

Titre:	Développement d'une méthode d'imagerie utilisant la spectroscopie Raman spatialement décalée afin de détecter la signature moléculaire de tissus biologiques
Auteur:	Hugo Tavera
Date:	2025
Type:	Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis
Référence:	Tavera, H. (2025). Développement d'une méthode d'imagerie utilisant la spectroscopie Raman spatialement décalée afin de détecter la signature moléculaire de tissus biologiques [Mémoire de maîtrise, Polytechnique Montréal]. PolyPublie. https://publications.polymtl.ca/66247/
Citation:	

Document en libre accès dans PolyPublie

Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/66247/>
PolyPublie URL:

Directeurs de recherche: Frédéric Leblond
Advisors:

Programme: Génie physique
Program:

POLYTECHNIQUE MONTRÉAL

affiliée à l'Université de Montréal

**Développement d'une méthode d'imagerie utilisant la spectroscopie Raman
spatialement décalée afin de détecter la signature moléculaire de tissus
biologiques**

HUGO TAVERA

Département de génie physique

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

Génie physique

Mai 2025

POLYTECHNIQUE MONTRÉAL

affiliée à l'Université de Montréal

Ce mémoire intitulé :

**Développement d'une méthode d'imagerie utilisant la spectroscopie Raman
spatialement décalée afin de détecter la signature moléculaire de tissus
biologiques**

présenté par **Hugo TAVERA**

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

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

Sébastien FRANCOEUR, président

Frédéric LEBLOND, membre et directeur de recherche

François YU, membre externe

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je voudrais remercier mon directeur de recherche, le professeur Frédéric Leblond, de m'avoir permis de réaliser tout ce travail de recherche au sein de son laboratoire, et ce, depuis mon arrivée lors de mon premier stage. Ce fut une chance énorme que de pouvoir travailler sur des projets si novateurs et profondément utiles pour l'avenir de notre société, au côté de gens passionnés et passionnants. Un merci particulier à Guillaume Sheehy pour son soutien scientifique énorme et ses anecdotes en tout genre. Merci aussi à tous les membres du laboratoire, anciens et actuels, pour tous leurs conseils tout au long de mes études.

Merci à PolyPhoto, mon comité de cœur, de m'avoir soutenu moralement et permis de continuer à développer ma passion pendant mes études. J'ai pu continuer d'apprendre sur divers aspects de la photographie, et y ai rencontré de nombreuses personnes talentueuses avec qui j'ai pu partager cette passion.

Finalement, je tiens à remercier mes parents, pour leur soutien inconditionnel tout au long de ce processus éreintant qu'est la poursuite aux études supérieures. Je n'aurais sans doute pas atteint le stade actuel de mon projet sans eux.

RÉSUMÉ

Le diagnostic précoce du cancer est un enjeu de grande importance, car il permet d'augmenter significativement les chances de survie des patients. Si la tumeur ne s'est pas encore répandue dans l'organisme, alors l'opération chirurgicale d'excision de la tumeur est le traitement le plus efficace. Cependant, le chirurgien doit pouvoir identifier les zones touchées par le cancer et l'inspection visuelle n'est pas toujours suffisante. La spectroscopie Raman est une technique de détection moléculaire spécifique reposant sur la diffusion inélastique des photons dans les tissus biologiques.

Des algorithmes de classification des tissus sains et cancéreux développés à partir de signal Raman ont montré leur efficacité pour des systèmes d'illumination à point unique. Cependant, ces modèles de classification n'ont jamais été testés pour un système de spectroscopie Raman à balayage linéaire. Un protocole d'imagerie d'échantillons issus de cancers du sein et du cerveau a alors été développé, dans le but de vérifier l'efficacité des modèles préalablement entraînés. La densité cellulaire des échantillons est aussi un indicateur de l'état du tissu. Un algorithme de calcul de la densité cellulaire à partir des coupes histologiques des échantillons de tumeurs cérébrales a été créé afin de différencier les zones nécrosées, cancéreuses et saines des échantillons.

Le signal Raman mesuré est un signal de surface, et les tissus cancéreux peuvent se situer en dessous d'un autre type de tissu biologique, alors indétectables par la spectroscopie Raman conventionnelle et non visibles par le chirurgien. Une technique de spectroscopie Raman pour la détection en profondeur a alors été développée, en créant un décalage spatial entre le site d'illumination du laser et le site de mesure du signal Raman. La diffusion des photons dans les tissus biologiques permet de mesurer les photons Raman émis par des couches plus profondes à une distance latérale spécifique par rapport au point d'illumination laser. Le système de spectroscopie Raman à balayage linéaire a la capacité de désynchroniser les sites d'illumination et de mesure, permettant l'usage de la spectroscopie Raman décalée spatialement. Un groupe de 60 fantômes optiques solides à deux couches (PDMS/Nylon) a été réalisé, avec différentes variations d'absorption et de diffusion de la couche supérieure. Une expérience de spectroscopie Raman décalée spatialement effectuée avec des tissus biologiques a aussi été réalisée comme preuve de concept. Le système a été capable de détecter un signal Raman jusqu'à 3 mm de profondeur en fonction des propriétés optiques de la couche supérieure des fantômes optiques, et jusqu'à 10 mm pour la preuve de concept.

ABSTRACT

Early diagnosis of cancer is an issue of great importance because it allows to significantly increase the chances of survival of patients. If the tumour has not yet spread into the body, then surgical removal of the tumour is the most effective treatment. However, the surgeon must be able to identify areas affected by cancer, and visual inspection is not always sufficient. Raman spectroscopy is a specific molecular detection technique based on the inelastic diffusion of photons in biological tissues.

Algorithms for the classification of healthy and cancerous tissues developed from Raman signals have shown their effectiveness for single point illumination systems. However, these classification models have never been tested for a line-scanning Raman spectroscopy system. An imaging protocol of samples from breast and brain cancer was then developed, in order to verify the effectiveness of previously trained models. The cell density of samples is also an indicator of tissue conditions. An algorithm for calculating cell density from histological sections of brain tumour samples was created to differentiate necrotic, cancerous and healthy areas in the samples.

The measured Raman signal is a surface signal, and the cancerous tissue may be below another type of biological tissue, then undetectable by conventional Raman spectroscopy, and not visible to the surgeon. A Raman spectroscopy technique for deep sensing was developed, creating a spatial shift between the laser illumination site and the Raman signal measurement site. The phenomenon of photon scattering in biological tissues makes it possible to measure Raman photons coming from deeper layers at a certain lateral distance from the laser illumination site. The line-scanning Raman spectroscopy system has the ability to de-synchronize illumination and measurement sites, allowing the use of spatially offset Raman spectroscopy. A group of 60 two-layer solid optical phantoms (PDMS/Nylon) was realized, with different variations in absorption and diffusion of the upper layer. A spatially offset Raman spectroscopy experiment with biological tissues was also performed as proof of concept. The system was able to detect Raman signal up to 3 mm depth depending on the optical properties of the upper layer in optical phantoms, and up to 10 mm in the proof of concept.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	III
RÉSUMÉ.....	IV
ABSTRACT	V
TABLE DES MATIÈRES	VI
LISTE DES TABLEAUX.....	IX
LISTE DES FIGURES.....	X
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XIII
CHAPITRE 1 INTRODUCTION.....	1
1.1 Hypothèses et objectifs.....	2
1.2 Organisation de ce mémoire.....	3
CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE	5
2.1 Propagation des photons dans les tissus biologiques	5
2.1.1 Fondement et origine physique	5
2.1.2 Absorption des tissus biologiques	8
2.1.3 Diffusion dans les tissus biologiques	9
2.1.4 Fluorescence des tissus biologiques	14
2.2 Spectroscopie Raman : Instrumentation et méthodes	16
2.2.1 Composants d'un système de spectroscopie Raman	19
2.2.2 Caractérisation des tissus biologiques.....	20
2.3 Spectroscopie Raman décalée spatialement.....	22
2.3.1 Différences par rapport à la spectroscopie Raman conventionnelle	22
2.3.2 Méthodes numériques et fantômes optiques	24
CHAPITRE 3 DÉMARCHE DE L'ENSEMBLE DU TRAVAIL DE RECHERCHE.....	27

3.1	Système macroscopique de spectroscopie Raman à balayage linéaire	27
3.1.1	Description générale.....	27
3.1.2	Description des composants	29
3.1.3	Acquisitions.....	31
3.2	Prototypage du système pour un usage en clinique.....	32
3.3	Protocole d'imagerie <i>ex-vivo</i> en cancer du sein	34
3.4	Protocole de calcul de la densité cellulaire en cancer du cerveau.....	36
3.5	Développement de fantômes optiques pour l'imagerie SORS	37
CHAPITRE 4 ARTICLE 1: AN EXPERIMENTAL METHOD TO ASSESS DEPTH SENSING LIMITS OF INELASTIC SCATTERING MEASUREMENTS USING SPATIAL-OFFSET RAMAN SPECTROSCOPY IMAGING		39
4.1	Mise en contexte.....	39
4.2	Abstract	40
4.3	Introduction	41
4.4	Materials and Methods	43
4.4.1	Tissue phantoms	43
4.4.2	Imaging system	45
4.4.3	Imaging protocol	46
4.4.4	Data processing	47
4.4.5	Proof of concept: bi-layer biological phantoms	49
4.5	Results	49
4.5.1	Bi-layer PDMS/Nylon phantoms	49
4.5.2	Estimated penetration depth in synthetic bi-layer phantoms	52
4.5.3	Depth sensing proof-of-principle study in bi-layer biological phantoms	56
4.6	Discussion	56

4.7	Acknowledgments	59
4.8	Conflict of interest.....	59
4.9	Code, Data and Materials Availability	59
CHAPITRE 5 DISCUSSION GÉNÉRALE		60
5.1	Retour sur les objectifs	60
5.2	Avantages de la solution proposée	61
5.3	Défis rencontrés.....	62
CHAPITRE 6 CONCLUSION		64
RÉFÉRENCES		66

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1 Pics d'excitation et d'émission des fluorophores endogènes communs dans les tissus biologiques. Traduit et adapté de [20].....	16
Tableau 2.2 Interprétation spectrales de quelques pics Raman importants présents dans les tissus biologiques. Traduit et adapté de [28].....	21
Tableau 2.3 Résumé des différents fantômes optiques réalisés pour des études SORS. Traduit et adapté de [60].	25
Table 4.1 Concentrations of absorption and scattering agents mixed with PDMS for the ten different optical phantom recipes. Letters A or D in the recipe name referred to the presence of either an absorbing or a diffusive agent, respectively. An X meant no agent was used...	44
Table 4.2 List of all the PDMS layer thicknesses for each PDMS recipe. Letters A, D, or X in the recipe name refer to the presence of absorbing agent (A), diffusive agent (D), or if the respective agent is not present (X). PDMS layer thickness #1 is not shown because it was only used to measure optical properties and is not a dual layer optical phantom. Absorption coefficient μ_a and reduced scattering coefficient μ_s' are evaluated at 785 nm, as the mean value between the values at 780 nm and 790 nm calculated by IAD software.	49
Table 4.3 List of the recipes used to achieved different optical properties (absorption, reduced elastic scattering) for the PDMS layer with corresponding parameters A and φ of the fitted curves in Figure 4.4.....	54

LISTE DES FIGURES

Figure 2.1 Diagramme de Jablonski démontrant les différents types d'interaction lumière-matière, soit l'absorption, l'émission spontanée et la diffusion incluant la diffusion de Rayleigh, et les diffusions de Raman Stokes et anti-Stokes. Traduit et adapté de [13].....	7
Figure 2.2 Modes vibrationnels d'un groupe CH ₂ d'une molécule et leur énergie ν exprimée en nombre d'onde. Tiré de [15].	12
Figure 2.3 Définition des angles θ et φ lors de la diffusion par une particule. Tiré de [17].	13
Figure 2.4 Diagramme de Jablonski (à gauche) et spectres d'absorption (violet) et d'émission (bleu) de la fluorescence d'une molécule. Tiré de [19].....	15
Figure 2.5 Spectre Raman brut (en bleu) et corrigé (en orange) pour la fluorescence (en vert) du Nylon.....	17
Figure 2.6 Fenêtre thérapeutique optique où l'absorption de l'hémoglobine oxydée (HbO ₂) et désoxydée (Hb) et de l'eau (H ₂ O) est la plus faible. Tiré de [24].....	19
Figure 2.7 Spectre Raman d'un tissu cérébral sain (en noir) et d'une tumeur cérébrale (en rouge) ainsi que certains pics Raman communs. Adapté de [10].....	21
Figure 2.8 Parcours des photons diffusés et collectés selon la méthode expérimentale typique de SORS. Tiré de [34].....	22
Figure 3.1 Schéma du système optique du système de spectroscopie Raman par balayage linéaire, et ses trois parties principales : (a) la sonde d'imagerie ; (b) la branche d'excitation ; (c) la branche de collection. Traduit et adapté de [26].....	29
Figure 3.2 Interface utilisateur des différents panneaux de contrôle du logiciel du système Raman à balayage linéaire.....	31
Figure 3.3 Comparaison de l'effet de la fluorescence provenant de l'époxy utilisée dans le museau de la sonde. L'époxy 353 (en haut) a été testé sur du gras de porc et l'époxy 320 (en bas) sur du Nylon. Moyenne et écart-type de 1440 spectres. Les axes des ordonnées ne sont pas à la même échelle.....	34

Figure 3.4 Résultats de 5 sur 8 des échantillons de cancer du sein imaginés. Le protocole d'imagerie <i>ex-vivo</i> développé ici à permis d'obtenir les images de la colonne <i>White-light</i> et <i>Classification</i> . Tiré et adapté de [72].	36
Figure 3.5 Comparaison des cartes de densité cellulaire d'une image histologique (a) sans correction ; (b) corrigé pour les effets de bord du tissu ; (c) corrigé pour les effets de bords du tissu et de l'image.....	37
Figure 4.1 Schematic depiction of the experimental protocol used to image the two-layer PDMS/Nylon optical phantoms: (a) spectra of pure PDMS (blue/top) and Nylon (orange/bottom) obtained by averaging n measurements acquired with the line-scanning system with a spatial offset $\Delta s = 0$ mm; (b) SORS imaging protocol associated with a fixed laser line and a detection line scanned at different offsets values Δs from 0 to 10 mm by 0.25 mm increments. The imaging protocol was repeated for all 60 optical phantoms, each different layer thicknesses t and optical properties (absorption and elastic scattering)......	46
Figure 4.2 Proof-of-concept imaging protocol: (a) Average and standard deviation of pure spectrum of olive oil (top/blue) and muscle tissue (orange/bottom); (b) imaging protocol where the laser line is fixed, and the scanning line is progressively moved away from the laser line. The muscle cube is immersed in olive oil, and the oil layer thickness is measured by the difference in height of the two media.....	49
Figure 4.3 Spectral Angle Mapper (SAM) metric evaluated for PDMS and Nylon spectra for a representative optical phantom: C02XD5 ($t = 1650 \mu\text{m}$, $\mu_a = 0.09 \text{ cm}^{-1}$, $\mu_s' = 6.94 \text{ cm}^{-1}$): (a) evolution of SAM_{PDMS} (blue/circle) and $\text{SAM}_{\text{Nylon}}$ (orange/triangle) as well as the sum (green/dotted) of both SAM when increasing the spatial offset and the SAM cross-over offset labeled Δs_{CO} (vertical dashed line); (b) pure spectrum of PDMS; (c) evolution of the measured spectrum when increasing spatial offset Δs , which was used to calculate the SAM (a). The purple trace highlights the spectrum at Δs_{CO} , i.e. the SAM cross-over point; (d) pure spectrum of Nylon.....	51
Figure 4.4 Estimated depth penetration (t^*) in relation with the spatial offset at the SAM cross-over (Δs_{CO}) for each PDMS recipe. Each sequence of data points represents the relation between the spatial offset and the corresponding probed depth which depends on the optical	

properties of the top PDMS layer. Each curve was fitted with Equation 2 to highlight trends.

