

<b>Titre:</b>	Optimisation des paramètres de photoblanchiment des biofluides afin de supprimer l'autofluorescence des échantillons et d'améliorer la qualité du signal de diffusion Raman
<b>Auteur:</b>	Billie Maubois
<b>Date:</b>	2024
<b>Type:</b>	Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis
<b>Référence:</b>	Maubois, B. (2024). Optimisation des paramètres de photoblanchiment des biofluides afin de supprimer l'autofluorescence des échantillons et d'améliorer la qualité du signal de diffusion Raman [Mémoire de maîtrise, Polytechnique Montréal]. PolyPublie. <a href="https://publications.polymtl.ca/59202/">https://publications.polymtl.ca/59202/</a>
Citation:	

## Document en libre accès dans PolyPublie

Open Access document in PolyPublie

**URL de PolyPublie:** <https://publications.polymtl.ca/59202/>  
PolyPublie URL:

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

**Programme:** Génie biomédical  
Program:

**POLYTECHNIQUE MONTRÉAL**

affiliée à l'Université de Montréal

**Optimisation des paramètres de photoblanchiment des biofluides afin de  
supprimer l'autofluorescence des échantillons et d'améliorer la qualité du  
signal de diffusion Raman**

**BILLIE MAUBOIS**

Institut de génie biomédical

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de *Maîtrise ès sciences appliquées*

Génie biomédical

Août 2024

**POLYTECHNIQUE MONTRÉAL**

affiliée à l'Université de Montréal

Ce mémoire intitulé :

**Optimisation des paramètres de photoblanchiment des biofluides afin de supprimer l'autofluorescence des échantillons et d'améliorer la qualité du signal de diffusion Raman**

présenté par **Billie MAUBOIS**

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

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

**Benjamin DE LEENER**, président

**Frédéric LEBLOND**, membre et directeur de recherche

**Lucien WEISS**, membre

## DÉDICACE

*À mon papa,*

## REMERCIEMENTS

Avant tout, je tiens à remercier les membres du jury, Prof Benjamin DeLeneer et Prof Lucien Weiss, pour avoir accepté d'évaluer mon travail de recherche et un merci particulier à Prof Frédéric Leblond, mon directeur de recherche, pour m'avoir donné l'opportunité de travailler sur ce projet dans le cadre de ma maîtrise et aussi pour avoir réuni les membres du LUMEDLAB pour former cette belle équipe qui m'a tant apportée et aidée lors de cette étape académique.

Merci à l'Institut TransMedTech de m'avoir permis de faire partie de leur programme de bourse et de participer à leurs ateliers enrichissants. Merci à ComSciCon-QC pour les ateliers et les conférences et les rencontres inoubliables, j'ai hâte de voir ce que l'avenir réserve à ce merveilleux projet auquel j'ai la chance de pouvoir faire partie.

Un énorme merci à mon équipe de laboratoire, qui a enrichi ce projet par nos discussions et collaborations. En commençant par Guillaume Sheehy, j'ai beaucoup appris grâce à toi. Merci d'avoir pris le temps de t'asseoir avec moi pour m'aider avec mes analyses et m'avoir mentoré lors de mes premières expériences de photoblanchiment. Merci David Orlando Grajales Lopera pour ton aide lors des expériences en laboratoire. Ce petit projet de deux semaines s'est transformé en un de 2 ans. Voilà enfin mon rapport sur le photoblanchiment combiné à la spectroscopie Raman, j'espère que ça te sera utile pour ton doctorat! Merci Alice LeMoël, ma voisine de table optique, pour ton aide avec les débuggages de mes figures. Merci Esmat Zamani pour tes révisions et tes conseils lors de la rédaction et la préparation de ma défense. Merci Katherine Ember, Frédéric Dallaire, Nassim Ksantini, Sandryne David, Fabien Picot, Hugo Tavera, Gabriel Beaudoin, Antoine Noé, Victor Blanquez-Yeste, Tommy Brasseur, Romane Le Roy-Pépin, Laurence Danis, François Daoust, Juliette Selb, Samaneh Pahlevani vos conseils et expertises ont permis à ce projet d'évoluer jusqu'à la complétion de ce mémoire, qui a dû être repoussée à maintes reprises. Merci particulier à Trang Tran pour ton écoute et toute ton aide tout au long de ma maitrise. À tous les membres du LUMEDLAB (anciens et présents), encore merci d'avoir été là à toutes les étapes de ce projet. C'est cette belle cohésion et nos collaborations qui font toute la différence dans l'expérience des études supérieures en recherche. Je me considère très chanceuse et privilégiée d'avoir partagé les labos avec vous tous.

Un gros merci à mon ami Martin Poinsinet De Sivry-Houle pour avoir codé avec moi souvent jusqu'à tard le soir. Un autre gros merci à mes ami.es Raphaël Maltais-Tariant, Simon Brais-Brunet et Simon Bolduc-Beaudoin, Xavier Attendu, Jean-Sébastien Boisvert, Marie-Hélène Bourget et Édith Ducharme, pour votre soutien et grâce à vos points de vue externes à recherche en spectroscopie Raman, nos discussions m'ont très souvent permis de prendre du recul sur des questions sans réponse et de trouver un angle différent pour finalement en trouver la solution. Mes *writing buddies* Olivier Fréchette (et Felix et Sushi), David Zuchoski (et Kiba) et Émilie Cousineau (et Mousha) pour nos séances de rédaction. Les études supérieures sont très isolantes et grâce à vous je me suis sentie moins seule avec mes doutes et mes problèmes qui sont si nombreux lors de cette étape académique. Merci à Prof Caroline Boudoux de m'avoir transmis sa passion pour la recherche et m'avoir permis de trouver ma place en génie physique lors de mon baccalauréat en me donnant l'opportunité de m'initier à la recherche académique. Merci Mikaël Leduc pour ta patience, ta gentillesse et surtout pour tout ce que tu m'as appris lors de mes années à Poly. C'est à toi que je dois en grande partie mes bonnes pratiques et compétences en laboratoire par tes formations pendant mes stages au bacc et j'ai vraiment adoré travailler avec toi pour les labos d'optique moderne.

Merci à mes amis du baccalauréat pour avoir enduré et tenté de répondre à mes questions inattendues et bizarres telles que « Hey, hypothétiquement comment tu t'y prendrais pour réduire des ongles humains en poudre? » ou « Est-ce qu'il y a une façon pas trop gênante de demander au boucher d'épicerie pour juste de la peau de porc ou il faut que je change d'épicerie? » Un merci particulier à mon Jacob pour avoir posé la question au boucher pour moi, mais surtout pour son soutien du début à la fin de ma maîtrise. Mon amour, mon roc, tu m'as gardé la tête hors de l'eau durant ces 3 dernières années grâce à ta tendresse et ton amour. *Garantez ma aelig.*

Merci à ma sœur Fred pour ses encouragements et son soutien constant. Mon père à qui je dédie ce mémoire, qui m'a toujours encouragé à travailler en sciences et qui m'a soutenu tout au long de mes études, de la garderie jusqu'à maintenant et longtemps encore. Merci papa.

## RÉSUMÉ

Depuis 2020, le LUMEDLAB s'intéresse à l'application de la spectroscopie Raman sur les biofluides tels que la salive, le sang et l'urine. La spectroscopie Raman permet d'obtenir de l'information sur la composition moléculaire d'un échantillon. Or, deux signaux sont en compétition lors de l'acquisition de spectres, la diffusion Raman et l'autofluorescence. Tous deux sont intrinsèques à l'échantillon imagé. La fluorescence, lorsque trop importante, apporte le problème de confusion des bandes Raman donnant l'information sur la composition moléculaire de l'échantillon. Ceci limite le rapport signal Raman sur signal de fond (SBR) ainsi que le rapport signal sur bruit (SNR) des spectres Raman. La solution proposée est la jonction d'une source photoblanchissante à un système de spectroscopie Raman déjà opérationnel afin de supprimer l'autofluorescence d'échantillons biofluides. Le photoblanchissement se base sur la dénaturation des fluorophores endogènes responsables de la fluorescence de l'échantillon biologique. La méthode est développée pour la détection de spectres de la salive humaine. Des tests sont faits sur des échantillons inertes ayant une forte réponse Raman et en fluorescence, tels que des graines de sésame, de la poudre de collagène pur et un modèle de salive afin d'optimiser les paramètres expérimentaux du protocole. Les tests finaux sur la salive humaine démontrent que la méthode valide l'objectif du projet avec environ en moyenne 40% du niveau initial de fluorescence supprimé pour les échantillons de salive séchée à l'air ambiant et 30% pour celle liquide. La salive sèche obtient un gain moyen de SBR de la bande Raman  $1003\text{ cm}^{-1}$  de 1% et celle liquide, un gain moyen de 0,1%, ce qui représente une augmentation moyenne d'environ 85% et 10% respectivement. La salive sèche, en moyenne, obtient un gain d'environ 0,005 de SNR par rapport à sa valeur initiale, une amélioration d'environ 33% et un gain de 0,003, soit une amélioration de 17% pour celle liquide. Or, la moitié des échantillons de salive sèche ainsi que quelques gouttes de salive liquide ont subi un regain de fluorescence. Ces spectres n'ont pas eu des améliorations aussi marquées, mais ils ont quand même obtenu une amélioration de qualité de signal. L'analyse de ces résultats a permis de déterminer que la jonction photoblanchissante du montage expérimental n'est en fait pas la cause de ces améliorations, mais le laser Raman lors de l'acquisition des spectres. Ainsi, la recommandation principale de ce mémoire est de poursuivre cette étude en omettant l'ajout de la source photoblanchissante blanche et de simplement exposer l'échantillon au laser Raman avant l'acquisition jusqu'à stabilisation de la suppression du signal de fluorescence, qui correspond à 30s d'exposition selon les expériences faites sur des échantillons de salive sèche.

## ABSTRACT

Since 2020, the LUMEDLAB has been interested in the application of Raman spectroscopy on biofluids such as saliva, blood and urine. Raman spectroscopy provides information on the molecular composition of a sample. However, two signals compete during spectral acquisition: Raman scattering and autofluorescence. Both are intrinsic to the imaged sample. When fluorescence is too high, it causes the problem of confusing the Raman bands which provide information on the molecular composition of the sample. This limits the Raman signal to background signal ratio (SBR) as well as the signal-to-noise ratio (SNR) of the Raman spectra. The solution proposed by this Master thesis is the add-on of a photobleaching source to an already operational Raman spectroscopy system to suppress the autofluorescence of biological samples. Photobleaching is based on the denaturation of endogenous fluorophores responsible for the fluorescence of the biological sample. The method will be developed for the detection of spectra in human saliva, but it can be generalized to other biological media such as tissues. Tests performed on inert samples with a strong Raman and fluorescence response, such as sesame seeds, pure collagen powder and a saliva model, optimize experimental parameters of the protocol. Final tests on human saliva showed that the method validates the project objective with approximately on average 40% of the initial level of fluorescence suppressed for air-dried saliva samples and 30% for liquid saliva samples. Additionally, dry saliva achieves an average SBR gain at the  $1003\text{ cm}^{-1}$  Raman band SBR of 1% and liquid saliva achieves an average SBR gain of 0,1%, representing an average increase of approximately 85% and 10% respectively relatively to their initial values. On average, air-dried saliva samples gain about 0,005 in SNR of their Raman spectra compared to their initial value, a 33% increase and liquid saliva samples gain about 0,003 in SNR, a 17% increase. However, half of the dry saliva samples as well as a few drops of liquid saliva experienced fluorescence recovery. These spectra did not achieve as significant improvements, they still however achieved signal quality improvements in both SBR and SNR. Indeed, the analysis of these results shows that the photobleaching extension of the experimental setup is in fact not the cause of these improvements but the Raman laser during the acquisition of the spectra. Thus, the main recommendation of this thesis is to continue this study by omitting the addition of the photobleaching source and simply exposing the sample to the Raman laser before spectral acquisition until the suppression of the fluorescence signal stabilizes, which corresponds to 30s of exposure according to experiments carried out on dry saliva samples.

## TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE.....	III
REMERCIEMENTS .....	IV
RÉSUMÉ.....	VI
ABSTRACT .....	VII
LISTE DES TABLEAUX.....	XII
LISTE DES FIGURES .....	XV
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS .....	XXIII
LISTE DES ANNEXES.....	XXIV
CHAPITRE 1 INTRODUCTION.....	1
1.1 Problématique.....	1
1.2 Hypothèse de recherche .....	2
1.3 Objectifs .....	3
1.4 Plan du mémoire.....	3
CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE .....	4
2.1 Fluorescence.....	4
2.1.1 Fluorophores exogènes.....	5
2.1.2 Fluorophores endogènes.....	6
2.2 Absorption .....	6
2.3 Diffusion.....	8
2.3.1 Diffusion Rayleigh .....	10
2.3.2 Diffusion de Mie .....	10
2.3.3 Diffusion Raman .....	10

2.3.4	Règles de sélection Raman et IR .....	11
2.3.5	Spectroscopie Raman .....	13
2.3.6	Pré-traitement de spectres Raman .....	15
2.3.7	Applications cliniques .....	17
2.4	Méthodes d'amélioration du signal Raman.....	18
2.4.1	Spectroscopie Raman dans le domaine temporel (SRDT).....	18
2.4.2	SERS .....	18
2.4.3	Photoblanchiment des protéines.....	19
2.5	Métriques étudiées.....	21
2.5.1	Rapport Raman sur signal de fond (SBR) .....	21
2.5.2	Rapport signal sur bruit (SNR).....	21
CHAPITRE 3	MÉTHODOLOGIE.....	23
3.1	Instrumentation.....	23
3.2	Preuve de concept.....	24
3.2.1	Validation de la technique .....	25
3.2.2	Choix de la longueur d'onde de photoblanchiment .....	27
3.3	Choix du temps de photoblanchiment pour la salive humaine.....	30
3.4	Expérience sur de la salive humaine .....	31
3.4.1	Préparation des échantillons .....	32
3.4.2	Protocole expérimental.....	32
3.5	Tests statistiques.....	34
3.5.1	Tri des données.....	35
3.5.2	Test des rangs signés de Wilcoxon pour groupes pairés .....	36
3.5.3	Test de Kruskal-Wallis et test de Dunn.....	37

CHAPITRE 4 RÉSULTATS ET ANALYSES .....	38
4.1    Résultats de la preuve de concept .....	38
4.1.1    Validation de la technique.....	38
4.1.2    Choix de la longueur d'onde de photoblanchiment .....	39
4.1.3    Test du laser Raman comme source de photoblanchiment .....	41
4.1.4    Choix du temps de photoblanchiment pour la salive humaine.....	42
4.2    Salive humaine sèche .....	43
4.2.1    Analyse de l'évolution du niveau d'autofluorescence .....	43
4.2.2    Analyse des métriques relatives des spectres Raman.....	48
4.2.3    Analyse statistique.....	56
4.3    Salive humaine liquide .....	57
4.3.1    Analyses des échantillons avec photoblanchiment DEL.....	57
4.3.2    Analyse de l'évolution du niveau d'autofluorescence .....	57
4.3.3    Analyse des métriques relatives des spectres Raman.....	59
4.3.4    Analyse statistique.....	67
4.3.5    Analyse comparative photoblanchiment DEL vs assèchement de la goutte .....	68
4.3.6    Analyse de l'évolution du niveau d'autofluorescence .....	68
4.3.7    Analyse des métriques relatives des spectres Raman.....	69
4.3.8    Analyse statistique.....	73
CHAPITRE 5 DISCUSSION GÉNÉRALE .....	76
5.1    Retour sur les objectifs du projet.....	76
5.2    Avantages de la méthode.....	77
5.3    Limites de la méthode .....	77
CHAPITRE 6 CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS .....	79

6.1	Conclusions .....	79
6.2	Recommandations .....	79
6.2.1	Extinction de fluorescence .....	80
RÉFÉRENCES .....		82
ANNEXES .....		87

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1. Résumé des règles de sélection Raman et IR. [17], [20].....	12
Tableau 2.2. Les bandes Raman observées sur les spectres Raman bruts des différents échantillons utilisés dans le cadre de ce projet et les liens moléculaires et/ou les molécules qui si réfèrent. (v : étirement, δ : déformation, w : agitation, r : basculement, t : torsion).....	15
Tableau 3.1. Informations importantes en lien avec la puissance des sources de lumière du système expérimental. Les calculs des expositions maximales possibles (MPE de l'anglais <i>Maximal Possible Exposure</i> ) pour la peau de toutes les sources utilisées dans cette étude sont détaillés en annexe A. [41] .....	24
Tableau 3.2. Paramètres expérimentaux du test de validation de la méthode de photoblanchiment. ....	26
Tableau 3.3. L'ensemble des longueurs d'onde disponibles de la source DEL <i>Lumencor</i> .....	28
Tableau 3.4. Les paramètres expérimentaux du test du choix de la longueur d'onde avec chacune des DELs individuelles du <i>Lumencor</i> . ....	28
Tableau 3.5. Les paramètres expérimentaux du test du laser Raman IPS à puissance maximale comme source de photoblanchiment. ....	29
Tableau 3.6. Les paramètres expérimentaux de l'expérience visant à déterminer le temps de photoblanchiment. ....	31
Tableau 3.7. Les paramètres expérimentaux des expériences sur la salive humaine liquide et sèche. ....	32
Tableau 4.1. Valeurs relatives du niveau de fluorescence, SBR, SNR et de l'aire sous le signal Raman des spectres complets de collagène aux différentes longueurs d'onde du <i>Lumencor</i> . ....	40
Tableau 4.2. Les rapports moyennés sur l'ensemble des gouttes entre les différents niveaux de fluorescence A, B, C et D pour chacun des échantillons de salive sèche. ....	46
Tableau 4.3. Les rapports moyennés sur l'ensemble des gouttes entre les valeurs de SBR de la bande $1003\text{ cm}^{-1}$ associées aux accumulations A, B, C et D pour chacun des échantillons de salive sèche (#). ....	52

Tableau 4.4. Les rapports moyennés sur l'ensemble des gouttes entre les valeurs de SNR des spectres Raman associées aux accumulations A, B, C et D pour chacun des échantillons de salive sèche (#).....	54
Tableau 4.5. Résultats des tests statistiques Wilcoxon pour chacun des échantillons de salive sèche avec exposition photoblanchissante DEL pour un $\alpha = 0,05\%$ .....	56
Tableau 4.6. Les rapports moyennés sur l'ensemble des gouttes entre les différents niveaux de fluorescence A, B, C et D pour chacun des échantillons de salive liquide avec exposition photoblanchissante DEL.....	58
Tableau 4.7. Les rapports moyennés sur l'ensemble des gouttes entre les valeurs de SBR à la bande $1003 \text{ cm}^{-1}$ des spectres Raman associées aux accumulations A, B, C et D pour chacun des échantillons de salive liquide avec exposition photoblanchissante DEL.....	63
Tableau 4.8. Les rapports moyennés sur l'ensemble des gouttes entre les valeurs de SNR des spectres Raman associées aux accumulations A, B, C et D pour chacun des échantillons de salive liquide avec exposition photoblanchissante DEL.....	65
Tableau 4.9. Résultats des tests statistiques Wilcoxon pour chacun des échantillons de salive liquide avec exposition photoblanchissante DEL pour un $\alpha = 0,05\%$ .....	67
Tableau 4.10. Comparaison des rapports moyennés sur l'ensemble des gouttes entre les différents niveaux de fluorescence A, B, C et D pour chacun des échantillons (#) de salive liquide avec et sans exposition photoblanchissante (PB) DEL.....	68
Tableau 4.11. Comparaison des rapports moyennés sur l'ensemble des gouttes entre les valeurs de SBR à la bande $1003 \text{ cm}^{-1}$ des spectres Raman associées aux accumulations A, B, C et D pour chacun des échantillons de salive liquide avec et sans exposition photoblanchissante (PB) DEL.....	71
Tableau 4.12. Comparaison des rapports moyennés sur l'ensemble des gouttes entre les valeurs de SNR des spectres Raman associées aux accumulations A, B, C et D pour chacun des échantillons de salive liquide avec et sans exposition photoblanchissante DEL.....	73
Tableau 4.13. Résultats des tests statistiques Wilcoxon pour chacun des échantillons de salive liquide sans exposition photoblanchissante DEL avec un $\alpha = 0,05\%$ .....	74

Tableau 4.14. Résultats des tests statistiques Kruskal-Wallis pour chacun des échantillons de salive liquide avec et sans exposition photoblanchissante DEL avec un $\alpha = 0,05\%$ .....	75
Tableau A.1 Paramètres du laser Raman <i>Renishaw</i> utiles pour le calcul de son MPE de la peau.... .....	87
Tableau A.2 Paramètres du laser Raman IPS utiles pour le calcul de son MPE de la peau. ....	87
Tableau A.3 Paramètres de la source blanche <i>Lumencor</i> utiles pour le calcul de son MPE de la peau. ....	88
Tableau A.4 Paramètres de la source blanche LS-LW1 utiles pour le calcul de son MPE de la peau. Il est important de noter qu'il ne s'agit pas d'un laser, mais elle est classée comme un laser classe1. .....	88

## LISTE DES FIGURES

<p>Figure 2.1. Diagramme Jablonski de la fluorescence. Excitation en vert, conversion thermique en noir pointillé, conversion interne en bleu pointillé et émission en rouge. [3].....</p> <p>Figure 2.2. Diagramme de Jablonski de l'absorption. En vert, l'absorption d'états vibrationnels, en rouge l'absorption infrarouge. [3] .....</p> <p>Figure 2.3. Les variations des coefficients d'absorption de l'eau, l'oxyhémoglobine, la désoxyhémoglobine, la mélanie, le gras, l'élastine et le collagène en fonction de la longueur d'onde incidente, cette figure est tirée de [16]......</p> <p>Figure 2.4. Diagrammes de Jablonski de la diffusion Rayleigh ou de Mie, Raman Stokes et Anti-Stokes. [3].....</p> <p>Figure 2.5. Montage de spectroscopie Raman classique.....</p> <p>Figure 2.6. Résumé des étapes de pré-traitement des spectres Raman. .....</p> <p>Figure 2.7. Structure de la protéine de collagène. (Fait avec <i>BioRender</i>).....</p> <p>Figure 2.8. Diagramme de Jablonski du photobranchiment. Vert: absorption, pointillé noir: transition de conversion interne, pointillé bleu: transition de conversion inter-système. [38] .....</p> <p>Figure 3.1. Montage expérimental final de spectroscopie Raman combiné au photobranchiment. .....</p> <p>Figure 3.2. À gauche, le montage expérimental de spectroscopie Raman combiné au photobranchiment avec le microscope Raman <i>InVia Renishaw</i>. À droite, une photo de l'expérience dans la cuve du microscope. (Instrumentation en Annexe B) .....</p> <p>Figure 3.3. Déroulement du protocole des tests de validité et du choix de la longueur d'onde de photobranchiment. En haut, le protocole expérimental de la méthode de photobranchiment DEL. En bas, le contrôle avec seulement une exposition répétée au laser Raman. .....</p> <p>Figure 3.4. Illustration du changement de hauteur du point focal lors de l'acquisition causé par la déshydratation de l'échantillon. ....</p>	<p>4</p> <p>7</p> <p>8</p> <p>11</p> <p>14</p> <p>17</p> <p>19</p> <p>20</p> <p>23</p> <p>25</p> <p>26</p> <p>27</p>
---	--

Figure 3.5. Déroulement du protocole du test de photoblanchiment à l'aide du laser IPS à puissance maximale sur du collagène en poudre .....	30
Figure 3.6. Déroulement du protocole de l'expérience visant à déterminer le temps de photoblanchiment optimal T, où $T = [30s, 60s, 90s, 120s, 150s]$ . Ce test est fait sur des gouttes d'un modèle de salive.....	31
Figure 3.7. À gauche, déroulement du protocole de l'expérience de la méthode sur des échantillons de salive humaine sèche. À droite, l'agencement des gouttes des différents échantillons sur la cassette de test.....	33
Figure 3.8. Déroulement du protocole de l'expérience de la méthode sur des échantillons de salive humaine liquide. En haut, la méthode du projet, en bas le contrôle pour vérifier l'asséchement de la goutte durant l'expérience. ....	34
Figure 4.1. Résultats du test de validation de la méthode avec des graines de sésame. Colonne de gauche, le test contrôle où seul le laser Raman est exposé à l'échantillon. Colonne de droite, le test avec la source <i>Lumencor</i> à 514 nm. En haut, les spectres bruts des acquisitions de spectroscopie Raman, en bas, leur SNR respectifs. ....	38
Figure 4.2. Résultats du test du choix de longueur d'onde avec les 6 DELs du <i>Lumencor</i> sur des échantillons de collagène pur. ....	39
Figure 4.3. Résultats du test du laser IPS comme source de photoblanchiment sur de la poudre de collagène pur. En haut à gauche, les spectres bruts moyens de chacune des acquisitions Raman. En haut à droite, l'évolution de l'aire sous le signal de fluorescence moyen selon les acquisitions Raman. En bas à gauche, l'évolution du SNR moyen et à droite le SBR moyen selon les acquisitions Raman.....	41
Figure 4.4. Résultats de l'expérience visant à déterminer le temps optimal de photoblanchiment pour la salive humaine. De gauche à droite, la variation moyenne du niveau de fluorescence, du SNR et du SBR (pour la bande centrée à $1003\text{ cm}^{-1}$ ) pour chacun des temps de photoblanchiment avant et après l'exposition de la source blanche. ....	42
Figure 4.5. Exemple d'expérience de photoblanchiment sur une goutte de salive sèche. À gauche, les spectres bruts des accumulations des acquisitions pré (en bleu) et post-photoblanchiment (en rouge) par DEL blanche. À droite, l'aire sous la courbe du signal de fluorescence des	

spectres complets selon les accumulations pour les acquisitions avant et après photoblanchiment DEL.....	44
Figure 4.6. Exemple d'expérience de photoblanchiment sur une goutte de salive sèche ayant eu un regain de fluorescence entre les deux acquisitions. À gauche, les spectres bruts des accumulations des acquisitions pré (en bleu) et post-photoblanchiment (en rouge) par DEL blanche. À droite, l'aire sous la courbe du signal de fluorescence des spectres complets selon les accumulations pour les acquisitions avant et après photoblanchiment DEL.....	44
Figure 4.7. L'aire relative sous le signal total de fluorescence pour chacune des gouttes de chacun des échantillons de salive sèche en fonction de l'accumulation des acquisitions Raman.....	49
Figure 4.8. L'aire relative du signal total Raman de chacune des gouttes de salive sèche présentée pour chacun des échantillons en fonction de l'accumulation des acquisitions Raman.....	50
Figure 4.9. Les SBR relatifs de chacune des gouttes de salive sèche présentées pour chacun des échantillons en fonction de l'accumulation des acquisitions Raman à la bande $1003\text{ cm}^{-1}$ ..	51
Figure 4.10. Les SNR relatifs de chacune des gouttes de salive sèche présentées pour chacun des échantillons en fonction de l'accumulation des acquisitions Raman pour tous les échantillons. ....	53
Figure 4.11. Comparaison des spectres Raman moyennés et normalisés ayant les meilleurs (à droite) et les pires (à gauche) SNR et SBR résultant de l'expérience combinant le photoblanchiment à la spectroscopie Raman. À droite, la goutte #1 de l'échantillon 1 de salive sèche. À gauche, la goutte # 2 de l'échantillon 4 de salive sèche.....	55
Figure 4.12. L'aire relative sous le signal total de fluorescence pour chacune des gouttes de chacun des échantillons de salive liquide avec exposition photoblanchissante DEL en fonction de l'accumulation des acquisitions Raman.....	60
Figure 4.13. L'aire relative sous le signal Raman des spectres d'accumulation pour chacune des gouttes de chacun des échantillons de salive liquide avec exposition photoblanchissante DEL en fonction de l'accumulation des acquisitions Raman. ....	61
Figure 4.14. Les SBR relatifs de chacune des gouttes de salive liquide avec exposition photoblanchissante présentés pour chacun des échantillons en fonction de l'accumulation des acquisitions Raman à la bande $1003\text{ cm}^{-1}$ . ....	62

Figure 4.15. Les SNR relatifs de chacune des gouttes de salive liquide avec exposition photoblanchissante présentés pour chacun des échantillons en fonction de l'accumulation des acquisitions.....	64
Figure 4.16. Comparaison des spectres Raman moyennés et normalisés ayant les meilleurs (à droite) et les pires (à gauche) SNR et SBR résultant de l'expérience combinant le photoblançhiment à la spectroscopie Raman. À droite, la goutte #1 de l'échantillon 1 de salive liquide. À gauche, la goutte # 2 de l'échantillon 4 de salive liquide. ....	66
Figure 4.17. L'aire relative sous le signal total de fluorescence (à gauche) et l'aire relative sous le signal Raman de la bande $1003\text{ cm}^{-1}$ (à droite) pour chacune des gouttes de chacun des échantillons de salive liquide avec (Avec PB : sous-figures gauches) et sans exposition photoblanchissante DEL (Sans PB : sous-figures droites) en fonction de l'accumulation des acquisitions Raman. .....	69
Figure 4.18. Les SBR relatifs de chacune des gouttes de salive liquide avec exposition photoblanchissante DEL (Avec PB : à gauche) et sans (Sans PB : à droite) présentés pour chacun des échantillons en fonction de l'accumulation des acquisitions Raman à la bande $1003\text{ cm}^{-1}$ .....	70
Figure 4.19. Les SNR relatifs de chacune des gouttes de salive liquide avec exposition photoblanchissante (à gauche) et sans (à droite) présentés pour chacun des échantillons en fonction de l'accumulation des acquisitions Raman. ....	72
Figure 6.1. Proposition de protocole expérimental amélioré pour la suppression de l'autofluorescence d'échantillons de salive.....	80
Figure 6.2. Spectres Raman de composés d'iode sous forme cristalline ( $\text{I}^-$ iodide et $\text{IO}_3^3$ Iodate), figure tirée de [47].....	81
Figure B.1 Montage expérimental de spectroscopie Raman combiné au photoblançhiment avec le microscope Raman <i>InVia Renishaw</i> .....	91
Figure C.1 Résultats bruts des <b>gouttes de salive sèche #1,2,3 et 5 de l'échantillon 1</b> . À gauche, les accumulations des acquisitions de spectres Raman pré-PB DEL (en nuance de bleu à vert) et post-PB DEL (en nuance de rouge à jaune). À droite, l'évolution de l'aire sous le signal de	

fluorescence en fonction de leur accumulation respective pour l'acquisition pré-PB DEL (en bleu) et post-PB DEL (en rouge)..... 94

Figure C.2 Résultats bruts des **gouttes de salive sèche #1 à 5 de l'échantillon 2**. À gauche, les accumulations des acquisitions de spectres Raman pré-PB DEL (en nuance de bleu à vert) et post-PB DEL (en nuance de rouge à jaune). À droite, l'évolution de l'aire sous le signal de fluorescence en fonction de leur accumulation respective pour l'acquisition pré-PB DEL (en bleu) et post-PB DEL (en rouge)..... 95

Figure C.3 Résultats bruts des **gouttes de salive sèche #1 à 5 de l'échantillon 3**. À gauche, les accumulations des acquisitions de spectres Raman pré-PB DEL (en nuance de bleu à vert) et post-PB DEL (en nuance de rouge à jaune). À droite, l'évolution de l'aire sous le signal de fluorescence en fonction de leur accumulation respective pour l'acquisition pré-PB DEL (en bleu) et post-PB DEL (en rouge)..... 95

Figure C.4 Résultats bruts des **gouttes de salive sèche #1 à 5 de l'échantillon 4**. À gauche, les accumulations des acquisitions de spectres Raman pré-PB DEL (en nuance de bleu à vert) et post-PB DEL (en nuance de rouge à jaune). À droite, l'évolution de l'aire sous le signal de fluorescence en fonction de leur accumulation respective pour l'acquisition pré-PB DEL (en bleu) et post-PB DEL (en rouge)..... 96

Figure C.5 Résultats bruts des **gouttes de salive sèche #1 à 5 de l'échantillon 5**. À gauche, les accumulations des acquisitions de spectres Raman pré-PB DEL (en nuance de bleu à vert) et post-PB DEL (en nuance de rouge à jaune). À droite, l'évolution de l'aire sous le signal de fluorescence en fonction de leur accumulation respective pour l'acquisition pré-PB DEL (en bleu) et post-PB DEL (en rouge)..... 97

Figure C.6 Résultats bruts des **gouttes de salive sèche #1 à 4 de l'échantillon 6**. À gauche, les 50 accumulations des acquisitions de spectres Raman pré-photoblanchiment DEL (en nuance de bleu à vert) et post-photoblanchiment DEL (en nuance de rouge à jaune). À droite, l'évolution de l'aire sous le signal de fluorescence en fonction de leur accumulation respective pour l'acquisition pré-photoblanchiment DEL (en bleu) et post-photoblanchiment DEL (en rouge)..... 97

Figure C.7 Les aires sous le signal Raman brutes de chacune des acquisitions avant (en foncé) et après (en pâle) photoblanchiment DEL des gouttes de salive sèche présentées pour chacun des échantillons en fonction de l'accumulation des acquisitions Raman pour tous les échantillons. . 98

Figure C.8 Les aires sous le signal de fluorescence brutes de chacune des acquisitions avant (en foncé) et après (en pâle) photoblanchiment DEL des gouttes de salive sèche présentées pour chacun des échantillons en fonction de l'accumulation des acquisitions Raman pour tous les échantillons.

99

Figure C.9 Les SBR bruts de la bande  $1003\text{ cm}^{-1}$  de chacune des acquisitions avant (en foncé) et après (en pâle) photoblanchiment DEL des gouttes de salive sèche présentées pour chacun des échantillons en fonction de l'accumulation des acquisitions Raman pour tous les échantillons.

100

Figure C.10 Les SNR bruts de chacune des acquisitions avant (en foncé) et après (en pâle) photoblanchiment DEL des gouttes de salive sèche présentées pour chacun des échantillons en fonction de l'accumulation des acquisitions Raman pour tous les échantillons.

101

Figure C.11 Résultats bruts des **gouttes de salive liquide # 1 à 11 de l'échantillon 1 avec photoblanchiment DEL**. À gauche, les accumulations des acquisitions de spectres Raman pré-PB DEL (en nuance de bleu à vert) et post-PB DEL (en nuance de rouge à jaune). À droite, l'évolution de l'aire sous le signal de fluorescence en fonction de leur accumulation respective pour l'acquisition pré-PB DEL (en bleu) et post-PB DEL (en rouge).

102

Figure C.12 Résultats bruts des **gouttes de salive liquide #1 et 2 de l'échantillon 1 sans photoblanchiment DEL**. À gauche, les accumulations des acquisitions de spectres Raman de la première acquisition Raman (en nuance de bleu à vert) et la deuxième après la pause de 1min 30s (en nuance de rouge à jaune). À droite, l'évolution de l'aire sous le signal de fluorescence en fonction de leur accumulation respective pour les acquisitions avant la pause de 1min 30s (en bleu) et après (en rouge).

103

Figure C.13 Résultats bruts des **gouttes de salive liquide #1 à 3 de l'échantillon 2 avec photoblanchiment DEL**. À gauche, les accumulations des acquisitions de spectres Raman pré-PB DEL (en nuance de bleu à vert) et post-PB DEL (en nuance de rouge à jaune). À droite, l'évolution de l'aire sous le signal de fluorescence en fonction de leur accumulation respective pour l'acquisition pré-PB DEL (en bleu) et post-PB DEL (en rouge).

103

Figure C.14 Résultats bruts des **gouttes de salive liquide #1, 2, et 4 de l'échantillon 3 avec photoblanchiment DEL**. À gauche, les accumulations des acquisitions de spectres Raman pré-PB DEL (en nuance de bleu à vert) et post-PB DEL (en nuance de rouge à jaune). À droite, l'évolution

de l'aire sous le signal de fluorescence en fonction de leur accumulation respective pour l'acquisition pré-PB DEL (en bleu) et post-PB DEL (en rouge). ..... 104

Figure C.15 Résultats bruts des **gouttes de salive liquide # 2 à 6 de l'échantillon 4 avec photobranchiment DEL**. À gauche, les accumulations des acquisitions de spectres Raman pré-PB DEL (en nuance de bleu à vert) et post-PB DEL (en nuance de rouge à jaune). À droite, l'évolution de l'aire sous le signal de fluorescence en fonction de leur accumulation respective pour l'acquisition pré-PB DEL (en bleu) et post-PB DEL (en rouge). ..... 105

Figure C.16 Résultats bruts des **gouttes de salive liquide #1 à 4 de l'échantillon 4 sans photobranchiment DEL**. À gauche, les accumulations des acquisitions de spectres Raman de la première acquisition Raman (en nuance de bleu à vert) et la deuxième après la pause de 1min 30s (en nuance de rouge à jaune). À droite, l'évolution de l'aire sous le signal de fluorescence en fonction de leur accumulation respective pour les acquisitions avant la pause de 1min 30s (en bleu) et après (en rouge). ..... 105

Figure C.17 Résultats bruts des **gouttes de salive liquide # 2 à 7 de l'échantillon 5 avec photobranchiment DEL**. À gauche, les accumulations des acquisitions de spectres Raman pré-PB DEL (en nuance de bleu à vert) et post-PB DEL (en nuance de rouge à jaune). À droite, l'évolution de l'aire sous le signal de fluorescence en fonction de leur accumulation respective pour l'acquisition pré-PB DEL (en bleu) et post-PB DEL (en rouge). ..... 106

Figure C.18 Résultats bruts des **gouttes de salive liquide # 1 à 4 de l'échantillon 5 sans photobranchiment DEL**. À gauche, les accumulations des acquisitions de spectres Raman de la première acquisition Raman (en nuance de bleu à vert) et la deuxième après la pause de 1min 30s (en nuance de rouge à jaune). À droite, l'évolution de l'aire sous le signal de fluorescence en fonction de leur accumulation respective pour les acquisitions avant la pause de 1min 30s (en bleu) et après (en rouge). ..... 106

Figure C.19 Les aires sous le signal Raman brutes de chacune des acquisitions avant (en foncé) et après (en pâle) photobranchiment DEL des gouttes de salive liquide présentées pour chacun des

échantillons en fonction de l'accumulation des acquisitions Raman pour tous les échantillons.	107
Figure C.20 Les aires sous le signal Raman brutes de chacune des acquisitions avant (en foncé) et après (en pâle) la pause de 1min30s d'exposition lumineuse des gouttes de salive liquide présentées pour chacun des échantillons en fonction de l'accumulation des acquisitions Raman pour tous les échantillons.....	107
Figure C.21 Les aires sous le signal de fluorescence brutes de chacune des acquisitions avant (en foncé) et après (en pâle) photoblanchiment DEL des gouttes de salive liquide présentées pour chacun des échantillons en fonction de l'accumulation des acquisitions Raman pour tous les échantillons.....	108
Figure C.22 Les aires sous le signal de fluorescence brutes de chacune des acquisitions avant (en foncé) et après (en pâle) la pause de 1min30s d'exposition lumineuse des gouttes de salive liquide présentées pour chacun des échantillons en fonction de l'accumulation des acquisitions Raman pour tous les échantillons. ....	109
Figure C.23 Les SBR bruts de chacune des acquisitions avant (en foncé) et après (en pâle) PB DEL des gouttes de salive liquide présentées pour chacun des échantillons en fonction de l'accumulation des acquisitions Raman pour tous les échantillons pour la bande $1003\text{ cm}^{-1}$ .....	110
Figure C.24 Les SBR bruts de chacune des acquisitions avant (en foncé) et après (en pâle) la pause de 1min30s d'exposition lumineuse des gouttes de salive liquide présentées pour chacun des échantillons en fonction de l'accumulation des acquisitions Raman pour tous les échantillons pour la bande $1003\text{ cm}^{-1}$ . ....	111
Figure C.25 Les SNR bruts de chacune des acquisitions avant (en foncé) et après (en pâle) photoblanchiment DEL des gouttes de salive liquide présentées pour chacun des échantillons en fonction de l'accumulation des acquisitions Raman pour tous les échantillons. ....	112
Figure C.26 Les SNR bruts de chacune des acquisitions avant (en foncé) et après (en pâle) la pause de 1min30s d'exposition lumineuse des gouttes de salive liquide présentées pour chacun des échantillons en fonction de l'accumulation des acquisitions Raman pour tous les échantillons.113	

## LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
CCD	Dispositif à transfert de charges ( <i>charge coupled device</i> )
COVID-19	Maladie à coronavirus 2019 ( <i>coronavirus disease 2019</i> )
CRCHUM	Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal
DEL	Diode Électroluminescente
FRAP	Redistribution de fluorescence après photoblanchiment ( <i>Fluorescence Recovery After Photobleaching</i> )
FRET	Transfert d'énergie entre molécules fluorescentes ( <i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i> )
IR	Infrarouge
LUMED	Lumen / Médical
MPE	Exposition maximale possible ( <i>Maximal possible exposure</i> )
NIR	Infrarouge proche ( <i>near-infrared</i> )
PB	Photoblanchiment/Photoblanchissant.e DEL
SBR	Rapport signal sur signal de fond ( <i>Raman to baseline ratio</i> )
SNR	Rapport signal sur bruit ( <i>signal to noise ratio</i> )
SRDS	Spectroscopie Raman dans le Domaine Temporel
UV	Ultraviolet
VPH	Virus du Papillome Humain

## **LISTE DES ANNEXES**

ANNEXE A Calculs du MPE de la peau des sources.....	87
ANNEXE B Instrumentation du système Invia Renishaw.....	91
ANNEXE C Résultats bruts .....	94

## CHAPITRE 1 INTRODUCTION

La guérison du cancer est le problème séculaire de l'oncologie. Plusieurs théories ont émergé au fil des siècles, mais l'essentiel reste que pour les cancers non métastatiques un enjeu majeur est de complètement enlever la tumeur afin d'éliminer les risques de récidive. [1] La spectroscopie Raman vient aider dans cette lutte par sa capacité à discerner les tissus cancéreux des tissus sains en identifiant l'empreinte digitale d'un échantillon associée à sa composition moléculaire. En effet, les tissus cancéreux ont des traits moléculaires distinctifs associés à différentes manifestations de processus oncogéniques d'origine génétique. Ceci peut inclure certaines protéines plus ou moins abondantes et la modulation de certains lipides associés aux métabolismes des tumeurs. Les tumeurs sont aussi très souvent associées à une plus forte densité de vaisseaux sanguins due à l'angiogenèse. [2]

### 1.1 Problématique

Bien qu'elle ait été démontrée hautement sensible et spécifique pour la détection de tissus cancéreux, la spectroscopie Raman a néanmoins ses limites. Les échantillons biologiques contiennent généralement des molécules qui sont naturellement fluorescentes et les signaux qui en résultent posent un problème lors de l'acquisition de spectres Raman. En effet, lorsque la fluorescence d'un échantillon est trop importante, les bandes du spectre Raman se confondent au signal de la fluorescence, ce qui limite le rapport du signal Raman sur signal de fond (SBR, du terme anglais *signal-to-baseline ratio*) pouvant être détecté. Ceci résulte notamment du fait que la section efficace de la diffusion Raman est beaucoup plus faible que celle de la fluorescence à pareille intensité d'excitation. [3]

Des méthodes de traitement de signal post-acquisitions ont été développées au cours des années afin de remédier à ce problème. Cependant, si la fluorescence intrinsèque de l'échantillon est telle que le rapport signal-sur-bruit (SNR, du terme anglais *signal-to-noise ratio*) du spectre est fortement affecté, le spectre une fois traité numériquement ne sera pas d'aussi bonne qualité qu'un spectre associé à un plus bas niveau de fluorescence. C'est pourquoi ce projet propose de résoudre le problème de la fluorescence en amont, en supprimant la fluorescence de l'échantillon biologique par photoblanchiment avant la détection d'un spectre Raman.

En 2018, PhD Joannie Desroches démontre pour la première fois l'intégration d'une sonde-aiguille de biopsie commerciale pour des mesures de spectroscopie Raman de tumeurs cérébrales *in vivo*. Or, le problème du compromis entre la qualité du signal Raman et le temps d'acquisition reste un enjeu de taille. En effet, dans le cadre d'études cliniques, une contrainte attendue est la limitation de l'exposition laser afin de minimiser les dommages des tissus et donc n'assure pas la qualité du signal Raman. [4]

Marchant dans ses pas, en 2022, PhD Fabien Picot présente sa thèse qui vient répondre au problème de localisation exacte des tissus cancéreux de prostate en utilisant le contraste moléculaire en combinant la spectroscopie Raman, la spectroscopie de fluorescence et la tomographie optique diffuse pour optimiser le guidage chirurgical afin de distinguer les tissus sains/bénins des cancéreux de la prostate *in situ* et ce pour la première fois avec ces techniques. [5] Le LUMEDLAB a étudié une panoplie de tissus humains au fil des ans, la prostate est de loin le plus fluorescent, tissus sains/bénins et cancéreux confondus.

