared Raman spectroscopy and support vector machines,” *Int. J. Oncol.*, vol. 32, no. 3, pp. 653–662, 2008, doi: 10.3892/ijo.32.3.653.
- [139] C. He, X. Wu, J. Zhou, Y. Chen, and J. Ye, “Raman optical identification of renal cell carcinoma via machine learning,” *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 252, p. 119520, 2021, doi: 10.1016/j.saa.2021.119520.
- [140] M. Pohar, M. Blas, and S. Turk, “Comparison of logistic regression and linear discriminant analysis,” *Adv. Methodol. Stat.*, vol. 1, no. 1, pp. 143–161, 2004, doi: 10.51936/ayrt6204.
- [141] R. Liu and D. F. Gillies, “Overfitting in linear feature extraction for classification of high-dimensional image data,” *Pattern Recognit.*, vol. 53, pp. 73–86, 2016, doi: 10.1016/j.patcog.2015.11.015.
- [142] E. Levina, A. Rothman, and J. Zhu, “Sparse estimation of large covariance matrices via a nested Lasso penalty,” *Ann. Appl. Stat.*, vol. 2, no. 1, pp. 245–263, 2008, doi: 10.1214/07-AoAs139.

- [143] N. Zhao, W. Mio, and X. Liu, “A hybrid PCA-LDA model for dimension reduction,” *Proc. Int. Jt. Conf. Neural Networks*, pp. 2184–2190, 2011, doi: 10.1109/IJCNN.2011.6033499.
- [144] X. Wu *et al.*, “Rapid and accurate identification of colon cancer by Raman spectroscopy coupled with convolutional neural networks,” *Jpn. J. Appl. Phys.*, vol. 60, no. 6, p. 67001, 2021, doi: 10.35848/1347-4065/ac0005.
- [145] W. Lee, A. T. M. Lenferink, C. Otto, and H. L. Offerhaus, “Classifying Raman spectra of extracellular vesicles based on convolutional neural networks for prostate cancer detection,” *J. Raman Spectrosc.*, vol. 51, no. 2, pp. 293–300, 2020, doi: 10.1002/jrs.5770.
- [146] M. Sattlecker, C. Bessant, J. Smith, and N. Stone, “Investigation of support vector machines and Raman spectroscopy for lymph node diagnostics,” *Analyst*, vol. 135, no. 5, pp. 895–901, 2010, doi: 10.1039/b920229c.
- [147] J. Singh, S. P. Mohanty, and D. K. Pradhan, *An Introduction to Statistical Learning*. 2013.
- [148] G. C. Cawley and N. L. C. Talbot, “On over-fitting in model selection and subsequent selection bias in performance evaluation,” *J. Mach. Learn. Res.*, vol. 11, pp. 2079–2107, 2010.
- [149] M. Sattlecker, N. Stone, and C. Bessant, “Current trends in machine-learning methods applied to spectroscopic cancer diagnosis,” *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 59, pp. 17–25, 2014, doi: 10.1016/j.trac.2014.02.016.
- [150] A. M. Molinaro, R. Simon, and R. M. Pfeiffer, “Prediction error estimation: a comparison of resampling methods,” *Bioinformatics*, vol. 21, no. 15, pp. 3301–3307, 2005.
- [151] M. C. Alonso, J. A. Malpica, and A. M. de Agirre, “Consequences of the Hughes phenomenon on some classification techniques,” in *Proceedings of the ASPRS 2001 annual conference*, 2011, pp. 1–5.
- [152] B. M. Shahshahani and D. A. Landgrebe, “The effect of unlabeled samples in reducing the small sample size problem and mitigating the Hughes phenomenon,” *IEEE Trans. Geosci. Remote Sens.*, vol. 32, no. 5, pp. 1087–1095, 1994.
- [153] T. Oommen, D. Misra, N. K. C. Twarakavi, A. Prakash, B. Sahoo, and S. Bandopadhyay, “An objective analysis of support vector machine based classification for remote sensing,”

- Math. Geosci.*, vol. 40, pp. 409–424, 2008.
- [154] M. Pal and G. M. Foody, “Feature selection for classification of hyperspectral data by SVM,” *IEEE Trans. Geosci. Remote Sens.*, vol. 48, no. 5, pp. 2297–2307, 2010.