..... 53

Figure 4.5 SAM metric evaluated for olive oil (triangles) and beef meat (circles) in a spectral window of 50 cm^{-1} centered at 1004 cm^{-1} for: (a) 1 mm oil layer thickness; (b) 3 mm oil layer thickness; (c) 10 mm oil layer thickness. A sigmoid fit function was applied to the beef meat data points to highlight their trend as a function of spatial offset. (d), (e) and (f) shows the corresponding measured Raman spectra for different values of the spatial offset Δs . The spectral window used for SAM calculation is highlighted by the shaded vertical band..... 55

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

BPE	<i>trans</i> 1,2-bis(4-pyridyl)-éthylène
CFB	<i>Collection Fibre Bundle</i> (Faisceau de fibres de collection)
COHAP	<i>Carbonate substituted hydroxyapatite</i> (Hydroxyapatite substituée par du carbonate)
COM	<i>Calcium Oxalate Monohydrate</i> (Oxalate de calcium monohydraté)
DAQ	<i>Data Acquisition system</i> (Carte d'acquisition numérique)
DCM	Dichlorométhane
EFB	<i>Excitation Fibre Bundle</i> (Faisceau de fibres d'excitation)
HAP	Hydroxyapatite
IR	Infrarouge
LLF	<i>Laser Line Filter</i> (Filtre de ligne laser)
LPF	<i>Low-Pass Filter</i> (Filtre passe-bas)
NF	<i>Notch Filter</i> (Filtre coupe-bande étroit)
NP(s)	Nanoparticule(s)
PCL	Polycaprolactone
PDMS	Poly(diméthylsiloxane)
PE	Polyéthylène
PTFE	Polytétrafluoroéthylène
RGB	<i>Red, Green, Blue</i> (Rouge, Vert, Bleu)
RS	<i>Raman Spectroscopy</i> (Spectroscopie Raman)
SERS	<i>Surface-enhanced Raman Spectroscopy</i> (Spectroscopie Raman amplifiée de surface)
SEORS	<i>Surface-enhanced spatially offset Raman Spectroscopy</i> (Spectroscopie Raman amplifiée de surface spatialement décalée)
SNR	<i>Signal to Noise Ratio</i> (Ratio signal-sur-bruit)

SNV	<i>Standard Normal Variate</i> (Variation normale standard)
SORS	<i>Spatially offset Raman Spectroscopy</i> (Spectroscopie Raman spatialement décalée)
TRS	<i>Transmission Raman Spectroscopy</i> (Spectroscopie Raman en transmission)
UV	Ultraviolet

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

Le cancer est la cause de mortalité la plus importante au monde, et était responsable d'un décès sur 6 en 2020 [1]. Pouvant toucher tous les individus indépendamment du sexe, les risques de développer un cancer augmentent rapidement avec l'âge. Heureusement, les chances de survie peuvent drastiquement augmenter si la tumeur est détectée et traitée assez tôt. Le diagnostic précoce du cancer est donc un enjeu très important pour la survie des patients. De plus, le traitement le plus efficace pendant les stades peu avancés du cancer demeure le retrait total de la tumeur par opération chirurgicale. Il s'agit cependant d'une opération à haut risque pour le patient, et le retrait de tissu sain autour de la tumeur doit être minimal afin de limiter les impacts négatifs sur le niveau de vie du patient. Des techniques de guidage en chirurgie sont alors nécessaires, pour orienter le chirurgien lors de l'excision de la tumeur. De plus, la technique de guidage se doit d'être non-invasive, c'est-à-dire qu'elle ne doit pas endommager les tissus afin de les caractériser. Dans ce but, le développement de technologies optiques non-invasives de caractérisation des tissus et de guidage chirurgical est un domaine très important dans la recherche biomédicale. La spectroscopie Raman est depuis longtemps une technique très prometteuse dans ce domaine [2]. En illuminant un tissu biologique avec un laser infrarouge (~750-1100 nm), les modes de vibrations moléculaires des espèces chimiques présentent peuvent être mesurés. Chaque liaison chimique présente dans une molécule possède un ou plusieurs modes de vibration, qui lui sont propres. L'énergie de ces modes vibrationnels peut être mesurée sous la forme d'un photon diffusé inélastiquement par la molécule. En mesurant toutes les énergies vibrationnelles d'une molécule, il est alors possible de tracer un histogramme du nombre de photons de diffusés par énergie vibrationnelle, qui correspond alors à la signature moléculaire unique du composé chimique mesuré, appelé spectre Raman. Il devient alors possible de distinguer moléculairement un tissu sain d'un tissu cancéreux en comparant les différences de leur spectre Raman respectif. Des algorithmes mathématiques de classification sont alors entraînés pour déterminer rapidement si la signature moléculaire d'un tissu correspond à celui d'un tissu sain ou non [3].

Lors de l'extraction de la tumeur en salle d'opération, une couche de tissu sain est toujours gardée autour de la tumeur pour garantir de ne laisser aucune cellule cancéreuse dans le patient. L'estimation de l'épaisseur de cette couche de tissu sain, la marge chirurgicale, est faite à partir d'images préopératoires. Cependant, ces méthodes préopératoires, souvent réalisées à l'aide de

l'imagerie par résonnance magnétique (IRM) fonctionnelle, perdent en précision à cause d'artéfacts de reconstruction ou du déplacement des zones imagées durant la chirurgie [4]. La précision sur l'épaisseur de la marge chirurgicale est alors faible, et se fait par inspection visuelle du chirurgien. La spectroscopie Raman a une profondeur de mesure de quelques centaines de micromètres, ce qui est insuffisant pour estimer des marges chirurgicales idéales d'environ 2 mm. La spectroscopie Raman décalée spatialement est une technique de spectroscopie développée dans la dernière décennie et permettant de mesurer la signature moléculaire de tissus en profondeur. Cette technique repose sur la diffusion latérale des photons dans le tissu, qui les fait réémerger à une certaine distance du site d'excitation en fonction de la profondeur de pénétration. L'utilisation de cette technique de spectroscopie peut alors devenir très utile dans un contexte clinique de guidage lors des chirurgies pour estimer les marges chirurgicales directement dans la salle d'opération, ou pour des applications de diagnostic plus générales à travers différents tissus, tels que la peau.

1.1 Hypothèses et objectifs

Les différents projets qui composent ce mémoire ont tous été réalisés au sein du Lumed Lab, un laboratoire de recherche axé sur le développement de technologies d'imagerie médicale par spectroscopie optique. Le laboratoire a développé dans les dernières années des sondes Raman à point unique ($\sim 500 \mu\text{m}$ de diamètre) par assemblage de fibres optiques [5], [6]. Ces sondes ont été testées et validées sur différents cancers, notamment du cerveau et de la prostate [3], [7], [8], [9], [10]. Les données mesurées avec ces sondes ont permis de développer des algorithmes de classification des tissus biologiques, cancer versus tissu normal, avec une précision supérieure à 90% [10]. Cependant, jusqu'à récemment l'application de ces modèles de classification à des données provenant d'autres systèmes n'avait pas encore été démontrée. Un système de spectroscopie Raman macroscopique à balayage linéaire a aussi été développé en parallèle au sein du laboratoire, permettant d'imager sur une surface couvrant une superficie de $1 \times 1 \text{ cm}$, résultant en une image de 40×36 pixels, soit 1440 spectres par image. Pour couvrir environ la même surface avec les sondes à point unique, il faudrait une grille de 20×20 sondes, soit 400 sondes résultant en 400 spectres. Le design optique du système macroscopique permet de désynchroniser le site d'excitation Raman et le site de collection du signal, ouvrant la porte à une autre modalité d'imagerie, la spectroscopie Raman décalée spatialement, aussi appelée SORS pour *Spatial Offset Raman Spectroscopy*. Les deux hypothèses suivantes sont alors émises :

Hypothèse 1 : Les modèles de classification du cancer versus tissu normal entraînés sur les mesures des sondes à point unique sont aussi applicables aux données acquises à l'aide du système macroscopique à balayage linéaire.

Hypothèse 2 : Le système d'imagerie Raman macroscopique à balayage linéaire est capable d'effectuer des mesures SORS sur des tissus biologiques afin de détecter la composition biomoléculaire des tissus en profondeur.

Ce mémoire a deux objectifs principaux, dont le second se divise en deux sous-objectifs (SO). Tout d'abord, un objectif est de démontrer que les modèles de classifications préalablement développés gardent leur performance initiale indépendamment de la source du spectre Raman. Cet objectif sera atteint par l'intermédiaire de différentes contributions que nous avons faites à certains articles publiés par le laboratoire.

Objectif 1 : Contribuer aux études cliniques par l'élaboration de protocole d'imagerie et de détection cellulaire sur des échantillons de cancer du sein et de cerveau.

Ensuite, le second objectif est de démontrer l'efficacité du système macroscopique afin d'effectuer des mesures de spectroscopie Raman décalée spatialement. Cet objectif sera atteint par l'élaboration d'un protocole de fabrication puis de mesures de fantômes optiques solides à deux couches (**SO1**), et d'une preuve de concept effectuée avec des tissus biologiques (**SO2**).

Objectif 2 : Réaliser des mesures de spectroscopie Raman décalée spatialement avec le système de spectroscopie Raman macroscopique à balayage linéaire.

- **Sous-objectifs 1 :** Développer un groupe de fantômes optiques solides à deux couches en variant les propriétés optiques et l'épaisseur de la couche supérieure pour effectuer des mesures SORS.
- **Sous-objectifs 2 :** Développer un protocole de preuve de concept sur des tissus biologiques afin de valider les mesures SORS du système d'imagerie Raman macroscopique.

1.2 Organisation de ce mémoire

Incluant ce chapitre, ce mémoire comporte 6 chapitres. Le présent chapitre permet d'introduire le lecteur au contexte de ce projet de recherche et d'y exposer les différents objectifs. Le chapitre 2 pose les bases nécessaires à la compréhension de l'origine des interactions entre la lumière et les tissus biologiques, ainsi que d'en expliquer les processus pertinents au projet de recherche. Un état

de l'art des techniques de spectroscopie Raman y est aussi présenté. Le chapitre 3 résume la démarche de l'ensemble du projet de recherche, et y présente les différentes contributions de l'auteur à des articles publiés par le Lumed Lab, incluant le prototypage d'un système de spectroscopie Raman pour l'utilisation en clinique, l'élaboration d'un protocole d'imagerie en clinique, ainsi que le développement d'un outil de calcul de la densité cellulaire à partir d'image histologique. Dans le chapitre 4 est présenté un protocole de fabrication, de mesure et de validation de fantômes optiques solides en spectroscopie Raman décalée spatialement, sous la forme d'un article soumis dans une revue à comité de lecture (*Journal of Biomedical Optics*). Le chapitre 5 revient sur les objectifs et met en avant les différents avantages et défis rencontrés pendant ce travail de recherche. Finalement, le chapitre 6 conclut ce mémoire en rappelant les résultats principaux et proposant des pistes pour des travaux futurs.

CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE

Ce chapitre s'appuie sur des ouvrages pertinents sur l'optique biomédicale, les interactions entre la lumière et les tissus biologiques, ainsi que les fondements de la spectroscopie Raman et de la spectroscopie infrarouge (IR) [11], [12], [13]. Les références sont mentionnées au début du chapitre afin d'alléger le texte. Ce chapitre posera les bases physiques nécessaires pour comprendre l'origine de la spectroscopie Raman ainsi que ce qui en fait une technique puissante pour mesurer la signature moléculaire d'un échantillon. L'état actuel des connaissances et des technologies associées à la spectroscopie Raman est aussi présenté brièvement. Finalement, la spectroscopie Raman décalée spatialement sera introduite, puisqu'il s'agit de la technique principalement développée au cours de ma maîtrise.

2.1 Propagation des photons dans les tissus biologiques

2.1.1 Fondement et origine physique

Dans la théorie de l'optique diffuse, le fondement microscopique de l'interaction lumière-matière peut être décrit, au niveau classique, par le modèle de l'oscillateur harmonique de Lorentz et des ondes électromagnétiques qui forment la lumière. L'oscillateur de Lorentz est un système simple composé d'un noyau fixe neutre et d'un électron de masse m_e et de charge q liés entre eux par la loi de Hooke (force électromagnétique) :

$$\vec{F} = -K\vec{r}, \quad (2.1)$$

où \vec{F} est la force de rappel, K la constante de force et \vec{r} la position de l'électron par rapport à son point d'équilibre. En l'absence de force extérieure, la force de rappel seule s'applique sur l'électron, et à l'aide de la deuxième loi du mouvement de Newton, le mouvement de l'électron peut être décrit tel que :

$$r(t) = r_0 \cos(\omega_0 t + \varphi), \quad (2.2)$$

où r_0 et ω_0 sont des constantes liées aux conditions initiales et aux propriétés physiques du système et φ la phase du système. La fréquence de résonance du système est alors définie par :

$$\omega_0 = \sqrt{\frac{K}{m_e}}. \quad (2.3)$$

De manière analogue, on peut définir un système similaire d'oscillateur pour une molécule diatomique, c'est-à-dire une molécule ne comportant que deux atomes. Les atomes de cette molécule partagent alors leurs électrons en formant un nuage électronique entourant toute la molécule. Ce nuage électronique peut être perturber par des champs électriques. La lumière, pouvant être représentée par une onde électromagnétique, agit alors comme une force extérieure alimentant l'oscillateur harmonique. On peut alors remarquer le parallèle entre l'oscillateur harmonique de Lorentz, qui s'inscrit en mécanique classique, et l'oscillateur harmonique quantique qui décrit le puits de potentiel d'une molécule diatomique et ses niveaux d'énergie possibles. Leurs similarités permettent un certain nombre de parallèles et les deux modèles se complémentent pour expliquer les interactions lumière-matière dans les tissus biologiques. La mécanique quantique nous indique que seuls certains niveaux d'énergie de vibration sont atteignables par l'oscillateur, notés

$$E_n = h\nu_0 \left(n + \frac{1}{2} \right), \quad (2.4)$$

où ν_0 [s⁻¹] est la fréquence de résonance de l'oscillateur, n est un entier naturel incluant 0 et représentant les différents niveaux d'énergie admissibles, et h est la constante de Planck. De même, l'énergie d'un photon s'écrit $E = h\nu$, où ν [s⁻¹] est la fréquence du photon. Chaque niveau d'énergie possible d'un atome, ou d'une molécule, peut être représenté par un état quantique S noté $|S_{ab}\rangle$. Cette notation a été développée par Dirac et représente une solution de l'équation de Schrödinger pour un état quantique donné, où a représente un niveau d'énergie électronique, défini par les orbitales électroniques, et b le niveau d'énergie vibrationnel de cet état électronique. Les niveaux d'énergie rotationnelle seraient alors des sous-divisions de chaque niveau vibrationnel, mais leur faible énergie peut être négligée dans le contexte de la spectroscopie Raman. Les détails de la théorie quantique des niveaux d'énergie ne seront pas abordés, puisqu'en dehors de la portée de ce mémoire.

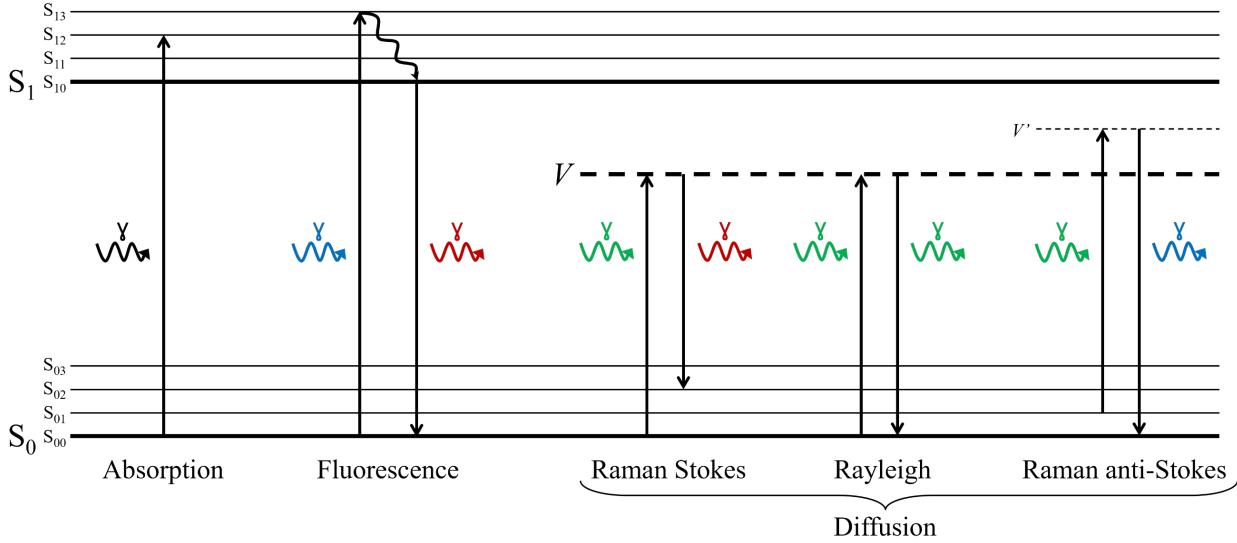


Figure 2.1 Diagramme de Jablonski démontrant les différents types d'interaction lumière-matière, soit l'absorption, l'émission spontanée et la diffusion incluant la diffusion de Rayleigh, et les diffusions de Raman Stokes et anti-Stokes. Traduit et adapté de [13].

Les niveaux d'énergie admissibles peuvent alors être représentés par des lignes horizontales, et les transitions électroniques et vibrationnelles par des flèches verticales indiquant le sens de la transition entre ces différents niveaux. Du nom du physicien qui l'a inventé, le diagramme de Jablonski (Figure 2.1) présente les interactions lumière-matière pertinentes à ce mémoire, à savoir l'absorption, la diffusion et la fluorescence. Elles seront détaillées plus tard dans ce chapitre. L'état électronique fondamental (0) et de premier niveau (1) sont habituellement représentés dans ce diagramme, car ce sont les transitions les plus probables selon le ratio de répartition de population de Maxwell-Boltzmann :

$$\frac{P_{a=1}}{P_{a=0}} = e^{-\Delta E/kT}, \quad (2.5)$$

avec P_a la population électronique au niveau a , ΔE la différence d'énergie entre les deux niveaux, k la constante de Boltzmann et T la température absolue. À température de la pièce, le terme kT est largement inférieur à la différence d'énergie entre le niveau fondamental et le premier niveau d'énergie, alors le ratio de population est largement biaisé vers le niveau fondamental. Les interactions entre la lumière et la matière peuvent alors se distinguer en deux catégories : 1) les interactions résonnantes, lorsque l'énergie du photon incident correspond à la différence d'énergie entre deux niveaux admissibles de la molécule, et 2) les interactions non résonnantes, lorsque le

photon incident a une énergie qui ne correspond à aucune transition admissible de la molécule. Ces transitions « interdites » sont représentées par une ligne hachurée dans le diagramme de Jablonski, et montrent le niveau d'énergie virtuel atteint par la molécule. Ainsi, l'absorption et la fluorescence sont des interactions résonnantes, tandis que la diffusion est une interaction non résonnante.