Depuis 2020, le LUMEDLAB s'intéresse aux biofluides. Comme énormément de laboratoires de recherche lors de cette période, le LUMEDLAB a contribué à la conception de tests rapides pour la détection de COVID-19. L'idée est de mettre à profit la capacité de détection du portait moléculaire du virus via spectroscopie Raman en testant la salive du patient au lieu du test nasal inconfortable. Cependant, la salive est un échantillon dont la composition très variante, non seulement d'un individu à un autre, mais aussi au cours de la journée pour une même personne. Ceci s'explique par un éventail de facteurs confondants tels que les habitudes alimentaires et hygiéniques, le cycle hormonal ou encore si l'individu est fumeur ou non pour n'en nommer que quelques exemples. [6] Tous ces facteurs viennent affecter le niveau d'autofluorescence de l'échantillon de salive et quelquefois celui-ci peut même saturer les capteurs du système rendant la mesure inutilisable.

## 1.2 Hypothèse de recherche

Ce projet repose sur l'hypothèse qu'il est possible d'imager des régions spécifiques d'un spectre avec de meilleures valeurs numériques associées au SBR et au SNR à l'aide d'une méthode de suppression de l'autofluorescence des échantillons biologiques, le photoblanchiment.

### 1.3 Objectifs

L'objectif principal de ce projet consiste à développer un système de spectroscopie Raman accompagné par une méthode pouvant supprimer l'autofluorescence lors de l'acquisition de spectres Raman. La méthode sera développée pour la détection de spectres de salive humaine, mais la méthode peut être généralisée à d'autres milieux biologiques tels que les tissus.

Le mémoire est subdivisé en trois sous-objectifs :

1. Concevoir le système et valider son fonctionnement à l'aide d'échantillons simples avec un fort signal Raman tels que des graines de sésame.
2. Réaliser la preuve de concept de la méthode à l'aide d'échantillons biologiques et inertes tels que de la poudre de collagène pure et un modèle de salive humaine afin de peaufiner la méthode avant de faire des tests sur des biofluides.
3. Réaliser des acquisitions sur des échantillons biofluides comme de la salive humaine, afin de démontrer une optimisation des métriques de qualité du signal (SNR, SBR) grâce à la méthode développée en la comparant à des résultats de spectroscopie Raman classique, c.-à-d. sans photoblanchiment.

### 1.4 Plan du mémoire

Ce mémoire est réalisé en 5 parties, en omettant celle-ci. Il débute par une revue de littérature (Chapitre 2) qui établit les bases théoriques du projet. Puis, la méthode expérimentale qui a permis de réaliser les objectifs ci-dessus est présentée (Chapitre 3) de même que les résultats en découlant dans le chapitre suivant (Chapitre 4). En outre, une analyse des avantages et limites de la méthode sera présentée dans un chapitre de discussion générale (Chapitre 5). Finalement, des conclusions et recommandations sont présentées dans le dernier chapitre (Chapitre 6).

## CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE

Ce chapitre établit les bases des concepts importants à la compréhension des expériences et résultats obtenus lors de cette étude explorant le photoblanchiment comme méthode de suppression de la fluorescence des échantillons.

### 2.1 Fluorescence

Ce phénomène se produit sous certaines conditions. L'origine de la fluorescence provient d'un fluorophore, une molécule produisant la fluorescence. Elle comporte généralement un ou plusieurs groupes aromatiques, une boucle de carbone hexagonal cyclique, ou une molécule planaire ou des liens  $\pi$ , donc essentiellement plusieurs électrons de liens covalents. [7] La fluorescence est le résultat d'état singulets excités suivi d'une conversion interne vers le niveau inférieur de l'état excité puis d'une émission d'un photon moins énergétique que celui absorbé, tel qu'illustré à la Figure 2.1.

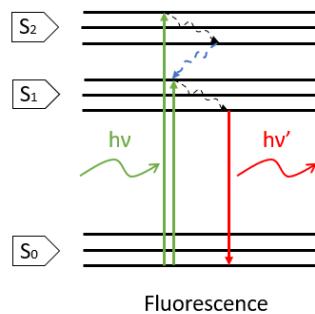


Figure 2.1. Diagramme Jablonski de la fluorescence. Excitation en vert, conversion thermique en noir pointillé, conversion interne en bleu pointillé et émission en rouge. [3]

Le spectre d'émission de fluorescence est intrinsèquement relié à la structure moléculaire du fluorophore et à celle du solvant dans lequel il se trouve. [8] Le spectre d'émission est aussi indépendant de la longueur d'onde d'excitation la majeure partie du temps et surtout dans le cadre d'échantillons biologiques, c'est ce qu'on appelle la loi de Kasha-Vavilov, portant les noms du spectroscopiste moléculaire américain Michael Kasha et le physicien soviétique Sergueï Ivanovitch Vavilov. Il s'agit d'un corolaire de la loi Kasha qui quant-à-elle stipule que le niveau d'émission d'un spin de moment angulaire donné est le niveau excité le plus bas de ce spin de moment angulaire. La loi de Kasha-Vavilov stipule donc que la fluorescence proviendra toujours de l'état

vibrationnel fondamental du niveau singulet excité le plus bas, le  $S_1$ . [9] Donc, même si le photon est absorbé par le niveau  $S_2$ , son photon de fluorescence ne sera émis que par le niveau  $S_1$ , voir Figure 2.1. Évidemment il y a des exceptions à cette loi, mais elles ne seront pas à l'étude ici, puisqu'elles n'interviendront pas dans le cadre d'un travail portant sur des échantillons biologiques.

Le déplacement de Stokes (en anglais, *Stokes shift*) est le décalage entre le spectre d'absorption et d'émission d'un échantillon fluorophore. Il résulte du fait que l'énergie de l'excitation est plus grande que celle de l'émission. Ceci est dû notamment à la conversion thermique de l'électron dans le singulet  $S_1$ , où une partie de l'énergie se dissipe en chaleur, tel qu'illustré à la Figure 2.1 par la flèche noire pointillée du diagramme de Jablonski de la fluorescence. D'autres causes possibles de ce décalage comportent la possibilité d'une conversion thermique interne d'un niveau supérieur vers un niveau inférieur de  $S_0$  lors de la phase de désexcitation, un effet du solvant, une formation d'un complexe ou d'un transfert énergétique entre molécules fluorescentes de l'échantillon. Le temps de vie de la fluorescence est de l'ordre de 10 ns. Ce phénomène est le résultat de transitions d'états énergétiques singulets tel qu'illustré à la Figure 2.1. [8]

Il existe deux types de fluorophores, ceux qui produisent de la fluorescence dite intrinsèque à l'échantillon aussi appelée autofluorescence; les fluorophores endogènes. Les fluorophores exogènes quant à eux proviennent d'un marqueur qu'on ajoute à l'échantillon comme agent de contraste pour de l'imagerie par fluorescence par exemple. [7]

### **2.1.1 Fluorophores exogènes**

Essentiellement les fluorophores exogènes sont des molécules injectées dans les tissus biologiques, soit par voie intraveineuse, soit par voie orale, à des fins d'agents de contraste ou de marqueurs cellulaires par exemple. La protéine fluorescente verte (GFP) et la rhodamine sont des exemples bien connus pour ces applications. [8], [10] En effet, le meilleur moyen pour éliminer les tumeurs cancéreuses solides est l'excision chirurgicale de celles-ci. Ainsi, la démarcation des marges de ladite tumeur est essentielle à la guérison du patient. C'est pourquoi l'injection de fluorophores exogènes comme le vert d'indocyanine (ICG, *Indocyanine green* en anglais) est utilisée de manière routinière pour détecter puis exciser les ganglions lymphatiques affectés de sites métastasiques en temps réel lors de la chirurgie. [11]

## 2.1.2 Fluorophores endogènes

L'autofluorescence est la fluorescence intrinsèque d'un échantillon, contenant des fluorophores endogènes. Ce mémoire vient étudier ce type de fluorescence. C'est pourquoi les termes fluorescence et autofluorescence y sont utilisés comme synonymes. Les fluorophores endogènes contrairement aux exogènes sont intrinsèques à la nature de l'échantillon biologique. De ce fait, il n'est pas possible de contrôler leur concentration comme pour les fluorophores exogènes. En outre, dans la majorité des cas, les fluorophores endogènes émettent dans le spectre du visible. [12]

Les protéines sont généralement les macromolécules responsables de l'émission d'autofluorescence. Celles-ci sont construites à partir d'acides aminés tels que la phénylalanine, le tryptophane, la proline pour en nommer quelques-uns. Ceux-ci ont la particularité d'être aromatiques, ce qui favorise leur émission de fluorescence par leur électrons délocalisés de leur composé aromatique. Par ailleurs, le collagène et l'élastine sont des protéines abondantes dans les tissus biologiques, puisqu'elles remplissent une fonction de structure de ceux-ci, leur autofluorescence est donc elle-aussi très abondante. Par ailleurs, le nicotinamide adénine dinucléotide réduite (NADH) est aussi une source abondante d'autofluorescence à cause de son cycle nicotinamide réduit. [8] Cette coenzyme est une des plus importantes d'un organisme cellulaire, puisqu'elle est essentielle au métabolisme qui est responsable pour la production d'énergie cellulaire. [13], [14]

## 2.2 Absorption

L'absorption consiste en un transfert énergétique provenant d'un photon vers un atome et/ou d'une molécule. Une fois le photon incident absorbé, l'électron excité par celui-ci transitionne vers un état plus énergétique et est réémis sous forme de chaleur.

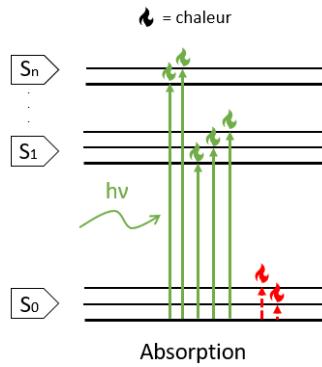


Figure 2.2. Diagramme de Jablonski de l'absorption. En vert, l'absorption d'états vibrationnels, en rouge l'absorption infrarouge. [3]

Les différents types d'absorptions possibles, illustrée à la Figure 2.2, sont les transitions électroniques et vibrationnelles illustrées en vert où l'électron passe d'une orbitale à une plus énergétique et où les atomes de la molécule vibrent selon des modes de vibration différents. [3] Enfin, les transitions infrarouges en rouge sont un type de transitions vibrationnelles ou rotationnelles dépendamment de la position dans le spectre d'excitation se trouve dans infrarouge. Lorsque le photon incident se trouve dans l'infrarouge proche, il est plus probable que les transitions soient vibrationnelles et lorsque ces électrons relaxent et émettent des photons, ceux-ci permettent de déterminer la nature atomique de l'échantillon, ses groupes fonctionnels etc. Or, lorsque le photon incident est dans l'infrarouge lointain, les transitions rotationnelles sont plus probables et après la relaxation des électrons, les photons émis de ces transitions permettent d'obtenir de l'information sur les types de liens des composés moléculaires de l'échantillon. [15] C'est ce principe sur lequel se base la spectroscopie d'absorption. L'absorption se quantifie selon un coefficient propre à l'échantillon. Le coefficient d'absorption correspond à la densité volumique de l'échantillon par sa section efficace d'absorption, soit l'équation  $\mu_a = N_a \sigma_a$ .

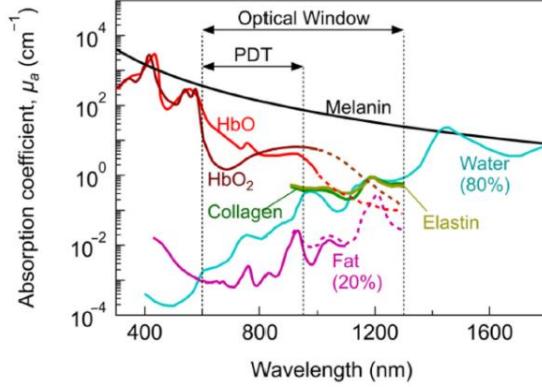


Figure 2.3. Les variations des coefficients d'absorption de l'eau, l'oxyhémoglobine, la désoxyhémoglobine, la mélanie, le gras, l'élastine et le collagène en fonction de la longueur d'onde incidente, cette figure est tirée de [16].

À la Figure 2.3, les coefficients d'absorption des molécules fréquentes voire essentielles au maintien des tissus biologiques du corps humain y sont présentés. Dans le cadre d'étude sur les tissus biologiques et les biofluides, il est donc important de tenir compte de la fenêtre thérapeutique, appelée *optical window* sur la figure ci-haut. Cette fenêtre représente la région spectrale où l'absorption et la diffusion de l'ensemble de ces composantes essentielles du corps humain sont à leur minimum. Ainsi, ces longueurs d'onde sont à prioriser lors d'expériences sur des tissus biologiques pour en minimiser les dommages.

### 2.3 Diffusion

Selon le portrait classique de la diffusion, celle-ci résulte de l'interaction entre un champ électromagnétique (lumière) et un système moléculaire (échantillon). La lumière incidente vient perturber la distribution des charges des molécules de l'échantillon, ce qui induit un moment dipolaire  $\mu$  et ce même si les molécules ne sont pas polaires initialement. Le tenseur  $\alpha$  représente la polarisabilité moléculaire, soit la capacité de perturber la densité électronique de l'échantillon à sa géométrie d'équilibre, le mode oscillatoire appelé ici  $q_0$ . Comme le veut la physique, l'énergie du système demeure minimisée si la géométrie du système moléculaire se déplace pour modifier la polarisabilité pendant que la densité électronique quant à elle s'ajuste adiabatiquement pour ajuster temporairement la géométrie nucléaire, soit l'ensemble des modes vibrationnels appelés ici  $q$ . [17]

$$(1) \quad \vec{\mu} = \sum \vec{\mu}_i = \text{Polarisation macroscopique} = \tilde{\alpha} \vec{E}_{\text{externe}} = \tilde{\alpha} \vec{E}_0 \cos(\omega_0 t)$$

Cette somme de ces moments dipolaires représente une seconde source de champ électromagnétique irradiée par les molécules de l'échantillon, soit la diffusion. Lorsque la série de Taylor du tenseur de polarisabilité est développée on obtient :

$$\alpha = \alpha(Q) = \alpha_0 + \sum_{q=1}^N \left[ \frac{\partial \alpha}{\partial q} \right]_{q_0} q + \frac{1}{2} \left[ \frac{\partial^2 \alpha}{\partial q \partial q'} \right]_{q_0 q'_0} q q' + O(q^3)$$

Où  $q = q_0 \cos(\omega_q t)$ , les modes normaux des déplacements géométriques du système moléculaire et ceux-ci oscillent à une fréquence  $\omega_q$ . Il est important de noter que les modes rotationnels sont négligés, car le modèle classique n'a pas de modes discrets pour les rotations moléculaires. En gardant les 2 premiers termes de la polarisabilité et en remplaçant le mode  $q$  par son expression générale on a :

$$\alpha \approx \alpha_0 + \left[ \frac{\partial \alpha}{\partial q} \right]_{q_0} q_0 \cos(\omega_q t)$$

L'équation du moment dipolaire devient :

$$\begin{aligned} \mu(t) &= \left[ \alpha_0 + \left[ \frac{\partial \alpha}{\partial q} \right]_{q_0} q_0 \cos(\omega_q t) \right] \cdot E_0 \cos(\omega_0 t) \\ \mu(t) &= \alpha_0 E_0 \cos(\omega_0 t) + \left[ \frac{\partial \alpha}{\partial q} \right]_{q_0} E_0 q_0 \cos(\omega_q t) \cos(\omega_0 t) \end{aligned}$$

Avec l'identité trigonométrique  $\cos\psi \cos\theta = \frac{1}{2} [\cos(\psi - \theta) + \cos(\psi + \theta)]$ , l'équation obtenue vient résumer cette section :

$$(2) \quad \mu(t) = \alpha_0 E_0 \cos(\omega_0 t) + \frac{E_0 q_0}{2} \left[ \frac{\partial \alpha}{\partial q} \right]_{q_0} \cos([\omega_q - \omega_0]t) + \frac{E_0 q_0}{2} \left[ \frac{\partial \alpha}{\partial q} \right]_{q_0} \cos([\omega_q + \omega_0]t)$$

Le premier terme représente soit la diffusion Rayleigh soit la diffusion de Mie selon le contexte, le deuxième, la diffusion Raman Stokes et le troisième, la diffusion Raman anti-Stokes. [17]

### 2.3.1 Diffusion Rayleigh

Ce phénomène fut publié par Lord Rayleigh en 1871 où il a démontré que l'intensité de cette diffusion est inversement proportionnelle à  $\lambda^4$ . On s'intéresse au contenu moléculaire de l'échantillon. Donc, les diffuseurs à l'étude sont des molécules. La longueur d'onde incidente et monochromatique (785 nm dans le cas à l'étude) est supérieure à la taille moléculaire de l'échantillon, souvent de l'ordre du nanomètre. [18] À titre d'exemple, le rayon de la molécule de l'acide désoxyribonucléique (ADN) est de 1 nm. [19] Quand la lumière incidente à un échantillon elle peut soit être absorbée si l'énergie des photons correspond à la séparation de 2 niveaux énergétiques de la molécule échantillon. Cependant si la lumière n'est ni transmise ni diffusée par l'échantillon, la lumière sera alors diffusée à une longueur d'onde/fréquence inchangée tel qu'illustré au centre de la Figure 2.4. [20] On parle alors de diffusion Rayleigh.

$$\lambda_{diffusé} = \lambda_{incident}$$

Pour faire le lien avec l'équation ( 2 ), il s'agit de son premier terme où le mode vibrationnel est identique à celui de l'onde incidente, soit :

$$(3) \quad \omega_q = \omega_0$$

### 2.3.2 Diffusion de Mie

Lorsque l'échantillon et la longueur d'onde incidente sont de tailles comparables ou si l'échantillon est de taille supérieure la longueur d'onde incidente, il est alors question de diffusion de Mie. Cette diffusion prédomine donc lors d'expériences sur des tissus biologiques, puisqu'ils sont composés de molécules de l'ordre des nanomètres à des organelles ou des cellules de l'ordre des micromètres. Comme la diffusion de Rayleigh, la diffusion de Mie émet la même longueur d'onde que la longueur d'onde incidente à l'échantillon, tel que conclu à l'équation ( 3 ). [14]

### 2.3.3 Diffusion Raman

Il y existe deux types de diffusion Raman, la diffusion Raman Stokes et Anti-Stokes. À l'équation ( 2 ) le terme de diffusion Stokes est décalé vers le rouge en termes de fréquence et celui de diffusion anti-Stokes vers le bleu tel qu'illustré à la Figure 2.4.

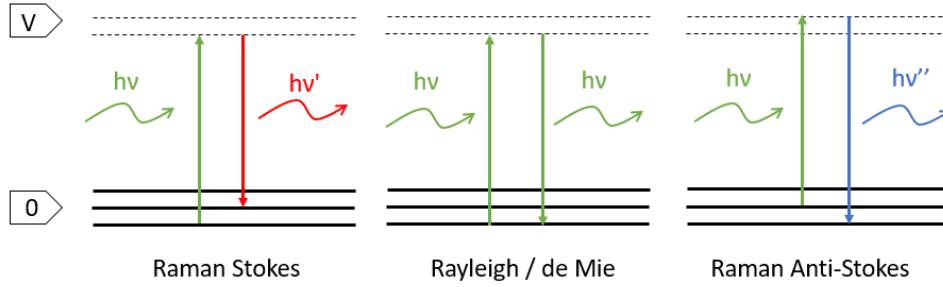


Figure 2.4. Diagrammes de Jablonski de la diffusion Rayleigh ou de Mie, Raman Stokes et Anti-Stokes. [3]

Dans le cadre de ce projet, seule la diffusion Raman Stokes sera considérée, car à l'équilibre thermodynamique les molécules ne sont pas assez énergétiques pour générer une assez grande population aux niveaux vibrationnels pour activer le phénomène de diffusion Raman Anti-Stokes. Donc à l'équilibre thermodynamique, la diffusion Raman Anti-Stokes est statistiquement moins probable que la diffusion Raman Stokes. [21] Ceci est aussi logique selon l'équation ( 2 ), puisque la diffusion Anti-Stokes est décalée vers le bleu par rapport à la fréquence incidente du laser et donc ces photons sont plus énergétiques ( $\omega_0 < \omega_q$ ), nécessitant une transition énergétique plus élevée. En se concentrant sur le 2<sup>e</sup> terme de l'équation ( 2 ), la diffusion Raman Stokes, qui donne de l'information sur la composition moléculaire de l'échantillon, car les oscillations des liens moléculaires provoquent une formation de moment dipolaire qui induit un transfert d'électron vers un état virtuel puis relaxe vers un état plus excité que celui dans lequel il était initialement, ce qui explique le décalage vers le rouge en termes de fréquence de ce type de diffusion.

$$(4) \quad \omega_0 > \omega_q$$

Or, pour que cette transition ait lieu il faut que le terme de dérivée partielle de la polarisabilité du mode à l'équilibre  $q_0$  ne soit pas nul. Il faut donc respecter des règles de sélection.

### 2.3.4 Règles de sélection Raman et IR

Les bandes Raman et les bandes d'absorption permettent de déterminer la construction moléculaire d'un échantillon imagé. Ces bandes peuvent être prédites à l'aide de règles de sélection dérivées de la théorie des groupes. [20] Ces règles de sélection, présentées au Tableau 2.1 permettent de prédire quelles bandes peuvent apparaître sur le spectre, mais elles ne donnent aucune information

sur leur intensité. Il est donc possible qu'elles n'apparaissent pas sur le spectre lors de l'acquisition même s'il est physiquement possible qu'elles existent. Ces règles permettent notamment de distinguer les transitions résultant de la diffusion Raman Stokes et de l'absorption infrarouge (IR) et ainsi établir un portrait complet de la structure moléculaire de l'échantillon. Lorsque la bande existe elle est dite active et sinon inactive.

Tableau 2.1. Résumé des règles de sélection Raman et IR. [17], [20]

	$\left(\frac{\partial\alpha}{\partial q}\right)_{q_0} \neq 0$	$\left(\frac{\partial\alpha}{\partial q}\right)_{q_0} = 0$	$\left(\frac{\partial\alpha}{\partial q}\right)_{q_0} = 0$
	$\left(\frac{\partial\mu}{\partial q}\right)_{q_0} = 0$	$\left(\frac{\partial\mu}{\partial q}\right)_{q_0} \neq 0$	$\left(\frac{\partial\mu}{\partial q}\right)_{q_0} = 0$
<b>Raman</b>	Active	Inactive	Diffusion
<b>IR</b>	Inactive	Active	

Dans le cas des transitions d'énergie vibrationnelle permises d'absorption IR, il faut s'intéresser au moment dipolaire généré par le déplacement du noyau moléculaire. L'électron passe du niveau vibrationnel  $v'$  au niveau  $v''$  (où  $v'' > v'$ ), le moment transitionnel est donné par la fonction d'onde :

$$\vec{R} = \int \psi'^* \vec{\mu} \psi'' dq$$

Avec (2) :

$$\vec{R} = \overline{\mu_0} \int \psi'^* \psi'' dq + \left( \frac{d\vec{\mu}}{dq} \right)_{q_0} \int \psi'^* q \psi'' dq + \dots$$

Lorsque les fonctions propres sont orthogonales, le premier terme devient alors nul, laissant :

$$(5) \quad \vec{R} = \left( \frac{d\vec{\mu}}{dq} \right)_{q_0} \int \psi'^* q \psi'' dq + \dots$$

On retrouve le terme de dérivée du Tableau 2.1. Le premier terme est non nul si et seulement si les valeurs propres des fonctions propres valent

$$\Delta\nu = \pm 1$$

Comme il s'agit ici d'absorption seules les transitions de  $\nu'$  vers  $\nu''$ ,  $\Delta\nu > 0$  ont une signification physique. La règle de sélection de l'absorption IR est donc :

$$\Delta\nu_{IR} = 1$$

L'intensité des bandes IR permises sont donc proportionnelles au carré du moment transitionnel  $|\vec{R}|^2$  et donc :

$$I_{IR} \propto \left( \frac{d\vec{\mu}}{dq} \right)_{q_0}^2$$

La même démarche est effectuée pour les transitions permises de diffusion Raman, au lieu du moment dipolaire, le tenseur de polarisabilité est utilisé. Résultant en le moment transitionnel :

$$(6) \quad \vec{R} = \left( \frac{d\alpha}{dq} \right)_{q_0} \int \psi'^* q \psi'' dq + \dots$$

$$\Delta\nu_{Raman} = \pm 1$$

$$I_{Raman} \propto \left( \frac{d\alpha}{dq} \right)_{q_0}^2$$

Ici contrairement aux transitions IR, les transitions homonucléaires et hétéronucléaires sont permises dans la molécule, ce qui rend les transitions Raman Stokes vibrationnelles beaucoup moins sensibles à l'environnement de la molécule c.à.d. le solvant. [20]

### 2.3.5 Spectroscopie Raman

La diffusion Raman permet d'obtenir l'empreinte digitale de l'échantillon étudié. En effet, les différents pics de ces spectres correspondent aux vibrations des liens moléculaires en réponse à l'excitation de la lumière incidente à l'échantillon.

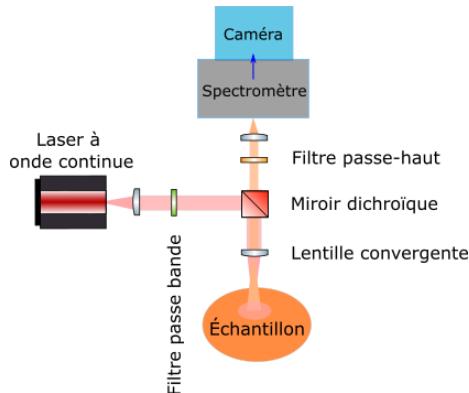


Figure 2.5. Montage de spectroscopie Raman classique.

Le système de spectroscopie Raman de base est illustré à la Figure 2.5. À des fins d'allégement du texte, le laser d'excitation de spectroscopie Raman est nommé laser Raman. Il consiste en un laser à onde continu, dans le cas à l'étude à la longueur d'onde 785 nm, qui passe par un filtre passe-bande à 785 nm afin d'assurer que seulement la longueur d'onde de laser ne se rende à l'échantillon. Puis, le faisceau est dirigé vers un miroir dichroïque qui l'envoie dans un premier temps vers l'échantillon où le laser est mis au focus afin de générer de la diffusion Raman à l'échantillon. Ensuite, les 3 sources de lumières de l'équation (2) sont émises de l'échantillon et envoyées au miroir dichroïque pour ensuite passer par un filtre passe-haut pour filtrer la diffusion de Rayleigh et/ou de Mie et la diffusion Raman anti-Stokes, à la longueur d'onde d'excitation du laser. Une fois filtré, le signal est transmis au spectromètre et le spectre résultant est détecté par la caméra. Les spectres bruts sont ensuite enregistrés sur un ordinateur pour passer au travers du pré-traitement de spectre Raman.

Le spectre Raman d'un échantillon peut être divisé en deux parties. L'empreinte digitale moléculaire ( $200$  à  $2000\text{ cm}^{-1}$ ) et les spectres à nombres d'onde élevé ( $< 2000\text{ cm}^{-1}$ ). La région de l'empreinte digitale moléculaire est largement suffisante pour identifier le contenu moléculaire de la plupart des échantillons, mais lorsqu'un échantillon organique comporte une faible densité d'atomes d'hydrogène cette région spectrale devient plus intéressante à étudier. Le signal de la région de spectres à nombres d'onde élevé plus difficile à obtenir et ce particulièrement pour des échantillons biologiques ayant des fluorophores endogènes. [22] C'est pourquoi cette étude se limite à la région de l'empreinte digitale moléculaire pour l'analyse des spectres Raman.

Tableau 2.2. Les bandes Raman observées sur les spectres Raman bruts des différents échantillons utilisés dans le cadre de ce projet et les liens moléculaires et/ou les molécules qui si réfèrent. (v : étirement, δ : déformation, w : agitation, r : basculement, t : torsion)

<b>Graine de sésame</b>		
Bandé Raman [cm <sup>-1</sup> ]	Lien moléculaire/Molécule	Référence
718	r(CH <sub>2</sub> )	[23]
875	v(C-C)	[24]
970	v(C=O) / Sucre	[23], [25]
1004	Phénylalanine	[6], [23], [24]
1033	v(C-N) / Proline	[24]
1063 - 1120	w(CH <sub>2</sub> ), t(CH <sub>2</sub> ), r(CH <sub>3</sub> )	[25]
1264 - 1031	δ(NH <sub>2</sub> ) / Amide III	[24]
1400	r(NH <sub>2</sub> ) / Amide III	[25]
1440	w(CH <sub>2</sub> )	[26]
1658	v(C=C) / Amide I	[24], [26]
<b>Poudre de collagène pure hydrolysée (peau bovine)</b>		
Bandé Raman [cm <sup>-1</sup> ]	Lien moléculaire/Molécule	Référence
811	v(C-C) / squelette protéique	[24]
859 - 878	v(C-C) / 4-Hydroxyproline	[24]
920	v(C-C) / Proline	[24]
1003	Phénylalanine	[6], [23], [24]
1032	v(C-N) / Proline	[24]
1095	δ(NCH) / Proline	[24]
1060	δ (carboxyle - OH) / Proline	[27]
1245 - 1270	C-N / Amide III	[24]
1318	δ(C-H)	[24]
1408	r(NH <sub>2</sub> ) / Amide III	[25]
1448	δ (CH <sub>2</sub> , CH <sub>3</sub> )	[24]
1663	v(C=O) / Amide I	[24]
<b>Salive humaine (patients sains)</b>		
Bandé Raman [cm <sup>-1</sup> ]	Lien moléculaire/Molécule	Référence
1605 - 1665	δ(O-H) / Eau	[28]

Au Tableau 2.2, les différentes bandes Raman observées des échantillons utilisés lors de cette études et leur liaison moléculaire associée y sont présentées pour les échantillons utilisés lors de l'étude.

### 2.3.6 Pré-traitement de spectres Raman

Le pré-traitement des spectres Raman est essentiel à l'analyse de ceux-ci. La première étape consiste à tronquer les spectres, car il se peut que le spectromètre ait une fenêtre d'acquisition inclus

des longueurs d'onde coupées par le filtre passe-haut, Figure 2.5. Il faut donc tronquer cette chute d'intensité pour que ces valeurs n'interfèrent pas avec le reste du traitement des spectres. Il arrive que des rayons cosmiques soient détectés par la caméra. Ces artefacts sont très faciles à distinguer des pics Raman par leur très haute intensité et donc à supprimer du reste du spectre. Par la suite, les accumulations de chaque acquisition sont moyennées afin d'améliorer le SBR de chacune des acquisitions. Cette étape peut être omise dépendamment du type d'analyse à faire, dans le cadre de ce projet elle est omise pour l'analyse du photoblanchiment causé par le laser Raman. Ensuite, il faut aussi supprimer les différentes sources de bruits externes au système de ces acquisitions, c'est-à-dire ce que la caméra détecte alors que le laser est éteint en ayant les mêmes paramètres d'acquisition que ceux des expériences, comme la lumière ambiante et émissions intrinsèques du système. Le système expérimental à lui seul apporte son lot de signaux indésirables. Il faut donc effectuer une correction du système, une calibration en  $y$  des spectres Raman. Dans le cas, d'un laser à 785 nm un standard NIST SRM 2241 est nécessaire. Il s'agit d'un petit carré de verre optique, qui sert à la correction de l'intensité relative des spectres Raman obtenus par une source de 785nm en émettant un spectre à large bande dont l'expression polynomiale permet d'obtenir la réponse du système. [29] Il est donc possible de la corriger au reste des spectres de l'expérience en les divisant par cette expression polynomiale. [30] En ce qui concerne la calibration en  $x$  des spectres Raman, il faut aussi un échantillon de référence. Celui-ci doit avoir un SBR à la bande Raman la plus intense par rapport au maximum du signal de fond au moins supérieur à 0.2 en plus d'avoir des pics Raman étroits et faciles à discerner à l'aide de fonctions Python intégrées. Deux échantillons répondent à ces critères, l'acétaminophène et le Nylon. Dans le cadre de cette étude, un comprimé d'acétaminophène est choisi. Le spectre de l'acétaminophène doit suivre les mêmes étapes de pré-traitement détaillées ci-haut. Au moment de cette étape, l'axe des  $x$  correspond aux pixels de la caméra. Pour faire la conversion en décalage Raman, il faut effectuer un ajustement polynomial d'ordre 2 ou 3. Maintenant, l'étape la plus importante du pré-traitement des spectres

Raman; la séparation du signal de fond d'autofluorescence, du signal Raman. L'algorithme *Bubblefill* est choisi pour cette étape. (Voir [30] pour les détails de l'algorithme)

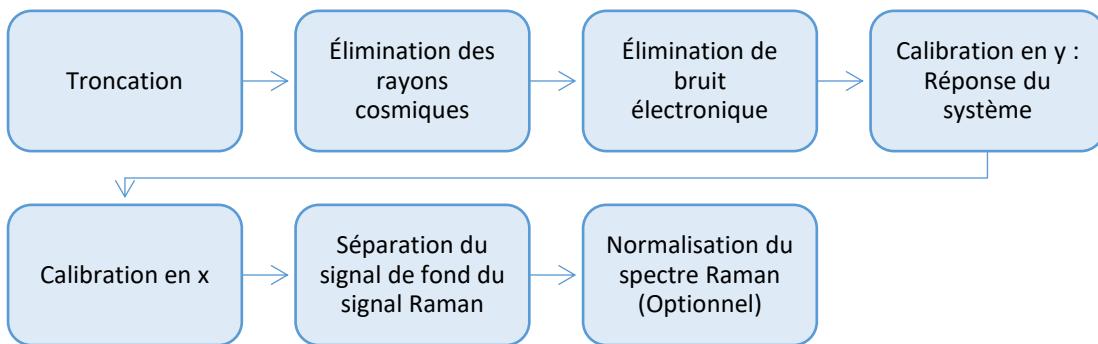


Figure 2.6. Résumé des étapes de pré-traitement des spectres Raman.

Finalement, les spectres Raman peuvent être normalisés. Cette étape est optionnelle si les paramètres d'acquisition sont constants pour tous les spectres de l'expérience, c'est le cas présent. De plus, cette étude s'intéresse à l'impact de l'expérience sur le compte de photons du signal de fond et de l'intensité des pics Raman. Il est donc inutile de normaliser dans le cas à l'étude.

### 2.3.7 Applications cliniques

Le LUMEDLAB a eu l'occasion d'appliquer la spectroscopie Raman à plusieurs types de tissus cancéreux et biofluides depuis ses débuts. Cette méthode spectroscopique permet par sa capacité à mieux détecter les marges de tissus cancéreux, permettant ainsi aux chirurgien.nes d'exciser plus optimalement les tissus cancéreux et ainsi réduire les risques de récidives. De plus, durant les 4 dernières années le LUMEDLAB s'est aussi intéressé aux biofluides tels que la salive, l'urine et le sang afin de détecter certains marqueurs notamment le virus du COVID-19 dans les échantillons de salive. Le problème de la fluorescence en spectroscopie Raman reste une constante pour les échantillons biologiques, tissus ou biofluides. Quant à la salive humaine, plusieurs enjeux sont à considérer. La salive n'est pas une solution constante dans le temps. En effet, les gens mangent, boivent, tombent malades et le cycle hormonal au courant d'une journée sont tous des facteurs venant affecter non seulement le contenu moléculaire de la salive, mais aussi sa concentration de fluorophores endogènes connus. [6]

## 2.4 Méthodes d'amélioration du signal Raman

Un défi de la spectroscopie Raman sur des échantillons biologiques est la contamination du spectre Raman par l'autofluorescence. Comme la diffusion Raman est statistiquement moins fréquente que la fluorescence, les bandes Raman se trouvent alors noyées dans le signal de fond (*baseline*). De plus, les échantillons biologiques tels que les biofluides comportent une grande quantité de protéines, qui peuvent agir comme fluorophores endogènes. Donc, pour améliorer la qualité du signal Raman, il faut trouver une méthode pour minimiser cette autofluorescence et/ou amplifier le signal Raman. Cette section présente des méthodes venant résoudre ce problème.

### 2.4.1 Spectroscopie Raman dans le domaine temporel (SRDT)

La spectroscopie Raman dans le domaine temporel (SRDT) se base sur les périodes d'émission des photons Raman et de fluorescence. En effet, ceux-ci sont émis à des échelles temporelles différentes. La fluorescence a un cycle d'excitation-émission de l'ordre de la nanoseconde, tandis que celui de la diffusion Raman se produisent principalement à l'échelle temporelle de la picoseconde. [31], [32], [33] Ainsi, des résultats de travaux passés du LUMEDLAB montrent qu'il est possible qu'en détectant les premiers photons émis lors d'une fenêtre temporelle d'acquisition de 300ps, le SBR total des spectres Raman est alors amélioré d'environ 30%. [34] Cette méthode a l'avantage de pouvoir être combinée à d'autres modalités d'imagerie. Cependant, le système expérimental est relativement complexe et n'est pas adaptable à un système fibré. De plus, cette méthode nécessite des temps d'intégration élevé pour capturer assez de signal Raman avec ces fenêtres temporelles d'acquisition ultra-courtes. Un temps d'intégration élevé implique une plus longue exposition de l'échantillon au laser d'excitation et donc augmente les risques de dégradation de l'échantillon. Toutes ces raisons rendent l'application de la méthode SRDT presque impossible pour l'étude d'échantillons *in vivo*.

### 2.4.2 SERS

La méthode SERS, *Surface-enhanced Raman Spectroscopy*, repose sur l'effet plasmonique du couplage d'une molécule Raman active et d'une surface SERS métallique, souvent de l'argent ou de l'or. La résonance plasmonique de surface permet donc d'améliorer le champs électrique local généré par ce couplage de molécules, résultant en une amélioration du signal Raman à la détection.[30],[35] Le montage de spectroscopie Raman conventionnel reste alors inchangé,

puisque la technique repose sur un ajout de surface SERS à l'échantillon. La surface SERS est choisie de sorte à amplifier le signal Raman pour une bande particulière. Or, l'identification des bandes SERS est non-triviale. En effet, certains modes de vibration visibles en spectroscopie Raman peuvent disparaître ou se confondre aux bandes SERS. De plus, la reproductibilité des spectres SERS n'est pas toujours garantie, car elle repose sur l'uniformité des surfaces dont la taille est de l'ordre des nanomètres. Ainsi, la moindre différence au niveau de la distribution spatiale des nanoparticules, nanotubes, etc. fait en sorte qu'il n'est pas toujours possible d'observer les mêmes bandes SERS d'un échantillon à l'autre, ou d'un substrat à l'autre. [36]

### 2.4.3 Photoblanchiment des protéines

Les protéines sont un agencement précis de chaîne d'acides aminés pouvant remplir des fonctions précises dans leur environnement. Elles commencent toutes par une chaîne unique d'acides aminés, la structure primaire. Puis, elles évoluent en une chaîne polypeptidique enroulée et/ou repliée par des ponts d'hydrogène pour former la structure secondaire. En se contorsionnant sous forme 3D à cause des chaînes latérales des acides aminés, la structure tertiaire est formée et parfois lorsque plus d'une chaîne d'acides aminés forme la protéine finale la combinaison des structures tertiaires forme la structure quaternaire, comme la structure triple hélice du collagène illustrée à la Figure 2.7.

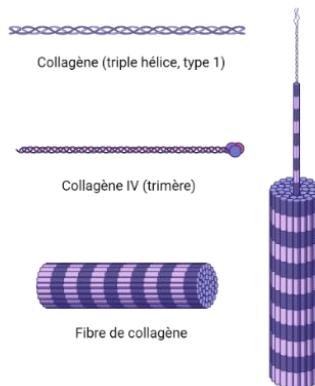


Figure 2.7. Structure de la protéine de collagène. (Fait avec *BioRender*)

Plusieurs facteurs environnementaux peuvent dénaturer une protéine, comme le pH, la température, le solvant, une réaction chimique du milieu où elle se trouve et même une radiation qui lui est incidente. C'est ce dernier exemple qui sera à l'étude ici. [37] Le photoblanchiment, comme le nom

l'indique, consiste en une réaction photochimique où la lumière incidente à l'échantillon provoque la photo-oxydation de protéines fluorophores endogènes, une forme de dénaturation. Cela peut être causé par une liaison de fluorophores excités à des molécules les environnant.[38] La dénaturation des protéines implique une reconfiguration spatiale de la molécule sans briser de liens moléculaires. Si la dénaturation est permanente, les liens des acides aminés sont alors brisés. Or s'ils restent intacts, le spectre Raman de ces protéines ne devrait pas être affecté, et si leur environnement le permet elles pourront retrouver leur forme fonctionnelle. [37]

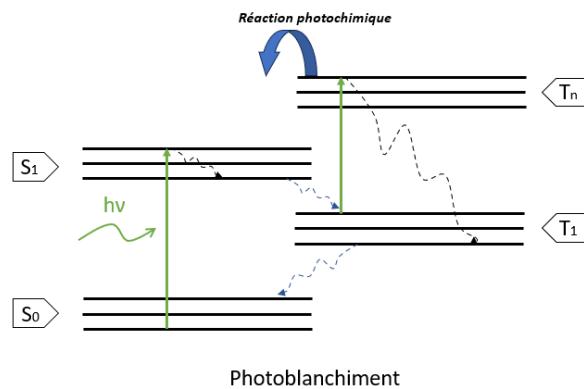


Figure 2.8. Diagramme de Jablonski du photoblanchiment. Vert: absorption, pointillé noir: transition de conversion interne, pointillé bleu: transition de conversion inter-système. [38]

Le photoblanchiment temporaire comme le nom l'indique est une perte momentanée de fluorescence suivie d'un regain causé par la renaturation des protéines affectées. Ci-dessous des exemples où le photoblanchiment est présent et observé [10]:

- Photo clignotement en spectroscopie de fluorescence issus de la redistribution de fluorescence après photoblanchiment (de l'anglais, *Fluorescence recovery after photobleaching – FRAP*).
- Dans un organisme vivant où la section photoblanchie est dynamique, échantillon *in vivo*.
- La densité de puissance incidente à l'échantillon n'atteint pas le seuil de destruction des liens moléculaires de la molécule.

Le photoblanchiment permanent est le résultat d'une exposition radiative dont la densité de puissance est telle que la dénaturation sent suit d'une réaction photochimique qui cause le bris de liens moléculaires.

L'application du photoblanchiment à la spectroscopie Raman permet donc de régler le problème de la plage dynamique saturée par l'autofluorescence de l'échantillon imager en la supprimant en amont. De plus, si les paramètres expérimentaux sont adéquatement optimisés pour l'échantillon à l'étude, les liens moléculaires ne sont pas affectés et ainsi les bandes Raman non plus, ce qui garantit l'amélioration des métriques de qualité des spectres Raman.

## 2.5 Métriques étudiées

La qualité des spectres Raman est quantifiée à l'aide de 2 métriques dans le cadre de cette étude, le rapport Raman sur signal de fond (SBR) et le rapport signal sur bruit (SNR).

### 2.5.1 Rapport Raman sur signal de fond (SBR)

Le rapport Raman sur signal de fond (SBR) permet de quantifier la quantité de signal de fond éliminé puisque le signal Raman devrait en théorie rester stable au long de l'expérience.

$$(7) \quad SBR [\%] = \frac{r[x: \text{bande Raman}]}{b [x: \text{bande Raman}]} \times 100$$

Où r est l'aire sous la courbe du signal Raman et b est l'aire sous la courbe du signal de fond.

Comme le spectre Raman de la salive humaine n'a qu'une bande assez intense visible dans les résultats obtenus lors de cette étude, ce mémoire se limitera au SBR de cette bande-ci au lieu du spectre complet.

### 2.5.2 Rapport signal sur bruit (SNR)

Le rapport signal sur bruit (SNR) permet de quantifier la qualité du spectre Raman selon sa proportion au bruit de photons ou ‘grenailles’, *shot noise* en anglais. Les sources de bruits principales du système illustré à la Figure 2.5 sont le bruit photonique, le bruit thermique et le bruit de lecture, *readout noise* en anglais, de la caméra à dispositif à transfert de charges (de l'anglais *Charge Coupled Device*, CCD). Le bruit thermique provient de la génération de charges provoquée dans la zone de déplétion de la puce CCD. Le bruit de lecture est généré par la détection de ces charges par l'instrument de lecture. Comme ces deux types de bruits sont intrinsèquement liés à l'instrumentation, ils sont tous deux filtrés lors de l'étape de calibration en y des spectres Raman. Il reste donc le bruit de photons comme source non-négligeable de bruit du signal. Le bruit de

photons cependant résulte de la nature discrète des photons et est présent dans tous les dispositifs conçus pour les détecter. Il se quantifie en la racine carrée du signal total, Raman et signal de fond. [39], [40] Mathématiquement, le SNR du signal Raman est alors donné par:

$$(8) \quad SNR_j [u. a.] \cong \sqrt{ntI_{Laser}} \frac{r_j}{\sqrt{r_j^2 + b_j^2}}$$

Où n est le nombre d'accumulations de l'acquisition, t est le temps d'acquisition (ou d'exposition du laser Raman) en secondes,  $I_{Laser}$  est l'intensité du laser Raman à l'échantillon en W, r est l'aire sous le signal Raman en  $m^2$ , b est l'aire sous le signal de fond en  $m^2$  et l'indice j représente les pixels de la caméra qui correspondent aux bandes du spectre.