- [155] L. A. Torre *et al.*, “Ovarian Cancer Statistics , 2018,” pp. 284–296, 2018, doi: 10.3322/caac.21456.
- [156] B. E. Greer, R. E. Swensen, and H. J. Gray, “Surgery for Ovarian Cancer: Rationale and Guidelines Surgical Staging: Early Ovarian Cancer,” *J. Natl. Compr. Cancer Netw.*, vol. 2, no. 6, pp. 561–568, 2004.
- [157] B. Orr and R. P. Edwards, “Diagnosis and Treatment of Ovarian Cancer,” *Hematol. Oncol. Clin. North Am.*, vol. 32, no. 6, pp. 943–964, 2018, doi: 10.1016/j.hoc.2018.07.010.
- [158] A. De Gramont, “Treatment of epithelial ovarian cancer,” *Press. Medicale*, vol. 20, no. 5, pp. 199–201, 1991, doi: 10.3322/canjclin.45.2.88.
- [159] F. S. Falcetta *et al.*, “Laparoscopy versus laparotomy for FIGO stage I ovarian cancer,” *Cochrane database Syst. Rev.*, vol. 10, no. 10, p. CD005344, Oct. 2016, doi: 10.1002/14651858.CD005344.pub4.
- [160] R. F. Ozols, “Epithelial cancer of the ovary: current data,” *Bull. Cancer*, vol. 80, no. 11, pp. 955–970, 1993.
- [161] B. R. E. Bristow, R. S. Tomacruz, D. K. Armstrong, E. L. Trimble, and F. J. Montz, “Bristow, B. R. E. et al. (2016) ‘Survival Effect of Maximal Cytoreductive Surgery for Advanced Ovarian Carcinoma ..,’” vol. 20, no. 5, pp. 1248–1259, 2016.
- [162] A. P. M. Heintz *et al.*, “Carcinoma of the ovary. FIGO 26th Annual Report on the Results of Treatment in Gynecological Cancer,” *Int. J. Gynaecol. Obstet. Off. organ Int. Fed. Gynaecol. Obstet.*, vol. 95 Suppl 1, pp. S161-92, Nov. 2006, doi: 10.1016/S0020-7292(06)60033-7.
- [163] N. D. G. Ratnavelu, A. Patel, P. Cross, A. Bryant, P. P. L. Martin-Hirsch, and R. Naik, “Intra-operative frozen section analysis for the diagnosis of early stage ovarian cancer in suspicious pelvic masses,” *Cochrane Database Syst. Rev.*, vol. 2013, no. 2, 2013, doi: 10.1002/14651858.CD010360.

- [164] Schueler, Trimbos, Hermans, and Fleuren, “The yield of surgical staging in presumed early stage ovarian cancer: benefits or doubts?,” *Int. J. Gynecol. Cancer*, vol. 8, no. 2, pp. 95–102, 1998.
- [165] E. Leblanc *et al.*, “Surgical staging of early invasive epithelial ovarian tumors,” in *Seminars in surgical oncology*, 2000, vol. 19, no. 1, pp. 36–41.
- [166] R. C. Young *et al.*, “Staging laparotomy in early ovarian cancer,” *Jama*, vol. 250, no. 22, pp. 3072–3076, 1983.
- [167] M. Timmermans, G. S. Sonke, K. K. Van de Vijver, M. A. van der Aa, and R. F. P. M. Kruitwagen, “No improvement in long-term survival for epithelial ovarian cancer patients: A population-based study between 1989 and 2014 in the Netherlands,” *Eur. J. Cancer*, vol. 88, pp. 31–37, 2018, doi: 10.1016/j.ejca.2017.10.030.
- [168] B. R. E. Bristow, R. S. Tomacruz, D. K. Armstrong, E. L. Trimble, and F. J. Montz, “Maximal Cytoreductive Surgery for Advanced Ovarian Carcinoma During the Platinum Era ;,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 20, no. 5, pp. 1248–1259, 2008.
- [169] A. Makar, M. Baekelandt, C. G. Trope, and G. B. Kristensen, “makar1995.pdf,” *Gynecol. Oncol.*, vol. 56, pp. 15–180, 1993.
- [170] L. M. A. Crane *et al.*, “Intraoperative Imaging in Ovarian Cancer : Fact or Fiction ?,” vol. 10, no. 4, pp. 248–257, 2011, doi: 10.2310/7290.2011.00004.