Dans l'état excité, une molécule libérera l'énergie absorbée pour revenir à son état fondamental de deux manières différentes. On distingue la désexcitation radiative, qui implique l'émission d'un ou plusieurs photons, et non radiative. Aussi appelées relaxation, les désexcitations des interactions pertinentes à ce mémoire sont toutes radiatives. Nous nous concentrerons donc sur ce type de relaxation. En fonction de l'énergie du photon libéré lors de la relaxation, cette transition peut être élastique si l'énergie du photon émis est la même que celle du photon absorbé. À l'inverse, la transition est dite inélastique si l'énergie du photon émis est différente.

Finalement, un dernier concept est nécessaire au développement des prochaines sections. En effet, les propriétés optiques des matériaux et tissus biologiques présentés dans ce mémoire proviennent certes des interactions quantiques entre un photon et une molécule, mais sont plutôt décrites par des observations macroscopiques. La section efficace d'interaction σ d'une molécule, en $[m^2]$, est définie comme la surface hypothétique disponible pour une interaction avec un photon. Ainsi, une section efficace faible indique alors que la probabilité qu'une interaction ait lieu est faible, et, inversement, une section efficace plus élevée décrira un processus ayant une probabilité d'interaction plus élevée. Elle se définit par l'équation :

$$\sigma = \frac{\mu}{\rho}, \quad (2.6)$$

avec μ le coefficient d'atténuation, en $[m^{-1}]$, qui détermine le nombre d'interactions par unité de distance et ρ , en $[m^{-3}]$, la densité des molécules atténuantes dans le matériau. L'atténuation peut avoir comme source l'absorption ou la diffusion des photons.

2.1.2 Absorption des tissus biologiques

Il est plus simple d'évaluer macroscopiquement l'absorption, qui a lieu à des fréquences de résonance ω_0 d'un échantillon. Cette dernière peut être décrite, classiquement, à l'aide de l'oscillateur classique plutôt que d'évaluer individuellement si chaque molécule est dans un état susceptible d'absorber le photon incident. Nous avons vu qu'à l'échelle microscopique d'une seule molécule, l'absorption d'un photon avait lieu lorsque l'énergie incidente et celle d'une transition

admissible correspondent. L'absorption peut s'effectuer à trois niveaux différents, en ordre de grandeur d'énergie décroissante. L'excitation électronique modifie le niveau d'énergie des électrons de la molécule et dont les transitions permises sont liées à la configuration moléculaire et des orbitales moléculaires. L'excitation vibrationnelle modifie le mouvement des liens entre les atomes de la molécule. Il s'agit de l'excitation mesurée grâce à la spectroscopie IR et Raman. Finalement, l'excitation rotationnelle influe sur la rotation de la molécule autour de différents axes.

Le coefficient d'absorption μ_a [m^{-1}] décrit ainsi l'absorption d'un matériau et se base sur la probabilité qu'un photon soit absorbé par celui-ci. En définissant la section efficace d'absorption du matériau en fonction du ratio d'intensité absorbée et incidente :

$$\sigma_a = \frac{P_{\text{abs}}}{I_0}, \quad (2.7)$$

où P_{abs} [W] est la puissance absorbée par le tissu et I_0 [W/m^2] est l'intensité de la lumière incidente, alors le coefficient d'absorption est défini tel que :

$$\mu_a = \rho \sigma_a. \quad (2.8)$$

Le coefficient d'absorption permet alors de décrire la réduction d'intensité d'un faisceau de lumière traversant une couche d'épaisseur h [m] à l'aide de la loi de Beer-Lambert :

$$I(h) = I_0 e^{-\mu_a h} \quad (2.9)$$

Dans les tissus biologiques, de nombreuses molécules sont responsables de l'absorption d'une partie du spectre visible. Ces molécules interagissant avec la lumière, donnent un aspect coloré aux dans lesquels elles sont présentes et sont donc appelées des chromophores. Les principaux chromophores présents dans les tissus biologiques sont l'hémoglobine, qui donne la couleur rouge du sang, la mélanine responsable de l'assombrissement de la peau lorsqu'exposée aux rayons du soleil, ou encore la myoglobine présente dans les muscles qui leur donne cette couleur rougeâtre.

2.1.3 Diffusion dans les tissus biologiques

À l'inverse de l'absorption, la diffusion (élastique ou non-élastique) est un processus non résonnant qui ne permet pas d'exciter une molécule dans un état stable. La molécule atteindra plutôt un niveau d'énergie interdit dit virtuel et, par conséquent de très courte durée ($\sim 10^{-14}$ s). Le photon sera réémis de manière élastique si aucun échange d'énergie n'est réalisé, ou de manière inélastique si un échange d'énergie s'est produit. En fonction de la taille des particules responsables de la diffusion,

nous pouvons distinguer trois types de diffusion dans les tissus biologiques. La diffusion de Mie est une diffusion élastique valide pour toutes tailles de particules. La diffusion de Rayleigh est un cas particulier de diffusion élastique valide pour les particules de petite taille, c.-à-d. approximativement de l'ordre de grandeur de la longueur d'onde des photons incidents. Finalement, la diffusion Raman est une diffusion inélastique où les photons peuvent perdre une partie de leur énergie (diffusion Raman Stokes) ou absorber une partie de l'énergie de la molécule (diffusion Raman anti-Stokes).

Afin de bien distinguer l'origine de la diffusion de Rayleigh et la diffusion Raman, nous reprenons le modèle de l'oscillateur classique, appliquée cette fois à une molécule dipolaire soumise à une onde électromagnétique [14]. La composante magnétique de l'onde peut être négligée puisqu'aucun phénomène magnétique n'entre en jeu. Ainsi, un moment électrique dipolaire \vec{p} est induit par le champ électrique \vec{E} de l'onde, exprimée :

$$\vec{p} = \alpha \vec{E}, \quad (2.10)$$

où α est le tenseur de polarisabilité de la molécule. La polarisabilité de la molécule varie en fonction des modes vibrationnels de celle-ci (Figure 2.2), et peut être exprimée comme une fonction des coordonnées des noyaux. Ainsi, il est possible de développer les composantes du tenseur de polarisabilité en séries de Taylor telles que :

$$\alpha_{ij} = (\alpha_{ij})_0 + \sum_k \left(\frac{\partial \alpha_{ij}}{\partial r_k} \right)_0 r_k + \frac{1}{2} \sum_{k,l} \left(\frac{\partial^2 \alpha_{ij}}{\partial r_k \partial r_l} \right)_0 r_k r_l + \dots, \quad (2.11)$$

Où $(\alpha_{ij})_0$ est la valeur α_{ij} à l'équilibre, r_k et r_l les coordonnées de vibration aux fréquences ω_k et ω_l respectivement. Les indices i et j représentent les coordonnées spatiales (x , y et z) du tenseur de polarisabilité de la molécule. Par approximation harmonique, on peut négliger les modes de vibrations autres que r_k , et où r_k a été défini par l'équation 2.2 tel que :

$$r_k(t) = r_{k0} \cos(\omega_k t + \varphi_k), \quad (2.12)$$

Alors, les éléments du tenseur peuvent s'écrire tel que :

$$\alpha_{ij} = (\alpha_{ij})_0 + \left(\frac{\partial \alpha_{ij}}{\partial r_k} \right)_0 r_k. \quad (2.13)$$

Les modes de vibrations k réfèrent aux différentes configurations de vibrations décrites par la Figure 2.2, dans le cas d'une liaison CH₂ par exemple. L'élément du tenseur de polarisabilité pour la vibration k prend alors la forme suivante :

$$\alpha_k = \alpha_0 + \left(\frac{\partial \alpha_k}{\partial r_k} \right)_0 r_{k0} \cos(\omega_k t + \varphi_k). \quad (2.14)$$

En remplaçant l'équation 2.13 dans l'équation 2.10, et en présence d'un champ électrique de fréquence ω_0 , le moment dipolaire s'exprime par :

$$\begin{aligned} p &= \alpha_k \vec{E}_0 \cos(\omega_0 t) = \alpha_0 \vec{E}_0 \cos(\omega_0 t) + \left(\frac{\partial \alpha_k}{\partial r_k} \right)_0 r_{k0} \vec{E}_0 \cos(\omega_0 t) \cos(\omega_k t + \varphi_k) \\ &= \alpha_0 \vec{E}_0 \cos(\omega_0 t) \\ &\quad + \frac{1}{2} \left[\left(\frac{\partial \alpha_k}{\partial r_k} \right)_0 r_{k0} \vec{E}_0 \cos((\omega_0 + \omega_k)t + \varphi_k) \right. \\ &\quad \left. + \left(\frac{\partial \alpha_k}{\partial r_k} \right)_0 r_{k0} \vec{E}_0 \cos((\omega_0 - \omega_k)t - \varphi_k) \right]. \end{aligned} \quad (2.15)$$

Le moment dipolaire de la molécule est alors influencé par trois fréquences, ω_0 qui définit la diffusion élastique de Rayleigh, $\omega_0 + \omega_k$ qui définit la diffusion inélastique Raman anti-Stokes (gain d'énergie du photon) et $\omega_0 - \omega_k$ qui définit la diffusion inélastique Raman Stokes (perte d'énergie du photon). De plus, une phase φ_k arbitraire s'ajoute à la diffusion Raman, contrairement à la diffusion de Rayleigh. Cette phase arbitraire permet aux photons issus de la diffusion Raman de ne pas interférer entre eux. La diffusion Rayleigh permet cette interférence, qui a pour conséquence que l'augmentation de l'intensité de la diffusion Rayleigh n'est pas proportionnelle à l'augmentation de la densité des molécules diffusantes.

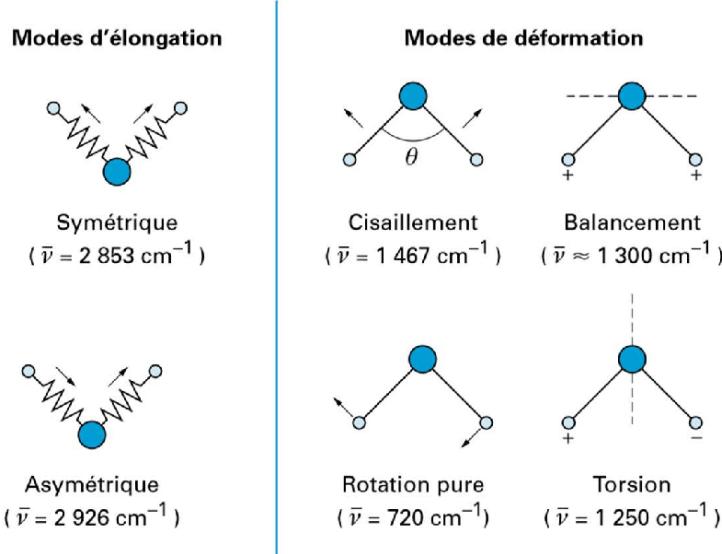


Figure 2.2 Modes vibrationnels d'un groupe CH₂ d'une molécule et leur énergie $\bar{\nu}$ exprimée en nombre d'onde. Tiré de [15].

De même que pour le coefficient d'absorption, il est possible de définir un coefficient de diffusion μ_s [m⁻¹] tel que :

$$\mu_s = \rho\sigma_s, \quad (2.16)$$

où $\sigma_s = \frac{P_s}{I_0}$ est la section efficace de diffusion et ρ la densité des molécules diffusives. Il est intéressant d'évaluer les paramètres qui influencent σ_s . La puissance diffusée P_s se définit comme :

$$P_s = \int_0^{2\pi} \int_0^\pi I_s(r, \theta, \varphi) r^2 \sin \theta d\theta d\varphi, \quad (2.17)$$

avec $I_s(r, \theta, \varphi)$ l'intensité diffusée en fonction des paramètres de distance à la molécule r , l'angle θ relatif à la direction de propagation initiale dans le même plan et l'angle azimutal φ (Figure 2.3). Considérant une intensité diffusée pour de la lumière non polarisée :

$$I_s(r, \theta, \varphi) = \frac{\mu_0^2 \alpha_0^2 \omega^4}{(4\pi)^2} \frac{1 + \cos^2 \theta}{2r^2} I_0, \quad (2.18)$$

avec μ_0 la perméabilité du vide, α_0 la polarisabilité de la molécule (équation 2.13) et ω la fréquence angulaire du champ électrique de l'onde, il est possible de démontrer que :

$$\sigma_s = \frac{8}{3}\pi \frac{\mu_0^2 \alpha_0^2 \omega^4}{(4\pi)^2} = \frac{1}{6\pi} \frac{\mu_0^2 \alpha_0^2 (2\pi c)^4}{\lambda^4} \propto \frac{1}{\lambda^4}. \quad (2.19)$$

Nous remarquons alors que la section efficace de diffusion est inversement proportionnelle à la longueur d'onde des photons incidents, et, par conséquent, la lumière bleue/UV sera beaucoup plus diffusée que la lumière rouge/IR. Cela a pour conséquence, qu'à coefficient d'absorption égal, la lumière bleue/UV atteindra des profondeurs de pénétration beaucoup plus faibles en moyenne que la lumière rouge/IR. De plus, la section efficace de la diffusion Raman est estimée à environ 10^{-30} cm², impliquant une interaction peu probable [16]. Nous pouvons remarquer que la polarisabilité à l'équilibre de la molécule α_0 intervient aussi dans le calcul de la section efficace et influence donc la probabilité de diffusion des photons.

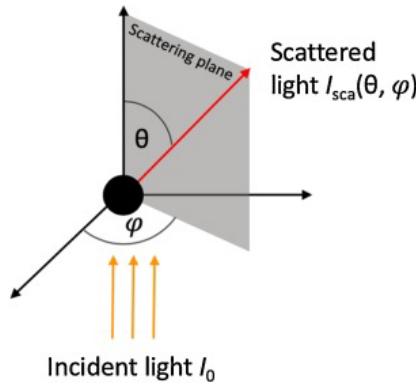


Figure 2.3 Définition des angles θ et φ lors de la diffusion par une particule. Tiré de [17].

D'autre part, la direction de diffusion des photons est définie par la fonction de phase de diffusion $\Phi(\theta, \varphi)$ de la molécule, une combinaison des angles de déviation θ et φ du photon (Figure 2.3). Un angle $\theta = 0^\circ$ implique que le photon se propage dans la même direction que le photon incident, tandis qu'un angle $\theta = 180^\circ$ nous indique que les photons sont renvoyés vers l'origine du photon incident. On appelle ce dernier phénomène la rétrodiffusion. La fonction de phase de diffusion correspond alors à la probabilité qu'un photon soit dévié à un angle Φ . Cependant, dans un contexte de tissus biologiques à l'échelle macroscopique, il est préférable d'écrire $\Phi(\hat{s}, \hat{s}')$ où \hat{s} est la direction de propagation du photon incident et \hat{s}' la direction de propagation du photon diffusé puisque l'on considère de multiples molécules diffusantes au lieu d'une seule. Par symétrie axiale, l'orientation de la molécule devient indépendante, et la fonction de phase ne dépend alors plus que de l'angle θ . De ce fait, on peut alors écrire :

$$\Phi(\hat{s}, \hat{s}') = \Phi(\hat{s} \cdot \hat{s}'), \quad (2.20)$$

où Φ est seulement représenté par le produit scalaire entre les deux vecteurs de propagations unitaires. Afin de décrire le comportement macroscopique du parcours de la lumière dans un milieu diffusif, il est alors nécessaire d'obtenir une direction moyenne de propagation, définie par l'espérance mathématique de la densité de probabilité Φ exprimée plus haut :

$$g = \int_{4\pi} (\hat{s} \cdot \hat{s}') \Phi(\hat{s} \cdot \hat{s}') d\Omega = \langle \cos \theta \rangle, \quad (2.21)$$

où l'on introduit alors le coefficient d'anisotropie g qui représente la propension de la diffusion à être biaisée dans une direction particulière. Ainsi, une valeur de $g = 0$ indique un matériau isotrope, c'est-à-dire qui diffuse dans toutes les directions équitablement et, à l'inverse, une valeur de $g = 1$ correspond à un matériau purement anisotrope vers l'avant, c'est-à-dire que tous les photons sont diffusés dans la même direction que les photons incidents. Les valeurs négatives du coefficient d'anisotropie indiquent que les photons seront majoritairement rétrodiffusés. Dans les tissus biologiques, les valeurs typiques sont de l'ordre de $g \geq 0.8$ [18]. Le coefficient d'anisotropie permet de corriger le coefficient de diffusion d'un matériau pour tenir compte de l'anisotropie de celui-ci, et pouvoir ainsi comparer la diffusion de différents matériaux. Le coefficient de diffusion réduit μ_s' est alors défini tel que :

$$\mu_s' = \mu_s(1 - g). \quad (2.22)$$

2.1.4 Fluorescence des tissus biologiques

La fluorescence est un processus complexe qui combine une transition d'absorption de l'état fondamental vers différents niveaux d'énergie vibrationnel de l'état électronique excité supérieur : $|S_{00}\rangle \rightarrow |S_{1b}\rangle$, puis d'une relaxation radiative vers le niveau fondamental : $|S_{10}\rangle \rightarrow |S_{0b}\rangle$. Cependant, une relaxation non radiative a lieu avant l'émission du photon, d'une durée plus longue que l'état excité virtuel de la diffusion ($\sim 10^{-8}$ à 10^{-5} s). Cette relaxation non radiative se produit au niveau électronique excité. Ainsi, les molécules ayant un niveau d'énergie vibrationnelle supérieur reviennent à l'état vibrationnel de plus basse énergie : $|S_{1b}\rangle \rightarrow |S_{10}\rangle$. Les photons émis par relaxation radiative ensuite sont alors de plus faible énergie que les photons absorbés à cause de la perte énergétique non radiative. Le spectre d'absorption d'une molécule est large à cause des multiples niveaux d'énergie vibrationnelle admissibles, représentés par les raies a-c dans la Figure

2.4. De la même manière, la relaxation de la molécule peut atteindre les différents niveaux d'énergie vibrationnelle de l'état fondamental (raies d-f de la Figure 2.4). L'énergie d'un photon étant inversement proportionnelle à sa longueur d'onde, et en prenant comme référence le spectre du visible, qui s'étant d'environ 400 nm (bleu) à 750 nm (rouge), on dit que la fluorescence décale les photons vers le rouge, ou décalage Stokes. Une exception à cette règle est la fluorescence multiphotons, où plusieurs photons de basse énergie sont absorbés en même temps (dans un intervalle de 10^{-15} s) pour atteindre l'énergie requise pour exciter une molécule [19]. Dans ce cas, bien que le photon émis ait une énergie inférieure à la somme de celles des photons absorbés, elle est supérieure à l'énergie d'un photon incident unique. Le décalage des longueurs d'onde entre photons absorbés et émis est donc vers le bleu, ou anti-Stokes.