Si les paramètres d'acquisitions restent constants lors de l'expérience, il est alors possible de simplifier la formule en omettant la constante de normalisation. C'est le cas dans le cadre de ce mémoire afin de réduire le nombre de variables de l'expérience.

## CHAPITRE 3 MÉTHODOLOGIE

### 3.1 Instrumentation

Le montage expérimental final est illustré à la Figure 3.1. Il peut être séparé en deux parties, le montage de spectroscopie Raman et le montage de photoblanchiment.

En suivant le faisceau du système de spectroscopie Raman, un laser à 785 nm en continu (compagnie: *Innovative Photonics Solutions*) est injecté dans une fibre optique où le faisceau est ensuite collimaté puis filtré par un filtre passe-bande 785 nm avec une largeur de bande de 62 nm (compagnie : *Semrock*, numéro de série : FF01-785/62-25) pour assurer que seulement la longueur d'onde d'excitation du laser Raman n'atteigne l'échantillon. Puis, le faisceau est réfléchi par le miroir dichroïque et mis au point par une lentille convergente. Les photons réémis par l'échantillon sont ensuite transmis par le miroir dichroïque vers un filtre passe-haut (compagnie : *Semrock*, numéro de série : BLP01-785R-25) pour filtrer la diffusion de Rayleigh/de Mie afin de n'avoir que les photons Raman Stokes. Ceux-ci sont alors injectés dans une fibre optique reliée à un spectromètre ayant en sortie une caméra CCD (compagnie: *Andor*, modèle : *Newton DU920P BR-DD*) qui transmet les spectres Raman à un ordinateur pour compiler et traiter ces données.

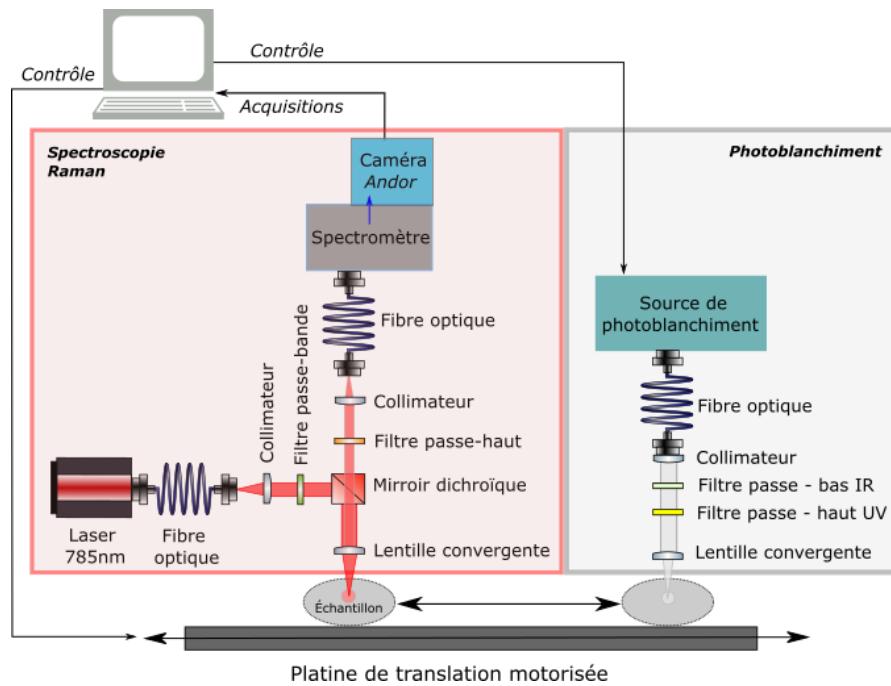


Figure 3.1. Montage expérimental final de spectroscopie Raman combiné au photoblanchiment.

La partie photoblanchiment du système, en suivant le faisceau à partir de la source de photoblanchiment, est constituée d'une source blanche de type DEL (compagnie : *lightsource.tech*, modèle : *LS-WL1*) qui est injecté dans une fibre optique. Cette source peut être contrôlée de manière externe ou par l'intermédiaire d'une interface graphique. Le faisceau est collimé et filtré par deux filtres UV passe-haut à 420 nm et deux filtres NIR passe-bas à 650 nm avant d'être mis au focus par une lentille convergente au niveau de l'échantillon.

L'échantillon peut passer d'une partie à l'autre, soit à l'aide d'une platine de translation motorisée contrôlée par l'ordinateur du système, soit en plaçant les deux sources de lumière au même point focal à l'échantillon.

Tableau 3.1. Informations importantes en lien avec la puissance des sources de lumière du système expérimental. Les calculs des expositions maximales possibles (MPE de l'anglais *Maximal Possible Exposure*) pour la peau de toutes les sources utilisées dans cette étude sont détaillés en annexe A. [41]

	<b>Laser <i>Renishaw</i></b>	<b>Laser <i>IPS</i></b>	<b><i>Lumencor</i></b>	<b><i>LS-LW1</i></b>
<b>Longueur d'onde [nm]</b>	785 ± < 1	785 ± < 1	400 à 630	420 à 650
<b>Diamètre au point focal [mm]</b>	0,02	1	3	1
<b>Puissance à l'échantillon [W]</b>	0,04	0,5	0,444	0,245
<b>Densité de puissance [W/cm<sup>2</sup>]</b>	12732,40	63,66	6,28	31,19
<b>MPE<sub>peau</sub> [W/cm<sup>2</sup>]</b>	2,433	0,295	0,2	0,2

## 3.2 Preuve de concept

Cette section vient détailler les étapes qui ont mené au montage final avec les paramètres expérimentaux optimisés pour la salive. En commençant par une preuve de faisabilité de la méthode sur un échantillon de graines de sésame. Puis, une série d'expériences visant à déterminer la longueur d'onde optimale de photoblanchiment sur un échantillon de collagène pur en poudre, en abordant le problème de densité de puissance de la source de photoblanchiment. Finalement, l'expérience d'optimisation du temps de photoblanchiment sur un modèle de salive humaine pour finaliser la méthode.

### 3.2.1 Validation de la technique

Le but de cette expérience est de vérifier la faisabilité de l'expérience. Pour ce faire, un échantillon de graine de sésame est choisi pour sa forte réponse en fluorescence et en diffusion Raman. Ces tests se font sur un système expérimental déjà fonctionnel et disponible, le microscope *InVia Renishaw*, auquel une source DEL *Lumencor* (compagnie : *Lumencor*, Modèle : *SPECTRA X*), est ajoutée et agit comme source de photoblanchiment. Cette source a la possibilité d'utiliser 6 DELs de longueur d'onde différente en plus de pouvoir les combiner, tel que présenté à la Figure 3.2.

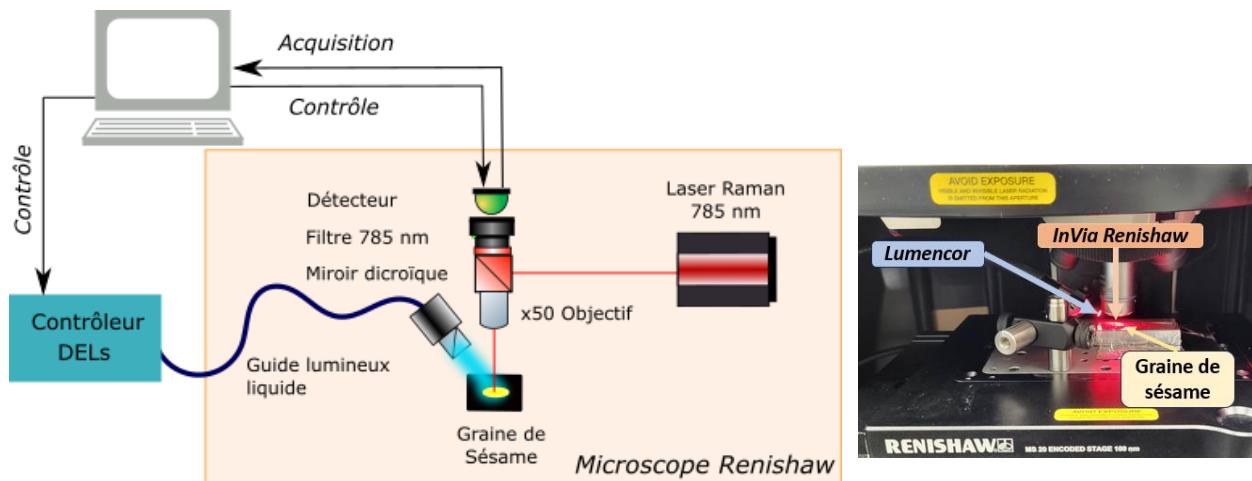


Figure 3.2. À gauche, le montage expérimental de spectroscopie Raman combiné au photoblanchiment avec le microscope Raman *InVia Renishaw*. À droite, une photo de l'expérience dans la cuve du microscope. (Instrumentation en Annexe B)

Le protocole du test de validation est illustré à la Figure 3.3. Deux tests sont faits, un test de la méthode de photoblanchiment et un test de contrôle, où seul le laser est exposé à l'échantillon. Le protocole de mesure de la méthode du photoblanchiment consiste en une acquisition Raman d'une accumulation de 5s suivie d'une période de photoblanchiment de 30s avec la source DEL *Lumencor* à la longueur d'onde turquoise de 514 nm suivi d'une pause de 30s afin d'assurer que l'échantillon retourne au repos. Le tout est répété dix fois sur le même échantillon de graine de sésame pour apprécier la progression des métriques de qualité de l'échantillon. Il est important de noter que tous les échantillons pour de l'ensemble de ce projet sont placés sur une cassette recouverte de ruban d'aluminium afin de n'obtenir que la réponse Raman de l'échantillon et non celle de la cassette d'échantillon.

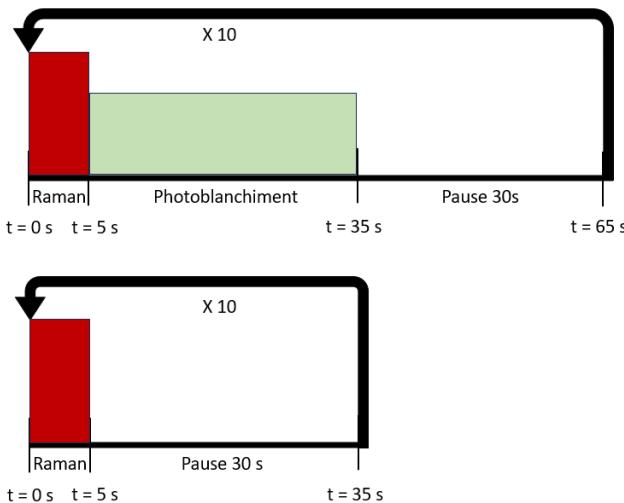


Figure 3.3. Déroulement du protocole des tests de validité et du choix de la longueur d'onde de photoblanchiment. En haut, le protocole expérimental de la méthode de photoblanchiment DEL. En bas, le contrôle avec seulement une exposition répétée au laser Raman.

Le test de contrôle consiste en le même test, mais fait sans l'exposition de la source de photoblanchiment DEL et avec tous les mêmes paramètres expérimentaux du laser Raman énoncés au Tableau 3.2. Ceci permet d'assurer la reproductibilité de l'expérience du test de validation.

Tableau 3.2. Paramètres expérimentaux du test de validation de la méthode de photoblanchiment.

Paramètres expérimentaux	Laser Raman <i>Renishaw</i>	<i>Lumencor</i>
<b>Longueur d'onde [nm]</b>	$785 \pm < 1$	514
<b>Densité de puissance [<math>\text{W/cm}^2</math>]</b>	$1,27 \times 10^4$	0,707
<b>MPE<sub>peau</sub> [<math>\text{W/cm}^2</math>]</b>	2,433	0,2
<b>Temps d'exposition [s]</b>	5	30
<b>Accumulations</b>	1	1

Le but de ce test est de montrer que l'ajout de l'exposition de la source de photoblanchiment DEL permet l'amélioration du signal Raman. Il est important de noter qu'à ce stade-ci aucune optimisation du système n'a été réalisée. Or, celles-ci sont présentées dans les sections suivantes.

### 3.2.2 Choix de la longueur d'onde de photoblanchiment

La longueur d'onde de photoblanchiment optimale pour des échantillons biologiques est déterminée par une série de tests sur des échantillons de poudre de collagène pure à différentes longueurs d'onde.

L'avantage principal de cet échantillon est qu'il est sec en plus d'être un ensemble de protéines et d'acides aminés fréquents des échantillons biologiques. Ainsi, le problème de déshydratation de l'échantillon biologique, illustré à la Figure 3.4, causé soit par la chaleur du faisceau lumineux, soit par simple déshydratation à l'air ambiant, est considéré comme négligeable. Le point focal pour les sources Raman et de photoblanchiment DEL reste donc à la même hauteur tout le long de la mesure et de l'expérience. Ceci est difficile à maintenir constant avec un échantillon hydraté comme un morceau de viande, puisque cette expérience nécessite de travailler avec des densités de puissance supérieures au MPE de la peau.

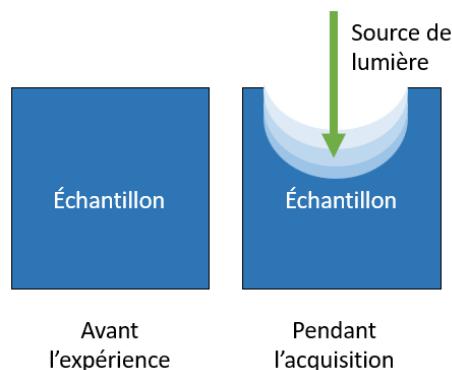


Figure 3.4. Illustration du changement de hauteur du point focal lors de l'acquisition causé par la déshydratation de l'échantillon.

Sur le même système que le test de faisabilité avec les graines de sésame, voir Figure 3.2, le collagène est exposé séparément aux longueurs d'onde de la source DEL *Lumencor* énoncées au Tableau 3.3. Cette source procure le choix de 6 différentes longueurs d'onde pouvant aller au-dessus du MPE<sub>peau</sub> de la source avec en plus la possibilité de les combiner.

Tableau 3.3. L'ensemble des longueurs d'onde disponibles de la source DEL *Lumencor*.

Couleur	Longueur d'onde [nm]
Rouge	630 ± 16
Vert	559 ± 27
Turquoise	514 ± 27
Cyan	476 ± 22
Bleu	439 ± 19
Violet	400 ± 13

Le premier test du choix de longueur d'onde se déroule exactement de la même façon qu'avec les graines de sésame, mais pour chacune des expériences la longueur d'onde de photoblanchiment de la source *Lumencor* change pour la prochaine. Au total, 7 expériences ont été effectuées en comptant le test de contrôle où seul le laser Raman du *Renishaw* expose l'échantillon de collagène. La puissance fixée pour chacune des DELs du *Lumencor* est déterminée par la DEL ayant la plus faible puissance, soit 50mW. Ainsi, la puissance de la source de photoblanchiment reste constante comme le reste des paramètres expérimentaux présenté au Tableau 3.4, laissant seulement la longueur d'onde varier.

Tableau 3.4. Les paramètres expérimentaux du test du choix de la longueur d'onde avec chacune des DELs individuelles du *Lumencor*.

Paramètres expérimentaux	Laser Raman <i>Renishaw</i>	<i>Lumencor</i>
Longueur d'onde [nm]	785 ± < 1	Tableau 3.3
MPE <sub>peau</sub> [W/cm <sup>2</sup> ]	2,433	0,2
Densité de puissance [W/cm <sup>2</sup> ]	1,27 x 10 <sup>4</sup>	0,707
Temps d'exposition [s]	5	30
Accumulations	1	1

Les résultats de ce test, présentés au chapitre suivant, dirigent l'étude vers une expérience avec l'ensemble des DELs du *Lumencor* allumées en même temps, produisant ainsi une source blanche. Il est alors possible de tester l'effet du photoblanchiment avec une plus grande densité de puissance, jusqu'à environ 6 fois supérieures à celle d'une DEL unique du *Lumencor*,  $6.281 \text{ W/cm}^2$  au lieu de  $0,707 \text{ W/cm}^2$ . Cependant, même avec cette densité de puissance, les résultats avec le collagène ne semblent pas concluants. De plus, un problème technique est survenu et cette source n'est plus stable en termes de puissance dans le temps à l'échelle d'une semaine. Toutes ces raisons amènent le projet à la source de photoblanchiment finale du montage, la source DEL blanche de la compagnie *lightsource.tech* et de modèle *LS-WL1*. Son spectre d'émission couvre le visible de 420 nm à 650 nm sans la possibilité d'isoler des couleurs et avec une densité de puissance de  $31.194 \text{ W/cm}^2$  avec un  $\text{MPE}_{\text{peau}} = 0.2 \text{ W/cm}^2$ . De plus, comme des optiques doivent être ajoutées à la partie photoblanchiment du montage pour réduire les pertes d'intensité de la source DEL, il faut changer de système faute de manque d'espace dans la cuve du microscope *InVia Renishaw*. Les prochaines expériences sont réalisées dans le système final illustré à la Figure 3.1. Ce système est entre autres régulièrement utilisé pour des expériences sur les biofluides par d'autres membres du LUMED LAB.

Par ailleurs, en attendant la livraison de la source blanche DEL, un test est fait sur de la poudre de collagène sur le système de la Figure 3.1 en utilisant le laser Raman IPS à puissance maximale comme source de photoblanchiment. Ce test vise à vérifier si le laser Raman à lui seul serait suffisant pour améliorer le signal Raman du spectre de poudre de collagène pur.

Tableau 3.5. Les paramètres expérimentaux du test du laser Raman IPS à puissance maximale comme source de photoblanchiment.

Paramètres expérimentaux	Laser IPS
<b>Longueur d'onde [nm]</b>	$785 \pm < 1$
<b>Densité de puissance [<math>\text{W/cm}^2</math>]</b>	188,821
<b>MPE<sub>peau</sub> [<math>\text{W/cm}^2</math>]</b>	2,736
<b>Temps d'exposition [s]</b>	0,05
<b>Accumulations</b>	10

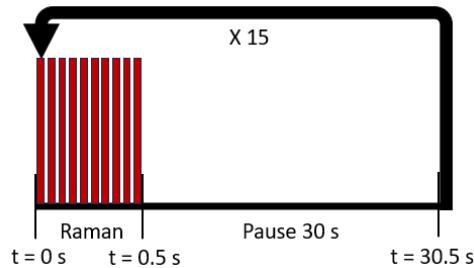


Figure 3.5. Déroulement du protocole du test de photoblanchiment à l'aide du laser IPS à puissance maximale sur du collagène en poudre.

À puissance maximale, cette source a une densité de puissance 6 fois supérieure à celle du *Lumencor* à puissance maximale. L'expérience consiste en une acquisition Raman suivie d'une pause de 30s, le tout recommandé 15 fois, tel qu'illustré à la Figure 3.5. Ainsi, le contrôle de l'expérience est la première acquisition Raman.

### 3.3 Choix du temps de photoblanchiment pour la salive humaine

Dans cette section, des tests sur un modèle de salive humaine permettent de déterminer quel temps de photoblanchiment est optimal pour la vraie salive humaine.

L'intérêt principal d'effectuer cette expérience sur un modèle et non sur de vrais échantillons de salive est le contrôle sur la concentration de diffuseurs de la solution du modèle et le niveau de fluorescence de l'échantillon. En effet, ces deux quantités peuvent grandement varier d'un individu à l'autre et même pour un même individu à différents moments de la journée. Ceci est dû à une panoplie de facteurs confondants (maladies, habitudes alimentaires, hygiéniques et de vie, etc.)

Les échantillons du modèle de salive proviennent de la biobanque de l'étude du LUMEDLAB sur le virus COVID-19. Il s'agit d'une solution principalement composée de mucine sous-maxillaire bovine (le reste de la recette se trouve dans le tableau S2 du matériel supplémentaire de l'article [6]). Ces échantillons étaient entreposés dans un congélateur à  $-80^{\circ}\text{C}$  au Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM). Une fois sorties, les fioles sont réservées à l'air ambiant pendant une trentaine de minutes pour les décongeler. Puis, des gouttes de  $10\text{ }\mu\text{L}$  sont pipettées sur la cassette de test recouverte de ruban d'aluminium. Les paramètres expérimentaux des acquisitions Raman sont détaillés au Tableau 3.6 ci-dessous.

Tableau 3.6. Les paramètres expérimentaux de l'expérience visant à déterminer le temps de photoblanchiment.

Paramètres expérimentaux	Laser IPS	<i>LS-WLI</i>
<b>Longueur d'onde [nm]</b>	$785 \pm < 1$	[420 à 650]
<b>Densité de puissance [W/cm<sup>2</sup>]</b>	63,662	31,194
<b>MPE<sub>peau</sub> [W/cm<sup>2</sup>]</b>	0,295	0,2
<b>Temps d'exposition [s]</b>	1,5	[30 à 150]
<b>Accumulations</b>	50	1

Le protocole de mesure diffère un peu des précédents pour se rapprocher du protocole final où la goutte ne refait pas le cycle de mesure. Une goutte ne subit qu'une acquisition avant et une après photoblanchiment DEL. Ainsi, chaque goutte est son propre contrôle, soit l'acquisition pré-photoblanchiment DEL. La durée de l'exposition de la source DEL est la seule variante de cette expérience. Un total de 25 tests est fait, soit 5 gouttes par temps de photoblanchiment  $T = [30\text{s}, 60\text{s}, 90\text{s}, 120\text{s}, 150\text{s}]$ . Toutes les gouttes sont sous forme liquide.

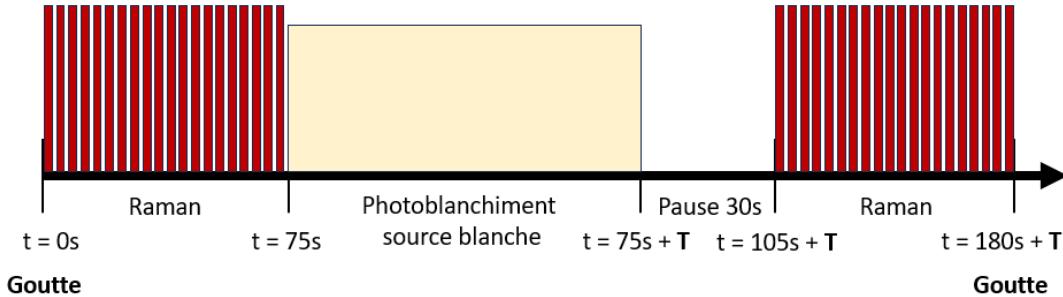


Figure 3.6. Déroulement du protocole de l'expérience visant à déterminer le temps de photoblanchiment optimal  $T$ , où  $T = [30\text{s}, 60\text{s}, 90\text{s}, 120\text{s}, 150\text{s}]$ . Ce test est fait sur des gouttes d'un modèle de salive.

### 3.4 Expérience sur de la salive humaine

Deux expériences sont réalisées, une sur des échantillons de salive séchée à l'air ambiant dans un tiroir à l'abris de la lumière la veille de l'expérience et une autre sur de la salive liquide pipettée une goutte par expérience.

### 3.4.1 Préparation des échantillons

Les échantillons de salive de patients sains ont été prélevés en novembre 2020 dans le cadre du projet COVID-19 du LUMEDLAB. Tous ces échantillons ont été préalablement centrifugés et filtrés avant d'être congelés à -80°C au CRCHUM. Les cinq retenus pour les expériences sur de la salive liquide ont la particularité d'être beaucoup plus fluorescents que les autres de cette banque d'échantillons et donc plus intéressant pour déterminer un effet sur l'autofluorescence. Il restait seulement une fiole d'un des échantillons très fluorescents pour les expériences sur de la salive sèche, alors d'autres échantillons de la même étude ont été choisis au hasard dans la biobanque. Un échantillon correspond à un individu et l'échantillon est séparé en des gouttes de 10 µL.

### 3.4.2 Protocole expérimental

Deux expériences sont exécutées, d'abord avec des gouttes de salive sèches et ensuite avec des gouttes de salive liquide. L'intérêt de tester la méthode sur de la salive sèche est que la solution se retrouve fixée spatialement. Les diffuseurs de la solution sont alors figés spatialement et le LUMED LAB a démontré lors de son étude COVID-19 que les échantillons de biofluides séchés produisent des spectres de meilleure qualité. [6]

Tableau 3.7. Les paramètres expérimentaux des expériences sur la salive humaine liquide et sèche.

Paramètres expérimentaux	Laser IPS (Salive liquide)	Laser IPS (Salive sèche)	<i>LS-WL1</i>
<b>Longueur d'onde [nm]</b>	785 ± < 1	785 ± < 1	[420 à 650]
<b>Densité de puissance [W/cm<sup>2</sup>]</b>	63,662	63,662	31,194
<b>MPE<sub>peau</sub> [W/cm<sup>2</sup>]</b>	0,295	0,295	0,2
<b>Temps d'exposition [s]</b>	1,5	1	60
<b>Accumulations</b>	50	50	1

En commençant par l'expérience de salive sèche, les gouttes de 10 µL sont pipettées la veille de l'expérience, puis entreposées dans un tiroir à l'abri de la lumière ambiante afin de minimiser la dénaturation des échantillons. Le lendemain, la cassette d'échantillon est placée dans le système expérimental illustré à la Figure 3.1.

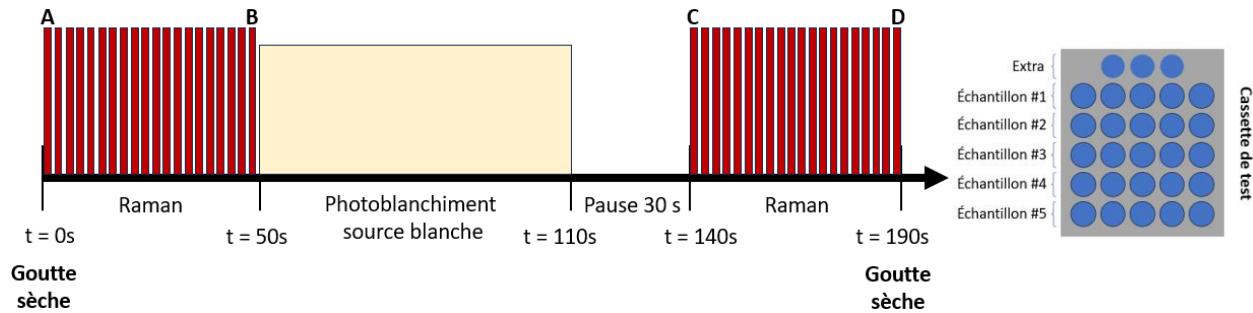


Figure 3.7. À gauche, déroulement du protocole de l’expérience de la méthode sur des échantillons de salive humaine sèche. À droite, l’agencement des gouttes des différents échantillons sur la cassette de test.

À aucun moment, la cassette ne sort du système. Elle n'est déplacée qu'avec la platine de translation motorisée du système (compagnie : *Zaber*). Les coordonnées de chacun des puits où les gouttes ont été pipettées avaient été notées au préalable. Trois gouttes en extra permettent de déterminer préalablement l'étendue dynamique de ces échantillons, c'est pourquoi le temps d'exposition au laser Raman pour les gouttes sèches et liquides diffère. Ces trois gouttes proviennent de l'échantillon de salive particulièrement fluorescent. L'expérience, telle que détaillée à la Figure 3.7, consiste à prendre une première acquisition Raman d'une goutte de salive sèche, puis elle est exposée à la source de photoblanchiment pendant une minute suivie de 30s de pause. Ensuite, une acquisition Raman est prise afin de montrer l'effet du photoblanchiment sur le signal Raman. Ce processus est répété pour chacune des gouttes de la cassette de test pour un total de 25 gouttes sèches de salive, et ce en conservant les paramètres expérimentaux du laser Raman et de la source blanche de photoblanchiment constants pour chacun des tests tels que présentés au Tableau 3.7.

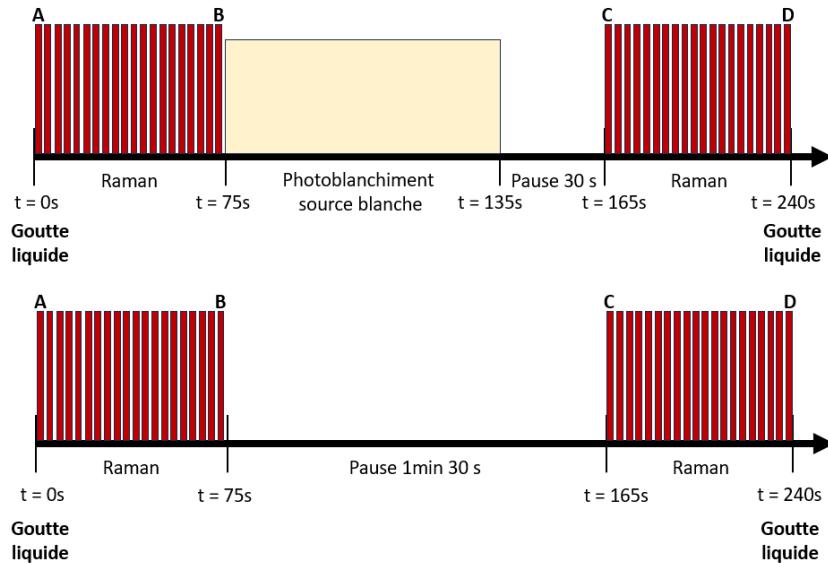


Figure 3.8. Déroulement du protocole de l’expérience de la méthode sur des échantillons de salive humaine liquide. En haut, la méthode du projet, en bas le contrôle pour vérifier l’assèchement de la goutte durant l’expérience.

L’expérience pour les gouttes liquides de salive humaine est similaire, la seule différence est que les gouttes sont pipettées au fur et à mesure qu’elles sont requises pour le test. Étant donné que des échantillons particulièrement fluorescents étaient retenus pour cette expérience et que le volume de ces fioles varie énormément entre elles, le nombre de gouttes par échantillon varie aussi. De plus, un test parallèle est fait pour vérifier si l’amélioration du signal Raman est causée par l’effet du photoblançage ou par l’assèchement de la goutte au cours de l’expérience. Ce test consiste à garder tous les paramètres expérimentaux identiques à ceux de l’expérience de photoblançage à l’exception de l’exposition de la goutte de salive à la source de photoblançage. Les deux expériences sont donc de même durée, tel qu’illustré à la Figure 3.8. Or, les volumes de salive pour chacun des échantillons sont limités. Ainsi, le nombre de gouttes par expérience pour ce test varie d’un échantillon à un autre.

### 3.5 Tests statistiques

Dans le prochain chapitre, les résultats des tests statistiques expliqués dans cette sous-section sont présentés et analysés. Comme certains échantillons ont des données distribuées non normalement, des tests statistiques non paramétriques sont choisis pour déterminer si statistiquement le photoblançage a un effet sur la qualité du signal Raman ou non et si le photoblançage

apporte un effet significatif à l'expérience par rapport à l'assèchement de la goutte de salive dans le cas d'échantillons liquides. Ici, les populations sont les valeurs du SNR et du SBR associés aux accumulations de chacune des acquisitions Raman des gouttes de salive. Les expériences sur des gouttes liquides et sèches sont traitées séparément.

### 3.5.1 Tri des données

Avant toutes analyses, les spectres bruts sont triés afin de retirer les accumulations ou même les acquisitions complètes ayant saturé les détecteurs de la caméra, les rendant inutilisables pour les analyses de données.

Dans le cas des expériences sur la salive sèche, seuls les résultats des tests sur la goutte 4 de l'échantillon 1 et la goutte 5 de l'échantillon 6 ont saturé et été retirés de l'analyse.

Dans le cas des expériences sur de la salive liquide avec photoblanchiment DEL, les spectres suivants ont saturé et été retirés de l'analyse de données :

- Échantillon # 1, gouttes # 2 à # 4 et # 9 à #11 : accumulation 0.
- Échantillon # 1, gouttes # 2 à # 4 : accumulation 1.
- Échantillon # 1, gouttes # 2 et # 3 : accumulation 2.
- Échantillon # 1, gouttes # 5 à # 7 : accumulation 0, 1, 2, 3.
- Échantillon # 1, gouttes # 6 et # 7 : accumulation 4.
- Échantillon # 1, goutte # 7 : accumulation 5.
- Échantillon # 2, gouttes #1 et # 2 : accumulations 0 à 9.
- Échantillon # 2, goutte # 3 : accumulation 0 à 2.
- Échantillon # 3, goutte # 1 : accumulation 0 à 6.
- Échantillon # 3, goutte # 2 : accumulation 0.
- Échantillon # 3, goutte # 3 : au complet.
- Échantillon # 3, goutte # 4 : accumulation 4.
- Échantillon # 4, goutte # 2 : accumulation 3.
- Échantillon # 5, goutte # 1 : au complet.
- Échantillon # 5, gouttes # 2, 3, 4, 6 et 7 : accumulation 0.
- Échantillon # 5, gouttes # 2, 3 et 7 : accumulation 1
- Échantillon # 5, goutte # 2 : accumulation 2.

Puis, les spectres retirés pour les expériences de salive liquide sans exposition photoblanchissante DEL :

- Échantillon # 1, goutte # 1 : accumulation 1.
- Échantillon # 4, goutte # 2 : accumulation 10.
- Échantillon # 5, goutte # 1 à # 4 : accumulation 0.
- Échantillon # 5, goutte # 1 : accumulation 1.
- Échantillon # 5, goutte # 2 : accumulation 2.

Il est important de noter que souvent l'accumulation de l'acquisition après photoblanchissement DEL n'a pas saturé, mais elle est retirée tout de même pour pouvoir faire une analyse statistique pairee.

### 3.5.2 Test des rangs signés de Wilcoxon pour groupes pairés

Le test des rangs signés de Wilcoxon est un test statistique non paramétrique permettant de déterminer si l'effet, l'ajout d'une exposition photoblanchissante, a un impact significatif ou non sur une population donnée. Comme tous les autres tests non paramétriques, une distribution normale de la population n'est pas requise. Dans le cas présent, la population est constituée de l'ensemble des valeurs de SNR et de SBR associées à chacune des accumulations des acquisitions pré et post-photoblanchissement DEL de chacune des gouttes de salive. Ce test est effectué sur les gouttes de salive sèches et liquides séparément.

Ce test compare les médianes de deux distributions pairees dépendantes, soit les acquisitions Raman avant photoblanchissement et après photoblanchissement. La différence absolue entre ces deux groupes est classée en ordre croissant puis sa somme est comparée à sa valeur correspondant depuis le tableau des valeurs critiques où le résultat permet de rejeter ou non l'hypothèse nulle. Comme il faut, déterminer le sens de l'hypothèse alternative, la valeur critique est classée dans le cas d'un test unilatéral (*one-tailed test*) selon une signification statistique  $\alpha$ . [42]

Dans le cas présent, l'hypothèse nulle stipule donc :

**H<sub>0</sub>** : Le photoblanchissement de l'échantillon n'a pas d'effet significatif sur la variation de la métrique de qualité étudiée du spectre Raman (du SNR ou du SBR) ou détériore la qualité du signal Raman.

$$[\text{SNR}, \text{SBR}]_{\text{avant PB}} \geq [\text{SNR}, \text{SBR}]_{\text{après PB}}$$

Et l'hypothèse alternative :

**H<sub>a</sub>** : Le photoblanchiment de l'échantillon a un impact significatif sur la variation de la métrique étudiée (du SNR ou du SBR). Cet impact permet d'améliorer le SNR ou le SBR du spectre Raman.

$$[\text{SNR}, \text{SBR}]_{\text{avant PB}} < [\text{SNR}, \text{SBR}]_{\text{après PB}}$$

### 3.5.3 Test de Kruskal-Wallis et test de Dunn

Aussi appelé le test H, le test statistique Kruskal-Wallis est seulement utilisé pour l'expérience de la salive humaine liquide. Il sert ici à déterminer s'il y a une différence entre l'effet observé qui est causé par l'exposition de la source de photoblanchiment ou à l'assèchement de la goutte de salive liquide. [43] La population est donc constituée de deux groupes indépendants, la variation des métriques pour les gouttes de salive ayant subi du photoblanchiment DEL et la variation des métriques pour les gouttes de salive du même échantillon n'ayant pas été exposées à la source de photoblanchiment pour la même période temporelle. L'hypothèse nulle stipule donc :

**H<sub>0</sub>** : Il n'y a pas de différence significative entre le test de photoblanchiment et le test sans photoblanchiment sur les métriques relatives à l'acquisition de départ.

$$[\text{SNR}_{\text{REL}}, \text{SBR}_{\text{REL}}]_{\text{sans PB}} = [\text{SNR}_{\text{REL}}, \text{SBR}_{\text{REL}}]_{\text{avec PB}}$$

Et l'hypothèse alternative :

**H<sub>a</sub>** : Il y a une différence significative entre le test de photoblanchiment et le test sans photoblanchiment sur les métriques relatives à l'acquisition de départ.

$$[\text{SNR}_{\text{REL}}, \text{SBR}_{\text{REL}}]_{\text{sans PB}} \neq [\text{SNR}_{\text{REL}}, \text{SBR}_{\text{REL}}]_{\text{avec PB}}$$

Ce test permet seulement de tester l'hypothèse nulle. Ainsi, il faut un test *post-hoc* au test Kruskal-Wallis pour déterminer comment ces groupes différents les uns aux autres. Si l'hypothèse nulle est rejetée, il faut alors faire un test de Dunn pour déterminer comment ces groupes diffèrent de façon statistiquement significative les uns par rapport aux autres. [44] Or, dans le cas présent, il n'y a que 2 groupes indépendants, ce qui rend le test de Dunn inutile. L'analyse relative effectuée précédemment permettra amplement de déterminer le sens de la variation des métriques de qualité pour ces deux groupes.

L'ensemble de ces résultats est présenté dans le chapitre suivant.

## CHAPITRE 4 RÉSULTATS ET ANALYSES

Dans cette section, les résultats des expériences issues des différentes étapes de la preuve de concept ainsi que les expériences finales sur de la salive humaine sont présentés.

### 4.1 Résultats de la preuve de concept

Les différentes expériences exposées dans cette sous-section ont mené aux choix permettant d'optimiser la méthode pour des échantillons de salive humaine.

#### 4.1.1 Validation de la technique

Ce test permet de montrer qu'effectivement l'ajout de l'exposition de la source de photoblanchiment permet l'amélioration du signal Raman. À la Figure 4.1, le SNR du contrôle stagne autour de 0,150 tandis que le test avec photoblanchiment montre, bien que légère, une constante augmentation du SNR d'une acquisition à l'autre. Il est important de noter qu'à ce stade-ci aucune optimisation du système n'a été réalisée.

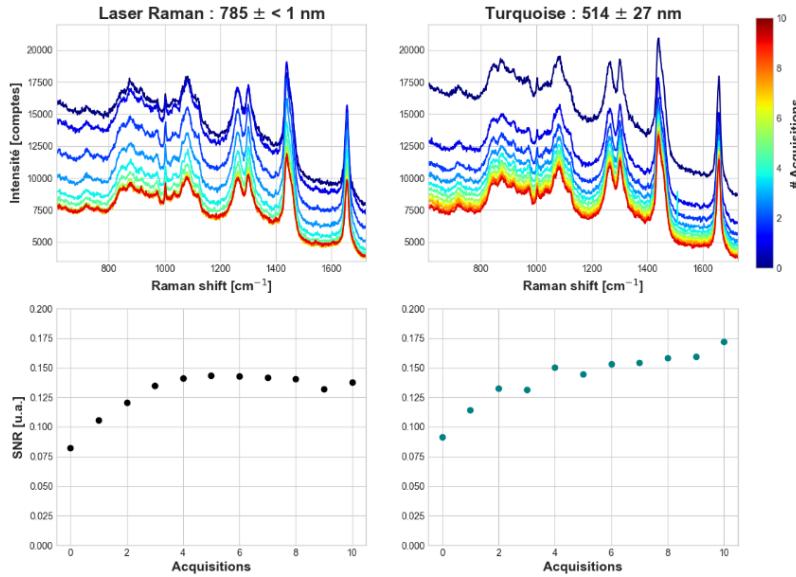


Figure 4.1. Résultats du test de validation de la méthode avec des graines de sésame. Colonne de gauche, le test contrôle où seul le laser Raman est exposé à l'échantillon. Colonne de droite, le test avec la source *Lumencor* à 514 nm. En haut, les spectres bruts des acquisitions de spectroscopie Raman, en bas, leur SNR respectifs.

Ce résultat est suffisant pour valider la faisabilité de la méthode de la combinaison du photoblanchiment à la spectroscopie Raman.

#### 4.1.2 Choix de la longueur d'onde de photoblanchiment

À la Figure 4.2, l'évolution du niveau de fluorescence, du SNR et du SBR est appréciée pour chacune des acquisitions de chacune des longueurs d'onde testées sur des échantillons de collagène. Systématiquement, la fluorescence diminue jusqu'à une stabilisation après 8 acquisitions, sauf avec la DEL violette (400nm) où le niveau de fluorescence au contraire légèrement augmente. Ceci peut s'expliquer par une dénaturation trop importante de l'échantillon. De plus, comme attendu le SNR et le SBR du spectre complet pour chacune des longueurs d'onde suivent une tendance à la hausse, encore sauf avec la DEL violette où les valeurs de ces métriques restent plus ou moins constantes tout au long de l'expérience. Remarque intéressante, les deux extrêmes des longueurs d'onde où l'échantillon n'a pas subi de regain de fluorescence, bleu (439nm) et rouge (630nm) ont des valeurs de paramètres presque superposées, et ce pour chacune des métriques présentées à la Figure 4.2.

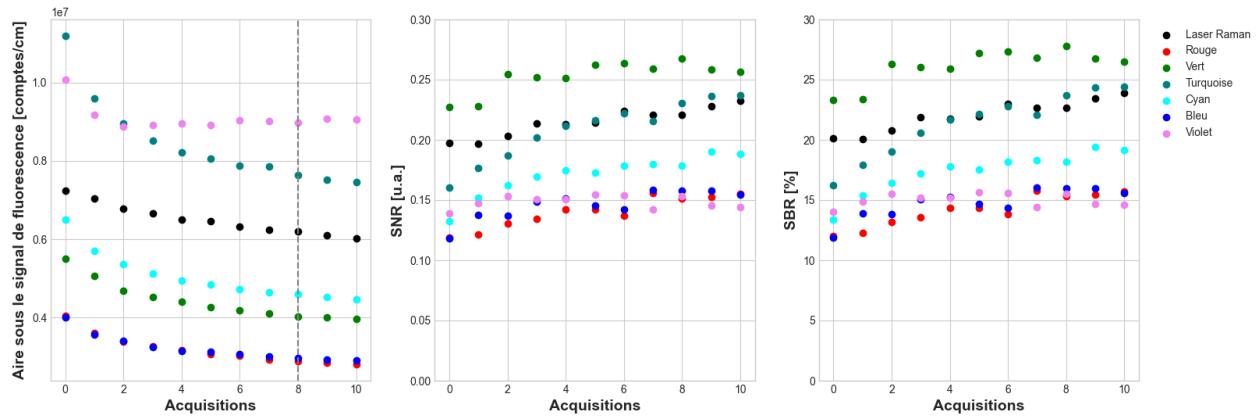


Figure 4.2. Résultats du test du choix de longueur d'onde avec les 6 DELs du *Lumencor* sur des échantillons de collagène pur.

Cependant, ce qui permet de faire un choix éclairé est de quantifier l'impact relatif à la première acquisition de l'expérience sur ces trois paramètres d'analyse selon l'équation ci-dessous :

$$(9) \quad \text{Valeur relative [%]} = \frac{\text{Dernière acquisition} - \text{Première acquisition}}{\text{Première acquisition}} \times 100$$

Ces valeurs sont présentées au Tableau 4.1 avec les valeurs relatives du contrôle mises en valeur pour mieux comparer les résultats des autres expériences. Note importante, le signe de ces valeurs permet de montrer si la première acquisition est de valeur supérieure ou non à la dernière acquisition. Ainsi, il est attendu que le niveau de fluorescence soit négatif (perte), et les SNR et SBR soit positifs (gain).