- [171] C. E. S. Hoogstins *et al.*, “A Novel Tumor-Speci fi c Agent for Intraoperative Near-Infrared Fluorescence Imaging : A Translational Study in Healthy Volunteers and Patients with Ovarian Cancer,” pp. 2929–2939, 2016, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-2640.
- [172] K. Viswanathan, K. Soumya, K. Gurusankar, and S. Jeyavijayan, “Raman spectroscopic analysis of ovarian cancer tissues and normal ovarian tissues,” *Laser Phys.*, vol. 29, no. 4, 2019, doi: 10.1088/1555-6611/ab05bb.
- [173] K. Maheedhar *et al.*, “Diagnosis of ovarian cancer by Raman spectroscopy: A pilot study,” *Photomed. Laser Surg.*, vol. 26, no. 2, pp. 83–90, 2008, doi: 10.1089/pho.2007.2128.
- [174] C. M. Krishna *et al.*, “Raman spectroscopy studies for diagnosis of cancers in human uterine cervix,” *Vib. Spectrosc.*, vol. 41, no. 1, pp. 136–141, 2006, doi:

10.1016/j.vibspec.2006.01.011.

- [175] F. Dallaire *et al.*, “Quantitative spectral quality assessment technique validated using intraoperative in vivo Raman spectroscopy measurements,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 25, no. 04, p. 1, 2020, doi: 10.1117/1.jbo.25.4.040501.
- [176] D. M. Hawkins, “The Problem of Overfitting,” *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, vol. 44, no. 1, pp. 1–12, 2004, doi: 10.1021/ci0342472.
- [177] J. Neumann, C. Schnörr, and G. Steidl, “Combined SVM-based feature selection and classification,” *Mach. Learn.*, vol. 61, no. 1–3, pp. 129–150, 2005, doi: 10.1007/s10994-005-1505-9.
- [178] N. Ksantini *et al.*, “Time-gated interferometric detection can increase Raman scattering to fluorescence signal ratio in biological samples,” *J. Biophotonics*, no. June, pp. 1–6, 2021, doi: 10.1002/jbio.202100188.
- [179] H. Sung *et al.*, “Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries,” *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 71, no. 3, pp. 209–249, 2021, doi: 10.3322/caac.21660.
- [180] M. Arnold *et al.*, “Current and future burden of breast cancer: Global statistics for 2020 and 2040,” *Breast*, vol. 66, no. June, pp. 15–23, 2022, doi: 10.1016/j.breast.2022.08.010.
- [181] A. U. Buzdar, “Breast cancer in men,” *Oncology*, vol. 17, no. 10, pp. 1361–1364, 2003, doi: 10.1177/1557988311416495.
- [182] P. M. Webb, M. C. Cummings, C. J. Bain, and C. M. Furnival, “Changes in survival after breast cancer: Improvements in diagnosis or treatment?,” *Breast*, vol. 13, no. 1, pp. 7–14, 2004, doi: 10.1016/S0960-9776(03)00129-2.
- [183] B. J. Yoder, E. J. Wilkinson, and N. A. Massoll, “Molecular and morphologic distinctions between infiltrating ductal and lobular carcinoma of the breast,” *Breast Journal*. 2007, doi: 10.1111/j.1524-4741.2007.00393.x.
- [184] L. Bartella, C. S. Smith, D. D. Dershaw, and L. Liberman, “Imaging Breast Cancer,” *Radiol. Clin. North Am.*, vol. 45, no. 1, pp. 45–67, 2007, doi: 10.1016/j.rcl.2006.10.007.
- [185] L. Jacobs, “Positive margins: The challenge continues for breast surgeons,” *Ann. Surg.*

- Oncol.*, vol. 15, no. 5, pp. 1271–1272, 2008, doi: 10.1245/s10434-007-9766-0.
- [186] J. M. Dixon, L. Renshaw, O. Young, and D. Kulkarni, “Intra-operative assessment of excised breast tumour margins using ClearEdge imaging device,” vol. 42, no. 2016, pp. 1834–1840, 2019.
- [187] S. J. Erickson-Bhatt *et al.*, “Real-time imaging of the resection bed using a handheld probe to reduce incidence of microscopic positive margins in cancer surgery,” *Cancer Res.*, 2015, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-0464.