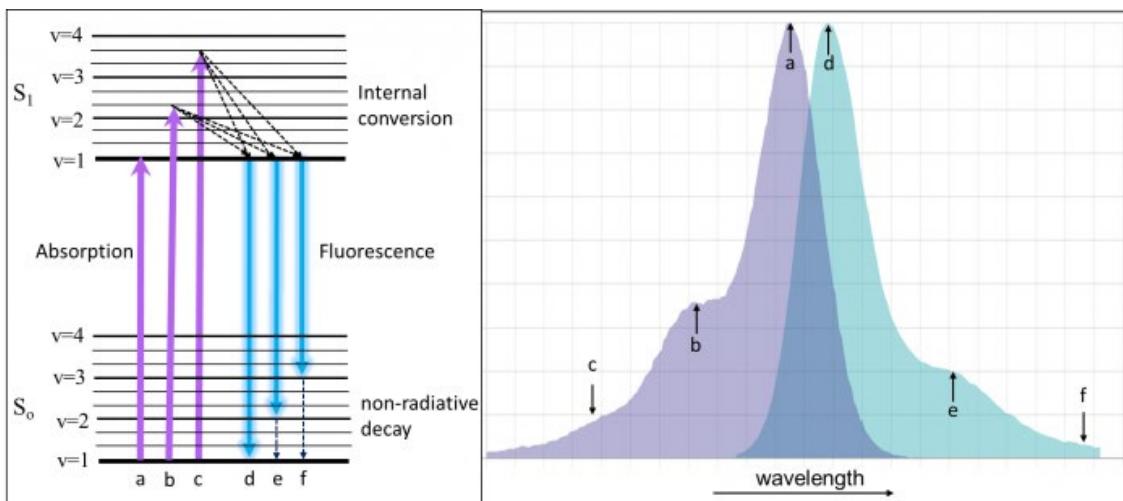


Figure 2.4 Diagramme de Jablonski (à gauche) et spectres d'absorption (violet) et d'émission (bleu) de la fluorescence d'une molécule. Tiré de [19].

Les molécules qui démontrent un comportement de fluorescence sont appelées des fluorophores, soit endogènes, s'ils sont naturellement présents dans l'échantillon mesuré, ou exogènes s'ils sont ajoutés à des fins d'imagerie. Dans les tissus biologiques, on retrouve certains fluorophores endogènes tel que le collagène, l'élastine, les flavines, les caroténoïdes ou des groupes tryptophane et tyrosine dans des protéines [20], [21]. Ces protéines et pigments sont largement présents dans les tissus biologiques et produisent un signal de fluorescence intrinsèque fort que l'on nomme autofluorescence, absorbant principalement dans les UV/bleus et émettant dans tout le spectre du visible (Tableau 2.1). La section efficace d'absorption de la fluorescence dans les tissus biologiques est estimée de l'ordre de 10^{-16} cm^2 [16].

Tableau 2.1 Pics d'excitation et d'émission des fluorophores endogènes communs dans les tissus biologiques. Traduit et adapté de [20].

Fluorophore endogène	Pic d'excitation (nm)	Pic d'émission (nm)
Collagène	365	420
Élastine	365	450
Flavines	365-450	510-550
Caroténoïdes	532	608
Tryptophane [22]	220-275	355
Tyrosine [23]	220-270	303

2.2 Spectroscopie Raman : Instrumentation et méthodes

La spectroscopie Raman est une méthode de caractérisation moléculaire d'un échantillon, s'appuyant sur la diffusion Raman des photons. En effet, lorsqu'une molécule est excitée par une source lumineuse dont l'énergie des photons ne correspond pas à une transition admissible, alors la molécule diffusera le photon soit de manière élastique (diffusion de Rayleigh) ou inélastique (diffusion Raman). Selon la Figure 2.1, et comme mentionné dans les sections précédentes, la diffusion Raman est dite Stokes lorsque le photon diffusé perd de l'énergie, ou anti-Stokes lorsque le photon diffusé gagne de l'énergie à la suite de l'interaction. Selon la distribution de population de Maxwell-Boltzmann (équation 2.5), les molécules initialement dans l'état fondamental sont beaucoup plus nombreuses que celles initialement dans un état excité quelconque. Ainsi, la diffusion Raman Stokes est beaucoup plus probable que la diffusion anti-Stokes. De plus, si l'on connaît l'énergie (et donc la longueur d'onde) du photon incident ainsi que celle des photons diffusés, la différence d'énergie entre ces photons correspond exactement aux niveaux d'énergie vibrationnelle de la molécule. Un histogramme du nombre de photons ayant une certaine différence d'énergie avec les photons d'excitation peut alors être mesuré : il s'agit d'un spectre Raman (Figure 2.5). Afin de pouvoir connaître précisément l'énergie des photons incidents, il est nécessaire d'utiliser une source lumineuse monochromatique issue d'un laser. En pratique, seul le spectre Stokes est mesuré. Le spectre anti-Stokes, puisqu'il mesure les mêmes niveaux d'énergie

vibrationnelle, est une image miroir du spectre Stokes, mais de plus faible intensité à cause de la répartition de population de Maxwell-Boltzmann.

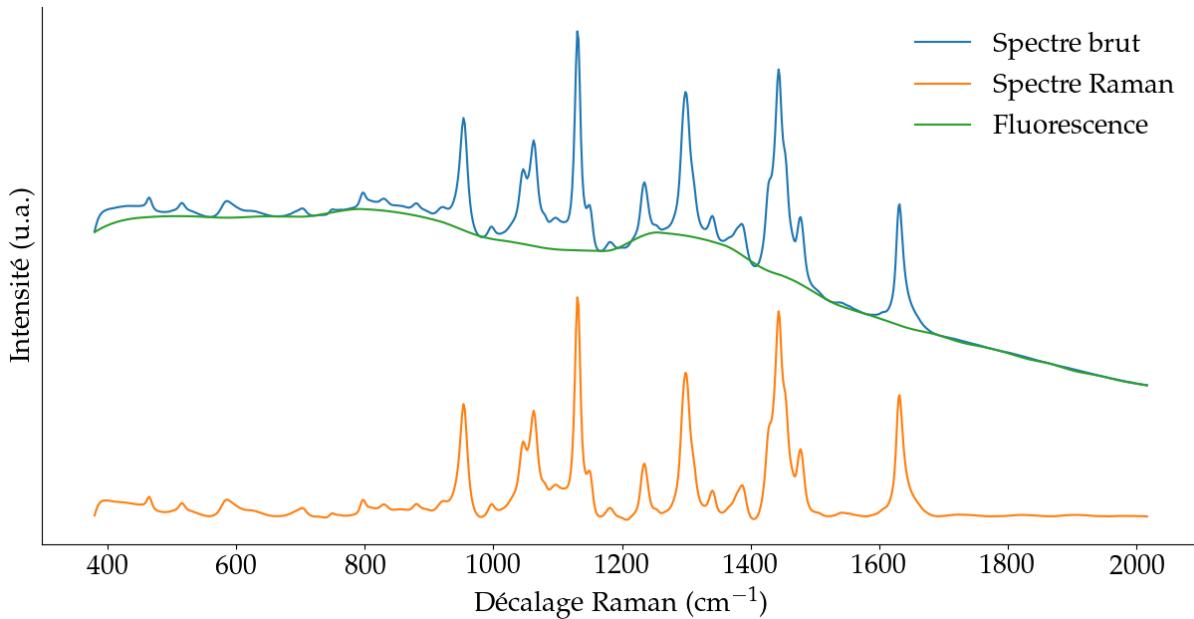


Figure 2.5 Spectre Raman brut (en bleu) et corrigé (en orange) pour la fluorescence (en vert) du Nylon.

Le décalage Raman est le plus souvent exprimé en nombre d'ondes plutôt qu'en termes de longueur d'onde, et correspond à la différence de nombre d'ondes entre les photons incidents et diffusés tel que :

$$\Delta\omega = \left(\frac{10^{-7}}{\lambda_r} - \frac{10^{-7}}{\lambda_d} \right), \quad (2.23)$$

Où $\Delta\omega$ [cm^{-1}] est le décalage Raman, λ_r [nm] la longueur d'onde d'excitation et λ_d [nm] la longueur d'onde mesurée des photons diffusés. Cela permet une comparaison directe entre les spectres Raman qui est indépendante de l'énergie des photons d'excitation. Les spectres Raman sont considérés comme les « empreintes digitales » des molécules, puisque chaque pic Raman correspond à un niveau d'énergie vibrationnelle admissible de la molécule. Ces niveaux d'énergie vibrationnelle sont directement liés à la géométrie de la molécule ainsi qu'à sa composition atomique, comme vu précédemment. Dans un milieu moléculaire complexe, le spectre est aussi affecté par les interactions entre les molécules qui peuvent affecter la position et la largeur des bandes spectrales.

Il est en théorie possible d'effectuer de la spectroscopie Raman à partir de n'importe quelle longueur d'onde, mais pour les tissus biologiques, elle est le plus souvent réalisée avec des sources laser à 785 nm, c.-à-d. dans le proche IR. Ce choix repose sur plusieurs avantages liés au comportement de la lumière avec les tissus biologiques. En effet, nous avons vu que la diffusion Raman décroît en fonction de la longueur d'onde tel que :

$$I_{\text{Raman}} \propto \frac{1}{\lambda^4}. \quad (2.24)$$

Alors, le laser peut pénétrer plus profondément dans les tissus au détriment d'un signal plus faible. La profondeur de pénétration est privilégiée dans le contexte de mesures non invasives à travers la peau. Cependant, une source laser de plus haute énergie pourrait être utilisée pour augmenter le signal Raman dans d'autres circonstances. Cela nous amène au compromis le plus important de la spectroscopie Raman, qui est la concurrence entre les signaux Raman et de fluorescence endogène. En effet, tel que vu dans la section 2.1.4, la majorité des fluorophores endogènes émettent fortement dans les longueurs d'onde plus faible (UV/bleu). Réduire la longueur d'onde du laser pour augmenter le signal Raman augmente ainsi l'autofluorescence du tissu, ce qui a pour effet de noyer le signal Raman. L'effet de la fluorescence intrinsèque peut être observé à la Figure 2.5. De plus, un laser de plus haute énergie (UV/bleu comparé à IR) augmente aussi les risques d'endommager le tissu biologique par effet photothermique, notamment, où l'énergie des photons est absorbée par les molécules et réémise sous forme de chaleur. Finalement, le plus gros avantage d'utiliser un laser à 785 nm est de pouvoir profiter de la fenêtre thérapeutique optique des tissus biologiques. Il s'agit de la plage de longueurs d'onde où l'absorption de l'hémoglobine et de l'eau est la plus faible (Figure 2.6). Dans les tissus biologiques, ces deux molécules constituent la grande majorité de la composition moléculaire du tissu, dans le sang et toutes les cellules. Cela permet de maximiser les chances de convertir les photons d'excitation en photons Raman.

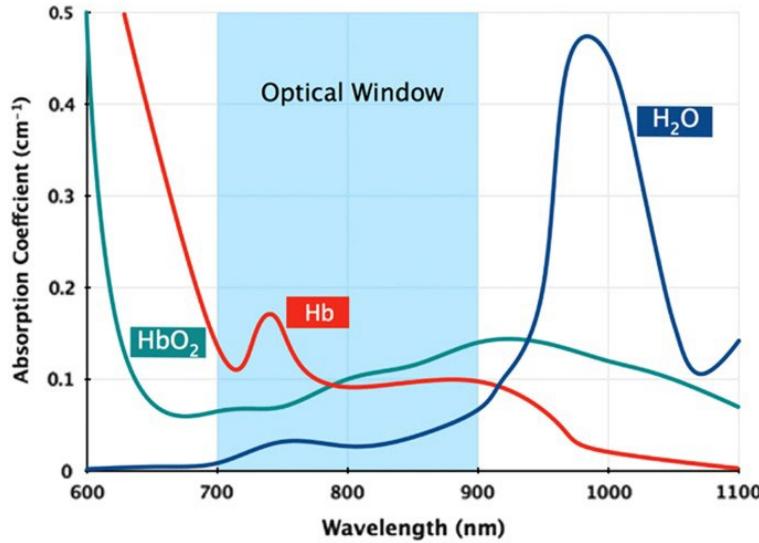


Figure 2.6 Fenêtre thérapeutique optique où l'absorption de l'hémoglobine oxydée (HbO_2) et désoxydée (Hb) et de l'eau (H_2O) est la plus faible. Tiré de [24].

2.2.1 Composants d'un système de spectroscopie Raman

Le plus simplement, un système de spectroscopie Raman est donc constitué d'une source lumineuse monochromatique, d'un spectromètre, d'un capteur infrarouge et d'une sonde optique permettant la collection de la lumière. Les sources laser sont donc toutes indiquées pour cette application. Le spectromètre permet de décomposer la lumière mesurée en fonction des différentes longueurs d'onde qui la compose. Le capteur proche-infrarouge (750-1000 nm), le plus souvent un capteur CCD, permet de transformer les photons collectés en signal électrique afin d'obtenir un spectre numérique. La sonde optique permet d'acheminer l'excitation laser vers l'échantillon et de collecter le signal de l'échantillon vers le spectromètre. Divers éléments optiques, tels que des lentilles, sont aussi inclus dans le spectromètre afin de maximiser le signal atteignant le capteur CCD. Pour faciliter l'utilisation des systèmes de spectroscopie Raman dans un contexte clinique, des fibres optiques ont été utilisées pour connecter la sonde optique au reste du système et maximiser la liberté de mouvement de la sonde. Ces systèmes fibrés ont donc été utilisés dans diverses études cliniques nécessitant des mesures directement dans le patient, *in-vivo*. Des sondes fibrées ont aussi été développé au sein de notre laboratoire, démontrant la possibilité de détecter des tumeurs cérébrales [25], [5], [10]. Notre laboratoire a aussi développé un système de spectroscopie Raman plus complexe, qui permet d'imager sur une surface d'environ 1 cm² grâce à

un système à balayage linéaire [26], [27]. Ce dernier système sera détaillé plus loin, et sera utilisé pour tous les projets relatifs à ce mémoire.

2.2.2 Caractérisation des tissus biologiques

Si on connaît la structure atomique d'une molécule, il est possible d'associer certaines liaisons chimiques spécifiques à des pics Raman précis. À l'inverse, l'ensemble des pics Raman composant le spectre d'une molécule inconnue permet d'en déduire sa composition atomique. Une étude menée sur 67 patients atteints de tumeurs cérébrales a mesuré des spectres Raman durant l'opération chirurgicale [10]. Les spectres ont été mesurés directement dans le cerveau (*in-situ*). Ainsi, des spectres issus de tissu cérébral sain et cancéreux peuvent être distingués (Figure 2.7). Bien qu'originalement identique à celle du tissu sain, la composition moléculaire du tissu cancéreux à changer à cause du développement de la tumeur. Certaines protéines sont ainsi plus présentes dans la tumeur, notamment la phénylalanine (1000 cm^{-1}) ou le tryptophane ($\sim 1560\text{ cm}^{-1}$), ce qui est démontré par un pic Raman plus haut sur le spectre. À l'inverse, les lipides sont moins présents dans la tumeur (1300 cm^{-1} et 1440 cm^{-1}). Chaque pic Raman correspond à un mode vibrationnel d'une liaison chimique. Un article de synthèse de 2015 regroupe les interprétations spectrales de pics Raman allants de 400 cm^{-1} à 3600 cm^{-1} [28] (Tableau 2.2). La spécificité des spectres vis-à-vis de la composition moléculaire d'un échantillon et de la possibilité d'effectuer des mesures de manière non invasive sont des avantages largement mis à profit dans le développement d'outils de diagnostics biomédicaux [29]. Plusieurs études *in-vivo* sur des humains ont déjà été réalisées depuis les années 2000, portant sur diverses pathologies, notamment le cancer du col utérin, le cancer gastro-intestinal, cancer de la bouche, le cancer de la peau ou la dégénérescence maculaire [30]. Toutes ces études ont démontré des taux de détection élevés du tissu non sain respectif à l'étude, avec une moyenne de $89 \pm 7\%$ pour la sensibilité du test et $88 \pm 8\%$ pour la spécificité du test.