En comparant les valeurs des différentes longueurs d'onde à celles du contrôle, le turquoise (514nm) obtient les meilleures améliorations par rapport à sa valeur initiale pour chacun de ces paramètres. Cependant, en termes de suppression de fluorescence toutes ces longueurs d'onde sont significativement meilleures que le contrôle et reste dans le même ordre de grandeur, sauf pour le violet (400nm) où un regain de fluorescence est identifié. De plus, en ce qui concerne les valeurs relatives de SNR et SBR sont toutes significativement supérieure à celles respectives du contrôle, sauf encore le violet (400nm) pour la même raison énoncée plus tôt, et cette fois le vert (559nm), parce que les bandes Raman ont été affectées en intensité, voir trop photoblanchie et des liens moléculaires ont été affectés lors de l'expérience.

Tableau 4.1. Valeurs relatives du niveau de fluorescence, SBR, SNR et de l'aire sous le signal Raman des spectres complets de collagène aux différentes longueurs d'onde du *Lumencor*.

Couleur	Niveau de fluorescence	SBR	SNR	Aire sous le signal Raman
<b>Contrôle Laser Raman</b>	-16,72%	18,82%	17,88%	-1,05%
<b>Turquoise</b>	-33,41%	50,28%	47,91%	0,07%
<b>Cyan</b>	-31,36%	43,17%	41,86%	-1,73%
<b>Rouge</b>	-30,67%	31,17%	30,50%	-9,05%
<b>Bleu</b>	-27,26%	31,10%	30,44%	-4,64%
<b>Vert</b>	-28,08%	13,17%	12,81%	-18,26%
<b>Violet</b>	-10,19%	4,07%	3,98%	-6,54%

Malgré le tiers du niveau de fluorescence supprimé, les SNR et SBR augmentés d'environ 50% et un signal Raman améliorer à la longueur d'onde 514nm, il reste qu'il y a un problème au niveau de la densité de puissance. En effet, lorsqu'on s'attarde à la variation du niveau de fluorescence du spectre, toutes les longueurs d'onde oscillent autour de 30% de suppression du signal de fluorescence.

Ces résultats dirigent l'étude vers une expérience avec l'ensemble des DELs du *Lumencor* allumées afin de tester l'effet du photoblanchiment avec une plus grande densité de puissance, jusqu'à environ 6 fois supérieures à celle d'une DEL unique du *Lumencor*,  $6,281 \text{ W/cm}^2$  au lieu de  $0,707 \text{ W/cm}^2$ . Cependant, même avec cette densité de puissance, les résultats avec le collagène ne semblent pas concluants. De plus, un problème technique est survenu et cette source n'est plus stable en termes de puissance dans le temps à l'échelle d'une semaine. Toutes ces raisons amènent le projet à la source de photoblanchiment finale du montage, la source DEL blanche LS-WL1.

#### 4.1.3 Test du laser Raman comme source de photoblanchiment

Ce test démontre qu'il est possible d'utiliser un laser Raman comme source de photoblanchiment.

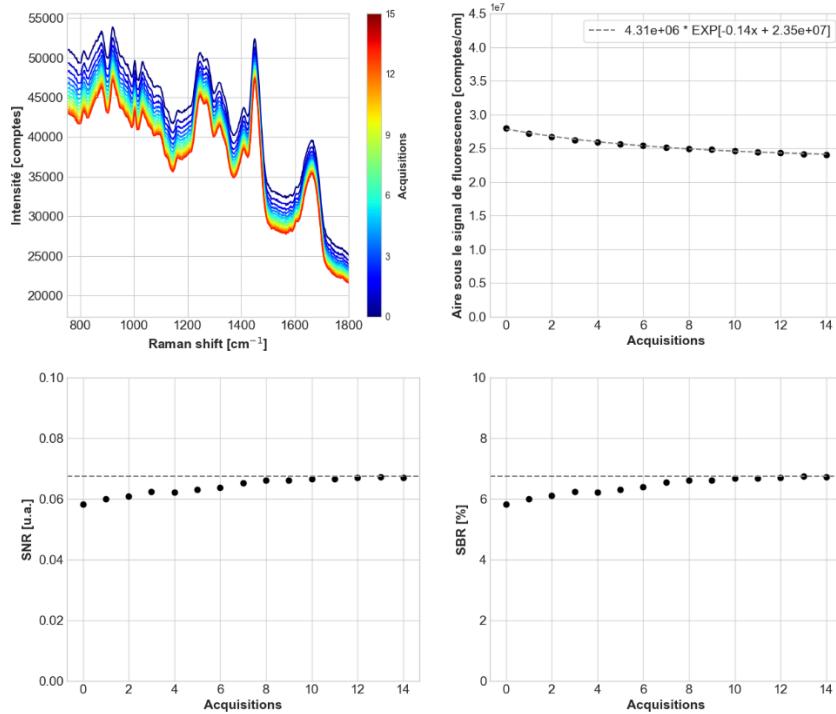


Figure 4.3. Résultats du test du laser IPS comme source de photoblanchiment sur de la poudre de collagène pur. En haut à gauche, les spectres bruts moyens de chacune des acquisitions Raman. En haut à droite, l'évolution de l'aire sous le signal de fluorescence moyen selon les acquisitions Raman. En bas à gauche, l'évolution du SNR moyen et à droite le SBR moyen selon les acquisitions Raman.

En effet, à partir de 10 acquisitions, soit environ 5min (en incluant les pauses de 30s), l'amélioration du signal semble se stabiliser à 0,0675 pour le SNR moyens et 6,75% pour le SBR

moyens des spectres Raman. Ceci représente une augmentation relative entre la première et dernière acquisition de 15,16% et 15,22% pour le SNR et SBR respectivement. De plus, par le même calcul, le niveau de fluorescence est supprimé de 14,11% par rapport à la première exposition.

Ces résultats permettent de proposer l'idée de simplement exposer l'échantillon au laser Raman sans prendre d'acquisition avant l'acquisition des spectres Raman afin d'améliorer leurs SNR et SBR.

#### 4.1.4 Choix du temps de photoblanchiment pour la salive humaine

L'aire sous le signal de fluorescence, le SBR et le SNR sont tous moyennés sur les 50 accumulations des acquisitions pré-photoblanchiment et post-photoblanchiment présentés à la Figure 4.4.

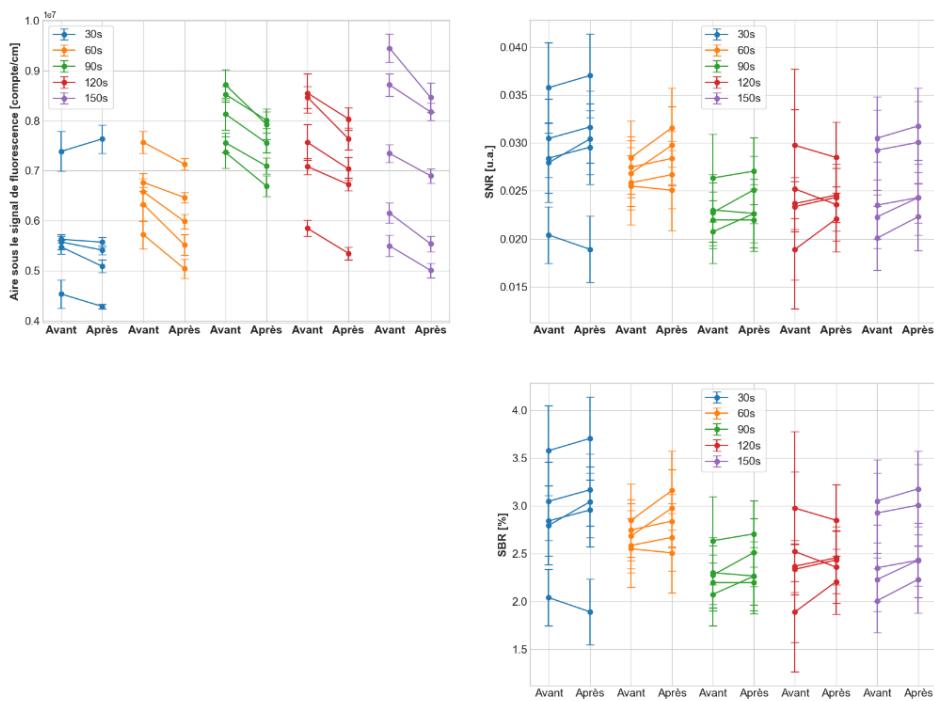


Figure 4.4. Résultats de l'expérience visant à déterminer le temps optimal de photoblanchiment pour la salive humaine. De gauche à droite, la variation moyenne du niveau de fluorescence, du SNR et du SBR (pour la bande centrée à  $1003\text{ cm}^{-1}$ ) pour chacun des temps de photoblanchiment avant et après l'exposition de la source blanche.

Les valeurs moyennes du SNR et du SBR de la bande  $1003\text{ cm}^{-1}$  augmentent dans la majorité des cas post-photoblanchiment contrairement à l'aire sous le signal de fluorescence moyenne qui diminue post-photoblanchiment tel qu'espéré. Ainsi lorsque l'importance des variations entre les valeurs pré et post-photoblanchiment est considérée, ces résultats démontrent qu'après 60 secondes de photoblanchiment par source blanche, le modèle de salive ne semble pas obtenir d'amélioration notable en termes de qualité de signal.

Cette expérience conclut qu'une minute d'exposition de l'échantillon de salive à la source de photoblanchiment DEL est suffisant pour améliorer le signal Raman. Il est maintenant possible de passer à des expériences sur de la vraie salive.

## 4.2 Salive humaine sèche

Dans cette section, les résultats de l'expérience combinant la spectroscopie Raman au photoblanchiment avec une source blanche DEL (LS-WL1) sur des échantillons de salive humaine sèche sont présentés et analysés. Tout d'abord, une analyse du niveau d'autofluorescence au cours de l'expérience est faite afin de quantifier la suppression de celle-ci. Ensuite, les différentes métriques permettant de quantifier la qualité du signal Raman sont analysées relativement aux acquisitions pré-photoblanchiment DEL pour apprécier l'impact de celui-ci. Puis, une analyse statistique est effectuée afin de quantifier le niveau de signification statistique de l'impact de l'ajout du photoblanchiment DEL sur les métriques de qualité des spectres Raman.

### 4.2.1 Analyse de l'évolution du niveau d'autofluorescence

L'analyse de l'effet du photoblanchiment sur la fluorescence est quantifiée par son aire sous la courbe. Ci-dessous, un exemple d'une goutte de salive sèche comparant les acquisitions avant et après photoblanchiment DEL. La sous-figure de droite de la Figure 4.5 permet de découpler les effets de photoblanchiment causés par le laser Raman lors de l'acquisition des spectres et ceux causés par la source DEL blanche.

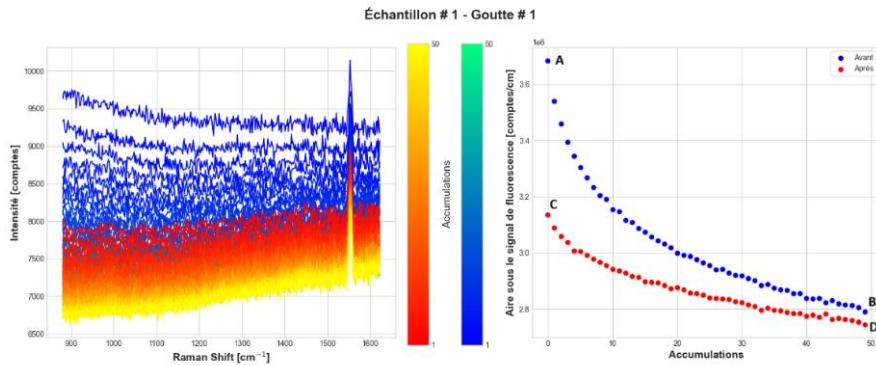


Figure 4.5. Exemple d’expérience de photoblanchiment sur une goutte de salive sèche. À gauche, les spectres bruts des accumulations des acquisitions pré (en bleu) et post-photoblanchiment (en rouge) par DEL blanche. À droite, l’aire sous la courbe du signal de fluorescence des spectres complets selon les accumulations pour les acquisitions avant et après photoblanchiment DEL.

Les lettres ABCD permettent de faire l’analyse de l’évolution du niveau de fluorescence de toutes les gouttes de tous les échantillons. La lettre A correspond à la première accumulation et B à la dernière accumulation de l’acquisition Raman pré-photoblanchiment DEL alors que C correspond à la première accumulation et D à la dernière accumulation de l’acquisition Raman post-photoblanchiment DEL. Contrairement à la Figure 4.5, quelques échantillons ont gagné en fluorescence entre la fin de l’acquisition Raman pré-photoblanchiment DEL et le début de l’acquisition post-photoblanchiment DEL blanche. Un exemple est illustré à la Figure 4.6.

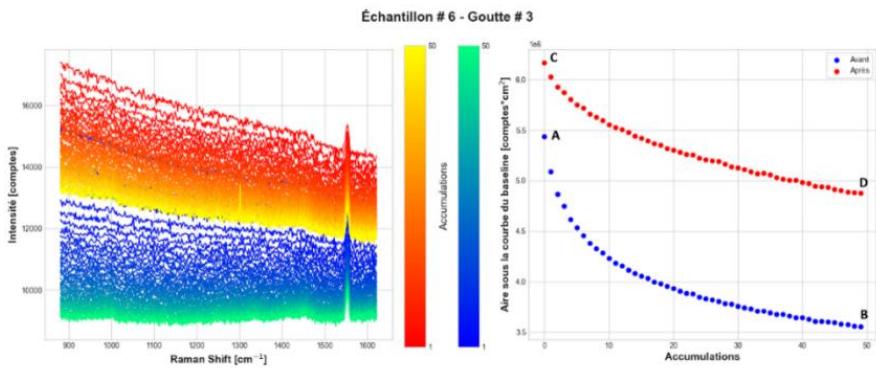


Figure 4.6. Exemple d’expérience de photoblanchiment sur une goutte de salive sèche ayant eu un regain de fluorescence entre les deux acquisitions. À gauche, les spectres bruts des accumulations des acquisitions pré (en bleu) et post-photoblanchiment (en rouge) par DEL blanche. À droite, l’aire sous la courbe du signal de fluorescence des spectres complets selon les accumulations pour les acquisitions avant et après photoblanchiment DEL.

Les niveaux de l'aire sous le signal de fluorescence à ces 4 accumulations (A, B, C, D) pour chacune des gouttes de chacun des échantillons de salive sèche communiquent des informations utiles pour analyser l'impact de la méthode. En effet, comme le montre les deux exemples de gouttes de salive sèche ci-haut, l'exposition au laser Raman lors de l'acquisition Raman pré-photoblanchiment DEL affecte systématiquement le niveau de fluorescence à la baisse. Puis, il y a un regain de fluorescence post-photoblanchiment DEL qui normalement est de plus faible intensité que la première accumulation au laser Raman pré-photoblanchiment DEL ( $C < A$ ), sauf dans le cas où ce regain dépasse significativement le niveau de fluorescence initial de l'expérience pour les gouttes de l'échantillon 6. Les gouttes des échantillons 4 et 5 ont aussi subi un regain de fluorescence, quoique moins impressionnant que pour celles de l'échantillon 6. L'exposition laser de l'acquisition post-photoblanchiment permet de contrer l'effet de ce regain de fluorescence. Cependant, dans le cas où le regain est supérieur au niveau initial, l'exposition laser Raman à elle seule ne permet pas de retrouver le niveau de fluorescence observé à la fin de l'acquisition pré-photoblanchiment DEL. En calculant les rapports entre ces niveaux de fluorescence clés, les regains et suppressions de fluorescence sont alors quantifiés au Tableau 4.2. Ces rapports permettent une analyse plus approfondie de la suppression de fluorescence.

Le rapport B/A permet de quantifier l'effet du photoblanchiment du laser Raman lors de l'acquisition avant le photoblanchiment DEL. Le rapport C/B permet de quantifier le regain de fluorescence entre la dernière accumulation de l'acquisition pré-photoblanchiment DEL et la première accumulation post-photoblanchiment DEL. Le rapport D/B quantifie l'effet du photoblanchiment DEL par rapport au photoblanchiment par laser Raman lors de l'acquisition post-photoblanchiment DEL. Puis, le rapport D/A quantifie le niveau de fluorescence restant du niveau initial, soit l'effet du photoblanchiment par laser Raman et par la source DEL blanche. Les deux dernières colonnes de ce tableau donnent le pourcentage de fluorescence supprimée par la combinaison du photoblanchiment causé par les deux sources ( $D/A - 100\%$ ) et le pourcentage de fluorescence supprimée par la première exposition Raman à elle seule ( $B/A - 100\%$ ).

Tableau 4.2. Les rapports moyennés sur l'ensemble des gouttes entre les différents niveaux de fluorescence A, B, C et D pour chacun des échantillons de salive sèche.

Échantillons #	B/A [%]	C/B [%]	D/B [%]	D/A [%]	D/A-100 [%]	B/A-100 [%]
1	71,46 ± 5,21	113,73 ± 2,38	97,73 ± 0,47	69,86 ± 5,32	-30,14 ± 5,32	-28,54 ± 5,21
2	55,54 ± 1,17	137,86 ± 3,08	99,00 ± 1,78	54,98 ± 1,58	-45,02 ± 1,58	-44,46 ± 1,17
3	52,50 ± 1,01	150,74 ± 1,60	99,35 ± 0,94	52,16 ± 1,26	-47,84 ± 1,26	-47,50 ± 1,01
4	59,93 ± 1,16	153,46 ± 1,84	101,42 ± 0,96	60,79 ± 1,39	-39,21 ± 1,39	-40,07 ± 1,16
5	59,43 ± 2,55	159,48 ± 6,87	110,68 ± 3,24	65,75 ± 2,91	-34,25 ± 2,91	-40,57 ± 2,55
6	66,14 ± 0,72	161,67 ± 7,69	127,17 ± 6,06	84,08 ± 3,33	-15,92 ± 3,33	-33,86 ± 0,72

En commençant par D/A, le niveau de fluorescence final sur l'initial, pour tous les échantillons il y a eu une diminution du niveau de fluorescence. De plus, les valeurs de pertes de fluorescence totales de l'expérience et après la première acquisition (D/A - 100% et B/A - 100%) pour les échantillons 1 à 4 sont dans le même intervalle de cohérence. En revanche dans le cas des échantillons 5 et 6, où il y a eu un regain de fluorescence important, le photoblanchiment causé par le laser Raman lors de la première acquisition a permis de supprimer significativement plus d'autofluorescence qu'avec le photoblanchiment DEL. Ceci est particulièrement apparent pour l'échantillon 6 où en moyenne le photoblanchiment par laser Raman supprime environ le double du niveau de fluorescence initial comparativement au photoblanchiment DEL combiné au laser Raman.

En s'intéressant à la transition entre le photoblanchiment Raman et DEL, le rapport C/B donne l'information sur le regain de fluorescence entre ces deux expositions. Effectivement, lorsque C/B est égal à 100 %, cela signifie que le niveau de fluorescence est inchangé entre la fin de la première acquisition et le début de la seconde. Or, dans tous les cas, en moyenne, les gouttes de salive ont toutes subi un regain de fluorescence entre les deux acquisitions Raman, puisque ce rapport est toujours supérieur à 100%. Ceci indique que ces échantillons sont particulièrement fluorescents, comme attendu. Cependant, certains regains de fluorescence post-photoblanchiment DEL sont plus

importants que d'autres dans les cas des gouttes des échantillons 4, 5 et 6, ce qui affecte l'efficacité de suppression de l'autofluorescence, tel qu'expliqué avec le rapport D/A.

En comparant les deux accumulations de fin d'acquisitions Raman avec le rapport D/B, l'efficacité du photoblanchiment DEL est testée. Lorsque D/B est inférieur à 100 %, le total des expositions a permis de supprimer davantage de fluorescence qu'avec l'exposition laser Raman à elle seule. À l'inverse, lorsque le ratio D/B est supérieur à 100 %, il y a eu un regain important de fluorescence qui a rendu l'effet du photoblanchiment par DEL inefficace. Tel est le cas pour les échantillons 4, 5, et 6. En revanche, les échantillons 1, 2 et 3 n'ont qu'une très faible différence entre les niveaux de fluorescence de B et D. En observant l'ensemble des niveaux de fluorescence des accumulations pour chacune des gouttes de salive sèche présenté à l'Annexe C, il est évident que 50 accumulations de spectres Raman est une trop grande quantité pour ce type d'expériences. Ce paramètre a été fixé selon les protocoles des expériences passées du LUMED LAB sur des échantillons de salive lors de l'étude sur le COVID-19.

Ainsi, ces résultats suggèrent que l'ajout de l'étape de photoblanchiment DEL lors d'une expérience de spectroscopie Raman sur de la salive humaine sèche n'apporte pas une grande différence à l'effet du photoblanchiment causé par le laser Raman à même l'acquisition des spectres. Le photoblanchiment causé par le laser Raman supprime autant ou presque qu'autant d'autofluorescence que la source blanche DEL dans la plupart des cas dans les conditions expérimentales présentées dans le chapitre précédent. Le photoblanchiment DEL serait peut-être plus approprié dans le contexte d'acquisitions de spectres Raman à moins de 50 accumulations avec les autres paramètres expérimentaux inchangés. Une autre idée serait d'exposer l'échantillon de goutte de salive sèche pendant la durée du nombre d'accumulations avant que le niveau de fluorescence n'atteigne un plateau de suppression et tout de suite effectuer l'acquisition Raman par la suite.

En outre, ceci justifie une analyse plus détaillée sur l'ensemble des accumulations des acquisitions Raman. Et ce en relativisant par rapport à l'acquisition pré-photoblanchiment DEL pour remplir les objectifs posés au début de cette étude sur l'impact du photoblanchiment sur la qualité des spectres Raman.

## 4.2.2 Analyse des métriques relatives des spectres Raman

Quatre métriques sont étudiées dans cette section. L'aire sous le signal Raman et l'aire sous le signal de fluorescence permettent d'évaluer l'évolution du signal d'intérêt et du signal à supprimer respectivement. Le SNR et le SBR permettent de quantifier la qualité des spectres Raman. L'analyse des différentes métriques est produite sur des valeurs relatives à l'acquisition pré-photoblanchiment DEL afin de quantifier la variation de ces métriques, et ce pour chacune des accumulations des acquisitions.

$$X_{Relatif} = \frac{X_{après} - X_{avant}}{X_{avant}} \times 100$$

Où X correspond soit à l'aire sous le signal Raman ou sous le signal de fluorescence, soit au SBR, soit au SNR du spectre Raman.

Le signe de l'axe y est donc important pour déterminer si la métrique à l'étude est supprimée ou augmentée post-photoblanchiment. Les valeurs brutes avant et après photoblanchiment DEL sont présentées à l'Annexe C. Les figures brutes des différentes métriques permettent d'apprécier les tendances des courbes avant et après photoblanchiment DEL, alors que celles présentées ici déterminent et quantifient l'effet du photoblanchiment DEL sur les métriques.

En commençant par l'aire relative sous le signal de fluorescence à la Figure 4.7, il est possible de remarquer que la variation post-photoblanchiment DEL se stabilise autour de 30 accumulations pour les échantillons n'ayant pas subi de regain de fluorescence (#1, 2 et 3). En effet, la fluorescence est supprimée pour l'ensemble des accumulations pour chacune de ces gouttes de salive sèche. Après 30 accumulations, l'effet s'atténue et stagne en s'approchant de 0%. Donc, après 30 accumulations l'ajout du photoblanchiment DEL n'est plus aussi efficace.

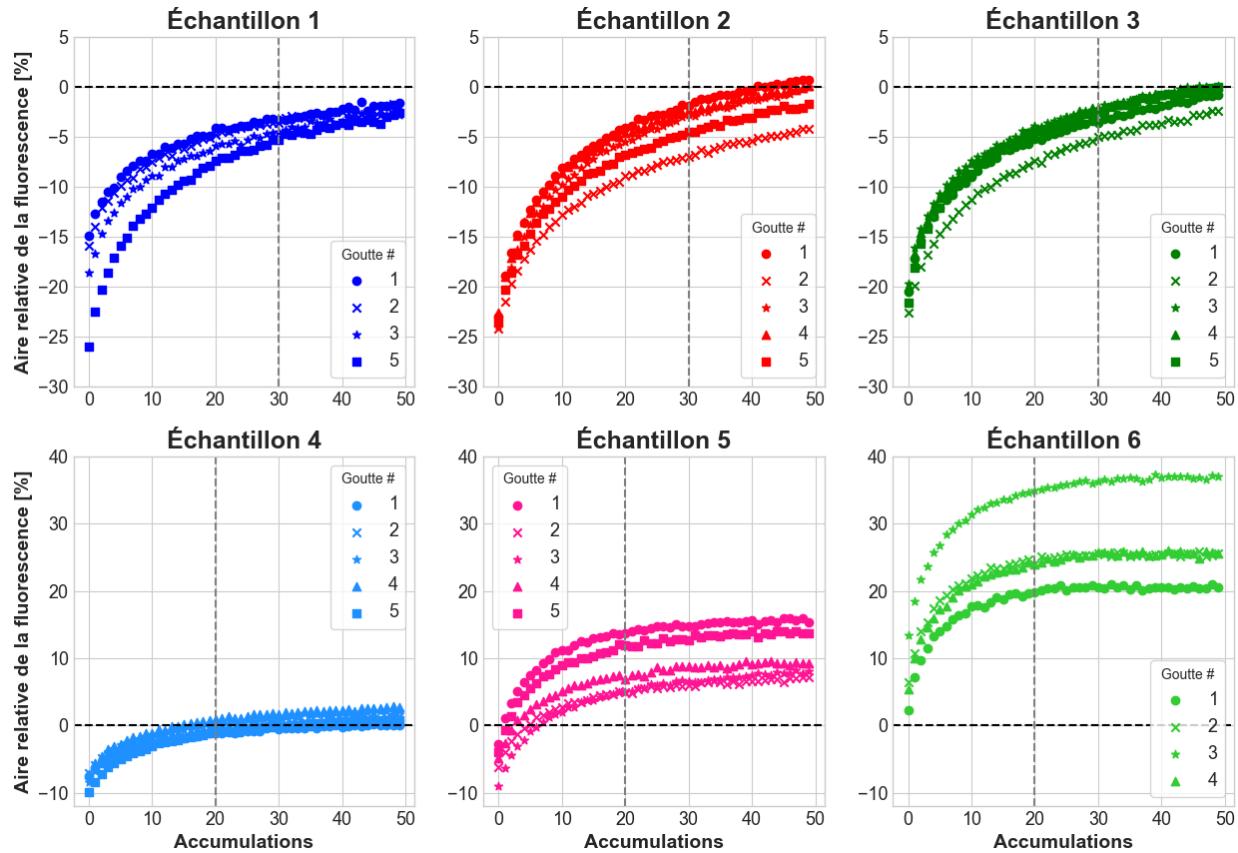


Figure 4.7. L'aire relative sous le signal total de fluorescence pour chacune des gouttes de chacun des échantillons de salive sèche en fonction de l'accumulation des acquisitions Raman.

Ceci vient répondre à la suggestion proposée à la section précédente. Une accumulation dure 1 seconde, alors il faudrait exposer la goutte de salive sèche au photoblanchiment DEL 30s avant l'acquisition Raman pour supprimer autour de 25% du signal de fluorescence en amont. En outre, lorsqu'il y a un regain de fluorescence important après l'exposition à la source DEL la variation se stabilise autour de 20 accumulations. Il est possible de supprimer l'autofluorescence pour ces échantillons (#4, 5, 6) mais seulement pour moins d'une dizaine d'accumulations et pour seulement 10% au plus de suppression d'autofluorescence.

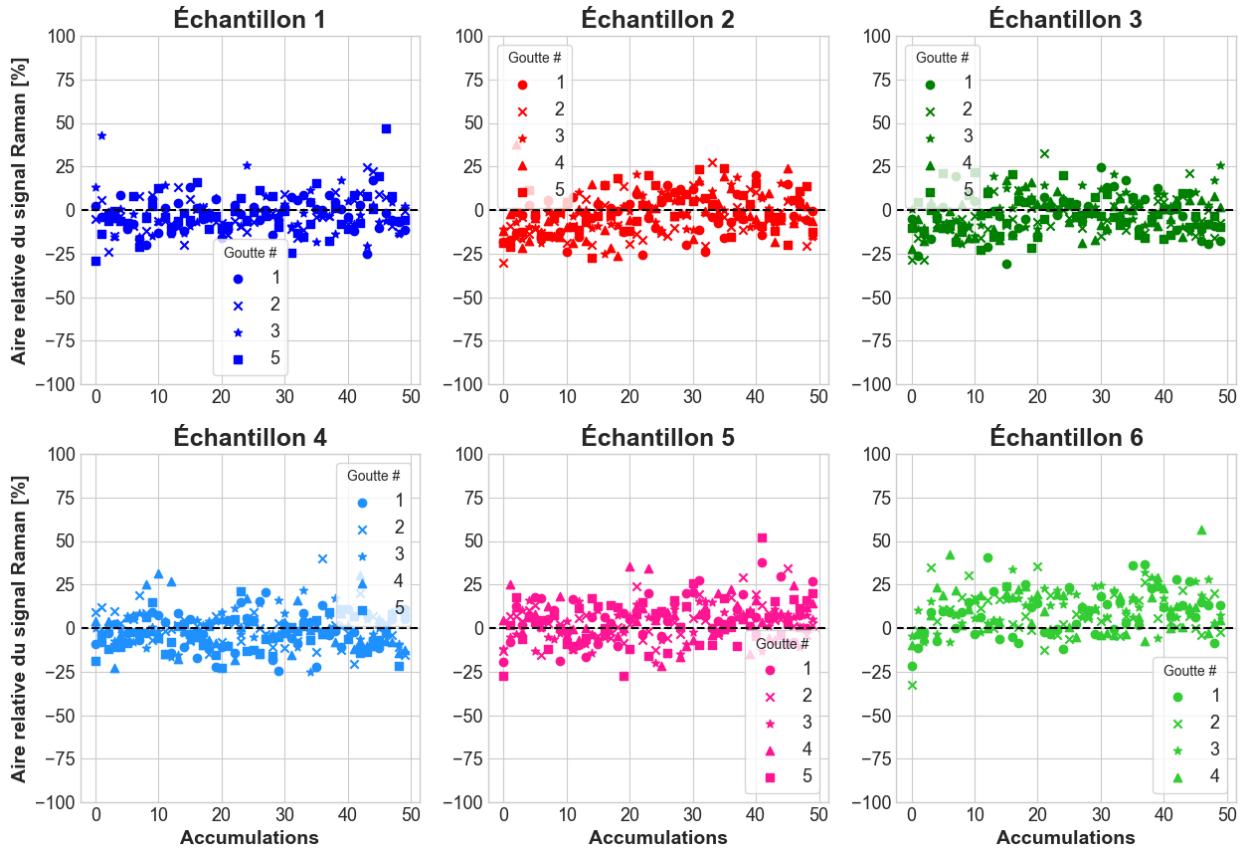


Figure 4.8. L'aire relative du signal total Raman de chacune des gouttes de salive sèche présentée pour chacun des échantillons en fonction de l'accumulation des acquisitions Raman.

Par ailleurs, l'aire relative du signal Raman présentée à la Figure 4.8, comme attendu, le niveau du signal Raman reste stable durant l'expérience. L'oscillement autour de 0% est potentiellement le résultat du bruit de grenailles intrinsèque à la détection de photons. Or, les aires sous le signal Raman des échantillons ayant subi un regain de fluorescence n'ont pas été affectées par ce phénomène. En effet, comme les échantillons 1, 2 et 3 les échantillons 4, 5 et 6 maintiennent une aire relative stable sous le signal Raman des spectres d'accumulations.

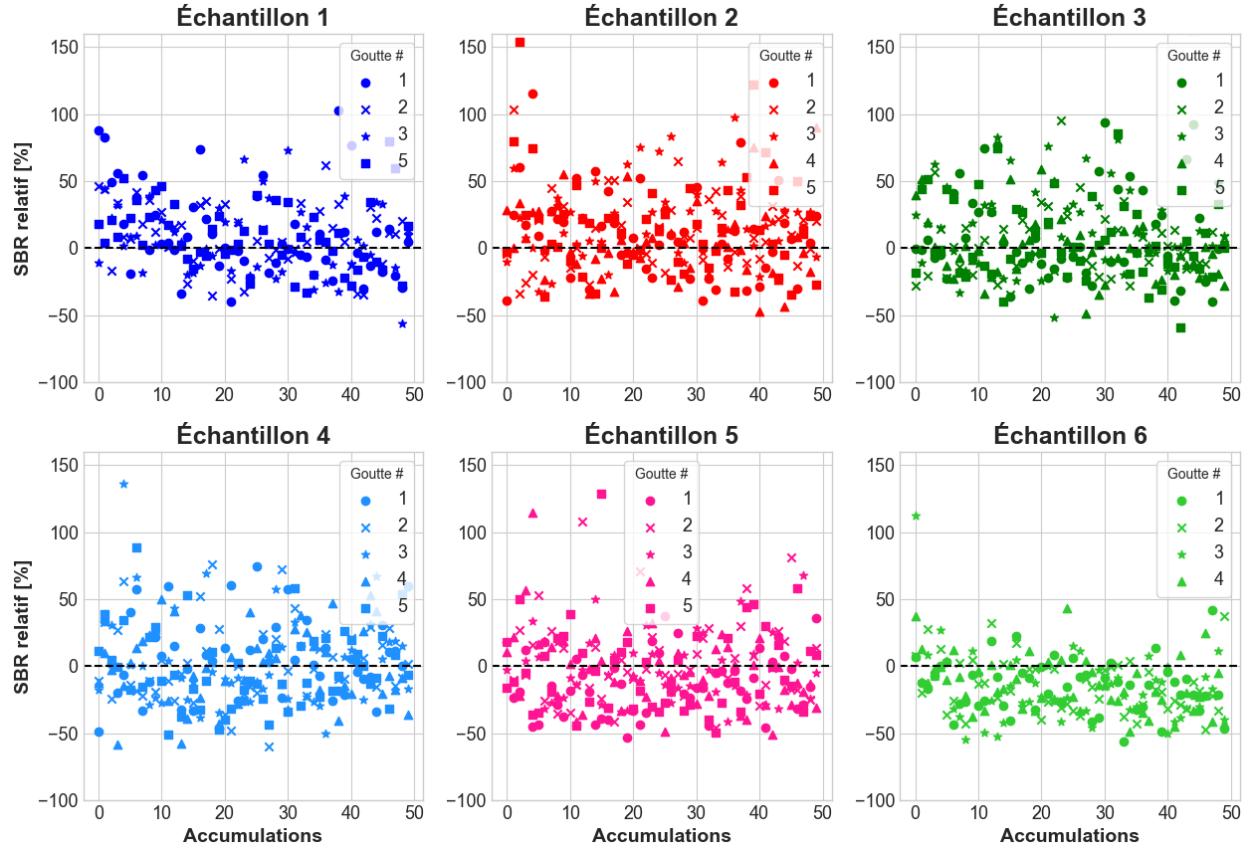


Figure 4.9. Les SBR relatifs de chacune des gouttes de salive sèche présentées pour chacun des échantillons en fonction de l'accumulation des acquisitions Raman à la bande  $1003\text{ cm}^{-1}$ .

En s'intéressant maintenant aux valeurs de SBR relatifs présentées à la Figure 4.9, le caractère relativement aléatoire des distributions des points est un artefact du bruit de grenailles expliqué plus haut. En s'intéressant plutôt au signe de la variation relative du SBR en fonction des accumulations, les échantillons 1, 2 et 3 ont une distribution majoritairement positive marquant une amélioration du signal sur la bande  $1003\text{ cm}^{-1}$ . L'échantillon 4 semble également distribué négativement et positivement, tandis que les échantillons 5 et 6 tendent vers une distribution négative suggérant une dépréciation du signal Raman à la bande  $1003\text{ cm}^{-1}$ . Ceci reflète bien l'analyse effectuée précédemment. Le Tableau 4.3 permet de quantifier ces améliorations.

Tableau 4.3. Les rapports moyennés sur l'ensemble des gouttes entre les valeurs de SBR de la bande  $1003\text{ cm}^{-1}$  associées aux accumulations A, B, C et D pour chacun des échantillons de salive sèche (#).

#	B/A	C/B	D/B	D/A	D/A -100	B/A -100
	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]
1	$136,09 \pm 26,52$	$98,57 \pm 12,99$	$111,31 \pm 4,51$	$150,55 \pm 24,39$	$50,55 \pm 24,39$	$36,09 \pm 26,52$
2	$116,27 \pm 34,37$	$89,83 \pm 41,02$	$120,08 \pm 39,63$	$127,56 \pm 13,14$	$27,56 \pm 13,14$	$16,27 \pm 34,37$
3	$132,86 \pm 23,08$	$77,30 \pm 10,72$	$98,22 \pm 13,60$	$129,86 \pm 28,43$	$29,86 \pm 28,43$	$32,86 \pm 23,08$
4	$119,64 \pm 30,63$	$71,63 \pm 5,20$	$100,38 \pm 32,25$	$111,90 \pm 20,89$	$11,90 \pm 20,89$	$19,64 \pm 30,63$
5	$150,10 \pm 23,68$	$71,79 \pm 13,59$	$104,38 \pm 22,25$	$154,66 \pm 37,16$	$54,66 \pm 37,16$	$50,10 \pm 23,68$
6	$243,22 \pm 62,33$	$58,69 \pm 10,23$	$77,05 \pm 34,68$	$169,93 \pm 34,68$	$69,93 \pm 34,68$	$143,22 \pm 62,33$

Dans tous les cas, qu'il y ait eu un regain de fluorescence ou non, le SBR de l'accumulation finale de l'expérience est toujours supérieur à celui de la première accumulation en moyenne ( $\text{D/A} > 100\%$ ). Il est donc intéressant de noter que le SBR augmente après les expositions de photoblanchiment DEL et du laser Raman. De surcroît, l'impact du photoblanchiment du laser Raman sur l'amélioration du SBR est évidemment dans tous les cas aussi,  $A < B$  et  $C < D$ . Les échantillons de salive n'ayant pas subi de regain de fluorescence voient leur SBR de la bande  $1003\text{ cm}^{-1}$  augmenter entre environ 25% et 50% entre le début et la fin de l'expérience ( $\text{D/A} - 100\%$ ). Il est très important de noter que bien que 50% semble être une augmentation importante, l'ordre de grandeur du SBR des spectres Raman oscille autour de 2%. Cela dit en comparant les deux dernières colonnes du Tableau 4.3, les échantillons 1 et 2 n'ayant pas subi de regain de fluorescence ont obtenu une légère amélioration de leur SBR de la bande Raman à  $1003\text{ cm}^{-1}$  grâce au photoblanchiment DEL par rapport à celui causé par le laser Raman lors de la première acquisition Raman. Or, les échantillons avec regain de fluorescence, il arrive même que le photoblanchiment Raman génère une meilleure amélioration du SBR qu'avec le photoblanchiment DEL tel qu'observé à l'aide des valeurs des échantillons 5 et 6 du Tableau 4.3.

Ceci vient corroborer qualitativement l'hypothèse que le photoblanchiment a un impact sur la qualité du signal diffusion Raman. Cependant, le photoblanchiment causé par le laser Raman est plus efficace que celui généré par la source DEL blanche.

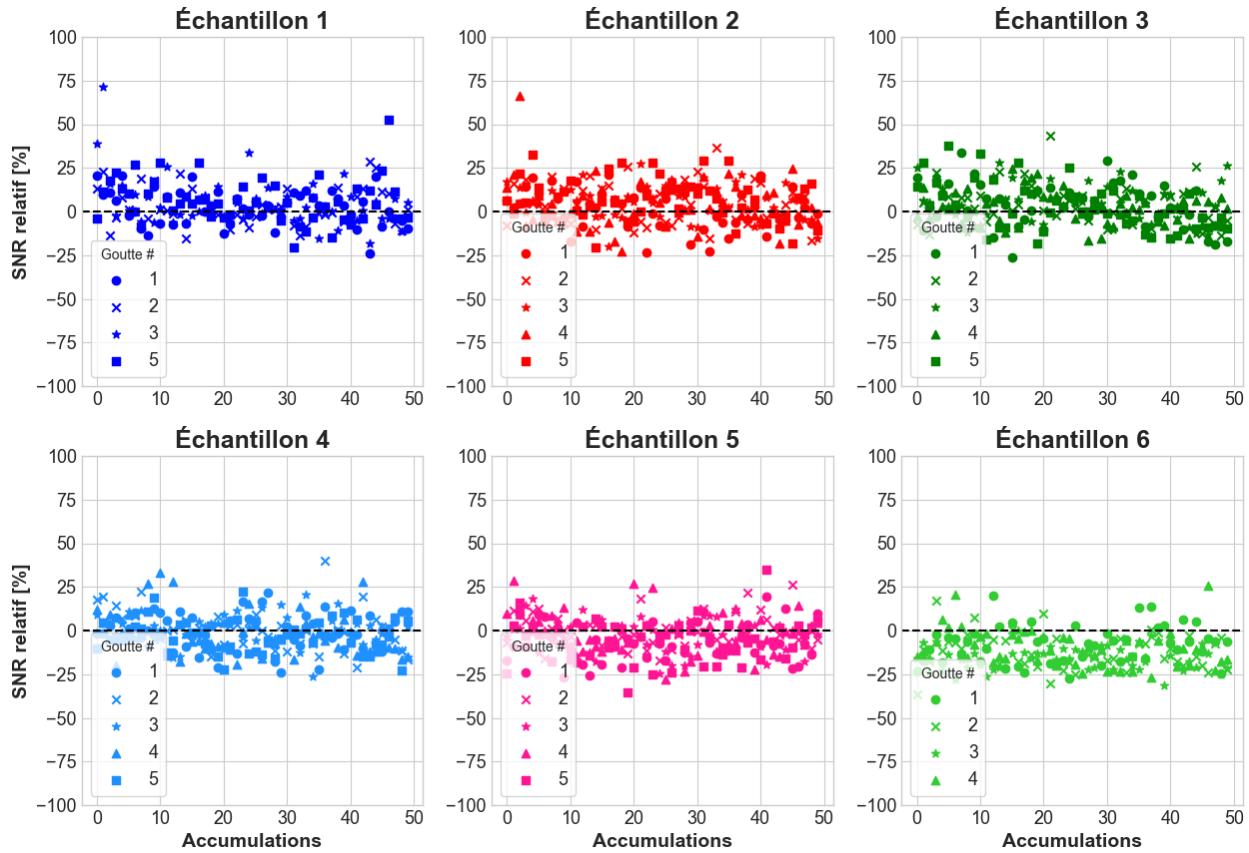


Figure 4.10. Les SNR relatifs de chacune des gouttes de salive sèche présentées pour chacun des échantillons en fonction de l'accumulation des acquisitions Raman pour tous les échantillons.

Finalement, semblablement à l'analyse du SBR, les valeurs de SNR relatifs à l'acquisition pré-photoblanchiment sont distribuées avec un certain degré de hasard attribué au bruit de grenailles intrinsèque à la détection de photons. À la Figure 4.10, les échantillons 1, 2 et 3 ont une distribution plutôt positive, tandis que les échantillons 5 et 6 ont une distribution plutôt négative et l'échantillon 4 est distribué à peu près également autour de l'axe 0%.

Au Tableau 4.4, il est possible de remarquer en comparant les deux dernières colonnes que la différence entre l'impact du photoblanchiment Raman ( $B/A - 100\%$ ) et celui du photoblanchiment Raman et DEL combiné ( $D/A - 100\%$ ) est minime en tenant compte des intervalles de cohérence des valeurs moyennes. De ce fait, une amélioration d'environ 25% entre le début et la fin de l'expérience peut être principalement attribué à l'exposition au laser Raman.

Tableau 4.4. Les rapports moyennés sur l'ensemble des gouttes entre les valeurs de SNR des spectres Raman associées aux accumulations A, B, C et D pour chacun des échantillons de salive sèche (#).