- [188] F. Fereidouni *et al.*, “Microscopy with ultraviolet surface excitation for rapid slide-free histology,” *Nat. Biomed. Eng.*, 2017, doi: 10.1038/s41551-017-0165-y.
- [189] A. K. Glaser *et al.*, “Light-sheet microscopy for slide-free non-destructive pathology of large clinical specimens,” *Nat. Biomed. Eng.*, 2017, doi: 10.1038/s41551-017-0084.
- [190] J. Mertz, “Nonlinear microscopy: New techniques and applications,” *Current Opinion in Neurobiology*. 2004, doi: 10.1016/j.conb.2004.08.013.
- [191] Y. Yang *et al.*, “Label-free imaging of human breast tissues using coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy,” 2011, doi: 10.1117/12.871063.
- [192] H. Abramczyk, B. Brozek-Pluska, J. Surmacki, J. Jablonska-Gajewicz, and R. Kordek, “Raman ‘optical biopsy’ of human breast cancer,” *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, vol. 108, no. 1–2, pp. 74–81, 2012, doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2011.10.004.
- [193] É. Lemoine *et al.*, “Feature engineering applied to intraoperative: In vivo Raman spectroscopy sheds light on molecular processes in brain cancer: A retrospective study of 65 patients,” *Analyst*, vol. 144, pp. 6517–6532, 2019, doi: 10.1039/c9an01144g.
- [194] S. David *et al.*, “Multispectral label-free Raman spectroscopy can detect ovarian and endometrial cancer with high accuracy,” *J. Biophotonics*, vol. 15, no. 2, pp. 1–10, 2022, doi: 10.1002/jbio.202100198.
- [195] D. Grajales *et al.*, “Image-guided Raman spectroscopy navigation system to improve transperineal prostate cancer detection. Part 2: in-vivo tumor-targeting using a classification model combining spectral and MRI-radiomics features,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 27, no. 09, pp. 1–16, 2022, doi: 10.1117/1.jbo.27.9.095004.

- [196] K. Aubertin *et al.*, “Mesoscopic characterization of prostate cancer using Raman spectroscopy: potential for diagnostics and therapeutics,” *BJU Int.*, 2018, doi: 10.1111/bju.14199.
- [197] A. C. S. Talari, Z. Movasaghi, S. Rehman, and I. U. Rehman, “Raman spectroscopy of biological tissues,” *Appl. Spectrosc. Rev.*, vol. 50, no. 1, pp. 46–111, 2015, doi: 10.1080/05704928.2014.923902.
- [198] W. C. Zúñiga *et al.*, “Raman Spectroscopy for Rapid Evaluation of Surgical Margins during Breast Cancer Lumpectomy,” *Sci. Rep.*, vol. 9, no. 1, pp. 1–16, 2019, doi: 10.1038/s41598-019-51112-0.
- [199] S. Contorno, R. E. Darienzo, and R. Tannenbaum, “Evaluation of aromatic amino acids as potential biomarkers in breast cancer by Raman spectroscopy analysis,” *Sci. Rep.*, vol. 11, no. 1, pp. 1–9, 2021, doi: 10.1038/s41598-021-81296-3.
- [200] C. Swanton, N. McGranahan, G. J. Starrett, and R. S. Harris, “APOBEC Enzymes: Mutagenic Fuel for Cancer Evolution and Heterogeneity,” *Cancer Discov.*, vol. 5, no. 7, pp. 704–712, 2015, doi: 10.1158/2159-8290.CD-15-0344.
- [201] S. Nik-Zainal *et al.*, “Mutational processes molding the genomes of 21 breast cancers,” *Cell*, vol. 149, no. 5, pp. 979–993, 2012, doi: 10.1016/j.cell.2012.04.024.
- [202] B. J. M. Taylor *et al.*, “DNA deaminases induce break-associated mutation showers with implication of APOBEC3B and 3A in breast cancer kataegis,” *Elife*, vol. 2013, no. 2, pp. 1–14, 2013, doi: 10.7554/eLife.00534.
- [203] C. H. Liu *et al.*, “Resonance Raman and Raman spectroscopy for breast cancer detection,” *Technol. Cancer Res. Treat.*, vol. 12, no. 4, pp. 371–382, 2013, doi: 10.7785/tcrt.2012.500325.