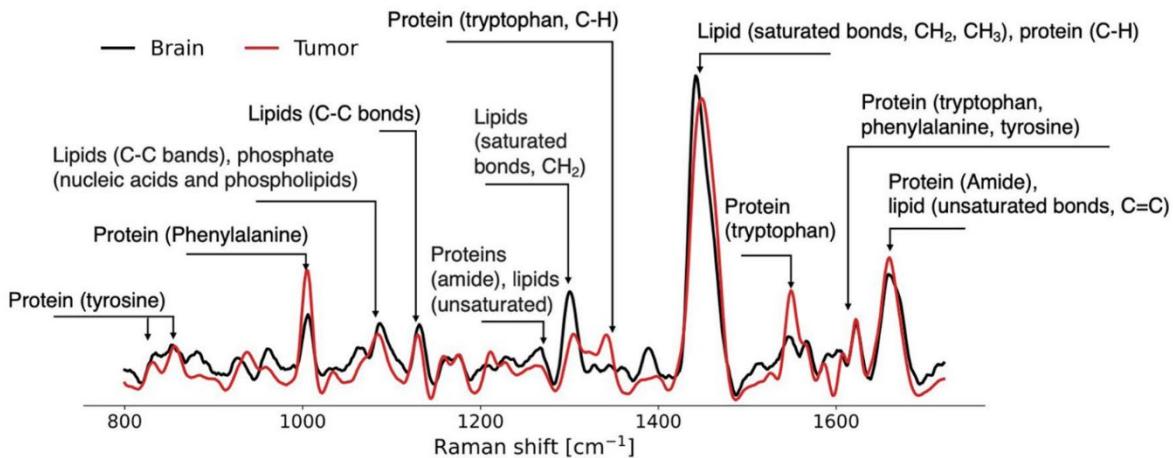


Figure 2.7 Spectre Raman d'un tissu cérébral sain (en noir) et d'une tumeur cérébrale (en rouge) ainsi que certains pics Raman communs. Adapté de [10].

Tableau 2.2 Interprétation spectrales de quelques pics Raman importants présents dans les tissus biologiques. Traduit et adapté de [28].

Pic Raman (cm ⁻¹)	Signification
860	Groupe phosphate (protéines, tyrosine)
937-941	Élongation C-C, modes squelettiques (protéines, collagène)
1002-1005	Élongation du groupe aromatique (protéines, phénylalanine, collagène)
1124-1129	Modes squelettiques du groupe acyle (lipides)
1155-1160	Élongation C-C et C-N (protéines)
1163, 1169-1184	Tyrosine, Cytosine, Guanine (ADN)
1208, 1209	Tryptophane
1220-1300	Amide III (protéines)
1300-1305	Déformation et torsion C-H (lipides)
1436-1451	Déformation et cisaillement CH ₂ et CH ₃
1602-1607	Élongation et déformation C=C (protéines, phénylalanine)
1650-1670	Amide I (protéines, collagène)

2.3 Spectroscopie Raman décalée spatialement

2.3.1 Différences par rapport à la spectroscopie Raman conventionnelle

Une technique de spectroscopie modifiée, dénommée spectroscopie Raman décalée spatialement (SORS en anglais) [31], [32], [33], [34], [35] permet de récupérer des informations de spectroscopie Raman dans les sous-couches d'un échantillon. Grâce à la propriété de diffusion des photons dans la matière, des photons Raman sont émis d'un peu partout dans le tissu et leur densité diminue à mesure que l'on s'éloigne de la source laser. De ce fait, il est possible de collecter les photons Raman provenant de couches plus profondes en spectroscopie Raman conventionnelle, mais le signal de surface étant beaucoup plus intense, ce signal des couches plus profondes n'est en pratique jamais observé. Afin de pouvoir isoler ce signal, il est nécessaire de créer un décalage spatial Δs entre le point d'illumination et le point de collection du signal [36]. Ainsi, les photons diffusés horizontalement dans les couches proches de la surface sont majoritairement perdus à l'interface air-tissus, alors que les photons diffusés dans les couches plus profondes sont majoritairement rétrodiffusés vers la surface à une certaine distance de la source d'illumination. La Figure 2.8 montre le parcours typique de certains photons lors de mesures SORS.

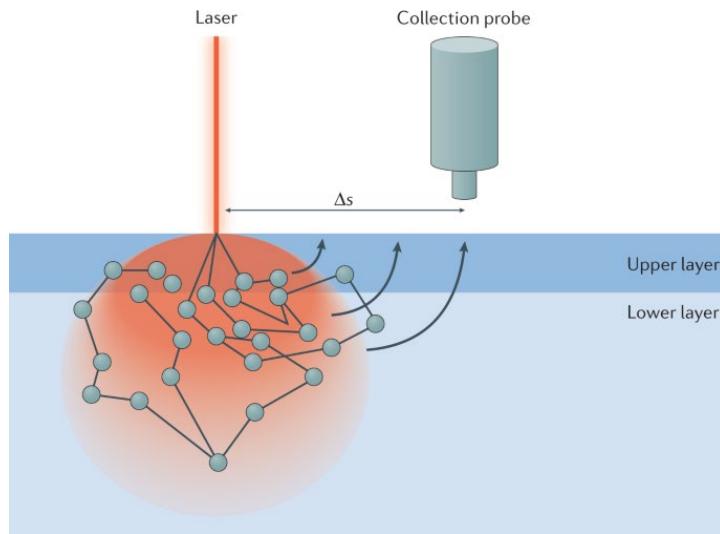


Figure 2.8 Parcours des photons diffusés et collectés selon la méthode expérimentale typique de SORS.
Tiré de [34].

Cependant, augmenter la distance entre la source d'illumination et la sonde de collection réduit l'intensité lumineuse totale disponible pour l'instrument. La détection des photons Raman au-delà d'un certain point en devient donc plus difficile, d'autant plus lorsque la fluorescence intrinsèque

s'ajoute au signal tel que vu précédemment. Initialement, les sondes SORS proposent un point d'illumination unique et un cercle de collection autour de ce point, le décalage spatial Δs étant contrôlé par le rayon du cercle de collection. Afin de limiter la perte d'intensité lumineuse due à la diffusion, une version modifiée de la technique SORS a été développée, en inversant les zones d'illumination et de collection à l'aide d'une lentille conique, créant ainsi un cercle d'illumination [37]. La zone de collection peut alors se situer au centre de ce cercle et profiter d'une ‘multitude’ de sources lumineuses pour un même décalage spatial. De plus, l'intensité totale du laser peut aussi être augmentée grâce à la surface d'illumination accrue, augmentant ainsi l'intensité du signal Raman. Avec l'arrivée des systèmes fibrés, l'usage d'une telle lentille devint compliqué, et des alternatives à l'aide de fibres multimodales [38] ou d'un agencement annulaire des multiples fibres [39] furent développées, réduisant ainsi drastiquement la taille des systèmes et permettant un usage *in-vivo* du SORS.

De manière plus générale, la spectroscopie Raman à décalage spatial a été utilisée dans de nombreux domaines d'application [34]. En pharmaceutique, le contrôle qualité des produits emballés a grandement bénéficié de cette technologie, pour assurer la conformité aux normes des médicaments vendus ainsi que la détection de médicaments de contrefaçon. En sécurité et pour les affaires judiciaires, le SORS est utilisé pour détecter certaines matières dangereuses interdites en avion, telles que des explosifs ou drogues de synthèse. On trouve aussi des applications du SORS en agroalimentaire, pour l'assurance-qualité des produits ou la détection de certains nutriments, mais aussi en sciences historiques. Cependant, nous allons nous concentrer dans ce mémoire aux applications biomédicales. La modalité SORS est toujours aujourd’hui en développement, mais a déjà fait ses preuves dans des études sur diverses maladies osseuses [40], [41], [42], [43], la qualité du sang pour transfusion [44], [45], ainsi qu'en oncologie notamment pour le cancer de la prostate [46], cancer de la peau [47], et cancer du sein [35], [48].

En 2010, la première étude visant à augmenter la profondeur de pénétration de la spectroscopie Raman amplifiée de surface (SERS en anglais) en la combinant avec le SORS vu le jour [49]. De là, diverses études ont continué à développer ces modalités combinées en SESORS pour bénéficier de la sensibilité accrue des nanoparticules (NPs) en Raman, principalement sur des analogues de tissus génériques [50], de tumeur de cancer du sein [51], [52]. Cette modalité combinée est aussi prometteuse en neuroscience afin de surveiller certains processus neurochimiques *in-vivo* [53]. Une

autre application du SESORS est la surveillance de la température des nanoparticules lors de traitements thermiques ciblés [54].

2.3.2 Méthodes numériques et fantômes optiques

Un aspect très important de la spectroscopie Raman à décalage spatial est la relation entre le décalage spatial Δs et la profondeur de pénétration moyenne des photons, qui correspond essentiellement à la profondeur de détection. Cependant, cette relation est très dépendante des milieux qui composent l'échantillon à étudier, particulièrement le milieu de surface. Il est donc nécessaire d'effectuer des simulations numériques pour tenter de prédire le décalage spatial idéal pour une profondeur de pénétration voulue. Les méthodes numériques ont l'avantage de pouvoir tester une grande variété de combinaison de propriétés optiques μ_a et μ_s' , d'épaisseur des couches de l'échantillon et de décalage spatial en relativement peu de temps. Cette relation a d'abord été étudiée sommairement grâce à des simulations Monte-Carlo, dans des conditions spécifiques afin d'évaluer les performances de la méthode [55], puis dans le but d'évaluer différentes géométries et l'impact des propriétés optiques dans le cadre de l'évaluation des marges tumorales en cancer du sein [56]. Une autre étude plus récente s'est intéressée à ce problème dans le cadre de mesures transcutanées des os grâce à un modèle Monte-Carlo à multiniveaux [57]. De manière plus générale, une méthodologie a été proposée afin d'établir une correspondance entre la profondeur de pénétration et le décalage spatial en fonction du coefficient de diffusion réduit du milieu de surface [58]. Cette méthodologie repose sur des résultats obtenus par simulation numérique Monte-Carlo. Finalement, notre groupe a développé une méthode de validation expérimentale des simulations Monte-Carlo pour l'analyse des tissus biologiques [59].

Pour compléter les simulations numériques, il est nécessaire d'étudier les performances des systèmes de spectroscopie Raman sur des échantillons simulant les propriétés optiques des tissus biologiques. Ces échantillons sont appelés des fantômes optiques, et ils peuvent se trouver sous la forme liquide, solide à base de polymère, de gélatine ou sous forme d'échantillon animal. Les échantillons synthétiques, liquide ou solide, offrent cependant la meilleure disponibilité, flexibilité de fabrication et stabilité à long terme. Malgré l'utilisation grandissante des fantômes optiques de tissus biologiques en spectroscopie Raman avant l'implémentation en contexte clinique, il existe assez peu d'études consacrées à la fabrication de fantômes optiques en SORS [60]. Dans cette

revue, 14 des 70 études présentées utilisent la modalité SORS. Elles sont résumées dans le Tableau 2.3.

Tableau 2.3 Résumé des différents fantômes optiques réalisés pour des études SORS. Traduit et adapté de [60].

Auteurs	Type de fantôme	Composition du fantôme	Modalité Raman	But de l'étude
Maher et Berger [61]	Liquide	Crème laitière et Teflon	SORS	Évaluation du décalage spatial optimal
Moody et al. [62]	Hydrogel	Gel d'agarose dans un crâne NPs d'or (SERS)	SESORS	Détection des neurotransmetteurs
Nicolson et al. [63]	Hydrogel	Agarose Crâne de souris enveloppé dans du tissu porcin PTFE	SORS	Évaluation de la modalité SESORS pour la détection de tumeurs cérébrales
Petterson et al. [64]	Solide	PDMS TiO ₂ CaCO ₃ , HAP	RS temporelle SORS	Comparaison de systèmes
Mosca et al. [65]	Solide	PE Paracétamol	SORS TRS	Prédiction de la profondeur
Dooley et al. [66]	Solide	PCL/DCM HAP	SORS	Évaluation du SORS pour la surveillance de la minéralisation des tissus
Stone et al. [48]	Animal	Poitrine de poulet avec la peau HAP, COHAP, COM	SORS	Évaluation du système pour la détection de calcification
Stone et al. [49]	Animal	Tissu porcin NPs (SERS)	SESORS multiplexé	Évaluation de détection du signal Raman
Mosca et al. [67]	Animal	Tissu porcin NPs d'or (SERS)	SESORS TRS	Évaluation du système pour la détection d'inclusion et prédiction de la profondeur
Xie et al. [68]	Animal	Muscle porcin NPs (SERS) Bisphosphonates	SESORS	Évaluation de la détection de NPs spécifiques à l'os sous du tissu
Dey et al. [69]	Animal	Poitrine de poulet NPs d'or (SERS)	SESORS	Évaluation du système

Asiala et al. [50]	Animal	Lame de verre Tissu porcin NPs (SERS)	SEORS	Évaluation du système
Sharma et al. [70]	Animal	Tissu ovin avec l'os Nanotags BPE (SERS)	SEORS	Preuve de concept par l'acquisition de signal à travers l'os
Wang et al. [71]	Animal	Tissus porcin maigre NPs d'or en gélatine (SERS)	SORS Tomographie Raman	Évaluation du système

Abréviations : BPE, trans1,2-bis(4-pyridyl)-éthylène ; COHAP, hydroxyapatite substituée par du carbonate ; COM, oxalate de calcium monohydraté ; DCM, dichlorométhane ; HAP, hydroxyapatite ; NP(s), nanoparticule(s) ; PCL, polycaprolactone ; PDMS, poly(diméthylsiloxane) ; PE, polyéthylène ; PTFE, polytétrafluoroéthylène ; TRS, spectroscopie Raman en transmission

On peut remarquer que la moitié de ces études s'intéressent au SEORS, et qu'une majorité d'études utilisent des fantômes animaux. De plus, seulement 3 de ces études, Mosca et al. [67], Mosca et al. [65] et Maher et Berger [61] utilisent leurs fantômes dans le but de déterminer le décalage spatial optimal ou la prédiction de la profondeur détectée. Il existe donc un manque de connaissances sur ce sujet. Ce mémoire tente alors d'ouvrir la voie vers la création d'une compilation de paramètres pour prédire la profondeur de détection d'un décalage spatial donné, ou, à l'inverse, de déterminer le décalage spatial optimal pour effectuer des mesures à une profondeur spécifique, en tenant compte des propriétés optiques des milieux diffusifs.

CHAPITRE 3 DÉMARCHE DE L'ENSEMBLE DU TRAVAIL DE RECHERCHE

Dans le cadre de ce projet de recherche, diverses contributions à des articles de recherche ont été réalisées. Ce chapitre fait état des différentes contributions aux articles cités ici, ainsi que d'une brève introduction au projet de développement de fantômes optiques pour la caractérisation des performances du système présenté par l'article au chapitre 4 (contribution premier auteur). Les contributions, comme auteur secondaire, aux articles que nous avons réalisés incluent l'amélioration d'un système macroscopique de spectroscopie Raman à balayage linéaire en vue d'une utilisation en salle d'opération [27], le développement d'un protocole d'imagerie de tissus biologiques à l'aide dudit système d'imagerie [72] ainsi que le développement d'un protocole de calcul de la densité cellulaire à partir d'images pathologiques [73]. La conception optique et les composants principaux du système utilisé dans le cadre de ces projets seront aussi décrits dans ce chapitre.

3.1 Système macroscopique de spectroscopie Raman à balayage linéaire

3.1.1 Description générale

Le système de spectroscopie Raman utilisé dans ce travail a été initialement développé dans le laboratoire, et se distingue des systèmes de spectroscopie Raman courants, qui sont des sondes de mesures à point unique, par le fait qu'il image une surface d'environ 1 cm². Ce système répondait à un besoin clinique d'avoir un système rapide de guidage lors des chirurgies [26].

La Figure 3.1 présente le schéma optique du système à balayage linéaire. On distingue trois parties principales. Sur la Figure 3.1(a), la sonde d'imagerie projette une ligne laser de 1 cm de longueur et de 400 µm d'épaisseur. On retrouve dans sa construction optique un filtre passe-bande de ligne laser (LLF) ainsi qu'un péricope pour acheminer la ligne laser vers l'échantillon. La lumière collectée est ensuite transmise par un filtre passe-bas (LPF), puis par un filtre coupe-bande (NF) qui assure qu'aucune lumière laser ne vient contaminer le signal collecté. Sur la Figure 3.1(b), la branche d'excitation est responsable de former et d'envoyer la ligne laser, ainsi que la lumière blanche, dans le faisceau de fibre d'excitation (EFB) vers la sonde. Un laser multimode fibré est envoyé à travers diverses lentilles cylindriques orientées horizontalement et verticalement (LH, LV) jusqu'à l'entrée du EFB monté sur une platine de translation linéaire motorisée. Ce sont ces

lentilles cylindriques qui permettent de créer une ligne laser à partir du faisceau initial. La platine assure le repositionnement du faisceau de fibres par rapport à la ligne laser, qui cause le balayage de la ligne laser en sortie du faisceau, donc à la sonde. La source de lumière blanche est aussi envoyée colinéairement au laser vers le EFB grâce à un LPF. Sur la Figure 3.1(c), la branche de collection est responsable de collecter et séparer les signaux Raman et de lumière blanche, respectivement envoyé vers le spectromètre et la caméra RBG. En entrée, le faisceau de fibre de collection (CFB) projette une image sur la chambre optique de séparation. Au milieu de cette chambre, un filtre passe-haut monté sur un galvanomètre (S-HPF) transmet l'image RGB vers la caméra dédiée, et projette l'image Raman vers le spectromètre. Puisque le spectromètre ne prend en entrée qu'une fente de lumière, le galvanomètre permet de faire correspondre la région de l'image alignée sur la fente avec la position de la ligne laser dans le champ de vue. Le spectromètre décompose alors cette fente de lumière sur une caméra CCD dédiée, créant une image ayant une dimension spatiale en y et spectrale en x . Le balayage simultané de la ligne laser et du galvanomètre en synchronisation permet alors d'imager tout le champ de vue, et d'obtenir des images hyperspectrales en trois dimensions (deux spatiales et une spectrale).