#	B/A [%]	C/B [%]	D/B [%]	D/A [%]	100 - D/A [%]	100 - B/A [%]
1	127,05 ± 14,66	93,23 ± 15,10	98,41 ± 5,59	124,46 ± 10,71	24,46 ± 10,71	27,05 ± 14,66
2	139,60 ± 4,32	76,71 ± 6,34	91,20 ± 4,72	127,39 ± 8,76	27,39 ± 8,76	39,60 ± 4,32
3	129,25 ± 16,80	85,53 ± 8,55	99,25 ± 14,84	127,64 ± 22,71	27,64 ± 22,71	29,25 ± 16,80
4	135,58 ± 11,08	77,91 ± 5,61	97,59 ± 11,04	131,46 ± 11,26	31,46 ± 11,26	35,58 ± 11,08
5	119,24 ± 11,91	77,00 ± 8,32	102,48 ± 5,49	122,00 ± 11,49	22,00 ± 11,49	19,24 ± 11,91
6	105,82 ± 10,03	73,17 ± 3,05	83,36 ± 6,40	88,30 ± 11,17	-11,70 ± 11,17	5,82 ± 10,03

En outre, il est intéressant de faire la comparaison entre les résultats des gouttes sèches avec la meilleure et la pire qualité de signal. Ceci est illustré à la Figure 4.11, où les spectres Raman des acquisitions pré et post-photoblanchiment des gouttes de salive sèche ayant la meilleure (goutte #1, échantillon 1) et la pire (goutte #2, échantillon 4) qualité de signal sont comparés. En effet, en appréciant les spectres Raman moyennés et normalisés il est évidemment que le spectre de droite est beaucoup plus bruité que celui de gauche. La goutte ayant la meilleure qualité de signal maintient un SBR quatre fois supérieur sur l'ensemble des accumulations par rapport à la goutte ayant la pire qualité de signal. De plus, le SNR de meilleure qualité représente presque le double de celui de moindre qualité.

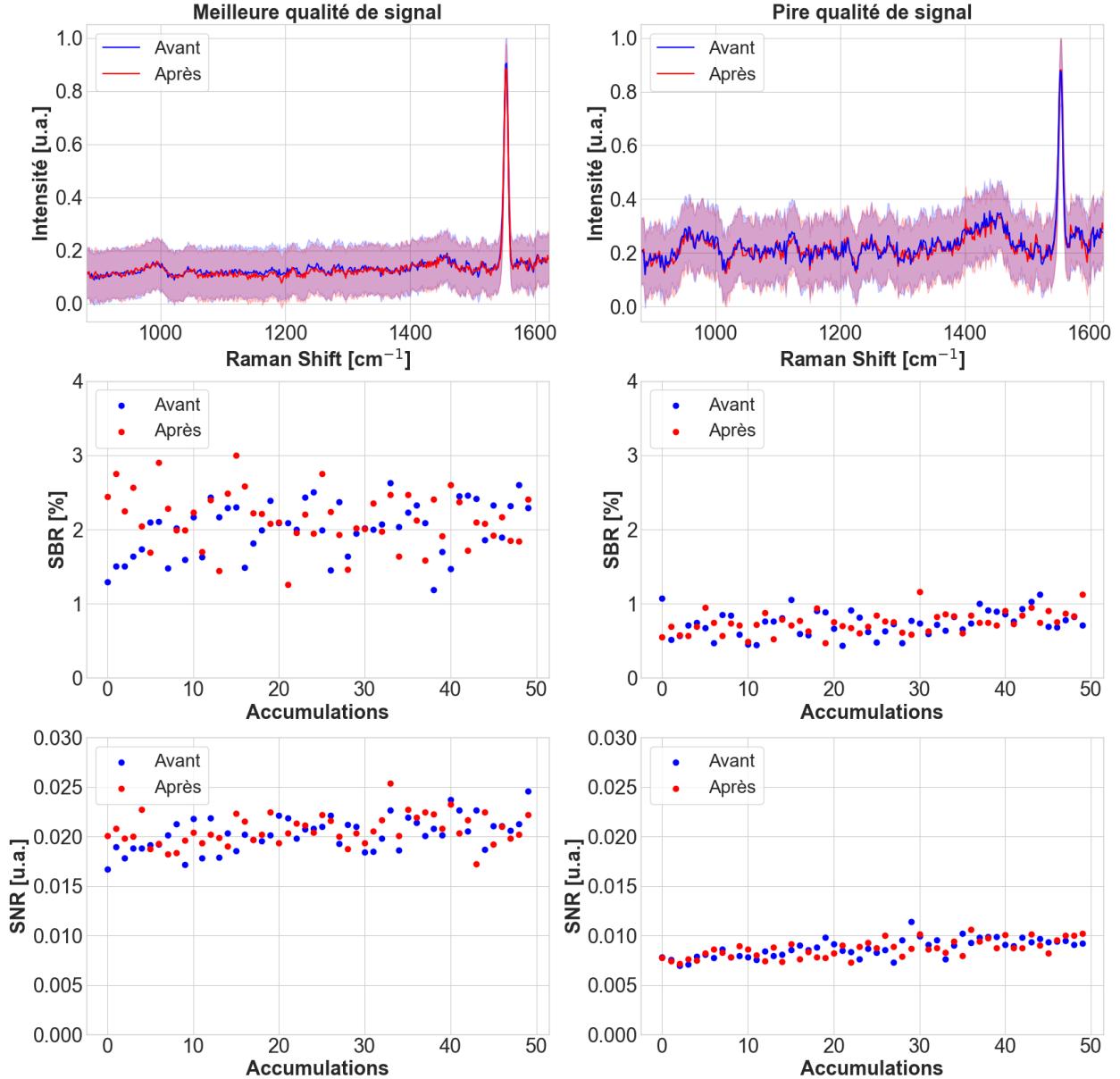


Figure 4.11. Comparaison des spectres Raman moyennés et normalisés ayant les meilleures (à droite) et les pires (à gauche) SNR et SBR résultant de l’expérience combinant le photoblanchiment à la spectroscopie Raman. À droite, la goutte #1 de l’échantillon 1 de salive sèche. À gauche, la goutte # 2 de l’échantillon 4 de salive sèche.

En appréciant les tendances des courbes de leurs SBR et SNR respectifs, seule la goutte de du meilleure spectre connaît une amélioration significative. Entre les valeurs initiales et finales le SBR de la bande Raman obtient un gain d’environ 1% et environ 0,005 de plus pour le SNR du spectre Raman, ce qui représente une amélioration de 85% pour le SBR et de 33% pour le SNR. En effet,

dans le cas de la goutte ayant la pire qualité de signal, elle n'obtient qu'un gain de SBR de la bande  $1003\text{ cm}^{-1}$  de 0,15%, ce qui représente une amélioration de 19% par rapport à sa valeur initiale et un gain de SNR de 0,001, ce qui représente une amélioration de 24% par rapport à sa valeur au début de l'expérience.

### 4.2.3 Analyse statistique

Cette analyse permet de quantifier statistiquement à quel point l'écart entre les valeurs pré et post-photoblanchiment DEL est important en raison de la faible quantité d'échantillons disponibles. Un test des rangs signés de Wilcoxon pour groupes pairés est fait pour chacun des échantillons en paires avant et après exposition photoblanchissante DEL.

Rappel de l'hypothèse nulle et l'alternative :

**H<sub>0</sub>** : Le photoblanchiment de l'échantillon n'a pas d'effet significatif sur la variation de la métrique de qualité étudiée du spectre Raman (du SNR ou du SBR) ou détériore la qualité du signal Raman.

$$[\text{SNR}, \text{SBR}]_{\text{avant PB}} \geq [\text{SNR}, \text{SBR}]_{\text{après PB}}$$

**H<sub>a</sub>** : Le photoblanchiment de l'échantillon a un impact significatif sur la variation de la métrique étudiée (du SNR ou du SBR). Cet impact permet d'améliorer le SNR ou le SBR du spectre Raman.

$$[\text{SNR}, \text{SBR}]_{\text{avant PB}} < [\text{SNR}, \text{SBR}]_{\text{après PB}}$$

Tableau 4.5. Résultats des tests statistiques Wilcoxon pour chacun des échantillons de salive sèche avec exposition photoblanchissante DEL pour un  $\alpha = 0,05\%$ .

Échantillons #	SBR		SNR	
	Valeurs-p	Réussi?	Valeurs-p	Réussi?
1	$6,27 \times 10^{-4}$	Oui	$1,25 \times 10^{-4}$	Oui
2	$1,48 \times 10^{-6}$	Oui	$8,26 \times 10^{-7}$	Oui
3	$5,05 \times 10^{-2}$	Non	$9,07 \times 10^{-5}$	Oui
4	$8,90 \times 10^{-1}$	Non	$9,77 \times 10^{-1}$	Non
5	$1,00 \times 10^0$	Non	$1,00 \times 10^0$	Non
6	$1,00 \times 10^0$	Non	$1,00 \times 10^0$	Non

En cohérence avec les analyses précédentes, l'écart entre les valeurs de SBR de la bande Raman à  $1003\text{ cm}^{-1}$  avant et après l'exposition photoblanchissante DEL est statistiquement significatif pour les deux premiers échantillons de salive humain sèche. Tel est de même pour l'écart entre les valeurs de SNR des spectres Raman avant et après l'exposition photoblanchissante DEL en plus du l'échantillon 3. Ainsi, l'hypothèse nulle est rejetée pour les échantillons 1 et 2 pour les deux métriques et l'hypothèse alternative est testée avec le niveau de signification statistique  $\alpha$  au Tableau 4.5. Cependant, il est impossible de rejeter l'hypothèse nulle pour les valeurs de SNR pour les échantillons 4, 5 et 6 et pour les valeurs de SBR de la bande Raman pour les échantillons 3 à 6.

### **4.3 Salive humaine liquide**

Tout comme pour les échantillons de salive humaine sèche, les échantillons de salive humaine liquide sont présentés et analysés. Les mêmes analyses sont effectuées en plus d'une comparaison entre les expériences effectuées sur des gouttes de salive d'un même échantillon avec et sans photoblanchiment DEL. Ceci permet de vérifier si les observations de ces résultats sont causées par le photoblanchiment DEL et/ou par l'assèchement de la goutte de salive exposée à des sources lumineuses puissantes au cours de l'expérience. Tout d'abord, une analyse de l'évolution du niveau d'autofluorescence des échantillons de salive liquide est présentée. Ensuite, une analyse des métriques relatives des spectres Raman permet d'apprécier l'impact du photoblanchiment DEL sur la qualité de ceux-ci. Puis, une analyse statistique est effectuée afin de montrer le niveau de signification statistique de ces résultats.

#### **4.3.1 Analyses des échantillons avec photoblanchiment DEL**

Tout d'abord, les échantillons de gouttes de salive liquide ayant suivi le même protocole expérimental que la salive sèche sont analysés de la même manière. Le groupe contrôle est donc l'acquisition pré-photoblanchiment DEL dans cette sous-section.

#### **4.3.2 Analyse de l'évolution du niveau d'autofluorescence**

Comme pour les échantillons de salive sèche, l'évolution des niveaux de fluorescence des échantillons de salive liquide suivent une tendance similaire. En effet, la première acquisition Raman permet une suppression d'autofluorescence (accumulations A à B), suivi d'un certain regain d'autofluorescence entre la fin de l'acquisition pré-photoblanchiment DEL et le début de celle post-photoblanchiment DEL (accumulations B à C).

Puis, comme pour l'acquisition pré-photoblanchiment DEL, l'exposition de l'échantillon au laser Raman lors de l'acquisition post-photoblanchiment aide aussi à la suppression du niveau de fluorescence (accumulations C à D). Le Tableau 4.6 permet de quantifier les pourcentages des niveaux de fluorescence supprimer lors des étapes de photoblanchiment DEL et d'exposition au laser Raman lors des acquisitions de spectroscopie Raman.

Tableau 4.6. Les rapports moyennés sur l'ensemble des gouttes entre les différents niveaux de fluorescence A, B, C et D pour chacun des échantillons de salive liquide avec exposition photoblanchissante DEL.

Échantillons	B/A	C/B	D/B	D/A	D/A-100	B/A-100
	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]
1	74,34 ± 8,01	120,52 ± 8,67	92,96 ± 1,28	69,04 ± 1,28	-30,96 ± 6,93	-25,66 ± 8,01
2	80,06 ± 4,56	104,45 ± 4,45	88,36 ± 0,32	70,75 ± 0,32	-29,25 ± 4,24	-19,94 ± 4,56
3	75,08 ± 9,56	126,28 ± 11,65	91,02 ± 3,57	68,35 ± 3,57	-31,65 ± 8,98	-24,92 ± 9,56
4	63,22 ± 1,18	154,44 ± 2,57	107,62 ± 3,16	68,02 ± 3,16	-31,98 ± 1,83	-36,78 ± 1,18
5	69,82 ± 5,64	126,98 ± 7,94	93,14 ± 1,58	65,05 ± 1,58	-34,95 ± 5,59	-30,18 ± 5,64

En étudiant le rapport D/B, il est possible de remarquer le niveau de fluorescence final est toujours en moyenne inférieur à 100%, ce qui indique que l'exposition photoblanchissante DEL et du laser Raman de l'acquisition post-photoblanchiment DEL permet une plus grande suppression de fluorescence que l'exposition au laser Raman pré-photoblanchiment DEL seulement, sauf pour l'échantillon 4 qui a subi un regain de fluorescence.

En s'intéressant maintenant aux deux dernières colonnes qui quantifient la suppression de fluorescence issue de l'exposition laser lors de l'acquisition pré-photoblanchiment (B/A – 100%) et l'ensemble des expositions photoblanchissante de l'expérience (D/A – 100%), l'écart entre les deux valeurs moyennes reste faible. En effet, en tenant compte des incertitudes la suppression moyenne de la fluorescence après l'ensemble des expositions (D/A – 100%) n'est qu'une amélioration d'environ 5% par rapport à la quantité de fluorescence supprimée lors de la première acquisition Raman pré-photoblanchiment DEL (B/A – 100%), qui est d'environ 25%.

En outre, il est intéressant de noter que malgré le regain de fluorescence important des échantillons 3 et 4, ceux-ci ont tout de même bénéficier une suppression de fluorescence d'environ 30% de leur niveau initial en moyenne.

### 4.3.3 Analyse des métriques relatives des spectres Raman

Comme pour l'analyse des échantillons de salive sèche, il faut s'intéresser à l'évolution des paramètres étudiés selon les accumulations des acquisitions Raman pour apprécier l'effet du photoblanchiment causé par le laser Raman et étudier la variation relative à l'acquisition pré-photoblanchiment DEL pour apprécier l'effet du photoblanchiment DEL.

En commençant par la variation du niveau de fluorescence par rapport à l'acquisition pré-photoblanchiment à la Figure 4.12, l'échantillon 3 a subi des phases de regain de fluorescence pendant les acquisitions Raman ce qui explique la tendance atypique des courbes des différentes gouttes. Les échantillons 1 et 5 quant à eux voient leur variation de l'aire sous le signal de fluorescence se stabiliser après 10 accumulations. De plus, l'expérience a permis pour ces échantillons de supprimer entre 5% et 10% du niveau de fluorescence pré-photoblanchiment DEL. Par ailleurs, l'échantillon 2 a particulièrement bien réagit à l'expérience et le niveau de fluorescence de ses gouttes de salive liquide a été réduit d'environ 15% et se stabilise après 30 accumulations. Ainsi, dans le cas des échantillons 1, 2 et 5 l'expérience a rempli sa fonction de supprimer substantiellement le signal de fluorescence du spectre Raman de leur gouttes de salive liquide. Or, tel n'est pas le cas pour les gouttes de salive liquide de l'échantillon 4 qui ont subi un regain de fluorescence entre les deux acquisitions Raman. Ceci peut s'expliquer probablement par une multitude de facteurs confondants propre aux échantillons de salive humaine. Ainsi, il faudrait une plus grande variété d'échantillon classée selon certains facteurs contrôlés pour vérifier l'impact de la variation de ces rapports et pourquoi ce phénomène de regain de fluorescence survient au cours de l'expérience.

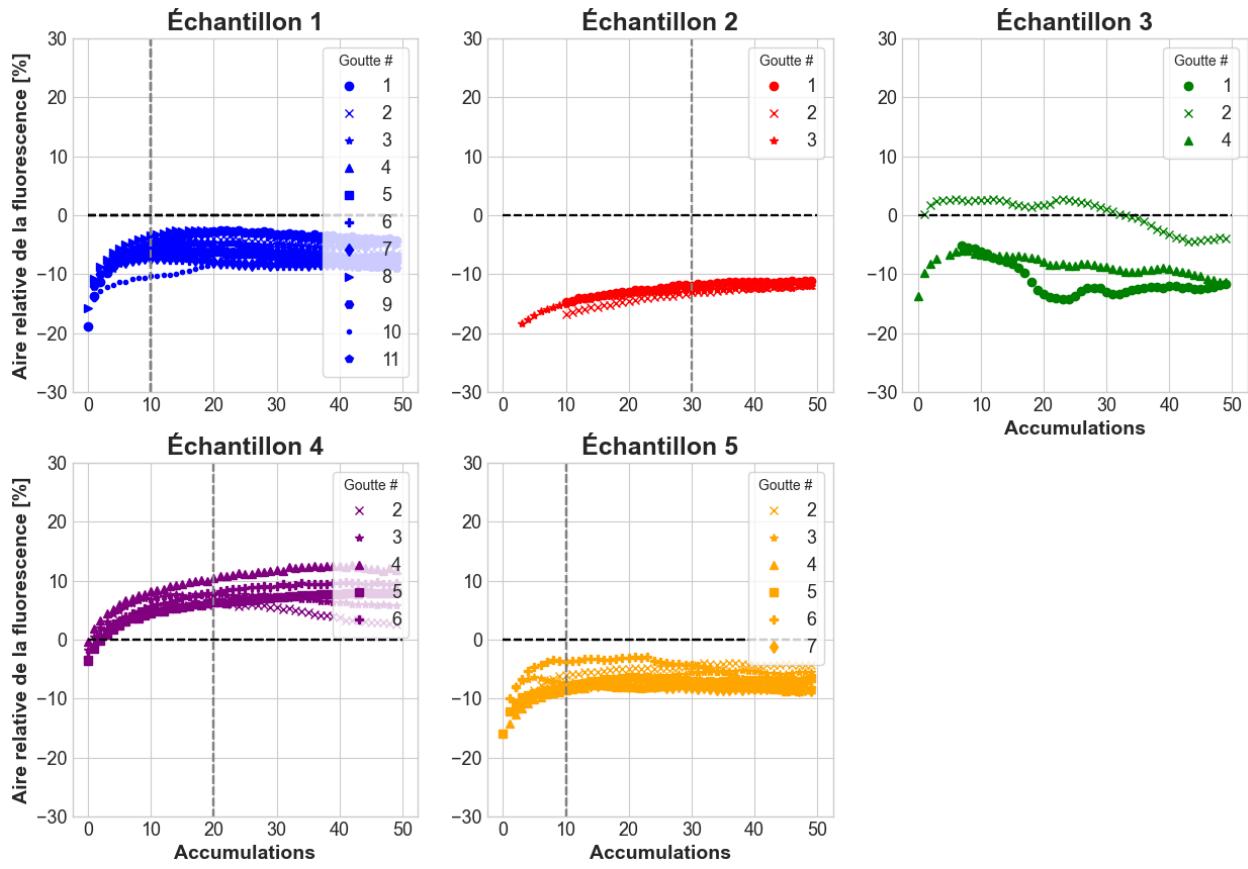


Figure 4.12. L’aire relative sous le signal total de fluorescence pour chacune des gouttes de chacun des échantillons de salive liquide avec exposition photoblanchissante DEL en fonction de l’accumulation des acquisitions Raman.

L’aire relative du signal Raman des spectres des gouttes de salive liquide présentée à la Figure 4.13 démontre que comme pour les gouttes de salive sèche, une distribution dispersée est le résultat du bruit de grenailles intrinsèque à la détection de photon. Le bruit de grenailles est d’environ 20%, soit la déviation standard du signal Raman. Ces valeurs demeurent dans l’intervalle généré par le bruit de grenailles pour l’ensemble des échantillons, indiquant une stabilité du signal Raman au cours de l’expérience et des acquisitions. Or, il est important de noter bien que les distributions des aires sous le signal Raman de chacune des gouttes est majoritairement négative, il faut prendre en compte qu’il s’agit ici de l’aire du spectre Raman au complet, incluant la bande Raman de l’eau. Il est fort probable que l’échantillon s’assèche au cours de l’expérience compte tenu des densités de puissance des sources de lumières utilisées.

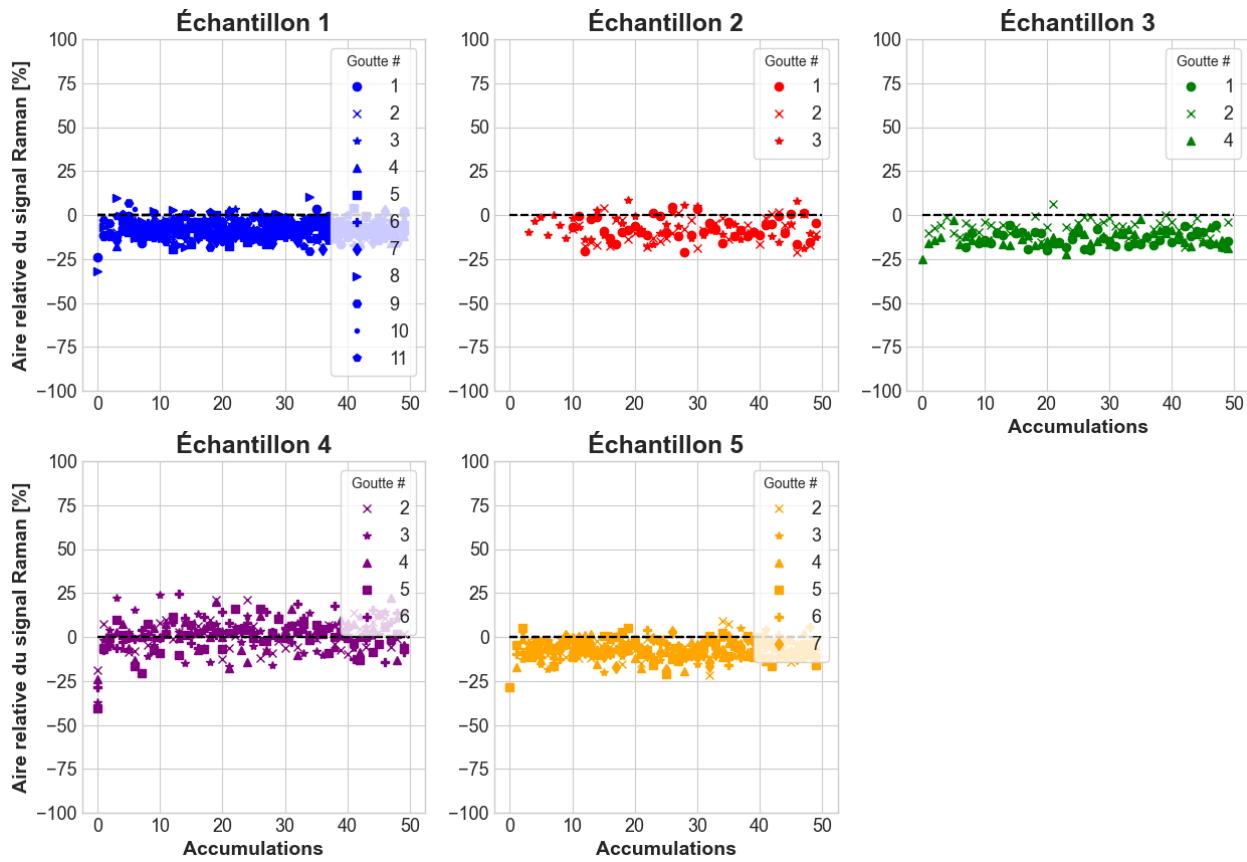


Figure 4.13. L'aire relative sous le signal Raman des spectres d'accumulation pour chacune des gouttes de chacun des échantillons de salive liquide avec exposition photoblanchissante DEL en fonction de l'accumulation des acquisitions Raman.

Ensuite, à la Figure 4.14 les SBR relatifs de la bande  $1003\text{ cm}^{-1}$  des différents échantillons exposés au photoblanchiment DEL montrent une amélioration du SBR par le signe positif de leur distribution relative. Il n'y a que l'échantillon 4 dont la distribution semble plutôt partagée et tendre vers le négatif. Il s'agit aussi d'un échantillon ayant subi un regain de fluorescence entre les deux acquisition Raman. Par ailleurs, même si l'échantillon 3 a subi des phases de regain pendant les acquisitions Raman ses valeurs de SBR ne semblent pas avoir été impactées négativement par cela. En effet, la majorité de la distribution de ses valeurs se situe dans la moitié positive marquant une amélioration du SBR de la bande  $1003\text{ cm}^{-1}$  des spectres Raman de salive liquide humaine.

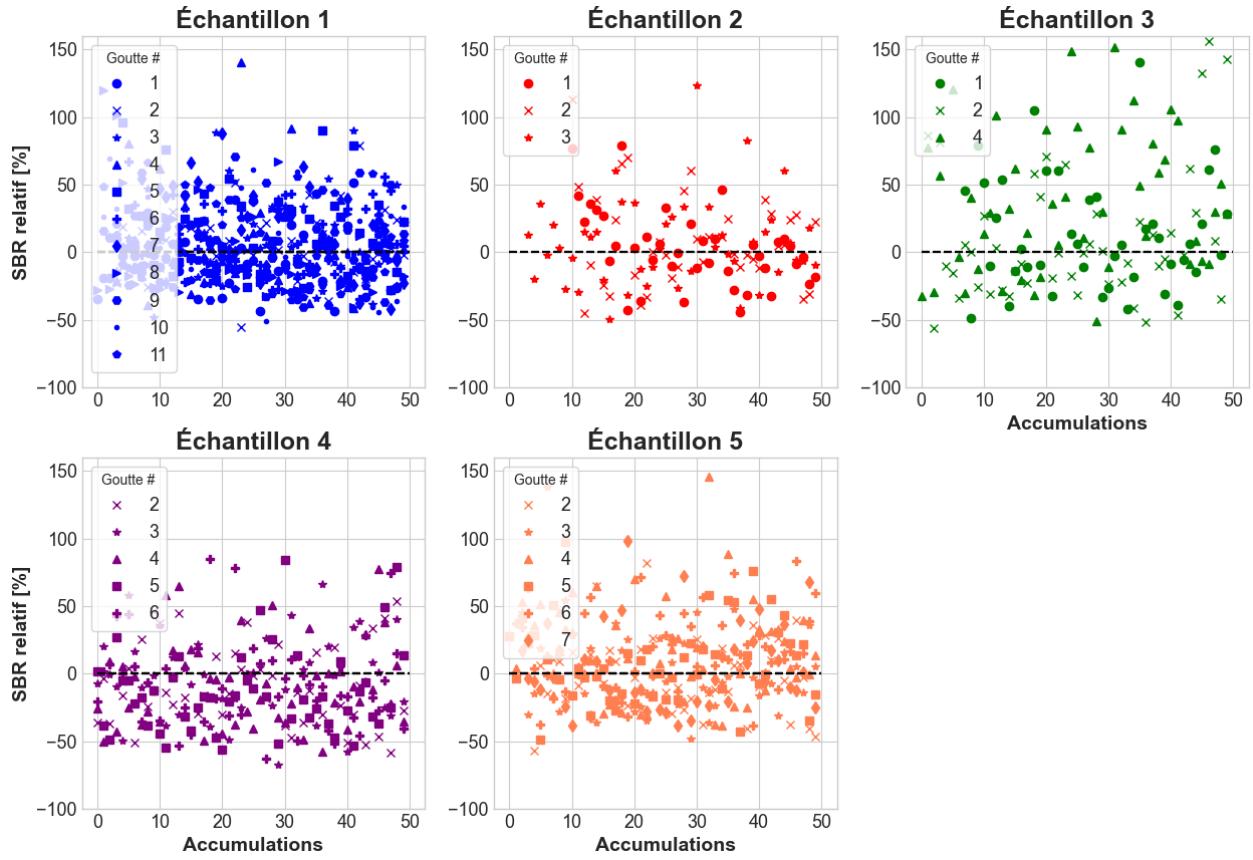


Figure 4.14. Les SBR relatifs de chacune des gouttes de salive liquide avec exposition photoblanchissante présentés pour chacun des échantillons en fonction de l'accumulation des acquisitions Raman à la bande  $1003\text{ cm}^{-1}$ .

Par ailleurs, au Tableau 4.7 les valeurs moyennes des rapports entre ces accumulations clés permettent de constater que dans tous les cas en moyenne un gain de SBR est obtenu par l'expérience, sauf l'échantillon 4. En moyenne les échantillons de gouttes de salive liquide exposée au photoblanchiment DEL voient leur SBR de la bande  $1003\text{ cm}^{-1}$  augmenter entre 20% et 50% par rapport au SBR de l'accumulation initiale. Cependant, l'incertitude de ces valeurs restent très élevées, soit presque la moitié, voire plus que la valeur moyenne associée pour les pourcentages de gains moyens de SBR de l'expérience totale (D/A - 100%). De plus, cette incertitude est presque de même amplitude que la valeur moyenne qui lui est associée dans le cas des pourcentages de gain lors de l'acquisition Raman pré-photoblanchiment (B/A - 100%). Ces incertitudes aussi élevées sont le résultat d'un ensemble de données petit allant de 3 à 11 gouttes par échantillon. Il est intéressant d'observer que les échantillons 2 et 5 obtiennent en moyenne un gain de SBR supérieur

pour la première exposition laser que pour l'ensemble des sources photoblanchissantes. Il est important de rappeler cependant que l'échantillon 3 a subi un regain de fluorescence pendant la première acquisition Raman ce qui explique la faible valeur de gain de SBR de la bande Raman.

Tableau 4.7. Les rapports moyennés sur l'ensemble des gouttes entre les valeurs de SBR à la bande  $1003\text{ cm}^{-1}$  des spectres Raman associées aux accumulations A, B, C et D pour chacun des échantillons de salive liquide avec exposition photoblanchissante DEL.

#	B/A [%]	C/B [%]	D/B [%]	D/A [%]	D/A-100 [%]	B/A-100 [%]
1	$116,86 \pm 21,68$	$94,89 \pm 23,06$	$104,35 \pm 17,59$	$122,45 \pm 17,59$	$22,45 \pm 32,09$	$16,86 \pm 21,68$
2	$158,75 \pm 31,52$	$105,88 \pm 20,65$	$98,36 \pm 17,73$	$154,88 \pm 17,73$	$54,88 \pm 34,85$	$58,75 \pm 31,52$
3	$96,55 \pm 7,50$	$139,14 \pm 55,64$	$166,72 \pm 53,71$	$158,21 \pm 53,71$	$58,21 \pm 41,95$	$-3,45 \pm 7,50$
4	$106,33 \pm 15,45$	$79,21 \pm 17,75$	$77,86 \pm 19,10$	$82,22 \pm 19,10$	$-17,78 \pm 19,78$	$6,33 \pm 15,45$
5	$133,36 \pm 41,14$	$106,12 \pm 26,65$	$98,49 \pm 33,60$	$120,17 \pm 33,60$	$20,17 \pm 18,73$	$33,36 \pm 41,14$

En ce qui concerne le SNR des spectres Raman relatif à l'acquisition pré-photoblanchiment DEL présenté à la Figure 4.15, les échantillon 3 et 4 sont les seuls dont l'expérience a détérioré le SNR de ses spectres Raman. Ceci s'explique par les regains de fluorescence pendant et entre les acquisitions Raman. Par ailleurs, les SNR des accumulations des échantillons 1 et 5 ne semblent pas avoir obtenu de changement notable avec une tendance négative pour l'échantillon 1. Les valeurs sont relativement partagées entre les gains (+) et les pertes (-) de SNR par rapport à l'acquisition pré-photoblanchiment. En outre, les SNR relatifs de l'échantillon 2 ont gagné un net gain par son exposition à la source de photoblanchiment DEL.

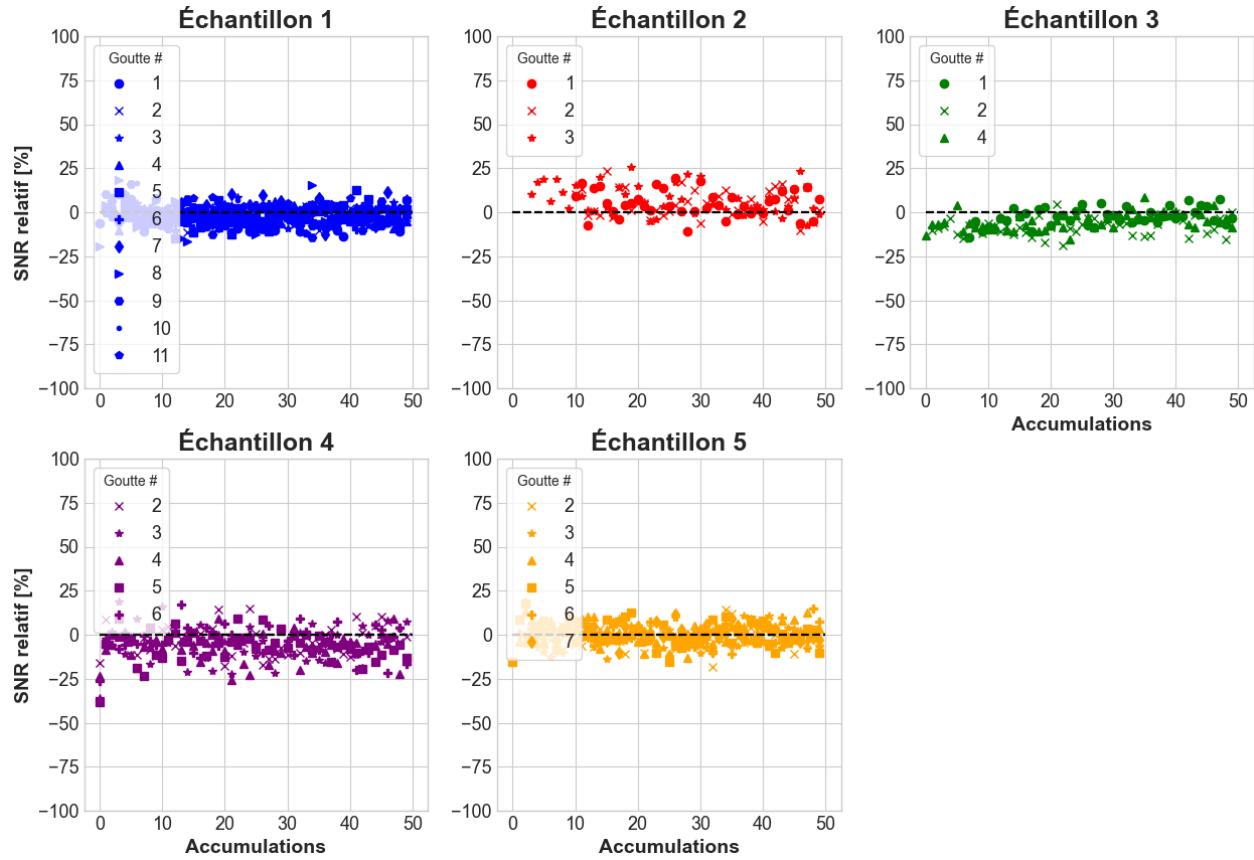


Figure 4.15. Les SNR relatifs de chacune des gouttes de salive liquide avec exposition photoblanchissante présentés pour chacun des échantillons en fonction de l'accumulation des acquisitions.

Au Tableau 4.8, en ne s'intéressant qu'aux valeurs moyennes celles du gain total de SNR (D/A-100%) est presque identique voire inférieure à celles du gain de SNR obtenu par l'exposition au laser Raman seule. Les rapports de D/B montrent aussi que la variation entre les fins des acquisitions avant et après photoblanchiment DEL est presque inexistante. Ceci invalide la méthode d'ajout de la source de photoblanchiment DEL au protocole expérimental comme amélioration de la qualité des spectres Raman. Or, il faut aussi prendre compte que les échantillons de salive liquide, contrairement aux échantillons de salive sèche, ne sont pas fixés spatialement, ce qui peut être la cause d'une augmentation du bruit du signal Raman.

Tableau 4.8. Les rapports moyennés sur l'ensemble des gouttes entre les valeurs de SNR des spectres Raman associées aux accumulations A, B, C et D pour chacun des échantillons de salive liquide avec exposition photoblanchissante DEL.

Échantillons	B/A [%]	C/B [%]	D/B [%]	D/A [%]	D/A-100 [%]	B/A-100 [%]
1	116,12 ± 7,94	84,72 ± 6,53	100,72 ± 3,95	116,90 ± 3,95	16,90 ± 8,52	16,12 ± 7,94
2	117,66 ± 7,68	93,87 ± 5,87	102,65 ± 3,69	120,50 ± 3,69	20,50 ± 3,88	17,66 ± 7,68
3	118,64 ± 6,66	73,93 ± 4,12	95,92 ± 3,49	113,64 ± 3,49	13,64 ± 4,64	18,64 ± 6,66
4	96,38 ± 9,62	74,80 ± 6,86	92,34 ± 9,40	88,27 ± 9,40	-11,73 ± 5,92	-3,62 ± 9,62
5	122,44 ± 6,02	81,15 ± 6,17	97,37 ± 6,16	119,18 ± 6,16	19,18 ± 8,97	22,44 ± 6,02

Ces résultats démontrent que l'exposition au laser Raman comme source photoblanchissante permet une meilleure augmentation du SNR. En effet, dans la majorité des cas le SNR de la fin de l'acquisition pré-photoblanchiment DEL est plus élevé que celui de la fin de l'acquisition post-photoblanchiment et ce même si l'échantillon a subi un regain de fluorescence important.

En retenant que les résultats des gouttes de salive liquide avec la meilleure et la pire qualité de signal, les observations et conclusions suivantes sont faites grâce à la Figure 4.16. Le meilleur gain pour le SBR de la bande Raman  $1003\text{ cm}^{-1}$  est de près de 0,1% entre la première acquisition pré-photoblanchiment DEL et la dernière acquisition post-photoblanchiment DEL, ce qui représente une amélioration de 10%. De plus, le meilleur gain de SNR du spectre Raman est d'environ 0,003 de plus que sa valeur initiale, soit une amélioration de 17%. Or, lorsqu'on s'attarde à la goutte ayant la pire qualité de signal son SBR et SNR restent pratiquement inchangés voire légèrement détériorés, c'est-à-dire une perte de 0,1% entre le début et la fin de l'expérience pour le SBR, ce qui représente une perte de 18% de sa valeur en début d'expérience, et une perte de 0,00015, ce qui présente une perte de 1,3% par rapport à sa valeur initiale de SNR.

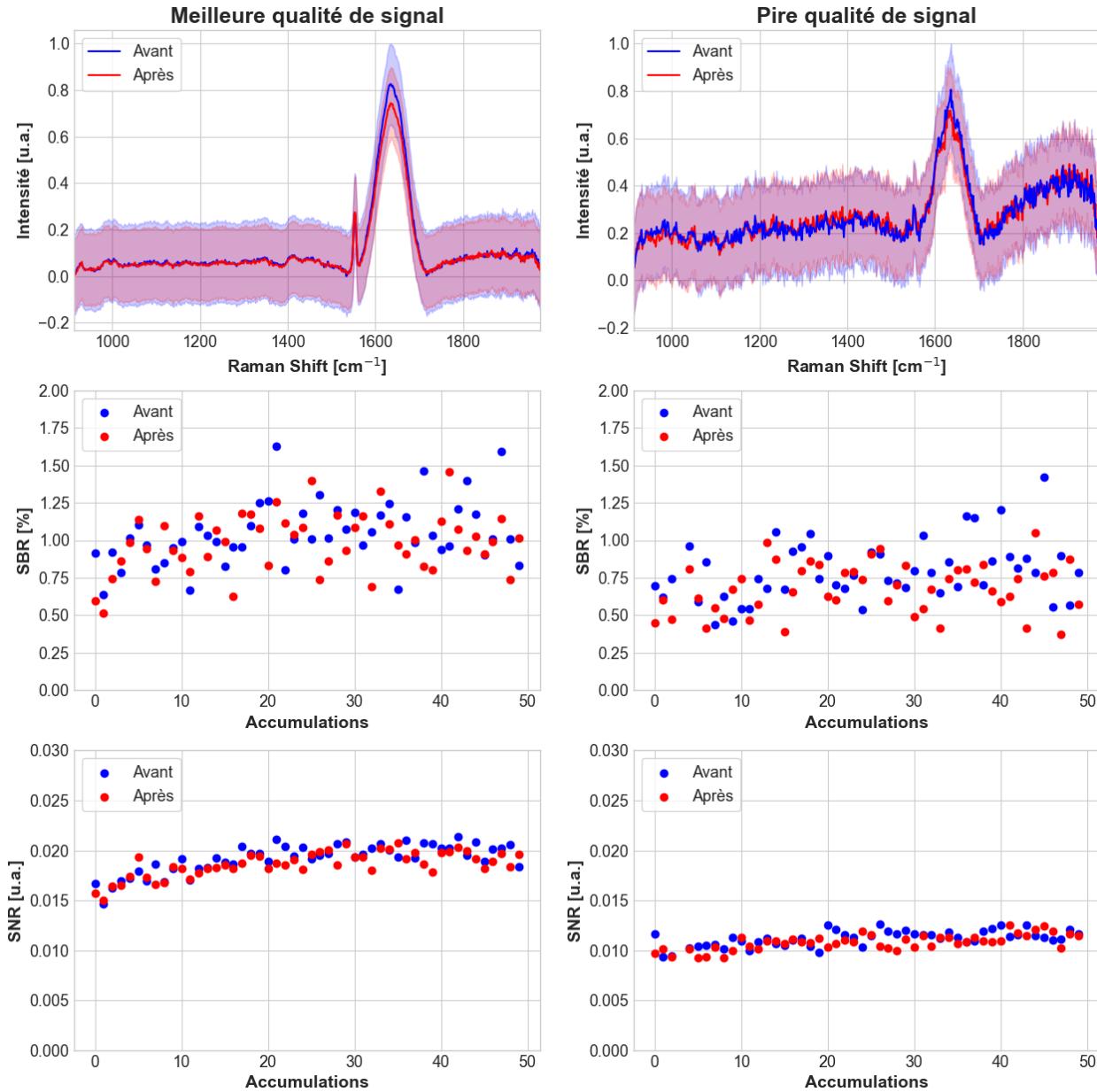


Figure 4.16. Comparaison des spectres Raman moyennés et normalisés ayant les meilleures (à droite) et les pires (à gauche) SNR et SBR résultant de l’expérience combinant le photoblanchiment à la spectroscopie Raman. À droite, la goutte #1 de l’échantillon 1 de salive liquide. À gauche, la goutte # 2 de l’échantillon 4 de salive liquide.

De ce fait, comme pour les gouttes de salive sèches, en tenant compte du photoblanchiment DEL et celui causé par l’exposition au laser Raman lors de l’acquisition des spectres, il est possible de

conclure que photoblanchiment DEL ne permet pas, dans ces conditions expérimentales tout au moins, à réduire le bruit du signal détecté au capteur.

#### 4.3.4 Analyse statistique

La section précédente démontre que la variation en plus de la taille de la population étudiée nécessite une étude statistique pour valider la signification statistique des résultats.

Rappel des hypothèses du test :

**H<sub>0</sub>** : Le photoblanchiment de l'échantillon n'a pas d'effet significatif sur la variation de la métrique de qualité étudiée du spectre Raman (du SNR ou du SBR) ou détériore la qualité du signal Raman.

$$[\text{SNR}, \text{SBR}]_{\text{avant PB}} \geq [\text{SNR}, \text{SBR}]_{\text{après PB}}$$

Et l'hypothèse alternative :

**H<sub>a</sub>** : Le photoblanchiment de l'échantillon a un impact significatif sur la variation de la métrique étudiée (du SNR ou du SBR). Cet impact permet d'améliorer le SNR ou le SBR du spectre Raman.

$$[\text{SNR}, \text{SBR}]_{\text{avant PB}} < [\text{SNR}, \text{SBR}]_{\text{après PB}}$$

Tableau 4.9. Résultats des tests statistiques Wilcoxon pour chacun des échantillons de salive liquide avec exposition photoblanchissante DEL pour un  $\alpha = 0,05\%$ .

Échantillons #	SBR		SNR	
	Valeur p	Réussi?	Valeur p	Réussi?
1	$6,69 \times 10^{-02}$	Non	$1,00 \times 10^0$	Non
2	$1,73 \times 10^{-01}$	Non	$3,50 \times 10^{-12}$	Oui
3	$1,89 \times 10^{-03}$	Oui	$1,00 \times 10^0$	Non
4	$1,00 \times 10^0$	Non	$1,00 \times 10^0$	Non
5	$4,82 \times 10^{-03}$	Oui	$6,76 \times 10^{-01}$	Oui

Les résultats sont présentés ci-dessus au Tableau 4.9. Seul l'échantillon 5 voit son SBR et son SNR améliorés significativement post-photoblanchiment DEL. Même si l'hypothèse nulle est rejetée pour ses valeurs de SNR, les valeurs de SBR de la bande Raman de l'échantillon 3 ont significativement augmentées grâce à la méthode. Cependant, il est impossible de rejeter l'hypothèse nulle pour les SBR des échantillons 1, 2 et 4, comme les SNR des échantillons 1, 3 et

4. Les SNR des échantillons 2 et 5 ont cependant réussi à rejeter l'hypothèse nulle et donc il est possible de conclure que l'expérience a eu un impact sur ces populations.