- [204] R. A. Bitar, H. da S. Martinho, C. J. Tierra-Criollo, L. N. Zambelli Ramalho, M. M. Netto, and A. A. Martin, “Biochemical analysis of human breast tissues using Fourier-transform Raman spectroscopy,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 11, no. 5, p. 054001, 2006, doi: 10.1117/1.2363362.
- [205] A. A. Grosset *et al.*, “A multicenter cohort study for prostate cancer diagnosis: Integration of Raman micro-spectroscopy to the clinical workflow,” *Prog.*

- [206] B. Z. and S. W. Heping Li, Tian Ning, Fan Yu, Yishen Chen, “Breast Cancer Pathological Characteristics,” *Molecules*, vol. 26, no. 921, 2021.
- [207] S. You *et al.*, “Raman Spectroscopic Analysis Reveals Abnormal Fatty Acid Composition in Tumor Micro- and Macroenvironments in Human Breast and Rat Mammary Cancer,” *Sci. Rep.*, vol. 6, no. December 2015, pp. 1–10, 2016, doi: 10.1038/srep32922.
- [208] B. Brozek-Pluska, K. Miazek, J. Musiał, and R. Kordek, “Label-free diagnostics and cancer surgery Raman spectra guidance for the human colon at different excitation wavelengths,” *RSC Adv.*, vol. 9, no. 69, pp. 40445–40454, 2019, doi: 10.1039/c9ra06831g.
- [209] C. Nieva, M. Marro, N. Santana-Codina, S. Rao, D. Petrov, and A. Sierra, “The Lipid Phenotype of Breast Cancer Cells Characterized by Raman Microspectroscopy: Towards a Stratification of Malignancy,” *PLoS One*, vol. 7, no. 10, 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0046456.
- [210] F. Daoust *et al.*, “Handheld macroscopic Raman spectroscopy imaging instrument for machine-learning-based molecular tissue margins characterization,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 26, no. 02, pp. 1–18, 2021, doi: 10.1117/1.jbo.26.2.022911.
- [211] F. Daoust *et al.*, “Clinical prototype Raman imaging system for intraoperative machine-learning-based molecular tissue margins characterization,” *Analyst*.
- [212] F. Limaiem and F. Ahmad, “Mucinous breast carcinoma,” in *StatPearls [Internet]*, StatPearls Publishing, 2023.
- [213] M. Lepomäki *et al.*, “Tumor margins that lead to reoperation in breast cancer: A retrospective register study of 4,489 patients,” *J. Surg. Oncol.*, vol. 125, no. 4, pp. 577–588, 2022, doi: 10.1002/jso.26749.
- [214] M. Thill, “MarginProbe®: Intraoperative margin assessment during breast conserving surgery by using radiofrequency spectroscopy,” *Expert Rev. Med. Devices*, 2013, doi: 10.1586/erd.13.5.
- [215] G. Thomas, T. Nguyen, I. J. Pence, B. Caldwell, M. E. O. Connor, and J. Giltane, “Evaluating feasibility of an automated 3-dimensional scanner using Raman spectroscopy for intraoperative breast margin assessment,” no. May, pp. 1–14, 2017, doi: 10.1038/s41598-017-13237-y.

- [216] S. David *et al.*, “In situ Raman spectroscopy and machine learning unveil biomolecular alterations in invasive breast cancer,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 29, no. 03, pp. 1–33, 2023, doi: 10.1117/1.JBO.28.3.036009.
- [217] F. Daoust *et al.*, “Clinical prototype Raman macroscopic imaging system for intraoperative machine-learning-based molecular tissue margins characterization,” *Analyst*, 2021, doi: 10.1039/x0xx00000x.
- [218] O. Riedl *et al.*, “Intraoperative frozen section analysis for breast-conserving therapy in 1016 patients with breast cancer,” *Eur. J. Surg. Oncol.*, vol. 35, no. 3, pp. 264–270, 2009.
- [219] K. Lin *et al.*, “Rapid fiber-optic raman spectroscopy for real-time in vivo detection of gastric intestinal metaplasia during clinical gastroscopy,” *Cancer Prev. Res.*, vol. 9, no. 6, pp. 476–483, 2016, doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-15-0213.