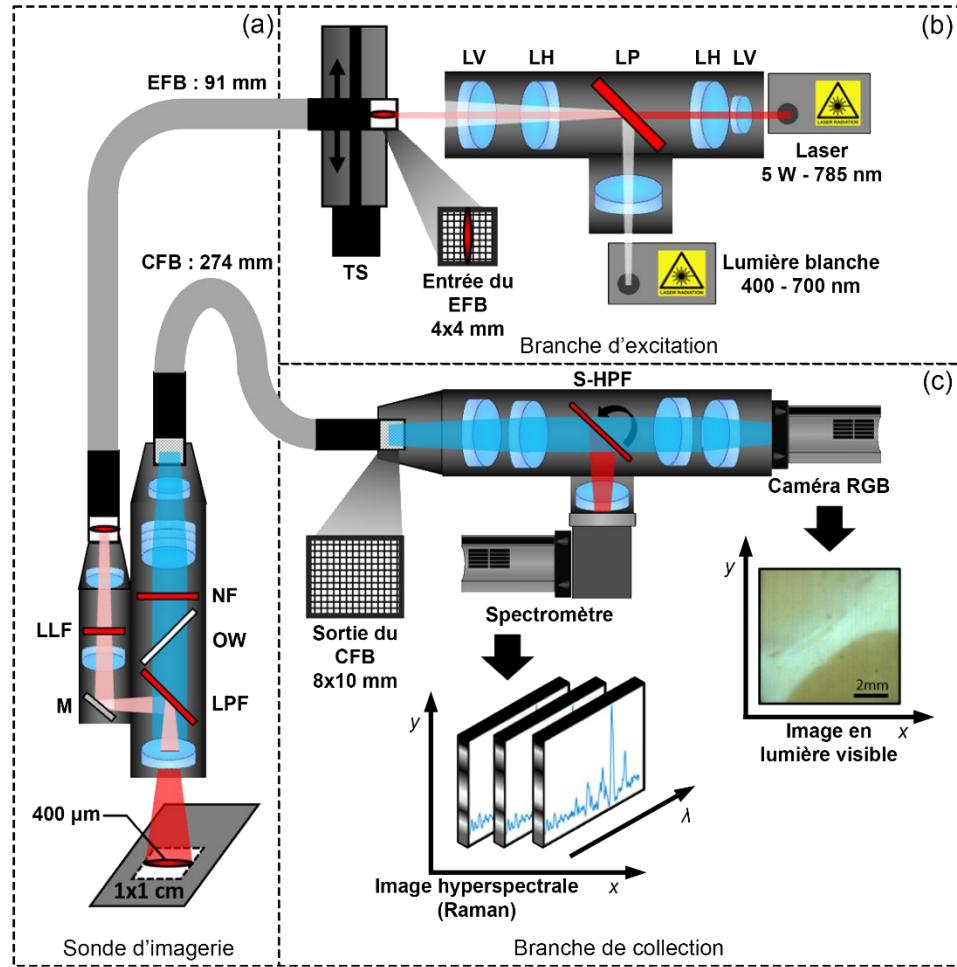


Figure 3.1 Schéma du système optique du système de spectroscopie Raman par balayage linéaire, et ses trois parties principales : (a) la sonde d'imagerie ; (b) la branche d'excitation ; (c) la branche de collection.
Traduit et adapté de [26].

3.1.2 Description des composants

La branche d'excitation est, telle qu'énoncé précédemment, responsable de créer la lumière laser et la lumière blanche pour illuminer l'échantillon. Le laser est le modèle I0785MU5000M4S-NT de chez Innovative Photonic Solutions (IPS). Centré à 785 nm, il a une largeur de raie spectrale inférieure à 0.2 nm et une puissance nominale de 5 W. Il s'agit d'un laser continu, fibré ayant une ouverture numérique (O.N.) de 0.39. Le laser est contrôlé en tension par une carte d'acquisition numérique (DAQ), modèle USB-6351 de National Instruments. Le DAQ permet aussi de synchroniser tous les appareils nécessaires lors des prises de mesures, incluant le laser, la caméra CCD, la platine de translation et le galvanomètre. La source de lumière blanche est une diode électroluminescente (DEL) blanche chaude, avec une température de 3000 K (spectre d'émission

entre 400 et 800 nm), modèle MWWHL4 de Thorlabs, USA. La ligne laser verticale de $100 \mu\text{m} \times 4 \text{ mm}$ est projetée vers l'EFB (4 mm \times 4 mm, fibres multimodes de diamètre 400 μm , O.N. 0.22, IG-154, Schott, USA). L'extrémité du faisceau de fibres est montée sur une platine de translation linéaire motorisée modèle A-LSQ075A-E01 de Zaber, Canada.

La sonde d'imagerie est composée de lentilles, filtres optiques et miroirs permettant d'acheminer la ligne laser vers l'échantillon, et de collecter le signal Raman pour l'acheminer vers la branche de collection. Particulièrement, on y retrouve un filtre de ligne laser centré à 785 nm (LL01-785-12.5, Semrock, USA) à une largeur de bande de 3 nm, et un spectre de transmission aussi dans le visible de 425 à 600 nm. Un miroir dichroïque assure que 50% de la lumière blanche soit reflétée vers l'échantillon, tout en laissant passer 50% de la lumière blanche reflétée par l'échantillon vers la branche de collection.

Finalement, la branche de collection regroupe les différentes caméras et composants optiques nécessaires à l'enregistrement des images Raman et RGB. Les images Raman et RGB provenant de la sonde sont acheminées à la branche de collection à l'aide d'un autre faisceau de fibre de 8 mm \times 10 mm (IG-163, Schott, USA). La caméra CCD est le modèle Andor Newton 920 d'Oxford Instruments. C'est une caméra refroidie qui peut atteindre -80°C et offre un capteur horizontal de 1024 \times 256 pixels. Le refroidissement de la caméra permet de limiter le bruit thermique, qui provient d'un courant non nul circulant dans le capteur même lorsqu'aucun photon n'est absorbé. La réduction du bruit est nécessaire afin de mesurer des signaux Raman parfois du même ordre de grandeur que le bruit thermique à température ambiante. La caméra est contrôlée par connexion USB par l'intermédiaire du DAQ. Elle est placée en sortie d'un spectromètre construit sur mesure de EmVision, USA, modèle EH 0001. Il dispose d'une fente d'entrée d'une largeur de 200 μm , et de 1 cm de hauteur. Le spectromètre produit une résolution spectrale de 8 cm^{-1} sur une plage de 350 à 2100 cm^{-1} (807 à 940 nm), avec une ouverture numérique de 0.22. La caméra RGB (DCC1240C, Thorlabs, USA) possède un capteur CMOS couleur de 1280 \times 1024 pixels. Elle est aussi contrôlée via USB par le DAQ. Les images Raman et RGB sont séparées à l'aide d'un miroir dichroïque (FLD 748 DSP, Iridian, USA) ayant une bande de transmission de 400 à 738 nm ($> 90\%$) pour laisser passer l'image en lumière blanche vers la caméra RGB et une bande de réflexion de 758 à 1000 nm ($> 97\%$) pour refléter le signal Raman vers le spectromètre. Ce miroir est placé sur un galvanomètre (6870M, Novanta, USA) contrôlé par le DAQ et synchronisé avec la platine

de translation de sorte que la position de l'image Raman alignée avec la fente du spectromètre corresponde à la position de la ligne laser sur l'échantillon.

Le système est aussi équipé d'un transformateur d'isolement de grade médical (MEDBOX-1200, Amgis LLC, USA) de 1200 W pour des raisons de sécurité et de performance. En effet, cela permet de limiter le bruit électrique, nuisible à la caméra Andor, mais aussi d'éliminer les risques d'électrocution. De plus, le MEDBOX permet aussi de protéger les équipements électroniques en cas de panne de courant, court-circuit ou autres problèmes électriques.

3.1.3 Acquisitions

Le système est contrôlé par un logiciel développé sur mesure avec l'application LabVIEW 2018, version 18.0f2 (Figure 3.2). Le logiciel permet de contrôler les principaux éléments du système, c'est-à-dire la caméra RGB, la source de lumière blanche, la caméra Andor, le laser, le galvanomètre ainsi que la platine de translation. La caméra RGB est contrôlée indépendamment du processus de prises de mesure, et est utilisée pour faire la mise au point sur l'échantillon. Le logiciel permet de contrôler tous les paramètres nécessaires à la prise de mesure de la caméra Andor tels que la température, le gain, le mode de lecture du capteur, ainsi que les paramètres d'acquisition (mode, temps d'exposition, nombres d'accumulations, etc.). La puissance du laser est contrôlée manuellement par le logiciel, et son allumage peut être soit manuel ou synchronisé avec le reste des équipements. De même, la platine de translation et le galvanomètre peuvent être opérés manuellement ou synchronisés.

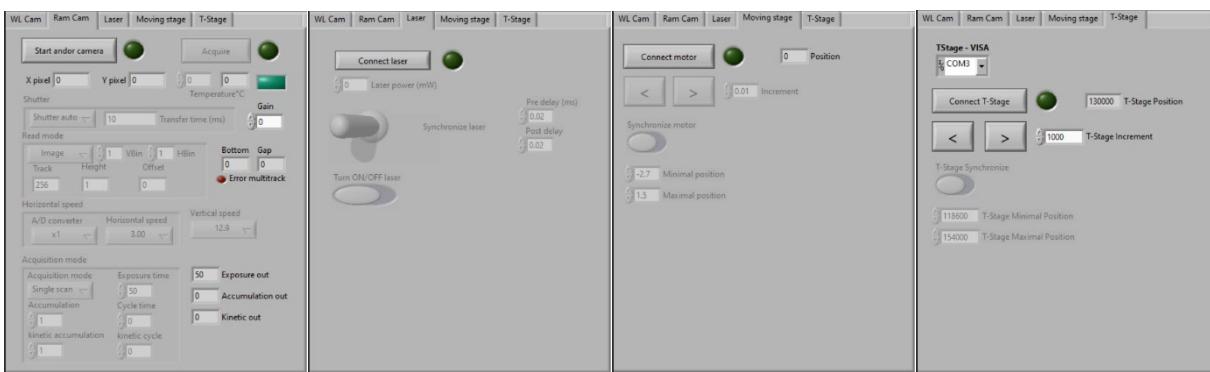


Figure 3.2 Interface utilisateur des différents panneaux de contrôle du logiciel du système Raman à balayage linéaire.

Une étape de calibration du système est toujours nécessaire avant de prendre des mesures. Cette calibration permet de définir les positions minimales et maximales de la platine de translation et du

galvanomètre pour garder la ligne de mesure dans les limites du champ de vue de la sonde. Un échantillon de poudre d'acétaminophène est placé sous la sonde et la mise au point est faite. La caméra est ensuite refroidie jusqu'à -70°C, puis le processus de calibration peut commencer. Les positions maximales et minimales sont définies lorsque le signal Raman de l'acétaminophène atteint 25% de son intensité au centre du champ de vue.

La prise de mesures est ensuite effectuée sur tous les échantillons requis, selon le cas. De même, la mise au point est faite sur chaque échantillon avant les mesures Raman à l'aide de la lumière blanche et la caméra Thorlabs. La lumière blanche est toujours éteinte pendant les mesures. La caméra Andor est opérée en mode de lecture Image, avec un regroupement des lignes verticales par groupe de 6, et en mode d'acquisition cinétique, avec 40 accumulations cinétiques. Les accumulations cinétiques indiquent au système de décaler la platine de translation et le galvanomètre après chaque mesure, ainsi que le nombre de décalages à effectuer sur la plage des valeurs de positions minimales et maximales définies lors de la calibration. Le temps d'exposition par ligne est variable en fonction de l'échantillon. Les valeurs typiques sont de 500 ms/ligne pour l'acétaminophène, 5 s/ligne pour le NIST et 5-15 s/ligne pour les échantillons biologiques. Le laser est toujours opéré à sa puissance maximale de 5W, contrôlé par une tension de 1.45 V. Le laser, la platine de translation et le galvanomètre sont toujours opérés de manière synchronisée lors des mesures.

La mesure d'un échantillon se compose de 40 images Raman correspondant chacune à une position de la ligne de scan dans le champ de vue. Ces images Raman sont des fichiers TIFFs de 1024×42 pixels à cause du regroupement par 6 des lignes du capteur de la caméra Andor, où l'on retrouve une dimension spatiale le long de la ligne de scan sur l'axe y et le décalage Raman sur l'axe x . Les 40 différentes images représentent la dimension spatiale perpendiculaire à la ligne de scan, et forment une image hyperspectrale Raman de l'échantillon.

3.2 Prototypage du système pour un usage en clinique

Plusieurs études cliniques *ex-vivo* ont été prévues dans le but d'évaluer la performance du système. Afin de pouvoir amener le système d'imagerie en salles d'opération, plusieurs modifications sont requises pour assurer la praticité et la sécurité du système pour le patient et le personnel. Tout d'abord, le système a été monté sur un chariot de transport robuste (POC001, Thorlabs, USA) à deux étages pour supporter toutes les parties du système. La sonde d'imagerie est supportée par un

bras articulé (BRAPT7880, B&D, Italie) monté sur le système. Un système de rotules sur mesure a été ajouté au bout du bras articulé, assorti d'une platine de translation linéaire afin de maximiser la flexibilité et la liberté de positionnement de la sonde. Les faisceaux de fibre sont attachés au bras articulé de manière à ne pas entraver leur mobilité, tout en réduisant l'encombrement.

Des mesures de stérilisation du système sont aussi nécessaires pour pouvoir l'amener en salle d'opération. Pour cela, les parties visibles du système sont stérilisées à l'aide de lingettes disponibles dans le bloc opératoire. De plus, le bras articulé est déployé au maximum, jusqu'à une longueur de 1.5 m pour éloigner le système au maximum de la zone stérile et ne pas gêner le personnel. Un drap stérile tubulaire est ensuite passé autour de la sonde et du bras articulé, puis scellé à chaque extrémité. Finalement, un museau en acier inoxydable de qualité 304 construit sur mesure est fixé au bout de la sonde à l'aide de pistons à ressort. Le museau peut être réutilisé et résiste aux procédures de stérilisation de l'hôpital. La fenêtre de verre à l'extrémité du museau est composée de MgF_2 pour son indice de réfraction proche de celui de l'eau et son absence de signal Raman/fluorescence. Elle est scellée hermétiquement au museau grâce à un époxy médical résistant à de hautes températures. Initialement, l'époxy EPO-TEK MED-353ND était utilisé, mais fut remplacé par l'époxy EPO-TEK 320 à cause de réflexion interne causant une forte fluorescence de l'époxy 353 lorsque le museau de sonde était en contact avec un tissu fortement diffusif tel que du gras (Figure 3.3a). À l'inverse, lorsque le museau réalisé avec de l'époxy 320 a été testé sur un autre échantillon fortement diffusif, le nylon, aucune différence n'a été mesurée entre les spectres avec et sans le museau (Figure 3.3b).

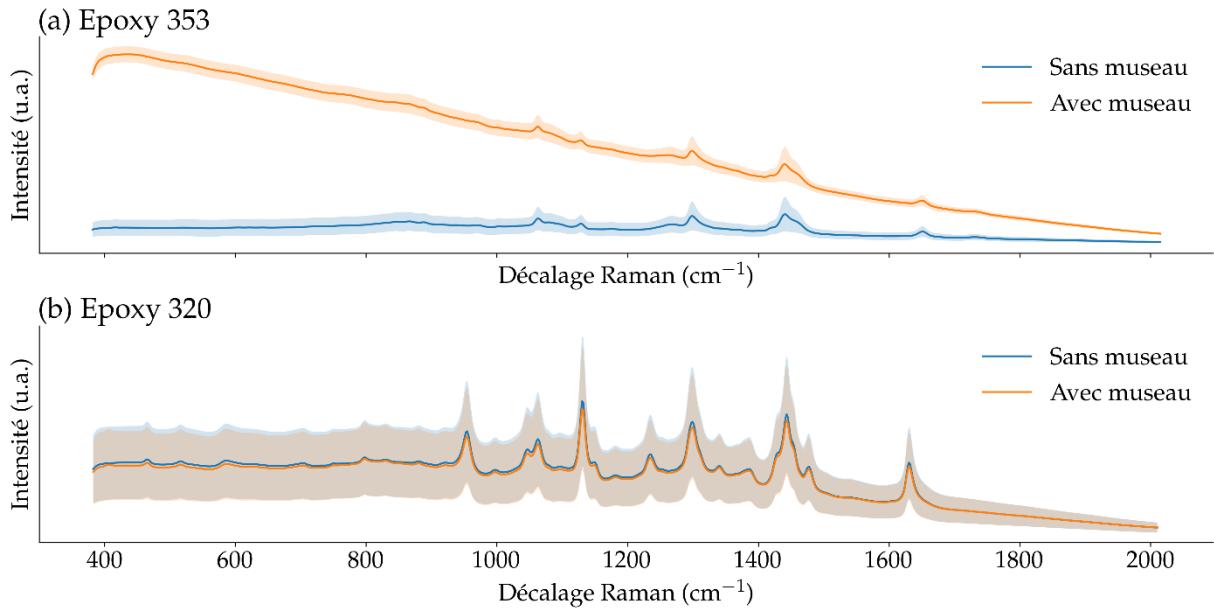


Figure 3.3 Comparaison de l’effet de la fluorescence provenant de l’époxy utilisée dans le museau de la sonde. L’époxy 353 (en haut) a été testé sur du gras de porc et l’époxy 320 (en bas) sur du Nylon. Moyenne et écart-type de 1440 spectres. Les axes des ordonnées ne sont pas à la même échelle.