### 4.3.5 Analyse comparative photoblanchiment DEL vs assèchement de la goutte

Maintenant que les échantillons de salive liquide ayant été exposés à la source DEL ont été analysés, il est important de vérifier si l'effet observé est bien le résultat de l'ajout de la source photoblanchissante au système de spectroscopie Raman et non à l'assèchement de la goutte de salive lors de l'expérience. Donc, dans cette sous-section deux groupes seront comparés pour un même échantillon de salive; des gouttes ayant été exposées au photoblanchiment DEL et d'autres ayant à la place eu un temps mort, sans exposition lumineuse pour la même période.

### 4.3.6 Analyse de l'évolution du niveau d'autofluorescence

Lorsque les valeurs moyennes des rapports de ces accumulations clées sont calculées au Tableau 4.10, une tendance intéressante est observée. Les échantillons d'un même individu n'ayant pas été exposés à la source DEL obtiennent en moyenne un niveau de fluorescence supprimé pouvant aller jusqu'à 10% inférieur à celui avec l'exposition DEL. C'est le cas des échantillons 1 et 4. L'échantillon 5 obtient cependant des résultats très similaires avec et sans exposition photoblanchissante DEL.

Tableau 4.10. Comparaison des rapports moyennés sur l'ensemble des gouttes entre les différents niveaux de fluorescence A, B, C et D pour chacun des échantillons (#) de salive liquide avec et sans exposition photoblanchissante (PB) DEL.

#	PB DEL?	B/A [%]	C/B [%]	D/B [%]	D/A [%]	D/A-100 [%]	B/A-100 [%]
1	Non	64,92 ± 2,89	107,47 ± 0,09	91,26 ± 1,06	59,28 ± 1,06	-40,72 ± 3,33	-35,08 ± 2,89
	Oui	74,34 ± 8,01	120,52 ± 8,67	92,96 ± 1,28	69,04 ± 1,28	-30,96 ± 6,93	-25,66 ± 8,01
4	Non	61,56 ± 0,54	119,92 ± 2,74	90,90 ± 1,28	55,95 ± 1,28	-44,05 ± 0,43	-38,44 ± 0,54
	Oui	63,22 ± 1,18	154,44 ± 2,57	107,62 ± 3,16	68,02 ± 3,16	-31,98 ± 1,83	-36,78 ± 1,18
5	Non	69,80 ± 1,70	113,66 ± 2,64	91,90 ± 2,14	64,14 ± 2,14	-35,86 ± 2,10	-30,20 ± 1,70
	Oui	69,82 ± 5,64	126,98 ± 7,94	93,14 ± 1,58	65,05 ± 1,58	-34,95 ± 5,59	-30,18 ± 5,64

Ainsi, il est possible que la suppression de fluorescence durant l'expérience soit le résultat de l'exposition du laser Raman et non de la source blanche DEL et même que la source DEL ait un impact limitant sur la capacité de l'échantillon de salive liquide de voir son autofluorescence diminuer. Par ailleurs, tel qu'observé chez les échantillons des expériences avec photoblanchiment DEL, les échantillons de salive liquide sans exposition DEL obtiennent des résultats plus notables grâce au photoblanchiment causé par le laser lors de la première acquisition Raman. En analysant les autres métriques, il sera alors possible d'obtenir un portrait plus concret de l'effet de l'expérience.

#### 4.3.7 Analyse des métriques relatives des spectres Raman

En effet, en comparant les aires relatives du signal de fluorescence des deux groupes à l'étude, les tendances semblent très similaires, sauf pour le niveau de fluorescence de l'échantillon 4 avec photoblanchiment DEL à cause de son regain de fluorescence entre les deux acquisitions Raman.

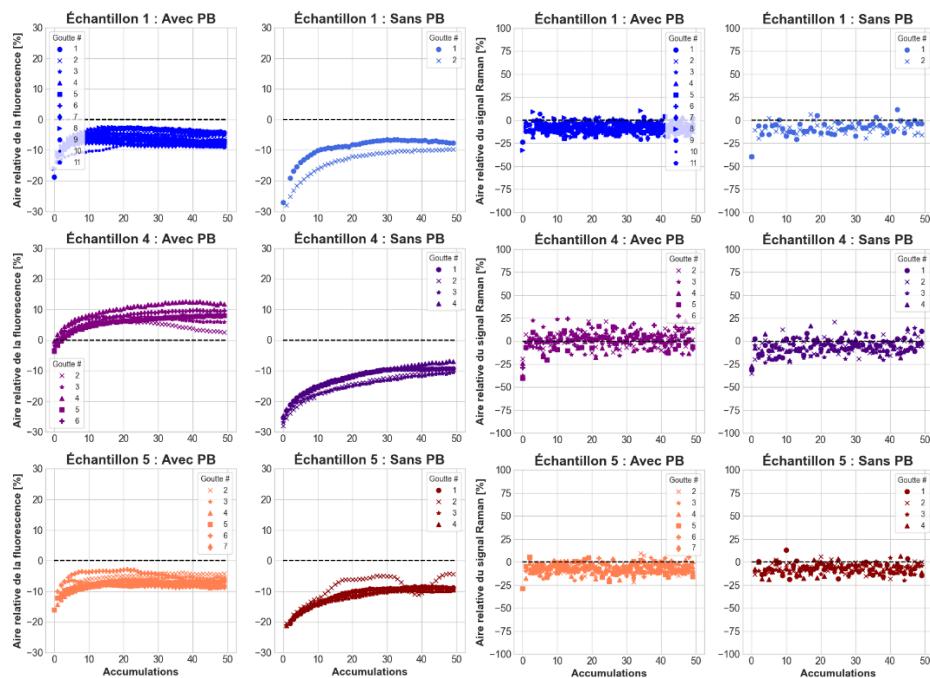


Figure 4.17. L'aire relative sous le signal total de fluorescence (à gauche) et l'aire relative sous le signal Raman de la bande  $1003\text{ cm}^{-1}$  (à droite) pour chacune des gouttes de chacun des échantillons de salive liquide avec (Avec PB : sous-figures gauches) et sans exposition photoblanchissante DEL (Sans PB : sous-figures droites) en fonction de l'accumulation des acquisitions Raman.

Par ailleurs, l'échantillon 4 exposé au photoblanchiment tel que présenté dans la section précédente, a subi un regain de fluorescence entre les deux acquisitions Raman, mais les gouttes de salive de cet échantillon n'ayant pas eu cette exposition n'ont pas eu ce phénomène. Ceci soulève la question, qui restera ouverte dans le cadre de cette étude, si l'effet de l'exposition d'une source DEL blanche sur les échantillons de salive humaine peut causer un regain d'autofluorescence. En outre, l'aire relative sous le signal Raman présente une distribution de points similaire, malgré la différence de taille de population tel que présenté à la Figure 4.17. L'aire sous le signal Raman semble rester stable en présence ou en absence de photoblanchiment DEL.

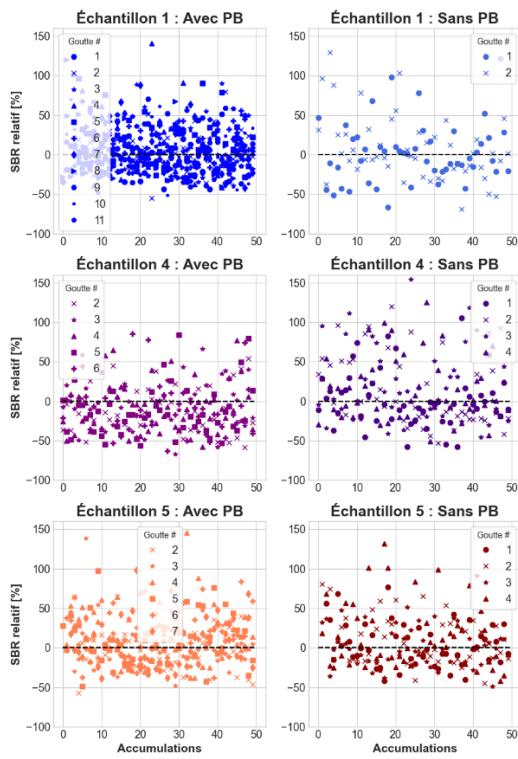


Figure 4.18. Les SBR relatifs de chacune des gouttes de salive liquide avec exposition photoblanchissante DEL (Avec PB : à gauche) et sans (Sans PB : à droite) présentés pour chacun des échantillons en fonction de l'accumulation des acquisitions Raman à la bande  $1003\text{ cm}^{-1}$ .

En comparant les SBR relatifs de la bande Raman à la Figure 4.18, il est possible d'observer que dans les deux cas la tendance est au gain de SBR par rapport aux valeurs initiales associées à la première acquisition Raman. Les valeurs de SBR de l'échantillon 4 semblent particulièrement amélioré lors de l'expérience sans photoblanchiment DEL. Ceci peut s'expliquer par l'absence de regain d'autofluorescence important qui s'est produit lors de l'expérience avec photoblanchiment

DEL. Or, en s'attardant aux rapports moyens de ces accumulations clés au Tableau 4.11, il est possible de constater que les gains moyens du SBR des spectres Raman obtenus par l'exposition au laser Raman lors de la première acquisition (B/A-100%) sont presque de moindre qualité avec l'exposition photoblanchissante DEL. Ceci peut s'expliquer par le fait que la taille de population est nettement plus faible pour les expériences sans photoblanchissement DEL. Ainsi, si des gouttes avec des valeurs de SBR de moindres qualités celles-ci peuvent venir affecter en moyenne les valeurs obtenues dans ce tableau. D'autant plus qu'il est important de rappeler que la bande  $1003\text{cm}^{-1}$  est de très faible intensité et donc sujette à être confondue au bruit du signal. De plus, les échantillons 1 et 4 sans photoblanchissement DEL obtiennent un gain de SBR de la bande Raman supérieur après la première acquisition Raman qu'à la fin de l'expérience, la même tendance est observée pour leurs gouttes ayant subi l'exposition DEL.

Tableau 4.11. Comparaison des rapports moyennés sur l'ensemble des gouttes entre les valeurs de SBR à la bande  $1003\text{ cm}^{-1}$  des spectres Raman associées aux accumulations A, B, C et D pour chacun des échantillons de salive liquide avec et sans exposition photoblanchissante (PB) DEL.

#	PB DEL	B/A [%]	C/B [%]	D/B [%]	D/A [%]	D/A-100 [%]	B/A-100 [%]
1	Non	$138,71 \pm 9,13$	$101,09 \pm 12,38$	$90,51 \pm 10,94$	$126,54 \pm 10,94$	$26,54 \pm 23,44$	$38,71 \pm 9,13$
	Oui	$116,86 \pm 21,68$	$94,89 \pm 23,06$	$104,35 \pm 17,59$	$122,45 \pm 17,59$	$22,45 \pm 32,09$	$16,86 \pm 21,68$
4	Non	$126,90 \pm 42,00$	$78,77 \pm 8,77$	$83,30 \pm 6,24$	$104,29 \pm 6,24$	$4,29 \pm 30,26$	$26,90 \pm 42,00$
	Oui	$106,33 \pm 15,45$	$79,21 \pm 17,75$	$77,86 \pm 19,10$	$82,22 \pm 19,10$	$-17,78 \pm 19,78$	$6,33 \pm 15,45$
5	Non	$142,73 \pm 38,68$	$106,17 \pm 15,75$	$129,13 \pm 67,31$	$169,04 \pm 67,31$	$69,04 \pm 57,44$	$42,73 \pm 38,68$
	Oui	$133,36 \pm 41,14$	$106,12 \pm 26,65$	$98,49 \pm 33,60$	$120,17 \pm 33,60$	$20,17 \pm 18,73$	$33,36 \pm 41,14$

En ce qui concerne les gains totaux de SBR de l'expérience (D/A-100%), les échantillons 4 et 5 obtiennent des gains inférieurs sans photoblanchissement DEL comparativement à leurs gouttes avec exposition photoblanchissante. Dans le cas de l'échantillon 4, ceci s'explique par le regain de fluorescence obtenu lors de l'expérience avec photoblanchissement DEL, qui n'est pas survenu lors de l'expérience sans photoblanchissement DEL. Or, les incertitudes sont si importantes que les conclusions finales ne seront qu'obtenues à l'aide de l'analyse statistique.

En ce qui concerne les valeurs de SNR relatifs à la première acquisition Raman à la Figure 4.19, les tendances sont très similaires. Un gain est observé pour l'échantillon 4 sans exposition à la source DEL blanche. Les distributions semblent équivalentes pour les autres échantillons entre les expériences avec et sans exposition photoblanchissante DEL.

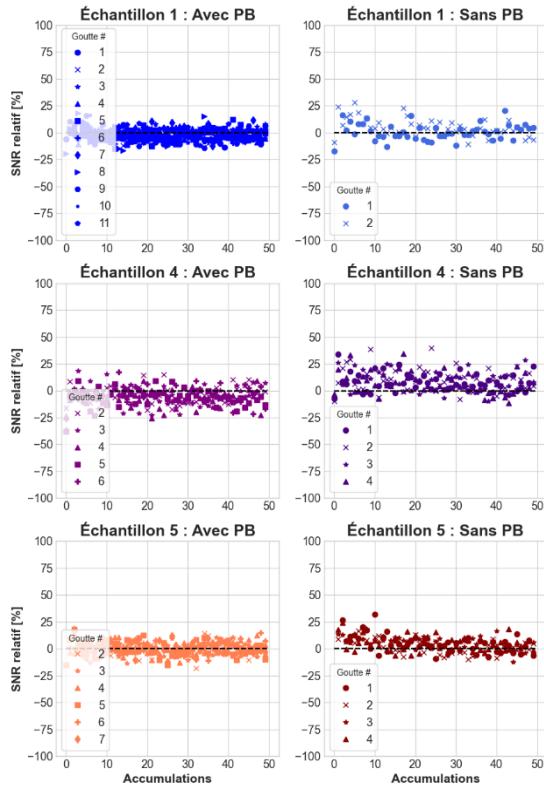


Figure 4.19. Les SNR relatifs de chacune des gouttes de salive liquide avec exposition photoblanchissante (à gauche) et sans (à droite) présentés pour chacun des échantillons en fonction de l'accumulation des acquisitions Raman.

Il est possible d'observer que les gains de SNR moyens lors de la première acquisition Raman ( $B/A-100\%$ ) sont identiques pour les expériences avec et sans photoblanchiment DEL de l'échantillon 5 au Tableau 4.12. De plus, en moyenne les gains totaux de SNR ( $D/A-100\%$ ) sont presque identiques pour l'échantillon 1 avec et sans exposition photoblanchissante DEL. Tel que mentionné plus tôt, comme l'échantillon 4 a subi un regain de fluorescence lors de l'expérience avec exposition DEL la comparaison avec l'expérience sans cette exposition devient plus difficile

à apprécier. Or, tel qu'espéré l'expérience sans exposition DEL de l'échantillon 4 n'ayant quant à elle pas subi de regain de fluorescence obtient un gain de SNR total.

Tableau 4.12. Comparaison des rapports moyennés sur l'ensemble des gouttes entre les valeurs de SNR des spectres Raman associées aux accumulations A, B, C et D pour chacun des échantillons de salive liquide avec et sans exposition photoblanchissante DEL.

#	PB DEL	B/A [%]	C/B [%]	D/B [%]	D/A [%]	D/A-100 [%]	B/A-100 [%]
1	Non	93,00 ± 5,73	93,47 ± 1,46	98,75 ± 5,60	91,52 ± 5,60	-8,48 ± 0,46	-7,00 ± 5,73
	Oui	116,12 ± 7,94	84,72 ± 6,53	100,72 ± 3,95	116,90 ± 3,95	16,90 ± 8,52	16,12 ± 7,94
4	Non	101,84 ± 8,74	92,19 ± 7,06	110,72 ± 6,96	112,62 ± 6,96	12,62 ± 10,33	1,84 ± 8,74
	Oui	96,38 ± 9,62	74,80 ± 6,86	92,34 ± 9,40	88,27 ± 9,40	-11,73 ± 5,92	-3,62 ± 9,62
5	Non	128,02 ± 8,05	91,15 ± 2,78	100,76 ± 5,13	128,58 ± 5,13	28,58 ± 1,64	28,02 ± 8,05
	Oui	122,44 ± 6,02	81,15 ± 6,17	97,37 ± 6,16	119,18 ± 6,16	19,18 ± 8,97	22,44 ± 6,02

Toutes ces observations dirigent l'analyse vers la possibilité que ces gains de SNR sont donc le résultat de l'exposition Raman et de l'assèchement de la goutte de salive liquide lors de l'expérience plutôt que l'exposition photoblanchissante DEL.

#### 4.3.8 Analyse statistique

Tout d'abord, un test des rangs signés de Wilcoxon pour groupes pairés est fait sur les valeurs de SBR et de SNR sur les paires de données de la première et deuxième acquisitions Raman.

Rappel des hypothèses du test :

**H<sub>0</sub>** : L'assèchement de la goutte de salive au lieu de la période de même durée de photoblanchissement DEL n'a pas d'effet significatif sur la variation de la métrique de qualité étudiée du spectre Raman (du SNR ou du SBR) ou détériore la qualité du signal Raman.

$$[\text{SNR}, \text{SBR}]_{\text{avant PB}} \geq [\text{SNR}, \text{SBR}]_{\text{après PB}}$$

Et l'hypothèse alternative :

**H<sub>a</sub>** : L'assèchement de la goutte de salive au lieu de la période de même durée de photoblanchiment DEL a un impact significatif sur la variation de la métrique étudiée (du SNR ou du SBR). Cet impact permet d'améliorer le SNR ou le SBR du spectre Raman.

$$[\text{SNR, SBR}] \text{ avant pause 1min 30s} < [\text{SNR, SBR}] \text{ après pause 1min 30s}$$

Tableau 4.13. Résultats des tests statistiques Wilcoxon pour chacun des échantillons de salive liquide sans exposition photoblanchissante DEL avec un  $\alpha = 0,05\%$ .

Échantillons	SBR		SNR	
	Valeur p	Réussi?	Valeur p	Réussi?
1	$6,40 \times 10^{-01}$	Non	$9,81 \times 10^{-04}$	Oui
4	$4,82 \times 10^{-03}$	Oui	$7,60 \times 10^{-23}$	Oui
5	$8,24 \times 10^{-02}$	Non	$4,52 \times 10^{-13}$	Oui

Les résultats présentés au Tableau 4.13 démontre que le SNR des spectres Raman des gouttes après la période de repos sans exposition DEL photoblanchissante est significativement amélioré par rapport à leur valeur lors de l'acquisition Raman initiale. De plus, ces résultats démontrent qu'il n'est pas possible de rejeter l'hypothèse nulle dans le cas des échantillons de salive liquide 1 et 5 n'ayant pas été exposé au photoblanchiment DEL. L'assèchement d'une goutte de salive liquide sur une durée de 1min 30s sans exposition lumineuse ne permet pas d'améliorer le SBR de la bande Raman  $1003 \text{ cm}^{-1}$ , mais aide cependant à améliorer le SNR des spectres Raman de ces même gouttes. Il faut le rappeler cette bande Raman est de très faible intensité, ce qui la rend difficile à discerner du bruit du signal détecté. Ceci n'est pas une mauvaise chose puisqu'il s'agit d'une circonstance très commune dans l'étude de bande Raman issues d'échantillons biologiques.

Or, il faut maintenant tester si les gouttes de salive ayant subi une exposition photoblanchissante DEL ont des valeurs de SNR ou de SBR de la bande Raman  $1003 \text{ cm}^{-1}$  discernables des gouttes ayant subi une période sans exposition lumineuse à l'air ambiant. Le test Kruskal-Wallis vient tester les hypothèses ci-dessous.

L'hypothèse nulle stipule donc :

**H<sub>0</sub>** : Il n'y a pas de différence significative entre le test de photoblanchiment et le test sans photoblanchiment sur les métriques relatives à l'acquisition de départ.

$$[\text{SNR}_{\text{REL}}, \text{SBR}_{\text{REL}}] \text{ sans PB} = [\text{SNR}_{\text{REL}}, \text{SBR}_{\text{REL}}] \text{ avec PB}$$

Et l'hypothèse alternative :

**H<sub>a</sub>** : Il y a une différence significative entre le test de photoblanchiment et le test sans photoblanchiment sur les métriques relatives à l'acquisition de départ.

$$[\text{SNR}_{\text{REL}}, \text{SBR}_{\text{REL}}] \text{ sans PB} \neq [\text{SNR}_{\text{REL}}, \text{SBR}_{\text{REL}}] \text{ avec PB}$$

Tableau 4.14. Résultats des tests statistiques Kruskal-Wallis pour chacun des échantillons de salive liquide avec et sans exposition photoblanchissante DEL avec un  $\alpha = 0,05\%$ .

Échantillons	SBR		SNR	
	Valeur p	Réussi?	Valeur p	Réussi?
1	$2,87 \times 10^{-01}$	Non	$1,93 \times 10^{-08}$	Oui
4	$1,27 \times 10^{-07}$	Oui	$6,24 \times 10^{-40}$	Oui
5	$5,97 \times 10^{-01}$	Non	$4,02 \times 10^{-11}$	Oui

Au Tableau 4.14, les résultats du test Kruskal-Wallis y sont présentés. Il est évident que l'échantillon 4 a des valeurs de SBR et de SNR significativement distinctes lors des expériences avec et sans photoblanchiment DEL, car lors des tests avec photoblanchiment DEL cet échantillon a subi un regain de fluorescence important entre les deux acquisitions Raman.

Or, il est intéressant de voir que les groupes avec et sans photoblanchiment DEL des échantillons 1 et 5 sont discernables pour le SNR, mais pas pour le SBR de la bande Raman. En effet, dans le cas de l'échantillon 1 le groupe avec photoblanchiment DEL est de 11 gouttes tandis que celui sans photoblanchiment DEL ne contient que 2 gouttes. Ceci vient remettre en question la validité du test. En effet, la fonction Python stats.kruskal() utilisée pour ce test statistique nécessite un minimum de population de 5 individus [45]. Ainsi, il est impossible de rejeter l'hypothèse nulle et donc ces groupes ne sont pas discernables.

## CHAPITRE 5 DISCUSSION GÉNÉRALE

Ce chapitre vise à faire un retour sur les objectifs en plus de discuter des avantages et limites de la méthode d'ajout du photoblanchiment DEL comme étape expérimentale à la spectroscopie Raman. La méthode finale visant à utiliser le photoblanchiment pour améliorer le signal Raman a été testée sur des échantillons de salive humaine. L'expérience a été faite sur des gouttes de salive sèches et liquides.

### 5.1 Retour sur les objectifs du projet

Les analyses du chapitre précédent permettent maintenant de faire un retour sur les objectifs du projet.

Le premier sous-objectif stipule de concevoir le système et valider son fonctionnement à l'aide d'échantillons simples avec un fort signal Raman tels que des graines de sésame. Cet objectif est complété avec succès. Les résultats présentés à la Figure 4.1 montrent qu'il est possible de supprimer l'autofluorescence du spectre Raman de graines de sésame. Cependant, à ce stade-ci, il est impossible de déterminer si l'effet est causé par la source de photoblanchiment DEL ou par le laser du système de spectroscopie Raman.

Le deuxième sous-objectif est de réaliser la preuve de concept de la méthode à l'aide d'échantillons biologiques et inertes tels que de la poudre de collagène pure et un modèle de salive humaine afin de peaufiner la méthode avant de faire des tests sur des biofluides. Cet objectif est complètement atteint. En effet, les tests faits sur la poudre de collagène pure ont permis de peaufiner la méthode de photoblanchiment par source DEL en adressant le problème de densité de puissance de la source de photoblanchiment externe au système de spectroscopie Raman. En effet, la choix de longueur d'onde de photoblanchiment n'est pas optimisé afin de favoriser la densité de puissance de la source de photoblanchiment à l'échantillon à l'aide d'une source blanche DEL. Puis, les tests sur le modèle de salive ont permis de déterminer la durée de photoblanchiment DEL optimale de 60 secondes pour pouvoir procéder efficacement sur des échantillons de salive humaine d'individus sains tel que présenté à la Figure 4.4.

Enfin, le dernier sous-objectif consiste à réaliser des acquisitions sur des échantillons de la salive humaine, afin de démontrer une optimisation des métriques de qualité du signal (SNR, SBR) grâce à la méthode développée en la comparant à des résultats de spectroscopie Raman classique, c.-à-d.

sans photoblanchiment. Cet objectif est partiellement atteint. D'une part, les résultats présentés au chapitre précédent montrent qu'effectivement un gain de SNR et de SBR des spectres de salive humaine est obtenu à la suite de l'expérience. D'autre part, les analyses de ces résultats ont aussi démontré que ces gains sont en fait le résultat du photoblanchiment causé par l'exposition du laser de spectroscopie Raman lors des acquisitions. Les expériences de la méthode sur de la salive séchée à l'air ambiant montre en moyenne qu'il est possible de supprimer 40% de l'autofluorescence initiale de l'échantillon et de gagner 1% du SBR de la bande Raman  $1003\text{cm}^{-1}$ , ce qui représente une augmentation d'environ 85% de sa valeur initiale, ainsi qu'un gain d'environ 0,005 de SNR du spectre Raman, ce qui représente une augmentation d'environ 33% de sa valeur au début de l'expérience. De plus, les expériences de la méthode sur de la salive liquide montre en moyenne qu'il est possible de supprimer environ 30% de l'autofluorescence initiale de l'échantillon et de gagner jusqu'à 0,1% du SBR de la bande Raman  $1003\text{cm}^{-1}$ , ce qui représente un gain d'environ 10% de sa valeur au début de l'expérience, ainsi que d'environ 0,003 du SNR du spectre Raman, ce qui représente un gain de 17% de sa valeur initiale.

Par ailleurs, dans le cas des échantillons de salive liquide, un test parallèle a permis de démontrer que l'effet observé n'est pas causé par le photoblanchiment DEL, mais probablement seulement par l'exposition au laser Raman lors de l'acquisition en plus d'un léger assèchement de la goutte de salive lors de l'expérience.

## **5.2 Avantages de la méthode**

L'avantage principal de cette méthode est sa simplicité d'extension à un montage déjà fonctionnel de spectroscopie Raman. En effet, il suffit d'ajouter une source photoblanchissante avec une platine de translation s'il n'est pas possible d'illuminer l'échantillon avec les deux sources au même point. De plus, le photoblanchiment aide effectivement à supprimer l'autofluorescence d'échantillons biofluides et ainsi contribue à l'augmentation du SNR des spectres Raman et du SBR de la bande  $1003\text{ cm}^{-1}$  des échantillons de salive humaine.

## **5.3 Limites de la méthode**

Le système de photoblanchiment du montage expérimental final n'est pas complètement optimisé pour la salive humaine. En effet, la source de photoblanchiment DEL (LS-WL1) est blanche et donc n'est pas optimisée pour la longueur d'onde de photoblanchiment. Ceci est le résultat du

problème de densité de puissance de la source photoblanchissante. Effectivement, une tentative d'optimisation de la longueur d'onde de photoblanchissement a été effectuée sur de la poudre de collagène pur. Cependant, la densité de puissance maximale de la source DEL *Lumencor* n'était pas suffisamment élevée par rapport à son MPE<sub>peau</sub> pour observer des résultats concluants. Il a donc fallu choisir une source de plus grande densité de puissance au détriment de pouvoir contrôler la longueur d'onde de photoblanchissement. Du même fait, cette méthode nécessite donc beaucoup de puissance de la source de photoblanchissement. Il faut alors un système de spectroscopie Raman confiné dans une boîte pour des tests cliniques potentiels afin de minimiser les risques associés.

De plus, puisqu'il faut travailler avec des densités de puissance grandement supérieures au MPE<sub>peau</sub> de leur source, le problème de déshydratation de l'échantillon devient important. En effet, lorsque la source dépasse son MPE<sub>peau</sub>, les effets thermiques ne sont pas négligeables. La déshydratation de l'échantillon vient changer le point focal de l'acquisition Raman dans le cas d'échantillons de tissus biologiques, et dans le cas d'échantillons biofluides, le solvant s'évapore, ce qui vient affecter la concentration de diffuseurs Raman de l'échantillon. Ceci rend donc l'application de la méthode à des tissus biologiques *in vivo* relativement difficile, puisqu'il s'agit d'un système dynamique. Les échantillons secs ont l'avantage d'être fixes spatialement et de ne pas varier en épaisseur à cause de la déshydratation lors de l'expérience.

Par ailleurs, il faut aussi adapter le protocole à l'échantillon étudié. Le choix d'une source blanche comme source de photoblanchissement permet d'éviter le problème de l'adaptabilité à la longueur d'onde photoblanchissante du système. Or, il semble qu'un laser serait plus adapté pour cette méthode pour sa largeur de bande réduite et sa densité de puissance. Cependant, il est possible que l'usage d'un laser différent de celui d'excitation du système de spectroscopie pourrait générer des effets non linéaires qui pourrait alors rendre l'analyse des spectres Raman plus complexe.

Les tests effectués sur les échantillons de salive ont aussi permis de montrer que cette méthode n'améliore pas un signal déjà très bruité initialement, bien qu'elle permette de supprimer une quantité significative de fluorescence du spectre Raman. En effet, les gains de SBR sont inférieurs à 2% en moyenne par rapport à leur valeur initiale pour la bande de Phénylalanine à 1003 cm<sup>-1</sup>.

## CHAPITRE 6 CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS

### 6.1 Conclusions

En somme, ce mémoire vient confirmer l'hypothèse sur laquelle se fonde ce projet de recherche. Elle pose qu'il est possible d'imager des régions spécifiques d'un spectre Raman avec de meilleures valeurs numériques associées au SBR et au SNR en photoblanchissant des échantillons biologiques afin de supprimer l'autofluorescence de leur signal. La région spécifique dans le cas de l'étude sur la salive humaine est la bande Raman  $1003\text{ cm}^{-1}$  et l'échantillon à l'étude est de la salive de patients sains.

En outre, l'objectif principal de ce projet consiste à développer un système de spectroscopie Raman complémenté par une méthode pouvant supprimer l'autofluorescence lors de l'acquisition de spectres Raman. Ce mémoire vient en partie compléter cet objectif, puisque la partie du montage expérimental ajouté au système de spectroscopie Raman initial ne contribue pas de manière assez significative à l'amélioration de la qualité du signal des spectres Raman comparativement au laser d'excitation de spectroscopie Raman. En effet, bien que simple d'ajout à un montage de spectroscopie Raman déjà fonctionnel, le laser Raman lui-même remplit déjà la fonction de suppression de l'autofluorescence de l'échantillon de biofluides.

### 6.2 Recommandations

Ce mémoire démontre que le photoblanchissement causé par l'exposition au laser d'excitation Raman lors de l'acquisition des spectres impact significativement davantage le niveau de fluorescence et la qualité des spectres Raman que l'exposition à la source blanche DEL. Ainsi, il faut apporter des modifications au protocole expérimental. De plus, comme les résultats sur les gouttes de salive séchées à l'air ambiant sont de meilleure qualité que ceux issus des gouttes de salive liquide pipettées une à la fois, il est recommandé de poursuivre les expériences sur des échantillons de biofluides séchés à l'air ambiant.

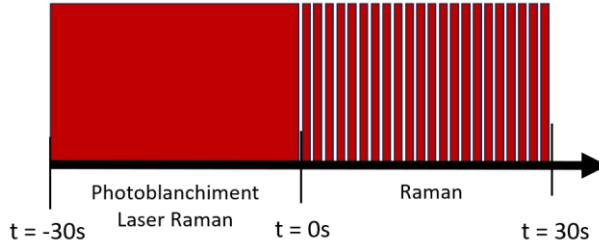


Figure 6.1. Proposition de protocole expérimental amélioré pour la suppression de l'autofluorescence d'échantillons de salive.

Le protocole expérimental suggéré à la Figure 6.1 consiste à illuminer l'échantillon de biofluides sec avec le laser Raman avant le début de l'acquisition de spectres. Les résultats de salive sèche montrent qu'après 30 accumulations de 1s lors la première exposition au laser Raman le niveau de fluorescence se met à stagner. Donc, il est recommandé d'exposer l'échantillon de biofluides au laser Raman pendant 30s à la même intensité qu'il est exposé lors de l'acquisition des spectres Raman. Le nombre d'accumulations de cette acquisition est suggéré afin d'obtenir une quantité suffisante de spectres pour pouvoir ensuite moyenner le signal et ainsi réduire le bruit de grenailles intrinsèque à la détection de photons.

### 6.2.1 Extinction de fluorescence

Il ne s'agit pas ici d'une recommandation, mais d'une suggestion de méthode pour atteindre les mêmes objectifs. Une autre méthode à explorer pour le même objectif de la suppression de l'autofluorescence des tissus biologiques serait l'*extinction de fluorescence* (en anglais, *fluorescence quenching*). Ce phénomène regroupe plusieurs mécanismes impliquant l'ajout de fluorophores exogènes afin d'exténuer les photons de fluorescence des fluorophores endogènes à l'échantillon. Le transfert d'énergie entre molécules fluorescentes (en anglais, *Fluorescence Resonance Energy Transfer* ou FRET) est un exemple de ces mécanismes [8]. Un exemple classique de ce phénomène est l'expérience du gin tonic avec une lampe UV pour montrer l'effet de la fluorescence et puis d'y ajouter du sel de table, NaCl, qui contient du chlore qui est un extincteur de fluorescence (*quencher*) pour la quinine, le fluorophore en question dans cette expérience. Avec le sel dans la solution, aucune fluorescence ne peut donc être observée. Une idée d'application pour le domaine du biomédical serait d'utiliser un *quencher* adapté pour des tissus biologiques. L'iode a cette propriété et lors de certaines procédures chirurgicales de la solution de

Lugol, une solution d'iode, est utilisée pour mieux observer les tissus cancéreux dans le colon ou des tissus affectés par le virus du Papillomavirus humain (VPH) dans l'utérus par exemple [46]. Comme il s'agit d'une solution biocompatible et déjà de pratique commune, il serait donc intéressant de tester cette solution d'iode sur un échantillon de tissus biologique afin de supprimer son autofluorescence. La réponse Raman de composés iodiques est donnée à la Figure 6.2.

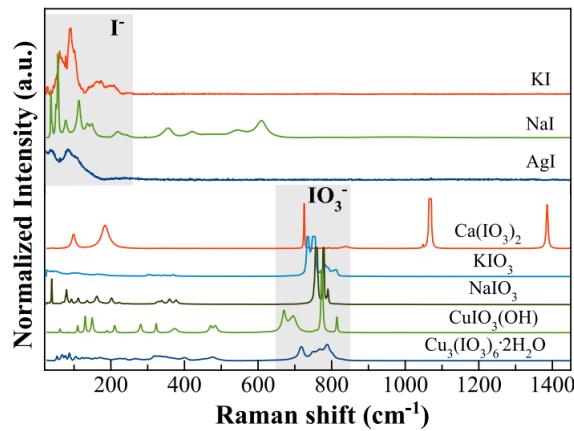


Figure 6.2. Spectres Raman de composés d'iode sous forme cristalline ( $I^-$  iodide et  $IO_3^-$  Iodate), figure tirée de [47].

Il est possible de constater l'absence de pics Raman dans la région d'empreinte digitale des spectres Raman, soit entre  $200\text{ cm}^{-1}$  et  $1400\text{ cm}^{-1}$  des composés d'iodine  $I^-$  à l'exception de l'iodure de sodium, NaI. La solution de Lugol contient du  $I_2$  et du KI, qui n'a qu'une réponse Raman à  $\leq 200\text{cm}^{-1}$ .[48]

## RÉFÉRENCES

- [1] S. Mukherjee, *The Emperor of All Maladies: A Biography of Cancer*. États-Unis: Scribner, 2011.
- [2] R. A. Weinberg, *The biology of cancer*. USA: Taylor & Francis Group, 2007.
- [3] C. Boudoux, *Fundamentals of Biomedical Optics: From Light Interactions with Cells to Complex Imaging Systems.*, Pollux. États-Unis, 2017.
- [4] J. Desroches, F. Leblond, K. Petrecca, et Q. I. de génie biomédical École polytechnique (Montréal, « Sonde de biopsie optique afin d'améliorer la sécurité et la précision de diagnostic des biopsies neurochirurgicales », École polytechnique de Montréal, Montréal, 2018. [En ligne]. Disponible sur: <https://publications.polymtl.ca/3545/>
- [5] F. Picot, « Sonde Raman multimodale intégrée à une plateforme d'imagerie TRUS-IRM à l'aide d'un capteur électromagnétique pour améliorer le guidage des biopsies de la prostate », Polytechnique Montreal, août 2022. [En ligne]. Disponible sur: [https://publications.polymtl.ca/10493/1/2022\\_FabienPicot.pdf](https://publications.polymtl.ca/10493/1/2022_FabienPicot.pdf)
- [6] K. Ember *et al.*, « Saliva-based detection of COVID-19 infection in a real-world setting using reagent-free Raman spectroscopy and machine learning », SPIE, 9 février 2022. [En ligne]. Disponible sur: [https://publications.polymtl.ca/10628/1/2022\\_Ember\\_Saliva-based\\_detection\\_COVID-19\\_infection\\_real-world.pdf](https://publications.polymtl.ca/10628/1/2022_Ember_Saliva-based_detection_COVID-19_infection_real-world.pdf)
- [7] J. Carlos. Stockert et Alfonso. Blázquez-Castro, *Fluorescence Microscopy In Life Sciences.*, 1 online resource (751 pages) vol. Sharjah: Bentham Science Publishers, 2017. [En ligne]. Disponible sur: <http://public.ebookcentral.proquest.com/choice/publicfullrecord.aspx?p=5216351>
- [8] J. K. Lakowicz, *Principles of fluorescence spectroscopy*, 3rd edition. Springer.
- [9] Edinburgh Instruments, « What is Kasha's Rule? », What is the Kasha Rule. Consulté le: 16 janvier 2024. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.edinst.com/blog/what-is-kashas-rule/#:~:text=Kasha'%20Rule%2C%20therefore%2C%20states,initial%20level%20the%20molecule%20is>

- [10] N. Klonis, M. Rug, I. Harper, M. Wickham, A. Cowman, et L. Tilley, « Fluorescence photobleaching analysis for the study of cellular dynamics », *European Biophysics Journal*, vol. 31, n° 1, p. 36-51, 2002, doi: 10.1007/s00249-001-0202-2.
- [11] Q. T. Nguyen et R. Y. Tsien, « Fluorescence-guided surgery with live molecular navigation--a new cutting edge », *Nature reviews. Cancer*, vol. 13, n° 9, p. 653-62, 2013, doi: 10.1038/nrc3566.
- [12] F. Leblond, S. C. Davis, P. A. Valdés, et B. W. Pogue, « Pre-clinical whole-body fluorescence imaging: Review of instruments, methods and applications », *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*, vol. 98, n° 1, p. 77-94, 2010, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2009.11.007.
- [13] J. F. Biellmann, C. Lapinte, E. Haid, et G. Weimann, « Structure of lactate dehydrogenase inhibitor generated from coenzyme », *Biochemistry*, vol. 18, n° 7, p. 1212-1217, avr. 1979, doi: 10.1021/bi00574a015.
- [14] K. K. Tsia, *Understanding biophotonics : fundamentals, advances, and applications*, 1 online resource (758 pages) : illustrations (some color) vol. Boca Raton, Florida: Pan Stanford Publishing, 2015. [En ligne]. Disponible sur: <http://site.ebrary.com/id/11041843>
- [15] J. Coates, « Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach », in *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, 2006. doi: 10.1002/9780470027318.a5606.
- [16] J. F. Algorri, M. Ochoa, P. Roldán-Varona, L. Rodríguez-Cobo, et J. M. López-Higuera, « Light Technology for Efficient and Effective Photodynamic Therapy: A Critical Review », *Cancers*, vol. 13, n° 14, 2021, doi: 10.3390/cancers13143484.
- [17] Thomas. Dieing, Olaf. Hollricher, et Jan. Toporski, *Confocal raman microscopy*, 1 online resource (xv, 289 pages) : illustrations vol. in Springer series in optical sciences ; 158. Berlin ; Springer, 2011. doi: 10.1007/978-3-642-12522-5.
- [18] A. Zangwill, *Modern electrodynamics*. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press, 2017.
- [19] R. E. FRANKLIN et R. G. GOSLING, « Molecular configuration in sodium thymonucleate », *Nature*, vol. 171, n° 4356, p. 740-1, 1953.

- [20] J. Michael. Hollas, *Modern spectroscopy*, 4th ed. Chichester [Angleterre]: John Wiley & Sons, 2004.
- [21] R. W. Hakala, « A new derivation of the Boltzmann distribution law », *Journal of Chemical Education*, vol. 38, n° 1, p. 33, 1961.
- [22] Shan Yang, « High-Wavenumber Raman Analysis », in *Recent Developments in Atomic Force Microscopy and Raman Spectroscopy for Materials Characterization*, Chandra Shakher Pathak et Samir Kumar, Éd., Rijeka: IntechOpen, 2021, p. Ch. 6. doi: 10.5772/intechopen.100474.
- [23] S. K. Freeman, *Applications of laser raman spectroscopy*. New York: Wiley, 1974.
- [24] L. Van Gulick *et al.*, « An integrated approach to investigate age-related modifications of morphological, mechanical and structural properties of type I collagen », *Acta Biomaterialia*, vol. 137, p. 64-78, 2022, doi: 10.1016/j.actbio.2021.10.020.
- [25] E. T. Sato et H. Martinho, « First-principles calculations of Raman vibrational modes in the fingerprint region for connective tissue », *Biomedical optics express*, vol. 9, n° 4, p. 1728-1734, 2018, doi: 10.1364/BOE.9.001728.
- [26] A. F. Khan, M. Awais, A. S. Khan, S. Tabassum, A. A. Chaudhry, et I. U. Rehman, « Raman Spectroscopy of Natural Bone and Synthetic Apatites », *Applied Spectroscopy Reviews*, vol. 48, n° 4, p. 329-355, 2013, doi: 10.1080/05704928.2012.721107.
- [27] B. G. Frushour et J. L. Koenig, « Raman scattering of collagen, gelatin, and elastin », *Biopolymers*, vol. 14, n° 2, p. 379-391, 1975, doi: 10.1002/bip.1975.360140211.
- [28] S. Stevanovic *et al.*, « Study of SO<sub>2</sub>/water and NO/water/salt systems from 25 to 150 °C using fused silica capillaries, batch autoclave and Raman microspectrometry », *Energy Procedia*, vol. 63, p. 3775-3781, doi: 10.1016/j.egypro.2014.11.406.
- [29] S. J. Choquette, E. S. Etz, W. S. Hurst, D. H. Blackburn, et S. D. Leigh, « Relative Intensity Correction of Raman Spectrometers: NIST SRMs 2241 through 2243 for 785 nm, 532 nm, and 488 nm/514.5 nm Excitation », *Appl Spectrosc*, vol. 61, n° 2, p. 117-129, févr. 2007, doi: 10.1366/000370207779947585.
- [30] 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 », *Journal of Biomedical Optics*, vol. 28, n° 2, 2023, doi: 10.1117/1.JBO.28.2.025002.

[31] M. Y. Berezin et S. Achilefu, « Fluorescence Lifetime Measurements and Biological Imaging », *Chem. Rev.*, vol. 110, n° 5, p. 2641-2684, mai 2010, doi: 10.1021/cr900343z.

[32] D. Wei, S. Chen, et Q. Liu, « Review of Fluorescence Suppression Techniques in Raman Spectroscopy », *Applied Spectroscopy Reviews*, vol. 50, n° 5, p. 387-406, mai 2015, doi: 10.1080/05704928.2014.999936.

[33] Kogler M. et Heilala B., « Time-gated Raman spectroscopy - a review », *Measurement Science and Technology*, vol. 32, n° 1, 2021, doi: 10.1088/1361-6501/abb044.

[34] N. Ksantini, « Spectroscopie Raman de tissus biologiques dans le domaine temporel », Mémoire de maîtrise, Polytechnique Montréal, Montréal, 2021. [En ligne]. Disponible sur: <https://publications.polymtl.ca/5554/>

[35] P. N. Prasad, *Introduction to nanomedicine and nanobioengineering*. in Wiley series in biomedical engineering and multidisciplinary integrated systems. Hoboken, N.J.: John Wiley & Sons, 2012. [En ligne]. Disponible sur: <http://catdir.loc.gov/catdir/enhancements/fy1210/2012002564-t.html>

[36] E. Zamani *et al.*, « Spectral effects and enhancement quantification in healthy human saliva with surface-enhanced Raman spectroscopy using silver nanopillar substrates », *Lasers in Surgery and Medicine*, vol. 56, n° 2, p. 206-217, 2024, doi: 10.1002/lsm.23746.