- [220] H. C. McGregor *et al.*, “Real-time endoscopic Raman spectroscopy for in vivo early lung cancer detection,” *J. Biophotonics*, vol. 10, no. 1, pp. 98–110, 2017, doi: 10.1002/jbio.201500204.
- [221] N. Kourkouvelis, I. Balatsoukas, V. Moulia, A. Elka, G. Gaitanis, and I. D. Bassukas, “Advances in the in vivo Raman spectroscopy of malignant skin tumors using portable instrumentation,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 16, no. 7, pp. 14554–14570, 2015, doi: 10.3390/ijms160714554.
- [222] P. Crow *et al.*, “The use of Raman spectroscopy to identify and grade prostatic adenocarcinoma in vitro,” *Br. J. Cancer*, vol. 89, no. 1, pp. 106–108, 2003, doi: 10.1038/sj.bjc.6601059.
- [223] C. W. Teng *et al.*, “Applications of indocyanine green in brain tumor surgery: review of clinical evidence and emerging technologies,” *Neurosurg. Focus*, vol. 50, no. 1, pp. 1–10, 2021, doi: 10.3171/2020.10.FOCUS20782.
- [224] A. V. Save, B. J. Gill, R. S. D’amico, P. Canoll, and J. N. Bruce, “Fluorescein-guided resection of gliomas,” *J. Neurosurg. Sci.*, vol. 63, no. 6, pp. 648–655, Dec. 2019, doi: 10.23736/S0390-5616.19.04738-6.
- [225] S. David *et al.*, “Macroscopic inelastic scattering imaging using a hyperspectral line-scanning system identifies invasive breast cancer in lumpectomy and mastectomy

- specimens,” *J. Biomed. Opt.*, vol. under revi, 2023.
- [226] K. Ember *et al.*, “In Situ Brain Tumor Detection Using the Raman Spectroscopy Sentry System – Results of a Multicenter Study,” *Nat. Commun.*, vol. under revi, 2023.
- [227] F. Leblond *et al.*, “Subsecond lung cancer detection within a heterogeneous background of normal and benign tissue using single-point Raman spectroscopy,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 28, no. 09, pp. 1–8, 2023, doi: 10.1117/1.jbo.28.9.090501.
- [228] G. Sheehy *et al.*, “Open-sourced Raman spectroscopy data processing package implementing a baseline removal algorithm validated from multiple datasets acquired in human tissue and biofluids,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 28, no. 02, pp. 1–20, 2023, doi: 10.1117/1.jbo.28.2.025002.
- [229] K. Czamara, K. Majzner, M. Z. Pacia, K. Kochan, A. Kaczor, and M. Baranska, “Raman spectroscopy of lipids: a review,” *J. Raman Spectrosc.*, vol. 46, no. 1, pp. 4–20, 2015.
- [230] A. Rygula, K. Majzner, K. M. Marzec, A. Kaczor, M. Pilarczyk, and M. Baranska, “Raman spectroscopy of proteins: a review,” *J. Raman Spectrosc.*, vol. 44, no. 8, pp. 1061–1076, 2013.
- [231] F. Leblond, K. Ember, A. Plante, J. Tremblay, A. Dupuis, and L. McCarthy, “In Situ Brain Tumor Detection Using the Raman Spectroscopy Sentry System – Results of a Multicenter Study.”
- [232] I. Barman, C.-R. Kong, G. P. Singh, and R. R. Dasari, “Effect of photobleaching on calibration model development in biological Raman spectroscopy,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 16, no. 1, p. 11004, 2011.
- [233] S. Hoekstra, D. Stoller, and H. Raef, “Does Gross Margin Examination Reduce Re-excision Rate in Breast Conservation for Invasive Carcinoma? CALLER Review,” *Eur. J. breast Heal.*, vol. 16, no. 3, pp. 198–200, Jul. 2020, doi: 10.5152/ejbh.2020.5180.
- [234] A. Chagpar *et al.*, “Intraoperative margin assessment reduces reexcision rates in patients with ductal carcinoma in situ treated with breast-conserving surgery,” *Am. J. Surg.*, vol. 186, no. 4, pp. 371–377, 2003, doi: 10.1016/S0002-9610(03)00264-2.
- [235] J. Desroches *et al.*, “A new method using Raman spectroscopy for in vivo targeted brain cancer tissue biopsy,” *Sci. Rep.*, 2018, doi: 10.1038/s41598-018-20233-3.