La sécurité laser est aussi un autre élément important dont il faut tenir compte. Plusieurs systèmes de sécurité permettent de limiter l’exposition accidentelle à de la lumière laser. Tout d’abord, la partie d’excitation, là où se trouve la source laser, se situe sur le niveau du bas du chariot, à hauteur des genoux. Le rayon est dirigé parallèlement au sol. De plus, des cages de protection ont été ajoutées aux parties d’excitation et de collection du système, fabriquées sur mesure à l’aide de rails optiques de 25 mm Thorlabs et de panneaux durs noirs. Ces cages de protection permettent d’éviter toute fuite de lumière vers le personnel, mais élimine aussi les contaminations potentielles du signal Raman, provenant de l’éclairage ambiant. Finalement, un bouton de sécurité laser a été ajouté au système, en cas de fuite de lumière accidentelle ou tout autre problème.

3.3 Protocole d’imagerie *ex-vivo* en cancer du sein

Une étude préliminaire tentant de démontrer l’applicabilité des modèles de classification préalablement développés au sein du Lumed Lab sur les données du système macroscopique a été réalisée sur 6 patientes atteintes de cancer du sein et nécessitant une chirurgie mammaire [72]. Un protocole d’imagerie a alors été développé afin de pouvoir corrélérer efficacement les images Raman, les images en lumière blanche et les images histologiques fournies par la suite par le département de pathologie.

Le protocole d'imagerie référence deux cas de figure ; lorsque l'échantillon mesure moins de 1 cm, il ne peut pas être découpé sans risquer d'endommagement et est donc mesuré entier. Les échantillons ayant une taille supérieure à 1 cm suivent un processus différent. Ils sont d'abord découpés pour rentrer entièrement dans le champ de vue du système. Une fois les échantillons réduits à une taille propice à l'imagerie si besoin, ils sont placés sur une feuille d'aluminium anodisé noir, elle-même sur un bloc de polystyrène marqué de l'orientation du tissu. Une image en lumière blanche est alors prise avec les marques de l'orientation du tissu visible pour la corrélation avec les autres modalités d'imagerie par la suite. L'acquisition Raman est effectuée sur tout le champ de vue, avec une puissance laser de 500 mW, un temps d'exposition de 10 s par ligne (40 lignes par image) et une répétition de 3 images par échantillon, moyennées pour améliorer le signal sur bruit. Les différentes faces de l'échantillon ont ensuite été marquées à l'encre selon l'orientation, puis l'échantillon a été fixé dans une solution de formaldéhyde concentré à 10% pour le processus d'inclusion en paraffine et de coupe histologique.

Ce protocole a permis d'obtenir des images en lumière blanche (Figure 3.4 colonne *White-light*) colocalisées avec les résultats de classification des modèles (Figure 3.4 colonne *Classification*). Les images des autres colonnes (*Histology* et les pics Raman) proviennent d'autres systèmes. Puisque chaque pixel d'une image Raman acquise par le système macroscopique à balayage linéaire, chaque pixel de l'image peut être analysé et identifié par un modèle de classification de tissu sain versus tissu cancéreux. Cependant, le modèle ne pouvait assigner correctement les pixels ayant un spectre différent, celui du gras. Ainsi, un nouveau modèle de tri filtrait d'abord les pixels de « gras » versus « autres », puis le modèle de classification des tissus cancéreux s'appliquait au pixel s'il était classé « autres » par le premier modèle. Cette classification en deux étapes a permis de construire les cartes de classifications présentées à la Figure 3.4.

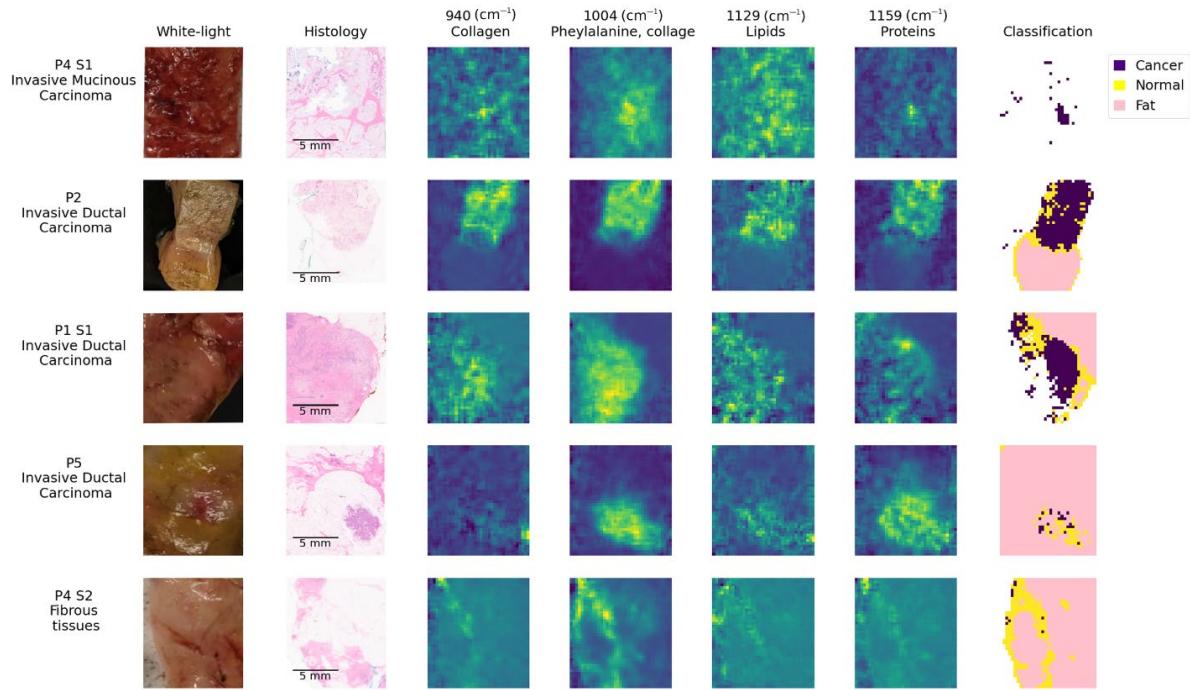


Figure 3.4 Résultats de 5 sur 8 des échantillons de cancer du sein imités. Le protocole d'imagerie *ex-vivo* développé ici à permis d'obtenir les images de la colonne *White-light* et *Classification*. Tiré et adapté de [72].

3.4 Protocole de calcul de la densité cellulaire en cancer du cerveau

Une autre étude préliminaire démontrant la détection de cellules cancéreuses résiduelles lors de l'extraction de tumeurs cérébrales, effectuée sur 9 patients, a été réalisée [73]. Les résultats prédictifs des zones cancéreuses des différents échantillons mesurés ont été comparés avec des cartes de densité cellulaire produites à partir des images histologiques des échantillons. Les images histologiques colorées à l'hématoxyline et à l'éosine fournies par le département de pathologie sont aussi légendées des différents types de tissus retrouvés dans l'échantillon. Ces marqueurs sont alors utilisés pour corrélérer la prédiction du modèle de classification et la densité cellulaire locale du tissu, qui peut alors devenir un indicateur de l'état du tissu (cancéreux, sain, nécrosé). Un protocole de détection et dénombrement des noyaux cellulaires sur les images histologiques a donc été développé, dans le but de créer une cartographie de la densité cellulaire de chaque échantillon mesuré.

Le logiciel d'analyse d'image biologique QuPath a été utilisé pour la détection et la création des cartes de densité. Tout d'abord, la détection de cellules s'est faite à l'aide de la fonction *Cell*

Detection avec les paramètres par défaut sur les images histologiques. Ensuite, la densité cellulaire a été calculée grâce à la fonction *Density map* du logiciel, avec un rayon de calcul de 282 µm autour de chaque pixel afin d'obtenir le nombre de noyaux par 0,25 mm². La densité sera ensuite convertie par mm² en multipliant les valeurs d'un facteur 4. Cependant, cette méthode pose un problème au bord du tissu et de l'image, puisque le compte de densité est influencé par une zone vide. Afin de corriger ce problème, un programme Python a été développé afin de quadriller l'image en sections de 256 × 256 pixels, puis de dupliquer les sections remplies avec du tissu dans les sections vides d'au moins 5% pour extrapoler la densité cellulaire en dehors du tissu original. Des sections ont aussi été dupliquées sur tout le pourtour de l'image afin d'éliminer les effets de bord de l'image originale. Les sections dupliquées ont été utilisées seulement pour le calcul de la densité, et un masque binaire du contour du tissu original produit par le logiciel ImageJ a été appliqué ensuite pour ne considérer que les valeurs de densité cellulaire à l'intérieur des contours du tissu (Figure 3.5). La création des figures a été réalisée ensuite sous Python à l'aide de la bibliothèque Scikit-image.

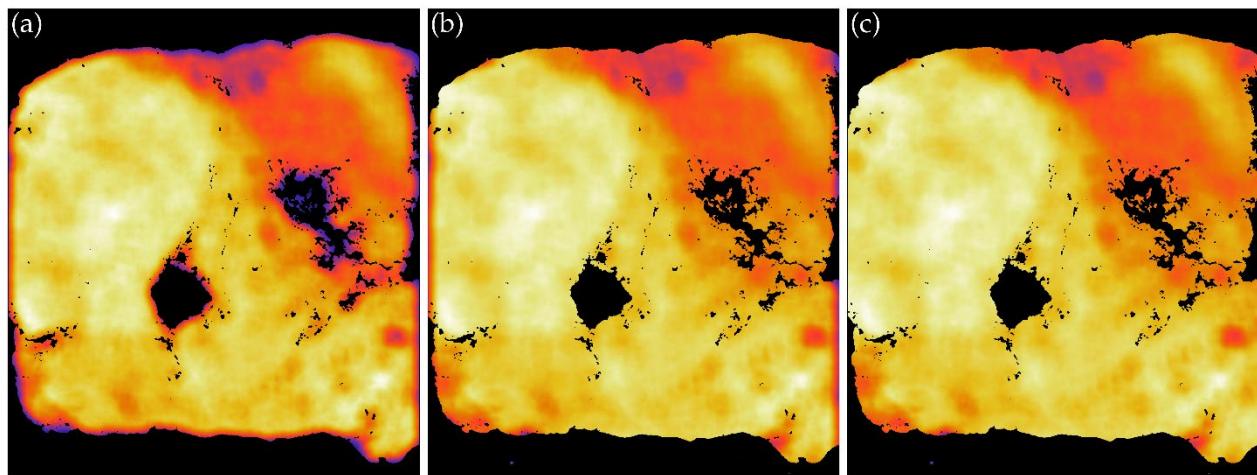


Figure 3.5 Comparaison des cartes de densité cellulaire d'une image histologique (a) sans correction ; (b) corrigé pour les effets de bord du tissu ; (c) corrigé pour les effets de bords du tissu et de l'image

3.5 Développement de fantômes optiques pour l'imagerie SORS

La construction optique du système permet de désynchroniser les lignes laser et de mesure, ce qui crée un décalage entre la position d'excitation sur le tissu biologique et la position de collection du signal. Ce décalage spatial permet d'imager le tissu en profondeur selon la spectroscopie Raman décalée spatialement présentée plus tôt. L'usage combiné de spectroscopie Raman conventionnelle

et décalée spatialement grâce au même système d'imagerie serait un atout puissant pour la recherche. Afin de démontrer les possibilités d'utilisation du SORS avec ce système à balayage linéaire, il a fallu développer un protocole de fabrication de fantômes optiques à deux couches ayant des coefficients optiques proches de ceux des tissus biologiques.

L'utilisation de fantômes optiques solides en polymère était déjà répandue, grâce à son fort signal Raman et sa faible fluorescence à 785 nm. Le polydiméthylesiloxane (PDMS) est un polymère transparent, très stable sur le long terme et simple à fabriquer. Afin de contrôler les propriétés optiques de PDMS, il est possible d'y ajouter des agents de diffusion et d'absorption. La poudre de dioxyde de titane (TiO_2) pour la diffusion et de l'encre noire de Chine pour l'absorption sont des agents couramment utilisés dans ce domaine. Le Nylon est largement utilisé à des fins de calibration dans divers systèmes Raman grâce à son fort signal Raman et sa faible fluorescence. Les fantômes optiques développés pour ce projet utiliseront ces deux matériaux pour leur fabrication. Plusieurs combinaisons de concentrations des agents de diffusion et d'absorption ont été réalisées, à différentes épaisseurs de la couche de PDMS par-dessus la couche de Nylon. À l'aide de ces fantômes optiques, nous avons pu démontrer la détectabilité de la couche inférieure à travers le PDMS. Le développement des fantômes ainsi que les résultats associés seront décrits plus en détail au chapitre suivant, par le biais d'un article soumis à une revue à comité de lecture.

CHAPITRE 4 ARTICLE 1: AN EXPERIMENTAL METHOD TO ASSESS DEPTH SENSING LIMITS OF INELASTIC SCATTERING MEASUREMENTS USING SPATIAL-OFFSET RAMAN SPECTROSCOPY IMAGING

Hugo Tavera,^{a,b} Guillaume Sheehy,^{a,b} Patrick Orsini,^c Jacques Bismuth,^c Marie-Maude Baillargeon,^c Maroun Massabki,^c Jean-François Masson,^d Frederic Leblond^{a,b,*}

^aDepartment of Physics Engineering, Polytechnique Montreal, Montreal, QC, Canada

^bImaging and Engineering Axis, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Montreal, QC, Canada

^cOptech, Montreal, QC, Canada

^dDepartment of Chemistry, Institut Courtois, Centre interdisciplinaire de recherche sur le cerveau et l'apprentissage, Quebec Center for Advanced Materials, Regroupement québécois sur les matériaux de pointe, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada

*Corresponding author, E-mail: frederic.leblond@polymtl.ca

Soumis au *Journal of Biomedical Optics*,

le 18 mars 2025

4.1 Mise en contexte

Cette section ne fait pas partie de la version originale de l'article.

Nous avons vu l'importance de pouvoir évaluer la composition des tissus biologiques en profondeur de manière non invasive. La méthode expérimentale présentée dans ce chapitre vise à évaluer empiriquement la relation entre le décalage spatial et la profondeur de pénétration des photons dans le tissu biologique. La méthode propose un protocole de fabrication de fantômes optiques solides à deux couches dont les propriétés optiques μ_a et μ_s' sont contrôlées indépendamment. De plus, l'expérience permet de démontrer les capacités SORS d'un système d'imagerie Raman macroscopique à balayage linéaire, initialement conçu pour l'imagerie de surface.

Cette méthode expérimentale ainsi que les résultats associés ont été soumis au *Journal of Biomedical Optics* le 18 mars 2025 pour publication. Le premier auteur a contribué à hauteur de 80%, réalisant la fabrication des fantômes optiques, la prise de mesure, le traitement des données, et la rédaction initiale de l'article. Il a aussi largement contribué à la conception du protocole

expérimental avec l'aide et sur l'initiative du coauteur Guillaume Sheehy. La rédaction finale de l'article a été effectuée par le coauteur Frédéric Leblond.

4.2 Abstract

Significance: The relationship between spatial offset and tissue sensing depth is not well understood in spatial offset Raman spectroscopy (SORS). Detection of the subsurface biochemical composition could improve clinical translation of SORS-based methods, including for lumpectomy margins characterizations in breast cancer surgery.

Aim: This study aimed at developing an experimental method establishing a relationship between spatial offset in SORS and sampling depth. The technique was developed using a custom hyperspectral line-scanning imaging system optimized for Raman spectroscopy detection.

Approach: Bi-layer phantoms were produced with top and bottom layers made of material with different Raman spectroscopy signatures, i.e. PDMS and Nylon. The top layer of PDMS had different values of absorption and reduced elastic scattering coefficients, as well as thickness up to ~3 mm. A metric was defined, called spectral angle mapper, that allowed to compare SORS measurements with reference spectra of pure PDMS and Nylon. That metric was used to develop a metric predicting sensing depth for different values of spatial offset. A proof-of-concept study was also developed to assess the performance of the method in biological tissue, demonstrating detectability of protein-rich tissue across layers of fat.

Results: A total of 60 optical phantoms with varying optical properties and top layer thicknesses were imaged and processed to estimate sampling depth as a function of spatial offset. The study demonstrated detectability of the underlying Nylon layer across a PDMS layer up to 2 mm thickness. Similarly, detectability of meat tissue was demonstrated across layers of oil up to 1 cm thick.