[37] J. B. Reece 1944- et N. A. Campbell 1946-, *Campbell biologie*, 4e éd. in ERPI sciences. Saint-Laurent, Montréal: ERPI ; Pearson, 2012.

[38] A. Diaspro, G. Chirico, C. Usai, P. Ramoino, et J. Dobrucki, « Photobleaching », in *Handbook Of Biological Confocal Microscopy*, 2006, p. 690. doi: 10.1007/978-0-387-45524-2\_39.

[39] F. Dallaire *et al.*, « Quantitative spectral quality assessment technique validated using intraoperative in vivo Raman spectroscopy measurements. », *Journal of biomedical optics*, vol. 25, n° 4, p. 1-8, 2020, doi: 10.1117/1.JBO.25.4.040501.

[40] J.-P. Tremblay, F. Lesage, et Q. D. de génie électrique (2001-) École polytechnique (Montréal, « Études de sources de bruit et de facteurs confondants sur la mesure de spectres Raman

de tissus biologiques », École polytechnique de Montréal, Montréal, 2018. [En ligne]. Disponible sur: <https://publications.polymtl.ca/3104/>

[41] J. Snell, A. Sandia National Laboratories (SNL) NM, and Livermore, CA (United States), et 2008 in Albuquerque Proposed for presentation at the Rio Grande American Industrial Hygiene Association Fall Conference held October 16 NM., *Revisions to ANSI Z136.1-2007 : safe use of lasers.* 2008.

[42] R. L. Webb et Open Textbook Library, *Mostly Harmless Statistics*, 1 online resource. vol. in Open textbook library. [Place of publication not identified]: Portland State University Library, 2021. [En ligne]. Disponible sur: <https://open.umn.edu/opentextbooks/textbooks/1083>

[43] W. W. Daniel, *Applied non parametric statistics*. Boston: Houghton Mifflin, 1978.

[44] geeksforgeeks, « How to Perform Dunn's Test in Python », How to Perform Dunn's Test in Python. Consulté le: 26 juin 2024. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.geeksforgeeks.org/how-to-perform-dunns-test-in-python/>

[45] SciPy, « `scipy.stats.kruskal` ». [En ligne]. Disponible sur: <https://docs.scipy.org/doc/scipy/reference/generated/scipy.stats.kruskal.html>

[46] D. Traynor *et al.*, « The potential of biobanked liquid based cytology samples for cervical cancer screening using Raman spectroscopy », *Journal of Biophotonics*, vol. 12, n° 7, 2019, doi: 10.1002/jbio.201800377.

[47] M. R. Cicconi *et al.*, « Iodine solubility and speciation in glasses », *Scientific Reports*, vol. 9, n° 1, p. 1-13, 2019, doi: 10.1038/s41598-019-44274-4.

[48] M. Grissinger, « Look Out for Lugol's: Error-Prevention Strategies for This Strong Iodine Solution. », *Pharmacy and Therapeutics*, p. 412, 2015.

[49] Renishaw, *inVia<sup>TM</sup> InInspect confocal Raman microscope*. 2023. Consulté le: 25 juillet 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.renishaw.com/en/invia-inspect-confocal-raman-microscope--45378>

## ANNEXE A CALCULS DU MPE DE LA PEAU DES SOURCES

Pour le MPE de la peau, il faut suivre les deux règles suivantes :

- 1- Le temps d'exposition ne doit pas être supérieur au MPE d'un pulse unique
- 2- L'irradiance moyenne du pulse ne doit pas être supérieure à la somme du train de pulses de durée T.

Quatre sources ont été utilisées dans cette étude : le laser Raman du microscope *Renishaw* en mode continu à 785 nm, un laser Raman IPS en mode continu à 785 nm, une source DEL *Lumencor*, une source DEL blanche *LS-LWI*.

Tableau A.1 Paramètres du laser Raman *Renishaw* utiles pour le calcul de son MPE de la peau.

	<b>Pour 1 pulse</b>
<b>Longueur d'onde</b>	785 nm
<b>Temps d'exposition</b>	5 s
<b>Puissance</b>	40 mW

Tableau A.2 Paramètres du laser Raman IPS utiles pour le calcul de son MPE de la peau.

	<b>Pour 1 pulse ou 1 accumulation (Salive)</b>	<b>Pour 50 pulses ou accumulations (Salive)</b>	<b>Pour 1 pulse ou accumulation (Test puissance maximale)</b>	<b>Pour 10 pulses ou accumulations (Test puissance maximale)</b>
<b>Longueur d'onde</b>	785 nm	785 nm	785 nm	785 nm
<b>Temps d'exposition</b>	1s à 1.5 s	50s à 75s	0,05s	0,5s
<b>Puissance</b>	500 mW	500 mW (moyenne)	1,483W	1,483W (moyenne)

Tableau A.3 Paramètres de la source blanche *Lumencor* utiles pour le calcul de son MPE de la peau.

	<b>Pour 1 pulse</b>	<b>Pour 1 pulse</b>
<b>Longueur d'onde</b>	Entre 400 nm et 630 nm	Entre 400 nm et 630 nm
<b>Temps d'exposition</b>	30s	50s
<b>Puissance</b>	50 mW	444mW

Tableau A.4 Paramètres de la source blanche LS-LW1 utiles pour le calcul de son MPE de la peau. Il est important de noter qu'il ne s'agit pas d'un laser, mais elle est classée comme un laser classe1.

	<b>Pour 1 pulse</b>
<b>Longueur d'onde</b>	Entre 420 nm et 650 nm
<b>Temps d'exposition</b>	Entre 30s et 150s
<b>Puissance</b>	245 mW

Pour déterminer ces MPE de peau, il faut se référer aux Tableaux 7b et 6a du ANSI Z136.1. [41]

#### Pour le laser Raman *Renishaw* :

Le temps d'exposition se classe dans la catégorie  $[10^{-7} - 10]$  s dans le tableau 7b du ANSI Z136.1, donc sa formule de  $MPE_{peau}$  est :

$$MPE_{peau} = 1.1C_A t^{0.25}$$

Où  $C_A$  est donné dans le Tableau 6a du ANSI Z136.1 selon la longueur d'onde:

$$C_A \text{ Laser Renishaw} = 10^{0.002(\lambda-700)}$$

$$C_A \text{ Laser Renishaw} = 10^{0.002(785-700)} \approx 1.479$$

Donc,

$$MPE_{peau\ Renishaw} = 1.1(1.479)5^{0.25}$$

$$\mathbf{MPE}_{peau\ Renishaw} \cong \mathbf{2,433\ W/cm^2}$$

Pour le laser Raman IPS :

**Tests de SALIVE :**

Le temps d'exposition se classe dans la catégorie [10 à 3 x 10<sup>4</sup>] s dans le tableau 7b du ANSI Z136.1, donc sa formule de MPE<sub>peau</sub> est :

$$MPE_{peau} = 0.2C_A$$

Où C<sub>A</sub> est donné dans le Tableau 6a du ANSI Z136.1 selon la longueur d'onde:

$$C_A\ Laser\ IPS = 10^{0.002(\lambda-700)}$$

$$C_A\ Laser\ IPS = 10^{0.002(785-700)} \approx 1.479$$

Donc le MPE de la peau du laser est de :

$$MPE_{peau\ Laser\ IPS} = 0.2 * 1.479$$

$$\mathbf{MPE}_{peau\ Laser\ IPS} \cong \mathbf{0.295\ W/cm^2}$$

**Test puissance maximale :**

Le temps d'exposition se classe dans la catégorie [10-7 à 10] s dans le tableau 7b du ANSI Z136.1, donc sa formule de MPE<sub>peau</sub> est :

$$MPE_{peau} = 1.1C_{At}^{0.25}$$

Où C<sub>A</sub> est donné dans le Tableau 6a du ANSI Z136.1 selon la longueur d'onde:

$$C_A\ Laser\ IPS = 10^{0.002(\lambda-700)}$$

$$C_A\ Laser\ IPS = 10^{0.002(785-700)} \approx 1.479$$

Donc le MPE de la peau du laser est de :

$$MPE_{peau\ Laser\ IPS\_MAX} = 1.1 * 1.479 * (0.5)^{0.25}$$

$$\mathbf{MPE}_{peau\ Laser\ IPS\_MAX} \cong 1.368\ J/cm^2 = \mathbf{2.736\ W/cm^2}$$

Pour la source de lumière DEL Lumencor :

Le temps d'exposition se classe dans la catégorie [10 à 3 x 10<sup>4</sup>] s dans le tableau 7b du ANSI Z136.1, donc sa formule de MPE<sub>peau</sub> est aussi :

$$\text{MPE}_{\text{peau}} = 0.2C_A$$

Où C<sub>A</sub> est donné dans le Tableau 6a du ANSI Z136.1 selon la longueur d'onde:

$$C_A \text{ Lumencor} = 10$$

Donc le MPE de la peau de la source est de :

$$\text{MPE}_{\text{peau Lumencor}} = \mathbf{0.2 \text{ W/cm}^2}$$

Pour la source de lumière blanche DEL LS-LW1:

Le temps d'exposition se classe dans la catégorie [10 à 3 x 10<sup>4</sup>] s dans le tableau 7b du ANSI Z136.1, donc sa formule de MPE<sub>peau</sub> est aussi :

$$\text{MPE}_{\text{peau}} = 0.2C_A$$

Où C<sub>A</sub> est donné dans le Tableau 6a du ANSI Z136.1 selon la longueur d'onde:

$$C_A \text{ LS-LW1} = 10$$

Donc le MPE de la peau de la source blanche est de :

$$\text{MPE}_{\text{peau LS-LW1}} = \mathbf{0.2 \text{ W/cm}^2}$$

## ANNEXE B INSTRUMENTATION DU SYSTÈME INVIA RENISHAW

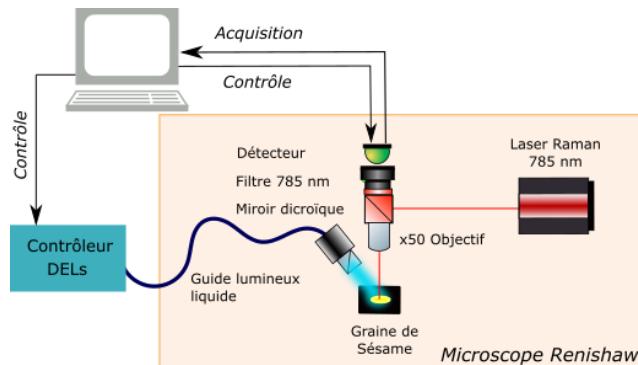


Figure B.1 Montage expérimental de spectroscopie Raman combiné au photoblanchiment avec le microscope Raman *InVia Renishaw*.

Tel que montré à la Figure B.1, le montage se trouve majoritairement à l'intérieur de la cuve du microscope *InVia Renishaw*. Celui-ci permet de prendre les acquisitions de spectres Raman à l'aide du logiciel *Wire* et celui-ci permet aussi de contrôler les paramètres du laser Raman tels que son intensité et le temps d'exposition. La seule composante rajoutée dans la cuve du microscope est le guide d'onde liquide qui amène la source de photoblanchiment, *Lumencor*, à l'échantillon au même point que l'acquisition Raman.

### Protocol de prise de mesures du microscope *InVia Renishaw*

Cette sous-section vise à aider de futures étudiant.es à utiliser le microscope *InVia Renishaw*.

#### Activation du microscope

- Tourner l'interrupteur du microscope pour l'allumer.
- Tourner la clé du laser. Il est préférable d'attendre 30min pour laisser le temps au laser de se réchauffer.
- Sur l'ordinateur du Renishaw, lors du lancement le logiciel de contrôle Wire il faut établir les positions de référence pour les moteurs avec la fonction *Reference all motors*.

**-La calibration doit être refaite si l'ordinateur doit être redémarré.**

#### Calibration

La calibration se fait en 2 étapes, une calibration en y avec du silicium à même le capteur du microscope et une calibration en x à l'aide d'un disque de nylon placé à la position de l'échantillon.

### Calibration en y :

Cette calibration permet de corriger la réponse du système sur les spectres d'échantillon à même le microscope.

-S'assurer que l'ampoule permettant de visualiser l'échantillon dans la cuve est éteinte avant l'acquisition et que la porte de la cuve est fermée.

-Aller dans *Tools* sur *Wire*, puis *Calibration* puis *Quick Calibration*. Un spectre d'un pic entre 520 et  $520.3\text{ cm}^{-1}$  devrait apparaître.

-Sinon, aller dans *Tools*, puis *Calibration* puis *Offset* pour ajuster le pic et refaire l'étape ci-haut jusqu'à être dans la bonne fourchette.

### Calibration en x :

Cette calibration permet de s'assurer de l'emplacement réel des pics d'un échantillon à l'aide d'un dont les pics sont bien connus de la littérature, ici soit du nylon soit de l'acétaminophène.

-Placer le disque de nylon au focus à l'aide de l'objectif X5 et continuer la calibration avec l'objectifs X50 LWD.

-Faire une acquisition en allant dans *Measurements* puis *New* puis *Spectral acquisition* avec les paramètres suivants :

- Nom du fichier : *Calibration\_Nylon\_date* (dans un dossier connu)
- Centre :  $1200\text{ cm}^{-1}$  (*fingerprint*)
- Accumulation : 10
- Temps d'acquisition : 1s
- Puissance du laser Raman : 100%

-Appuyer sur *Run* pour faire l'acquisition. Elle est sauvegardée automatiquement.

-À l'aide du clic-droit sur le spectre obtenu, la fonction *Tools* permet d'aller étudier les pics avec la fonction *Peak to peak*.

-Comparer les positions des pics à l'aide de la référence fournie :

- $955.3\text{ cm}^{-1}$  : 13 287 comptes
- $1131.12\text{ cm}^{-1}$  : 23 575 comptes

- $1443.42 \text{ cm}^{-1}$  : 29 541 comptes
- $1634.86 \text{ cm}^{-1}$  : 20 773 comptes

**Si les positions diffèrent, il faut ajouter un décalage (*offset*) comme avec la calibration en y.**

Protocole de prise de mesure :

Certains paramètres d'acquisition varient en fonction de l'échantillon, mais l'essentiel du protocole reste le même. Toutes les acquisitions sont faites avec l'objectif X50 LWD.

1. Acquisition Raman pré-photoblanchiment.

- ✓ Nom du fichier : NomÉchantillon\_0 (les prochaines acquisitions ajouteront les itérations au nom du fichier)
- ✓ Centre : 1200 cm<sup>-1</sup> (*fingerprint*)
- ✓ Accumulation : 10
- ✓ Temps d'acquisition : 5s
- ✓ Puissance du laser Raman : 100%

2. Photoblanchiment.

- ✓ Temps d'exposition : 30s
- ✓ Puissance de la source : 50mW
- ✓ Longueur d'onde de la source : Tableau 3.3

3. Attente de 30s (afin de s'assurer d'un photoblanchiment permanent de l'échantillon).

4. Acquisition Raman

5. Retour à l'étape 2, 10 fois.

Fermeture du microscope :

-S'assurer d'avoir tous les fichiers sauvegardés

-Éteindre Wire.

-Tourner la clé du laser à OFF.

-Éteindre l'interrupteur du microscope.

-Éteindre le contrôleur des DELs.

## ANNEXE C RÉSULTATS BRUTS

### Salive humaine sèche

Dans cette section, l'ensemble des gouttes de salive humaine sèches sont présentées.

#### Échantillon 1 : fiole # 30030

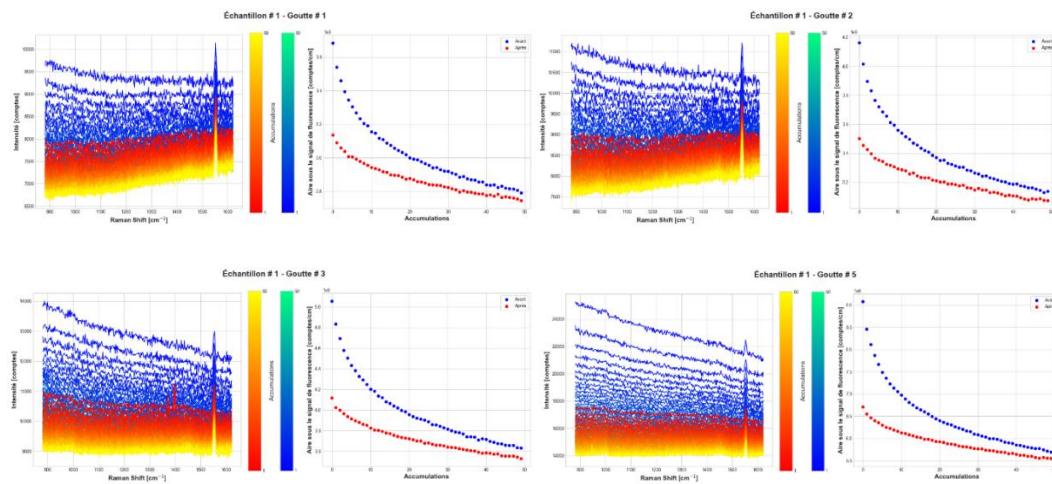
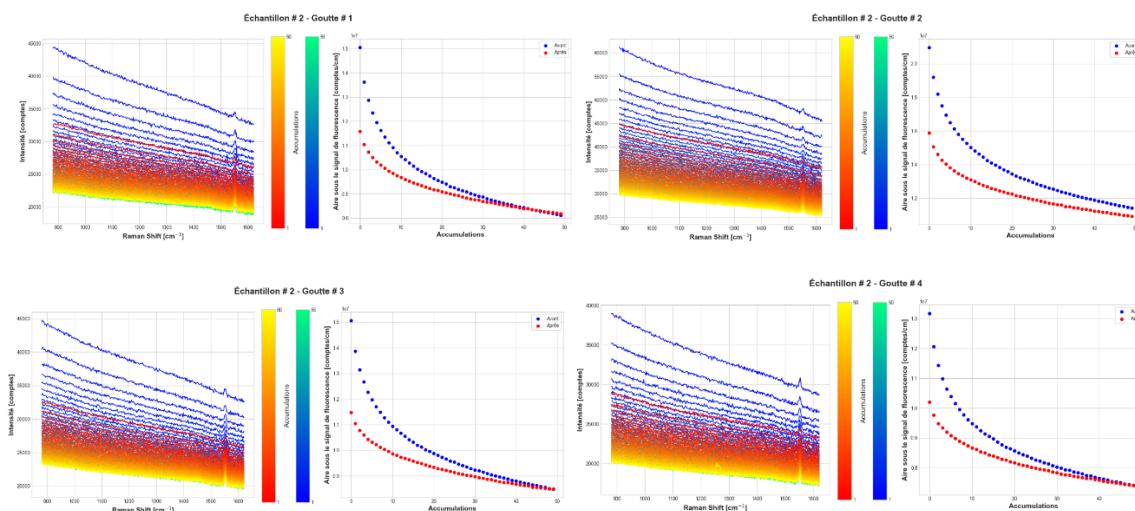


Figure C.1 Résultats bruts des **gouttes de salive sèche #1,2,3 et 5** de l'échantillon 1. À gauche, les accumulations des acquisitions de spectres Raman pré-PB DEL (en nuance de bleu à vert) et post-PB DEL (en nuance de rouge à jaune). À droite, l'évolution de l'aire sous le signal de fluorescence en fonction de leur accumulation respective pour l'acquisition pré-PB DEL (en bleu) et post-PB DEL (en rouge).

#### Échantillon 2 : fiole # 30019



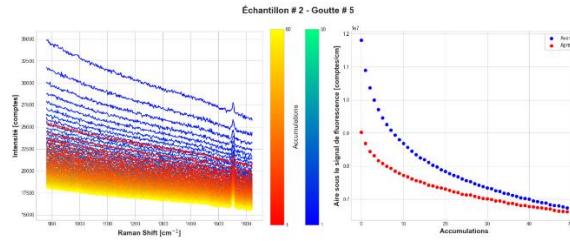


Figure C.2 Résultats bruts des **gouttes de salive sèche #1 à 5** de l'échantillon 2. À gauche, les accumulations des acquisitions de spectres Raman pré-PB DEL (en nuance de bleu à vert) et post-PB DEL (en nuance de rouge à jaune). À droite, l'évolution de l'aire sous le signal de fluorescence en fonction de leur accumulation respective pour l'acquisition pré-PB DEL (en bleu) et post-PB DEL (en rouge).

### Échantillon 3 : fiole # 30046

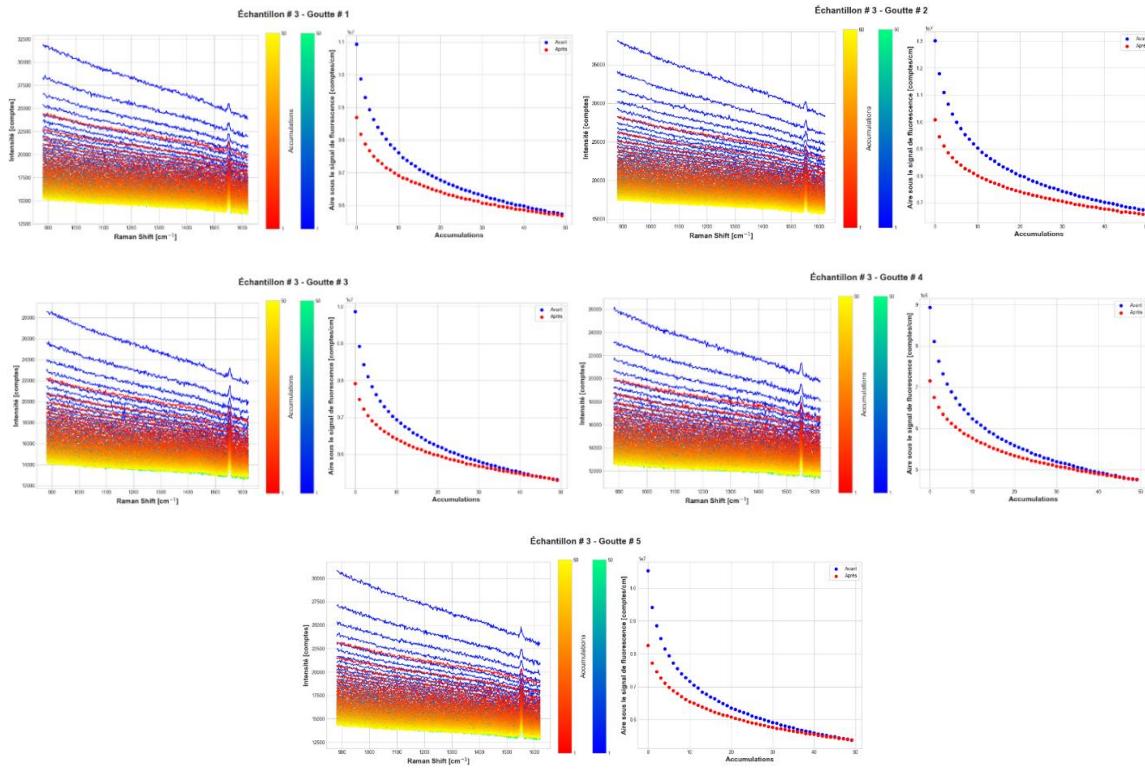


Figure C.3 Résultats bruts des **gouttes de salive sèche #1 à 5** de l'échantillon 3. À gauche, les accumulations des acquisitions de spectres Raman pré-PB DEL (en nuance de bleu à vert) et post-PB DEL (en nuance de rouge à jaune). À droite, l'évolution de l'aire sous le signal de fluorescence en fonction de leur accumulation respective pour l'acquisition pré-PB DEL (en bleu) et post-PB DEL (en rouge).

## Échantillon 4 : fiole # 30049

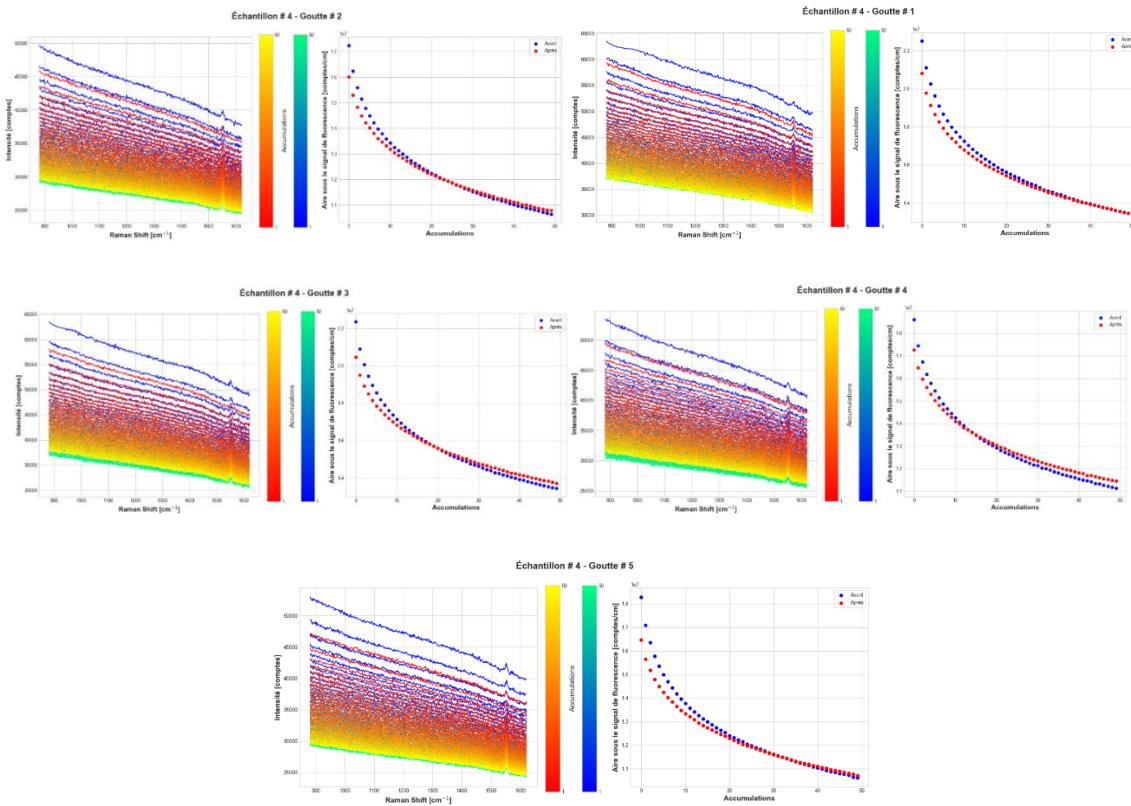
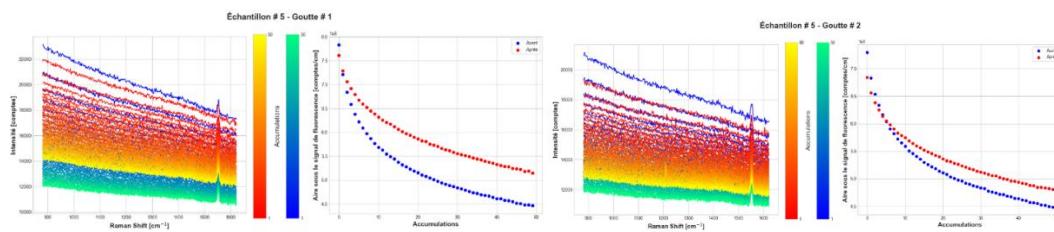


Figure C.4 Résultats bruts des **gouttes de salive sèche #1 à 5** de l'**échantillon 4**. À gauche, les accumulations des acquisitions de spectres Raman pré-PB DEL (en nuance de bleu à vert) et post-PB DEL (en nuance de rouge à jaune). À droite, l'évolution de l'aire sous le signal de fluorescence en fonction de leur accumulation respective pour l'acquisition pré-PB DEL (en bleu) et post-PB DEL (en rouge).

## Échantillon 5 : fiole # 30054



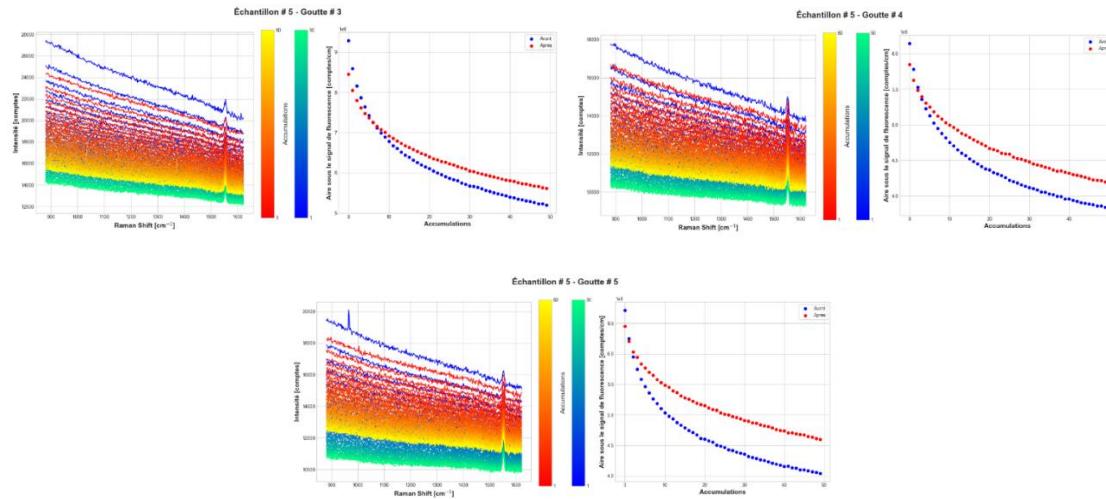


Figure C.5 Résultats bruts des **gouttes de salive sèche #1 à 5** de l'échantillon 5. À gauche, les accumulations des acquisitions de spectres Raman pré-PB DEL (en nuance de bleu à vert) et post-PB DEL (en nuance de rouge à jaune). À droite, l'évolution de l'aire sous le signal de fluorescence en fonction de leur accumulation respective pour l'acquisition pré-PB DEL (en bleu) et post-PB DEL (en rouge).

### Échantillon 6 : fiole # 30045

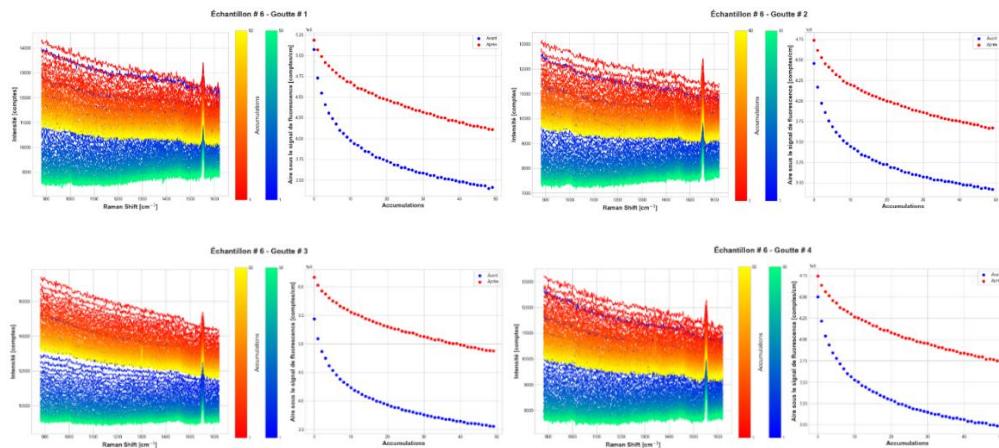


Figure C.6 Résultats bruts des **gouttes de salive sèche #1 à 4** de l'échantillon 6. À gauche, les 50 accumulations des acquisitions de spectres Raman pré-photobranchiment DEL (en nuance de bleu à vert) et post-photobranchiment DEL (en nuance de rouge à jaune). À droite, l'évolution de l'aire sous le signal de fluorescence en fonction de leur accumulation respective pour l'acquisition pré-photobranchiment DEL (en bleu) et post-photobranchiment DEL (en rouge).

### Métriques brutes – salive sèche

L'ensemble de toutes les métriques pour chacun des échantillons et de leurs gouttes sont illustrées.

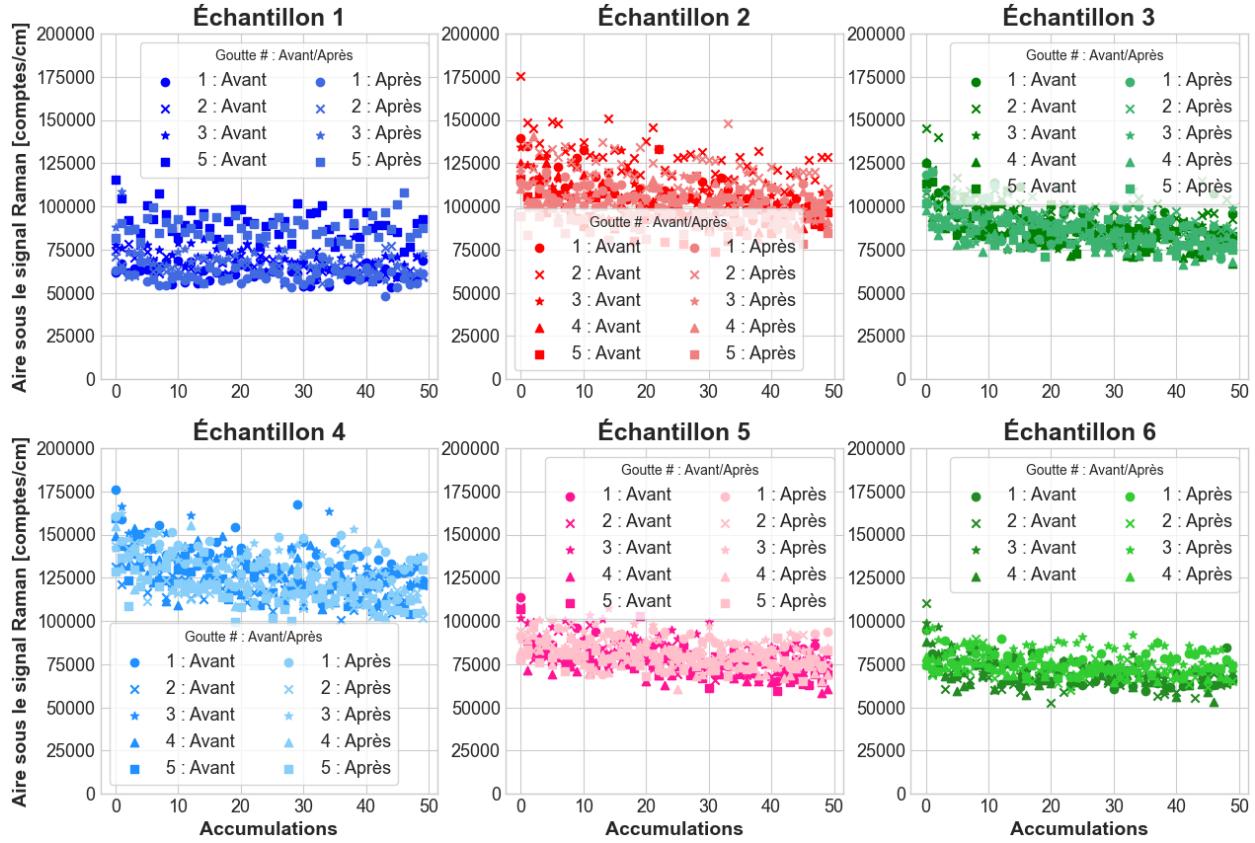


Figure C.7 Les aires sous le signal Raman brutes de chacune des acquisitions avant (en foncé) et après (en pâle) photoblanchiment DEL des gouttes de salive sèche présentées pour chacun des échantillons en fonction de l'accumulation des acquisitions Raman pour tous les échantillons.

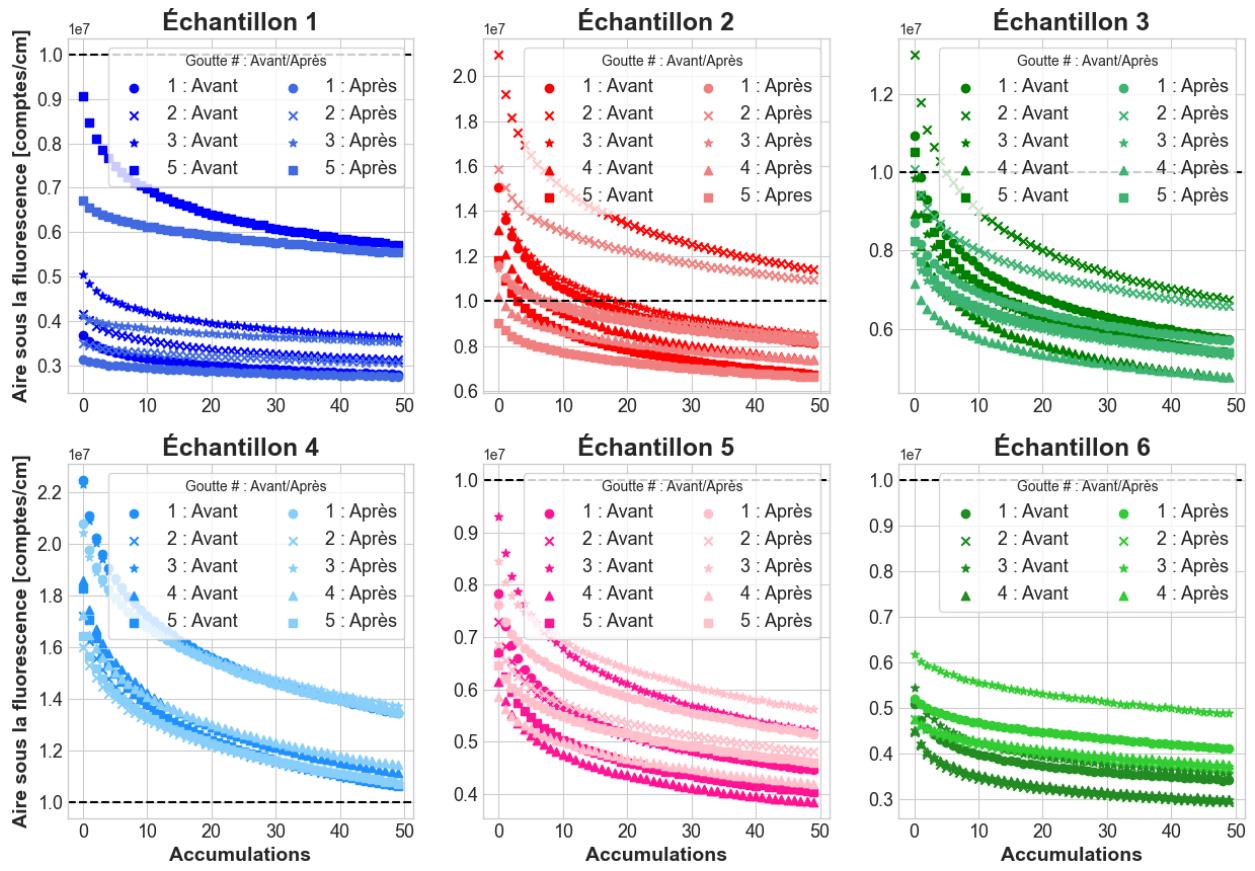


Figure C.8 Les aires sous le signal de fluorescence brutes de chacune des acquisitions avant (en foncé) et après (en pâle) photoblanchiment DEL des gouttes de salive sèche présentées pour chacun des échantillons en fonction de l'accumulation des acquisitions Raman pour tous les échantillons.

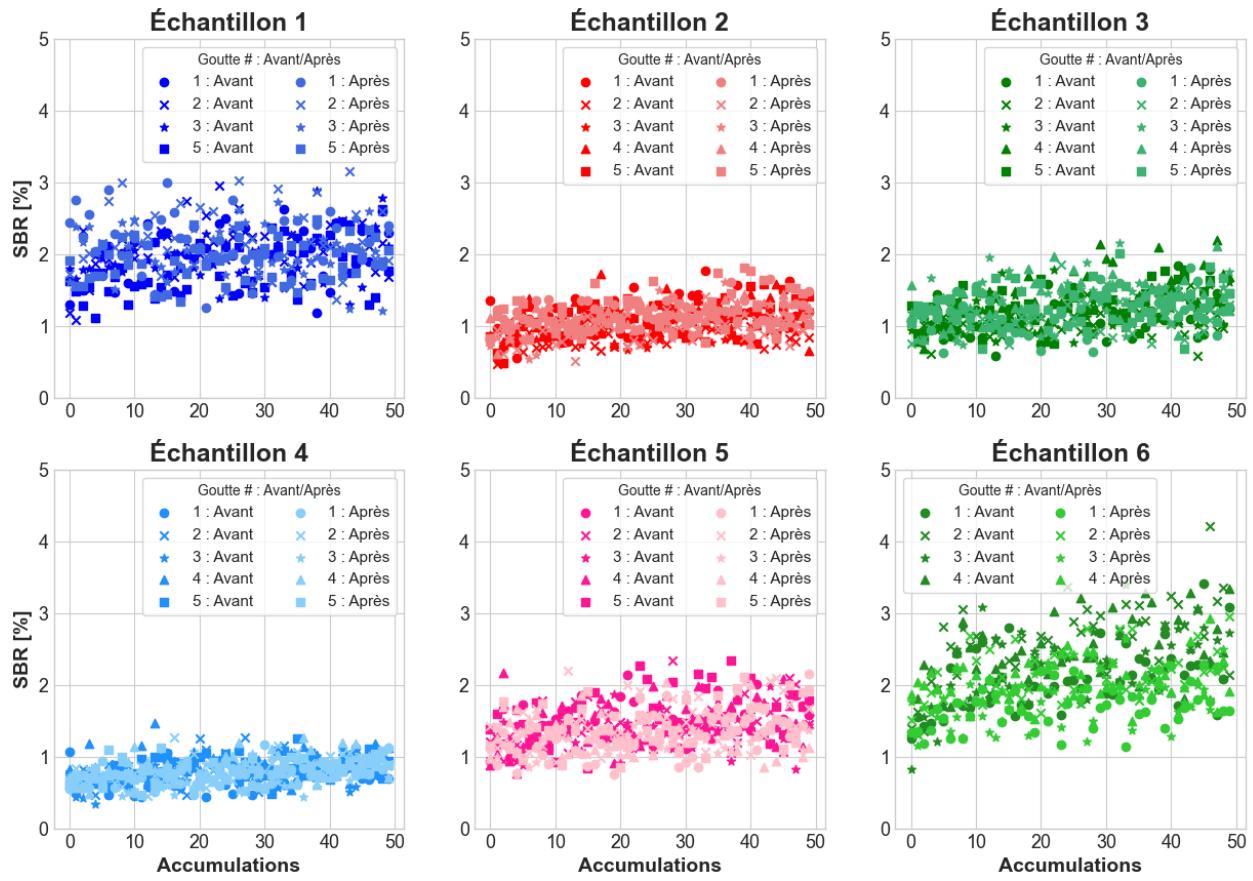


Figure C.9 Les SBR bruts de la bande  $1003\text{ cm}^{-1}$  de chacune des acquisitions avant (en foncé) et après (en pâle) photoblanchiment DEL des gouttes de salive sèche présentées pour chacun des échantillons en fonction de l'accumulation des acquisitions Raman pour tous les échantillons.

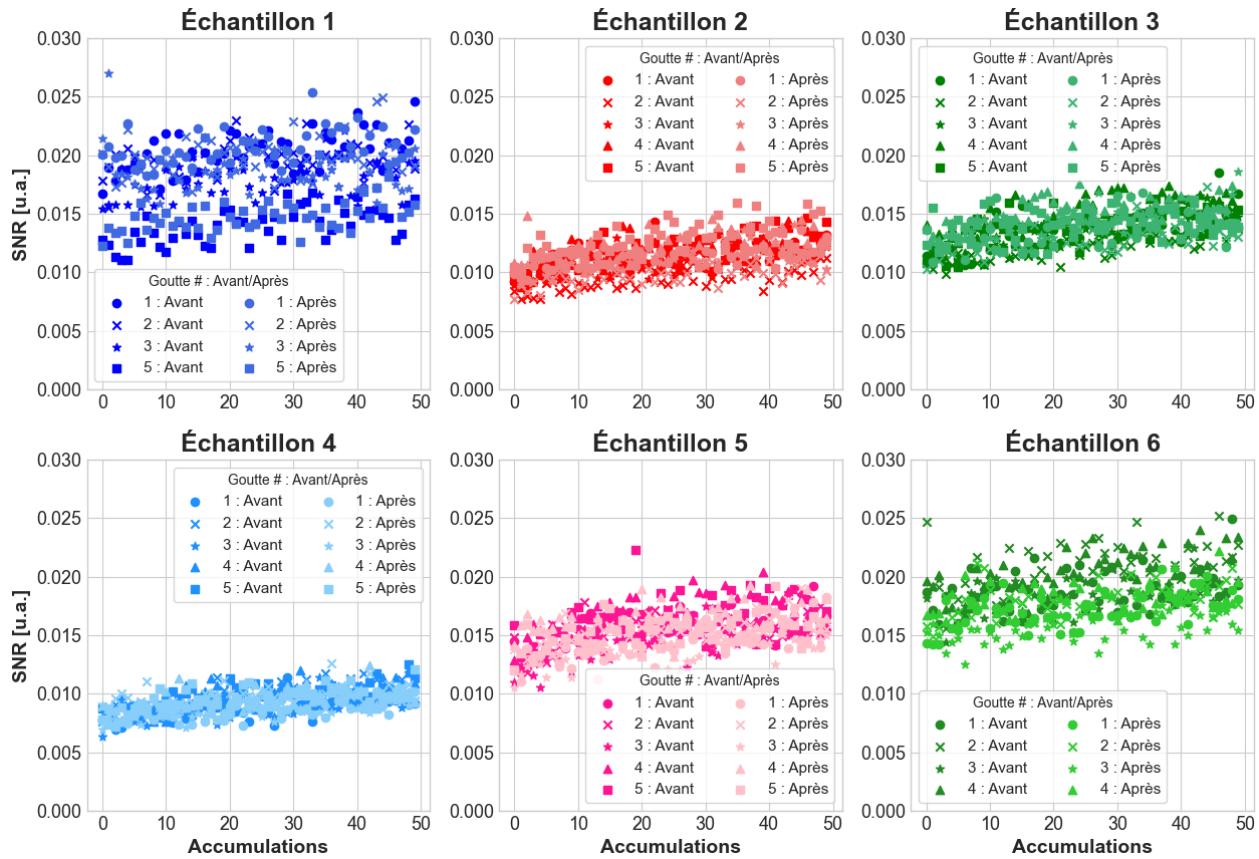


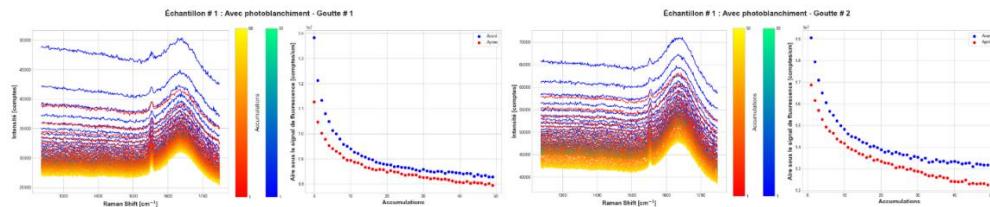
Figure C.10 Les SNR bruts de chacune des acquisitions avant (en foncé) et après (en pâle) photoblanchiment DEL des gouttes de salive sèche présentées pour chacun des échantillons en fonction de l'accumulation des acquisitions Raman pour tous les échantillons.

## Salive humaine liquide

Dans cette section, l'ensemble des gouttes de salive humaine liquide sont présentées.

### Échantillon 1 : fiole # 30047

#### Expériences avec photoblanchiment DEL



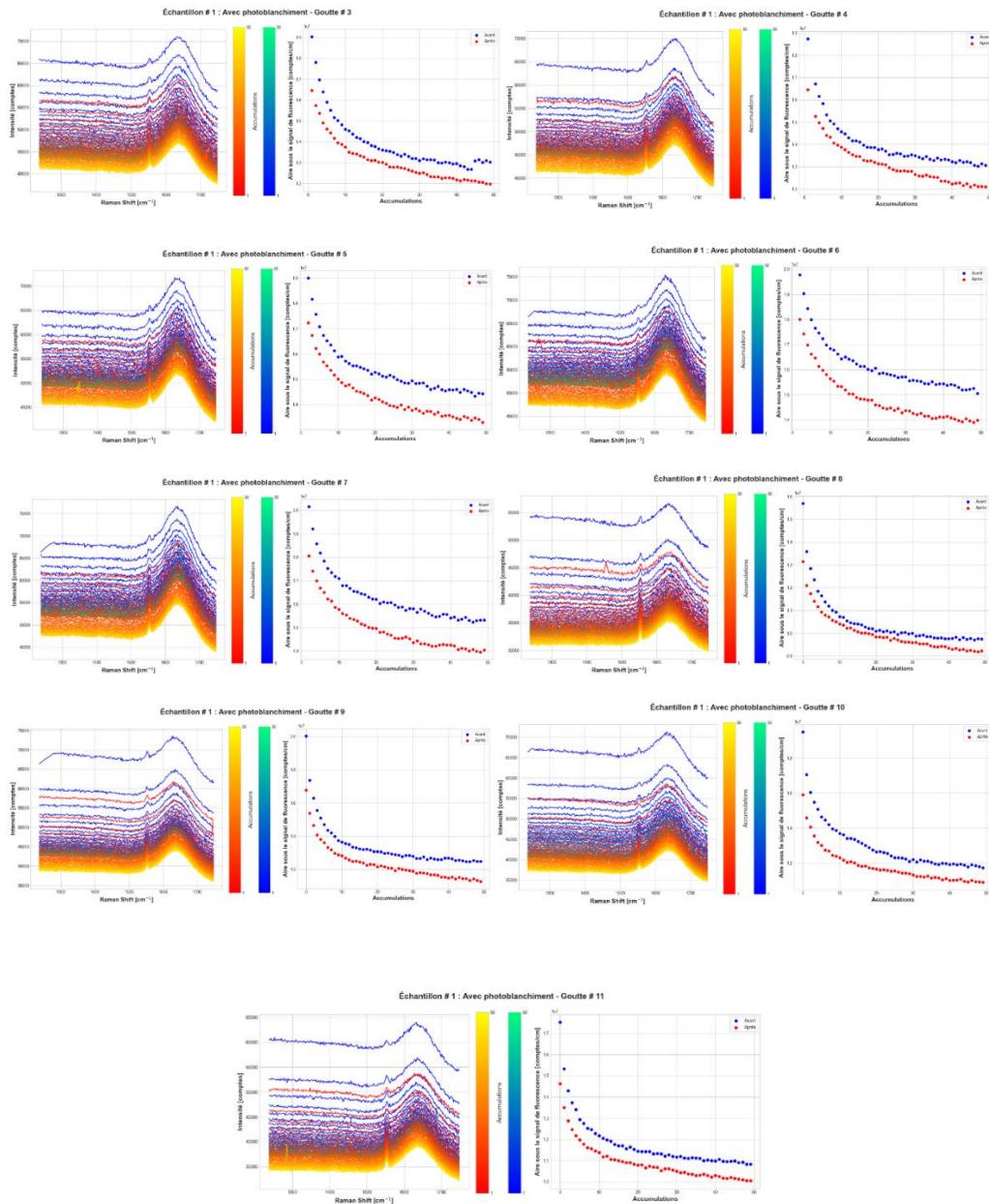


Figure C.11 Résultats bruts des **gouttes de salive liquide # 1 à 11** de l'**échantillon 1** avec **photoblanchiment DEL**. À gauche, les accumulations des acquisitions de spectres Raman pré-PB DEL (en nuance de bleu à vert) et post-PB DEL (en nuance de rouge à jaune). À droite, l'évolution de l'aire sous le signal de fluorescence en fonction de leur accumulation respective pour l'acquisition pré-PB DEL (en bleu) et post-PB DEL (en rouge).

### Expériences sans photoblanchiment DEL

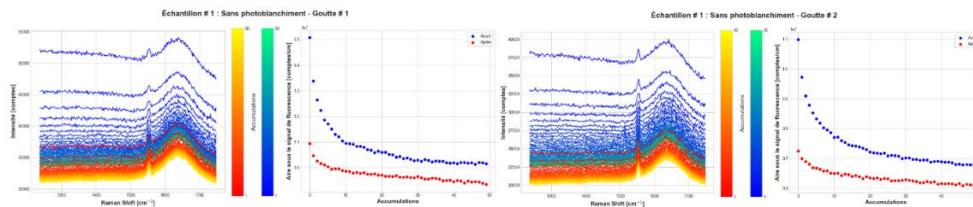


Figure C.12 Résultats bruts des **gouttes de salive liquide #1 et 2 de l'échantillon 1 sans photoblanchiment DEL**. À gauche, les accumulations des acquisitions de spectres Raman de la première acquisition Raman (en nuance de bleu à vert) et la deuxième après la pause de 1min 30s (en nuance de rouge à jaune). À droite, l'évolution de l'aire sous le signal de fluorescence en fonction de leur accumulation respective pour les acquisitions avant la pause de 1min 30s (en bleu) et après (en rouge).

### **Échantillon 2 : fiole # 30042**

### Expériences avec photoblanchiment DEL

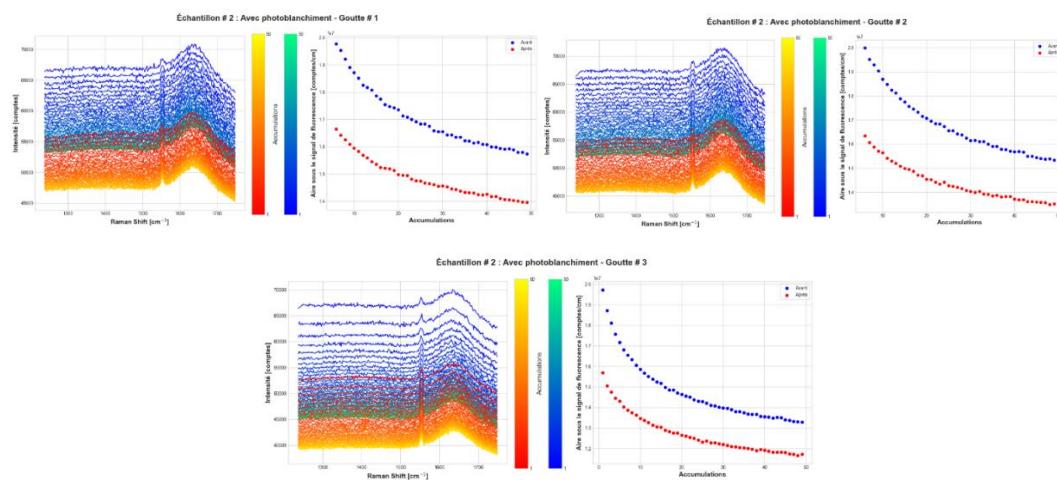


Figure C.13 Résultats bruts des **gouttes de salive liquide #1 à 3 de l'échantillon 2 avec photoblanchiment DEL**. À gauche, les accumulations des acquisitions de spectres Raman pré-PB DEL (en nuance de bleu à vert) et post-PB DEL (en nuance de rouge à jaune). À droite, l'évolution de l'aire sous le signal de fluorescence en fonction de leur accumulation respective pour l'acquisition pré-PB DEL (en bleu) et post-PB DEL (en rouge).

## Échantillon 3 : fiole # 30033

### Expériences avec photoblanchiment DEL

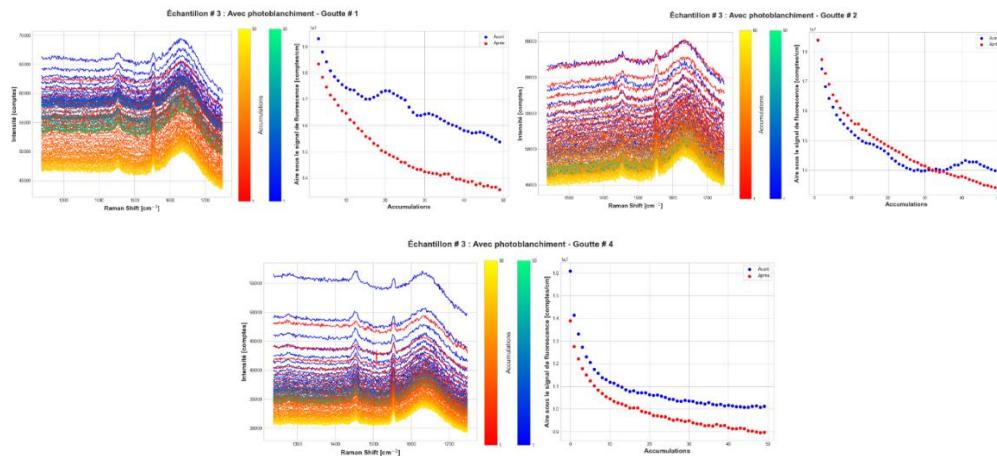


Figure C.14 Résultats bruts des **gouttes de salive liquide #1, 2, et 4** de l'échantillon 3 avec **photoblanchiment DEL**. À gauche, les accumulations des acquisitions de spectres Raman pré-PB DEL (en nuance de bleu à vert) et post-PB DEL (en nuance de rouge à jaune). À droite, l'évolution de l'aire sous le signal de fluorescence en fonction de leur accumulation respective pour l'acquisition pré-PB DEL (en bleu) et post-PB DEL (en rouge).

## Échantillon 4 : fiole # 30017

### Expériences avec photoblanchiment DEL

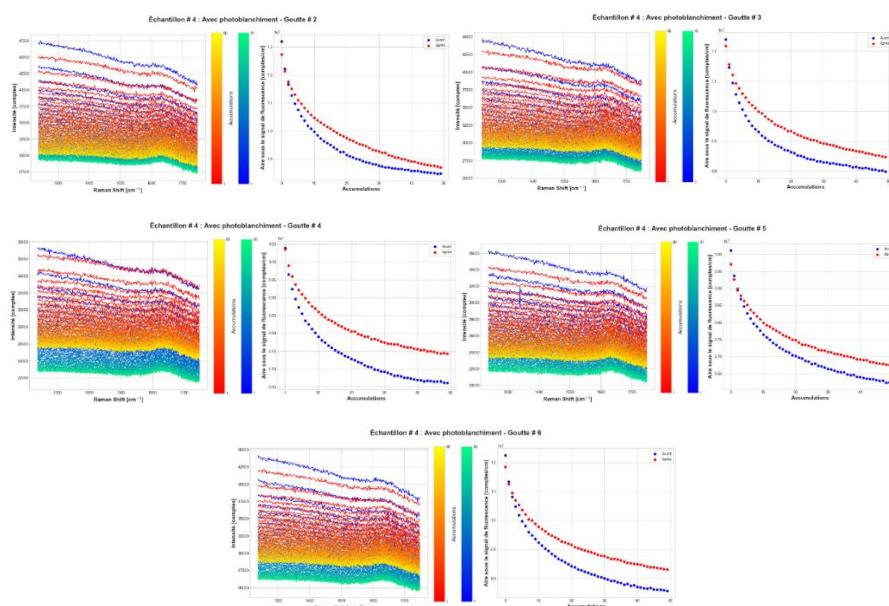


Figure C.15 Résultats bruts des **gouttes de salive liquide # 2 à 6** de l'échantillon 4 avec **photoblanchiment DEL**. À gauche, les accumulations des acquisitions de spectres Raman pré-PB DEL (en nuance de bleu à vert) et post-PB DEL (en nuance de rouge à jaune). À droite, l'évolution de l'aire sous le signal de fluorescence en fonction de leur accumulation respective pour l'acquisition pré-PB DEL (en bleu) et post-PB DEL (en rouge).

### Expériences sans photoblanchiment DEL

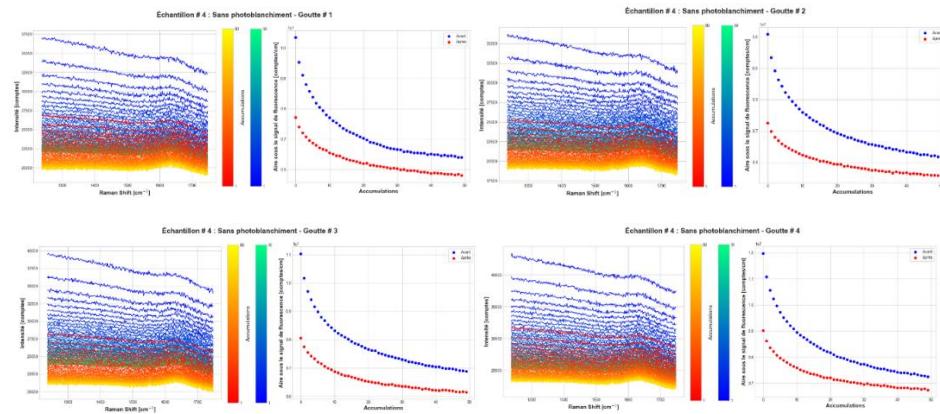
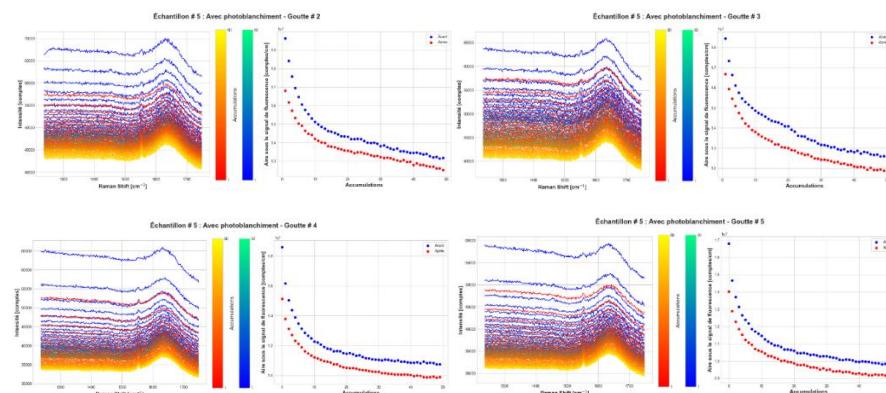


Figure C.16 Résultats bruts des **gouttes de salive liquide #1 à 4** de l'échantillon 4 sans **photoblanchiment DEL**. À gauche, les accumulations des acquisitions de spectres Raman de la première acquisition Raman (en nuance de bleu à vert) et la deuxième après la pause de 1min 30s (en nuance de rouge à jaune). À droite, l'évolution de l'aire sous le signal de fluorescence en fonction de leur accumulation respective pour les acquisitions avant la pause de 1min 30s (en bleu) et après (en rouge).

## Échantillon 5 : fiole # 30022

### Expériences avec photoblanchiment DEL



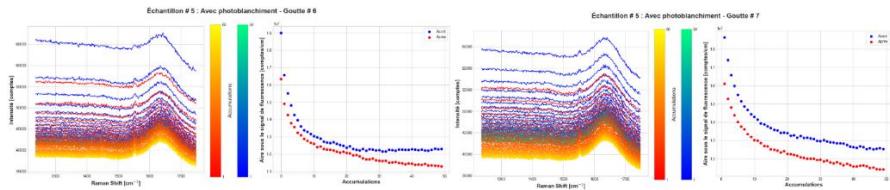


Figure C.17 Résultats bruts des **gouttes de salive liquide # 2 à 7 de l'échantillon 5 avec photoblanchiment DEL**. À gauche, les accumulations des acquisitions de spectres Raman pré-PB DEL (en nuance de bleu à vert) et post-PB DEL (en nuance de rouge à jaune). À droite, l'évolution de l'aire sous le signal de fluorescence en fonction de leur accumulation respective pour l'acquisition pré-PB DEL (en bleu) et post-PB DEL (en rouge).

### Expériences sans photoblanchiment DEL

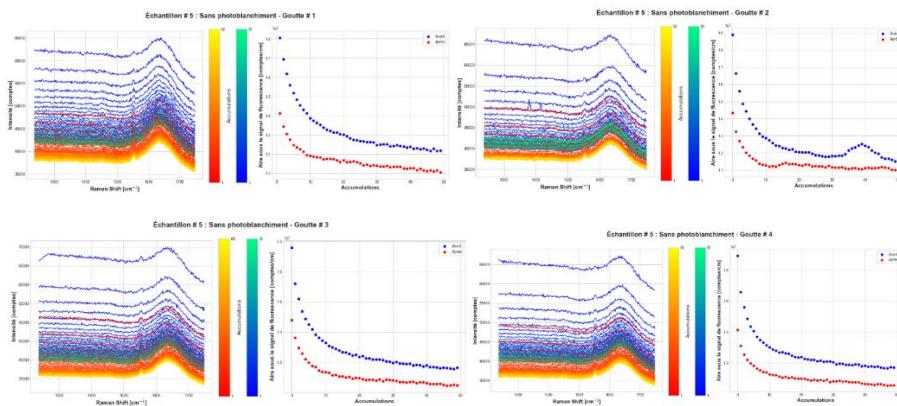


Figure C.18 Résultats bruts des **gouttes de salive liquide # 1 à 4 de l'échantillon 5 sans photoblanchiment DEL**. À gauche, les accumulations des acquisitions de spectres Raman de la première acquisition Raman (en nuance de bleu à vert) et la deuxième après la pause de 1min 30s (en nuance de rouge à jaune). À droite, l'évolution de l'aire sous le signal de fluorescence en fonction de leur accumulation respective pour les acquisitions avant la pause de 1min 30s (en bleu) et après (en rouge).

## Métriques brutes – salive liquide

L'ensemble de toutes les métriques pour chacun des échantillons et de leurs gouttes sont illustrées dans cette section. Ceci permet d'apprécier les tendances brutes de chacun de ces paramètres tout en découpant les effets de photoblanchiment de l'exposition laser Raman et de la DEL blanche.

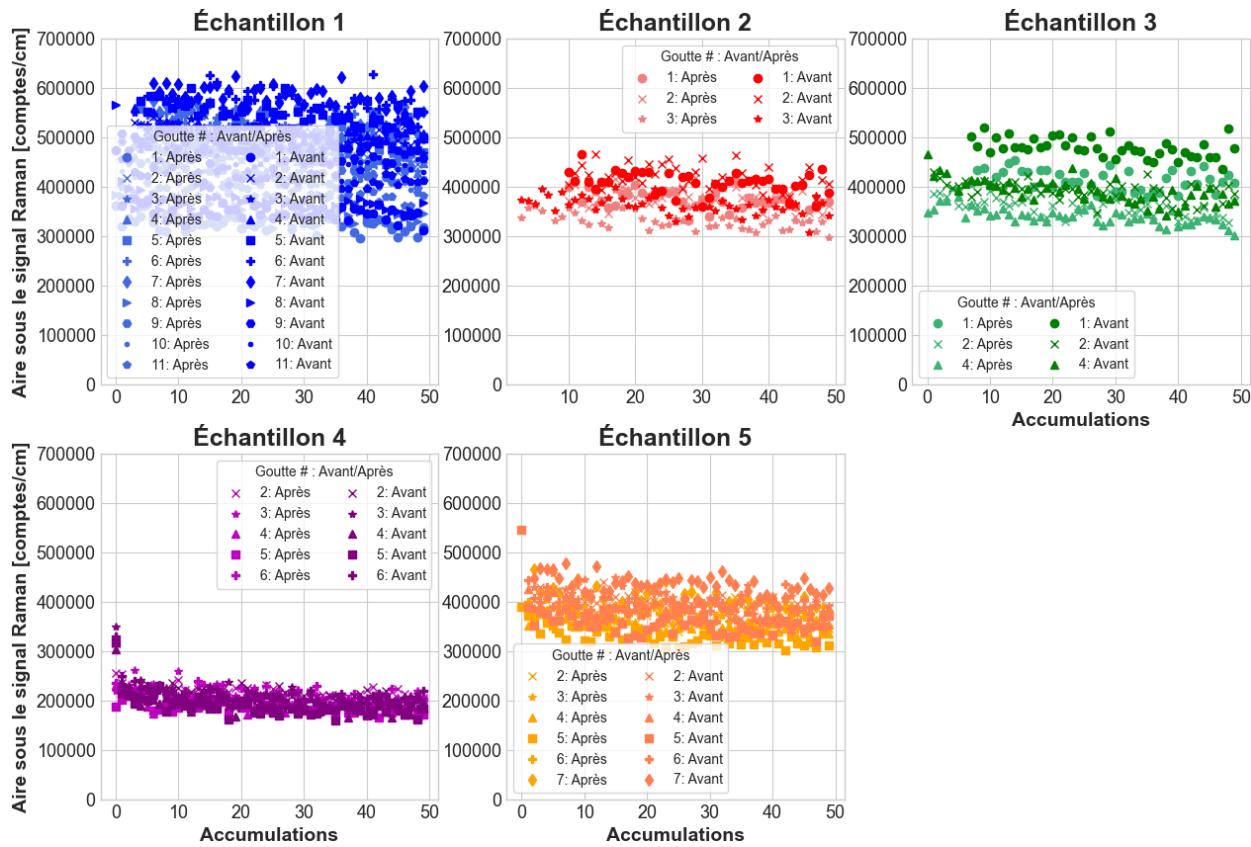


Figure C.19 Les aires sous le signal Raman brutes de chacune des acquisitions avant (en foncé) et après (en pâle) photoblanchiment DEL des gouttes de salive liquide présentées pour chacun des échantillons en fonction de l'accumulation des acquisitions Raman pour tous les échantillons.

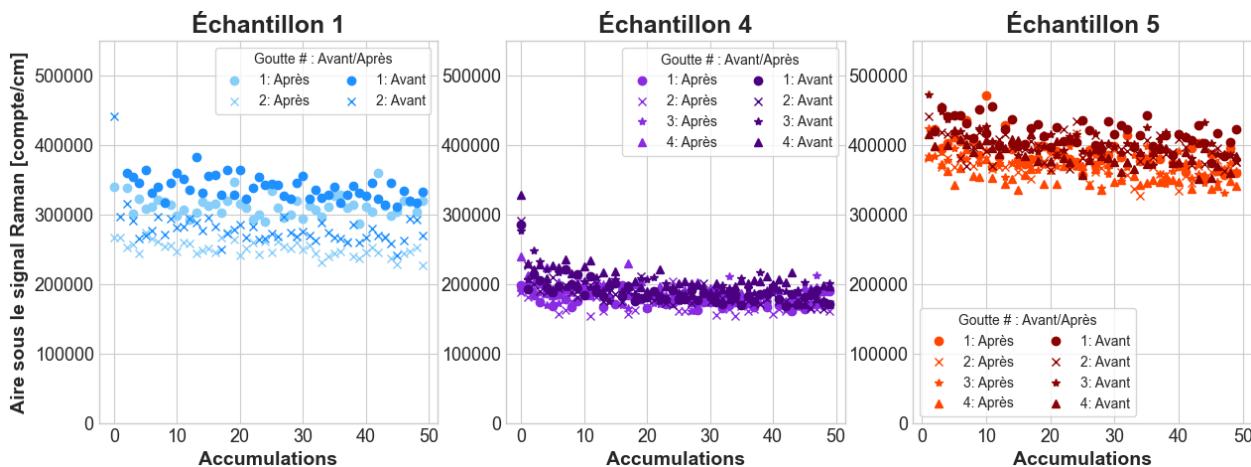


Figure C.20 Les aires sous le signal Raman brutes de chacune des acquisitions avant (en foncé) et après (en pâle) la pause de 1min30s d'exposition lumineuse des gouttes de salive liquide présentées

pour chacun des échantillons en fonction de l'accumulation des acquisitions Raman pour tous les échantillons.

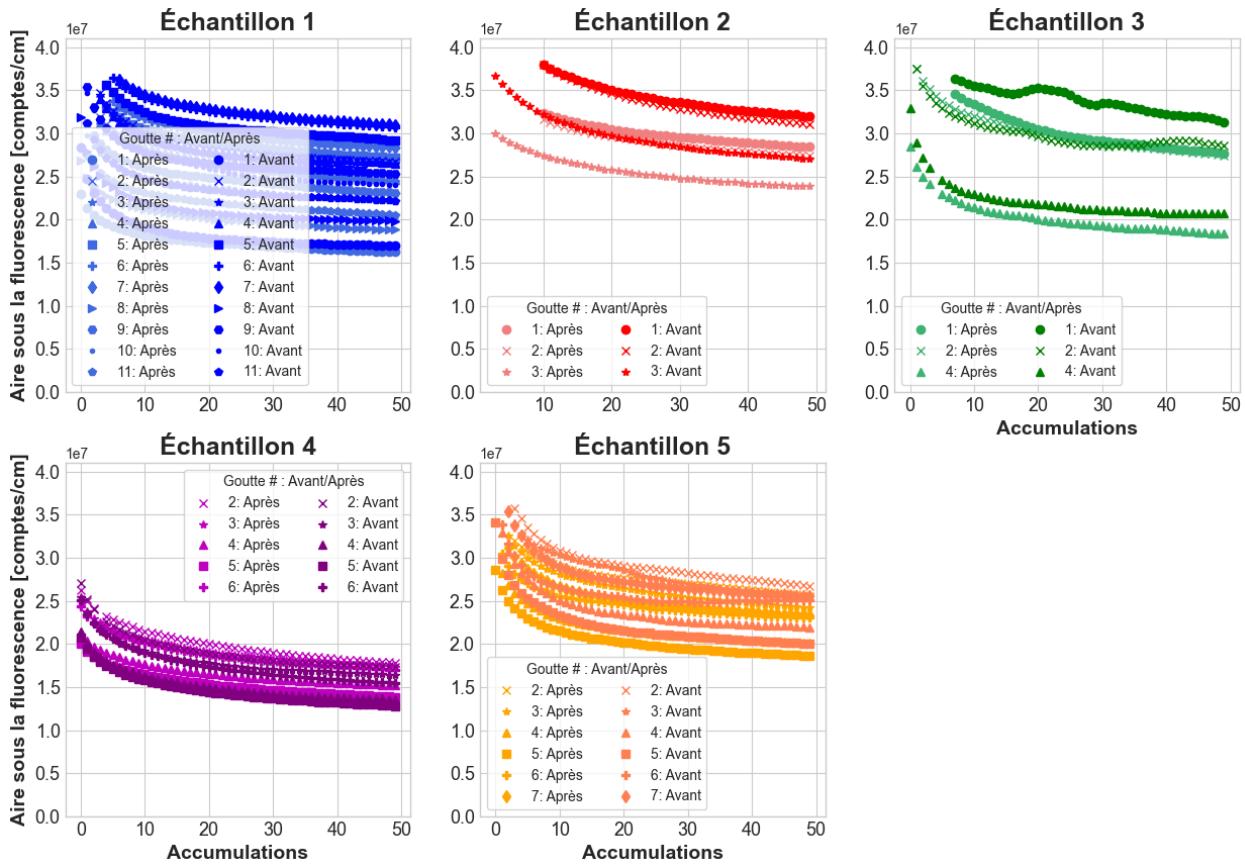


Figure C.21 Les aires sous le signal de fluorescence brutes de chacune des acquisitions avant (en foncé) et après (en pâle) photoblanchiment DEL des gouttes de salive liquide présentées pour chacun des échantillons en fonction de l'accumulation des acquisitions Raman pour tous les échantillons.

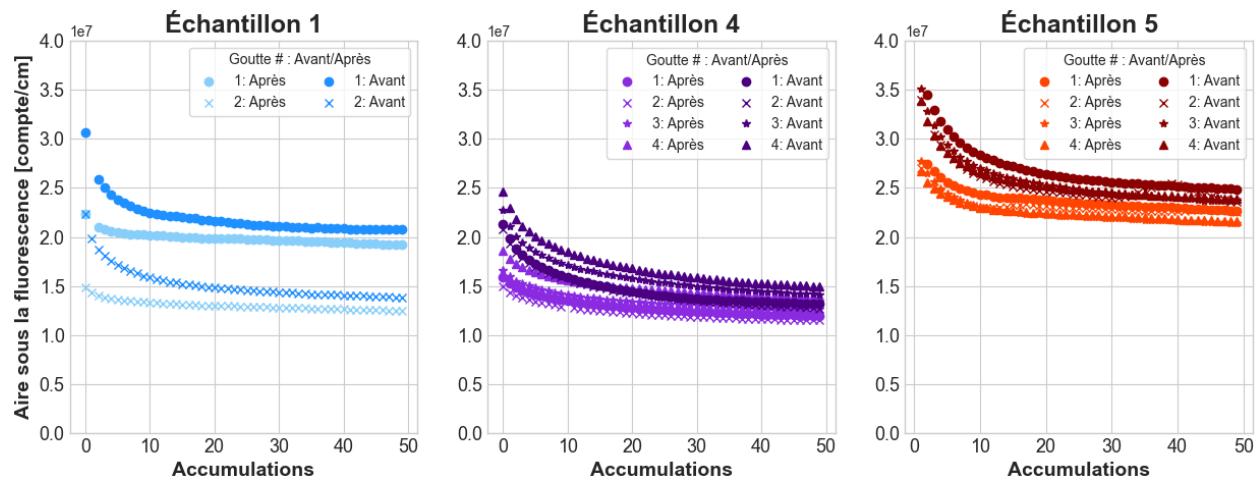


Figure C.22 Les aires sous le signal de fluorescence brutes de chacune des acquisitions avant (en foncé) et après (en pâle) la pause de 1min30s d'exposition lumineuse des gouttes de salive liquide présentées pour chacun des échantillons en fonction de l'accumulation des acquisitions Raman pour tous les échantillons.

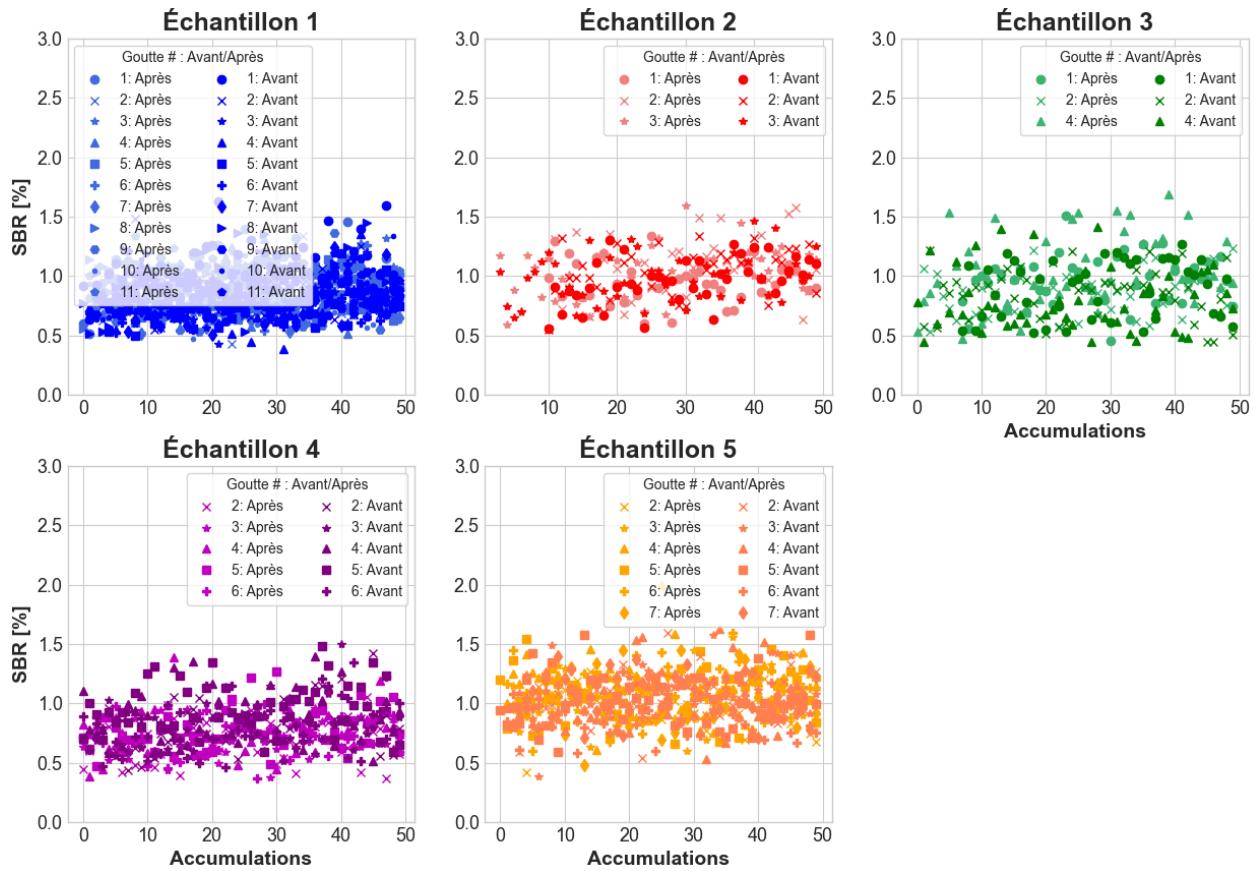


Figure C.23 Les SBR bruts de chacune des acquisitions avant (en foncé) et après (en pâle) PB DEL des gouttes de salive liquide présentées pour chacun des échantillons en fonction de l'accumulation des acquisitions Raman pour tous les échantillons pour la bande  $1003\text{ cm}^{-1}$ .

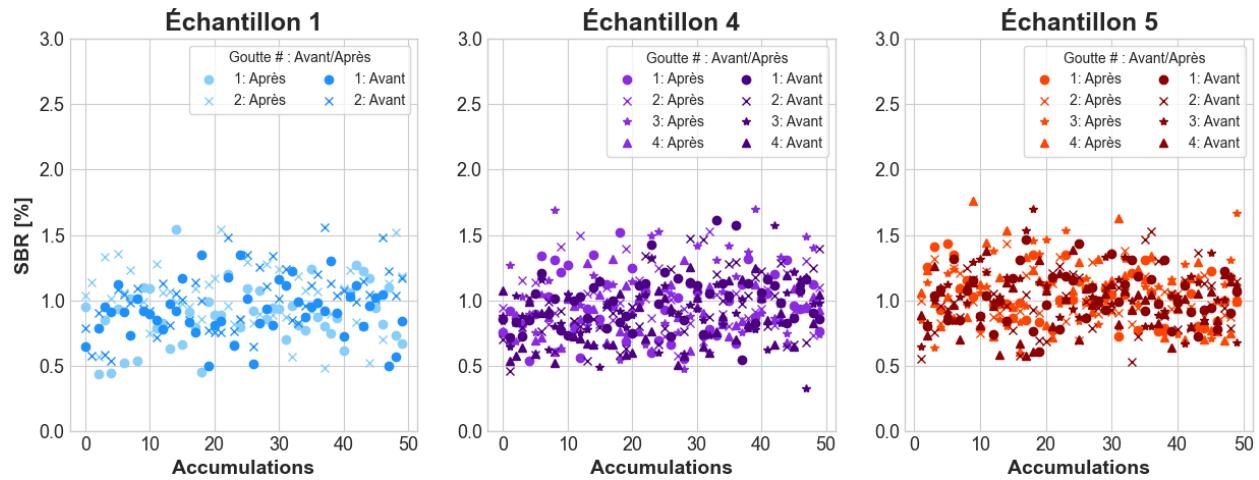


Figure C.24 Les SBR bruts de chacune des acquisitions avant (en foncé) et après (en pâle) la pause de 1min30s d'exposition lumineuse des gouttes de salive liquide présentées pour chacun des échantillons en fonction de l'accumulation des acquisitions Raman pour tous les échantillons pour la bande  $1003\text{ cm}^{-1}$ .

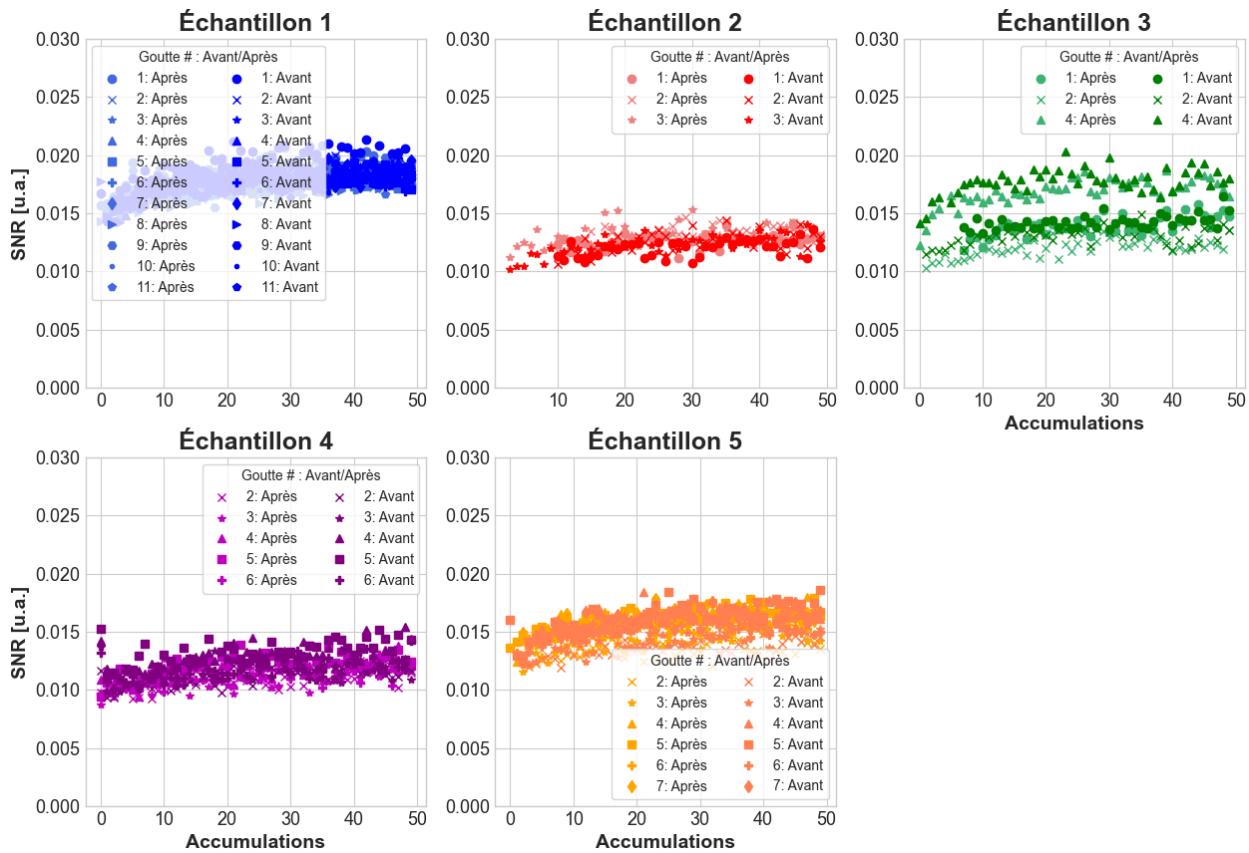


Figure C.25 Les SNR bruts de chacune des acquisitions avant (en foncé) et après (en pâle) photoblanchiment DEL des gouttes de salive liquide présentées pour chacun des échantillons en fonction de l'accumulation des acquisitions Raman pour tous les échantillons.

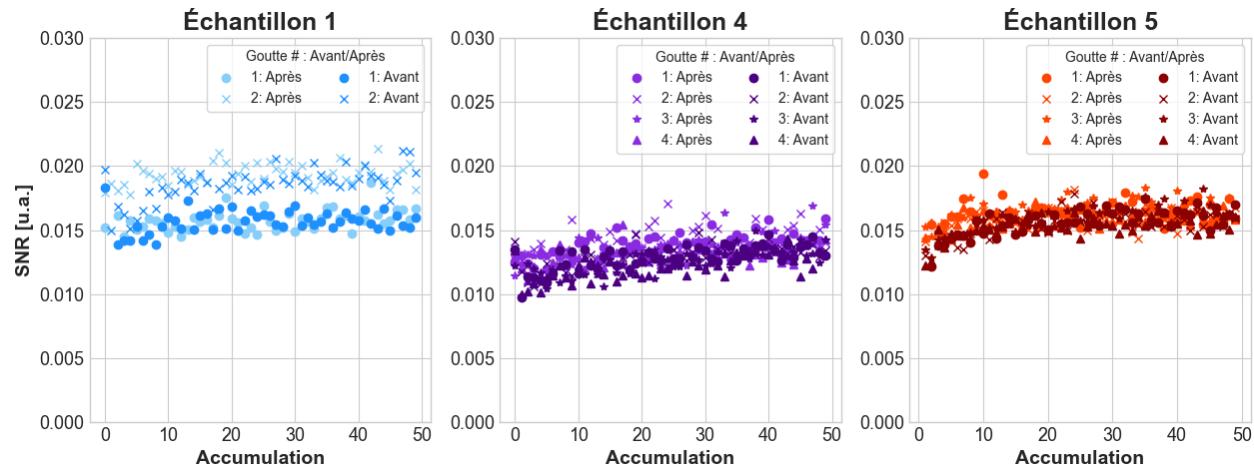


Figure C.26 Les SNR bruts de chacune des acquisitions avant (en foncé) et après (en pâle) la pause de 1min30s d'exposition lumineuse des gouttes de salive liquide présentées pour chacun des échantillons en fonction de l'accumulation des acquisitions Raman pour tous les échantillons.