Conclusions: The study showed the feasibility of using bi-layer solid optical phantoms to create correlation curves between the optimal spatial offset for a desired probed depth given the optical properties of the top layer. The technique could facilitate the clinical translation of SORS measurements for tumor detection and margins assessment.

Keywords: Raman spectroscopy, inelastic scattering, depth-resolved imaging, fluorescence, tissue optics, biochemistry.

4.3 Introduction

Spontaneous Raman spectroscopy is a well-established imaging method for tissue characterization, due to its molecular specificity and high sensitivity to biochemical content [29]. A large range of in vivo studies were conducted demonstrating the ability of the technique to detect tumor tissue in the context of oncology applications, including cervical, oral and skin cancer [30]. We have developed, and integrated into the neurosurgical workflow, intraoperative Raman spectroscopy, or *iRS*. The technique is based on a single-point macroscopic Raman spectroscopy probe system that can detect tumor tissue live, *in situ* during surgical procedures [5], [10], [25]. We subsequently developed the next-generation system, a hyperspectral macroscopic line-scanning instrument combining Raman spectroscopy and visible imaging to create 2D maps discriminating tumor from normal tissue from machine learning models trained using data acquired with the *iRS* system [26], [27]. The imaging system was designed for surgical-guidance applications in neurosurgery [73] and for lumpectomy specimen margins inspection in breast-conserving surgery [72].

While these two Raman spectroscopy techniques showed potential for label-free intraoperative tumor detection, pitfalls exist that could limit the real-world applicability of the tumor detection machine learning models. For example, erroneous predictions could result from spectroscopic measurements acquired in areas associated with cauterized or damaged tissue, as well as for measurements made in the presence of pathology inks or surgical blood, i.e. blood pooling. This is because predictive models are usually developed using supervised machine learning approaches to discriminate pathological from normal tissue, without including measurement instances associated with other tissue types. As a result, new techniques are required to reduce the impact of known or unanticipated sources of tissue spectral signature contamination on predictions made using Raman spectroscopy and machine learning.

Spatial-offset Raman spectroscopy, referred to as SORS, is a method developed to probe materials non-invasively by detecting inelastically scattered photons at depth [31], [32], [33], [34], [35]. When applied to tissue imaging, the technique can be used to retrieve Raman scattering information from subsurface layers, thereby potentially allowing to probe normal or tumor tissue underneath

layers of, e.g., blood pooling or tissue scarring. The method relies on the transverse-biased motion of diffused photons in a turbid medium. In its most common embodiment, based on fiber-optics probe systems, inelastically scattered and endogenous fluorescence photons are retrieved by offsetting the collection and excitation fibers by a distance Δs . Depth sensing modulation can then be achieved by varying Δs , with larger values leading to increased tissue penetration [36]. This, however, poses a conundrum since larger offsets lead to diminished levels of light, further increasing the difficulty of detecting Raman photons superposed with large endogenous fluorescence baselines. In SORS, the illumination fibers are usually at the center of the probe instrument and detection is achieved using optical fibers disposed over the perimeter. Several instruments were developed based on variations of the principle of depth-resolved Raman spectroscopy. This included inverse SORS where tissue interrogation was achieved from an excitation ring of fibers circumferentially distributed around a collection fiber in the center [37]. This provided improved light sensitivity, higher permissible exposure of laser intensity and enhanced flexibility to control spatial offset. Other studies used SORS in combination with surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) with the objective to increase sensitivity of subsurface layers using metallic nanoparticles [50]. The resulting surface-enhanced spatial-offset Raman spectroscopy technique, christened SESORS, was also used to monitor the temperature of nanoparticles during thermal treatment [54].

Spatial-offset Raman spectroscopy was applied to counterfeit drugs or explosive detection through unopened plastic containers as well as in biomedical applications including in the study of bone and joint diseases [40], [41], [42], [43] or transfusion medium quality assessment [44], [45]. The technique was also used in the scope of studies in oncology, notably for prostate cancer [46], skin cancer [47], and breast cancer [35], [48], [51]. Studies were conducted using Monte Carlo light transport simulations to optimize SORS detection geometries and predict ideal spatial offset values when targeting specific depths [55], [56]. Later studies used advanced Monte Carlo simulation techniques to provide a more accurate relationship between spatial offset and probed depth, for optical properties consistent with biological tissues [57], [58]. Our group subsequently developed a versatile Monte Carlo light transport simulation tool that was validated from experimental data and used to predict tissue sampling depth for the *iRS* system as well as for different scenarios involving spatial offset variations [59].

An aspect of our hyperspectral macroscopic Raman spectroscopy line-scanning instrument that was not exploited in past studies was its ability to automatically control the spatial offset Δs between the excitation and the detection line. This will be used in this manuscript to present the development of a method relying on bi-layer tissue phantoms to predict inelastic scattering depth sensing. The ability of the line-scanning technique will also be evaluated for its potential to reliably retrieve Raman spectroscopy information from sub-surface layers. Specifically, this manuscript describes a protocol allowing the fabrication of bi-layer optical phantoms and present an experimental protocol allowing SORS data to be acquired with variable spatial offset values. A technique is presented allowing to estimate depth sensing based on an experimental method using a quantitative metric computing the relative contribution of different Raman-active materials associated with a spectroscopic measurement. A proof-of-concept experiment is also provided based on more realistic tissue phantoms made from a fat-rich layer disposed over muscle tissue. The later phantom design was chosen to emulate a situation where tumor tissue needs to be detected through a layer of fat in the context, e.g., of breast-conserving surgery procedures.

4.4 Materials and Methods

4.4.1 Tissue phantoms

Bi-layer phantoms were produced from two Raman-active materials, Nylon and Poly(dimethylsiloxane) polymer (PDMS), to provide an experimental framework allowing to estimate SORS depth sampling using a custom line-scanning Raman spectroscopy system for different spatial offset values. The phantoms were fabricated using a Nylon disc (bottom layer) on which a semi-infinite layer and PDMS was superposed (top layer). Nylon discs were 9.9 ± 0.5 mm thick with a 5 cm diameter. For the PDMS layer, a SYLGARD 184 Silicone elastomer base was used, mixed with a curing agent at a 10:1 (base/curing agent) weight ratio [74]. The optical properties of the PDMS layer were varied by modifying the concentration of absorption and elastic scattering agents. The absorption agent was black Indian Ink mixed with an ethanol-based stock solution at a concentration of 48 mg/mL. The scattering agent was titanium dioxide (TiO_2) powder mixed in a similar ethanol-based stock solution at a concentration of 42 mg/mL.

In total, 10 different recipes of PDMS were produced. The volume of the stock solution added to PDMS was calculated to obtain the concentrations listed in Table 4.1. For each PDMS recipe, 6 solid phantoms were made associated with different thicknesses ranging from 0.5 mm to 3 mm by

0.5 mm increments. This resulted in 60 optical phantoms associated with different values of top layer thickness and optical properties (absorption, elastic scattering). The phantoms were initially placed in a vacuum chamber for 1 hour to eliminate all bubbles introduced when mixing the PDMS recipes. They were then placed in an oven at 80°C for 2 hours for curing. For each recipe, an extra slab of PDMS –without the bottom layer of Nylon– was produced and used to compute the absorption and reduced elastic scattering coefficients using a spectrophotometer (model: Lambda 1050 UV/Vis/NIR, PerkinElmers). The total detected reflectance and total detected transmission were measured with the instrument between 400 and 1000 nm by 10 nm increments. The coefficients μ_a and μ_s' were then computed using the Inverse Adding-Doubling (IAD) software [75].

Table 4.1 Concentrations of absorption and scattering agents mixed with PDMS for the ten different optical phantom recipes. Letters A or D in the recipe name referred to the presence of either an absorbing or a diffusive agent, respectively. An X meant no agent was used.

Recipe name	Concentrations of absorption and scattering agent mixed with PDMS (mg/mL)	
	Indian Ink	TiO ₂
C01AX	1.0	0.0
C02XD	0.0	1.0
C03AD	1.0	1.0
C04AD	1.0	0.5
C05AD	0.5	1.0
C06AD	0.5	0.5
C07AX	0.5	0.0
C08XD	0.0	0.5
C09AD	1.0	5.0
C10AD	1.0	10.0

4.4.2 Imaging system

Measurements were made using a macroscopic line-scanning hyperspectral imaging system optimized for inelastic scattering detection for which details were provided elsewhere [26], [27]. Briefly, the excitation branch of the imaging system was composed of a laser centered at 785 nm providing a line-shaped excitation beam and a white light source with wide field illumination between 400 and 700 nm. Laser and white light illumination were conveyed through an excitation fibre bundle to an imaging probe and onto the sample. The re-emitted light was collected back by the imaging probe and a collection fibre bundle. A dichroic mirror was used to transfer a fraction of the light to a white light camera. The other fraction of the light was conveyed to a hyperspectral camera across a high-pass filter limiting excitation light bleed-through. The illumination laser line and the detection line were scanned either independently or synchronously, at any desired spatial offset Δs . The spectroscopic, red-shifted signal was conveyed to an imaging spectrometer to produce hyperspectral images composed of inelastically scattered photons (Raman scattering) over a baseline associated with endogenous fluorescence. The white light images of the sample were captured using the white-light color camera. The spatial resolution of the hyperspectral images was approximately 250 μm with a spectral resolution of 6 cm^{-1} . The Raman spectra were acquired in the fingerprint region from 400 to 2100 cm^{-1} . The measurements were made without contact, at a working distance of 40 mm. The laser line and the detection line had a 400 μm width and 1 cm length at the level of the sample. The field-of-view (FOV) of the system was 1 cm^2 . The system was controlled by a custom software that allowed acquisition parameters to be set by the user, including laser power, exposure time per line, and number of repeated measurements.

4.4.3 Imaging protocol

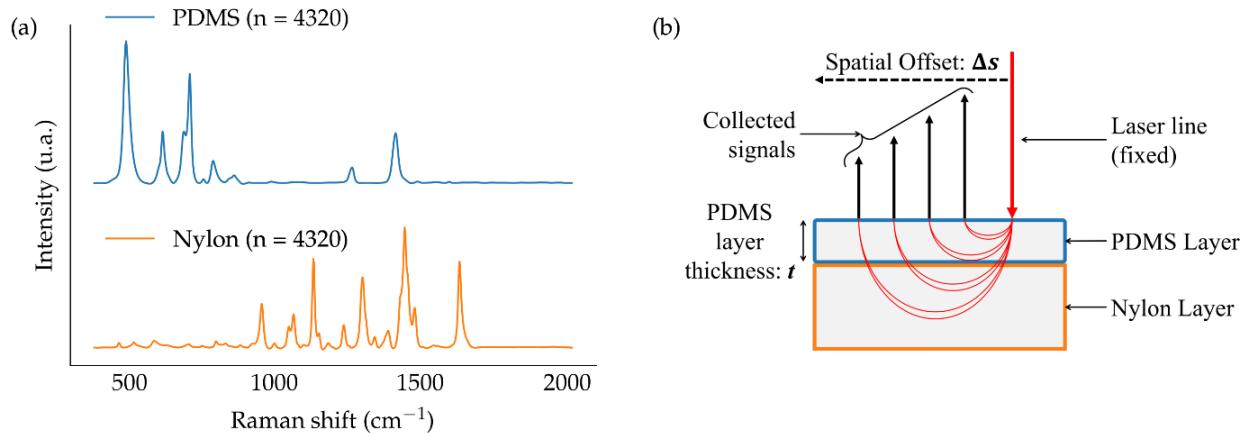


Figure 4.1 Schematic depiction of the experimental protocol used to image the two-layer PDMS/Nylon optical phantoms: (a) spectra of pure PDMS (blue/top) and Nylon (orange/bottom) obtained by averaging n measurements acquired with the line-scanning system with a spatial offset $\Delta s = 0 \text{ mm}$; (b) SORS imaging protocol associated with a fixed laser line and a detection line scanned at different offsets values Δs from 0 to 10 mm by 0.25 mm increments. The imaging protocol was repeated for all 60 optical phantoms, each different layer thicknesses t and optical properties (absorption and elastic scattering).

Figure 4.1a shows PDMS (top/blue) and Nylon (bottom/orange) Raman spectra obtained by averaging measurements from 3 Raman images of pure phantoms for an offset $\Delta s = 0 \text{ mm}$. Figure 4.1b shows a schematic of the imaging protocol of the optical phantoms, including a conceptual depiction of the path of higher probability followed by photons collected from spatial offset measurements. SORS hyperspectral images were acquired by fixing the laser line on one side of the square FOV of the system, and the surface was scanned by the detection line. The scanned line started at the same position as the laser line ($\Delta s = 0 \text{ mm}$) with subsequent measurements acquired at larger spatial offsets Δs by 250 μm increments, totaling 40 measurements per phantom. The imaging spectrometer acquired one Raman image for each of the 40 positions of the scanning line. Each of those images had 1024×42 pixels. The larger dimension (1024 pixels wide) consisted of the wavenumber shift values associated with the x -axis of 42 Raman spectra, each with a different position along the scan line. Each image of a line was acquired with an exposure time of 20 seconds. The scanning direction (perpendicular to the scan line) corresponded to increasing spatial offset values Δs between the laser line and the scanning line. The resulting hyperspectral image was of dimension $1024 \times 42 \times 40$, i.e. a wavenumber shifts dimension and two spatial dimensions. The

square FOV was positioned in the center of the optical phantoms to eliminate edge effects. This protocol was repeated for each of the 60 optical phantoms described in Section 4.4.1.

Two different calibration measurements were made for 1) Raman shift calibration on the spectrometer, and 2) system response and illumination uniformity correction. Acetaminophen Raman imaging served as a wavenumber shift standard for calibrating the Raman shifts associated with pixels on the CCD sensor of the spectrometer. An acetaminophen calibration image was acquired as the average of a series of 3 images at 500 ms per line (total: 20 s). System response correction was done by imaging a relative intensity correction standard developed for Raman Spectroscopy at 785 nm excitation from the National Institute of Standards and Technology (NIST), reference material number 2241. The NIST Standard calibration image corresponded to the average of a series of 4 images at 5 seconds per line (total: 200 s).

4.4.4 Data processing

Spectral pre-processing

Processing was done using Python 3.12 with common libraries, including Numpy, Pandas and SciPy, as well as the custom open-sourced code, the Open Raman Processing Library (ORPL) [76]. One SORS image was composed of 40 Raman images, stored as raw TIFF files. The TIFF files stored information from 1024 pixels (wavenumber axis) \times 42 pixels (spatial dimension transverse to the scan line). The first 120 pixels along the wavenumber axis were truncated out of the image files as they correspond to the wavelength range below the high pass filter cutoff. Cosmic rays were automatically identified and removed using tools available in ORPL. The acetaminophen calibration image was then used to correct for the *x*-axis curvature of the Raman bands on the spectrometer CCD sensor, known as ‘smile’ spectral distortions. This calibration frame was also used to correlate pixel numbers to wavenumber values based on the known locations of the acetaminophen Raman bands. The NIST Standard calibration image was used for the system response and illumination uniformity corrections. Intrinsic fluorescence from the optical phantoms was then removed using the Bubblefill algorithm from ORPL. Finally, standard normal variate (SNV) normalization was applied to each of the 42 Raman spectra composed of 904 wavenumber values.

Spectral Angle Measurement (SAM)

A metric was developed that quantified the relationship between the spatial offset Δs and the ability of the system to detect subsurface layers of Raman-active material. The method relied on the natural hypothesis that measured Raman spectra, from the bi-layer phantoms, were a linear combination of a PDMS spectrum and a Nylon spectrum. The metric quantified the similarity of any measured Raman spectrum with either of the two basis spectra, i.e. PDMS or Nylon (Figure 4.1a). This was achieved using the Spectral Angle Metric (SAM) that computed the higher-dimensional angle between two Raman spectra based on the scalar product between two N-dimensional vectors ($N = 904$), in wavenumber space:

$$SAM(\vec{R}, \vec{S}) = \frac{\vec{R} \cdot \vec{S}}{|\vec{R}| \cdot |\vec{S}|} = \frac{\sum R_i S_i}{\sqrt{\sum R_i^2} \sqrt{\sum S_i^2}}. \quad (4.1)$$

In the SAM formula, \vec{S} is the measured spectrum while \vec{R} is the reference spectrum, i.e. PDMS or Nylon. Using this definition, the SAM ranged from -1 to 1, where a value of +1 indicated spectral features were identical to the reference spectrum (i.e. the spectra were colinear and ‘point’ in the same direction) and a value of 0 indicated no correspondence between the two spectra (i.e. they were linearly independent). The SAM was computed for all Raman spectra from the SORS images of all bi-layer phantoms, for both PDMS and Nylon as reference spectrum. This provided SAM value curves, for PDMS (SAM_{PDMS}) and Nylon (SAM_{Nylon}), as a function of the spatial offset Δs for all sets of μ_a and μ_s' values associated with the top layer made of PDMS.

The naïve expectation was that, for any spatial offset Δs , $SAM_{PDMS} = 1$ and $SAM_{Nylon} = 0$ for a pure PDMS phantom, and vice versa for a pure Nylon phantom. However, as Δs increases the overall photonic signal-to-noise ratio (SNR) will decrease, eventually leading to the absence of detectable Raman features of PDMS or Nylon. Spectral features should then be detected that are associated with the fluorescence background of the phantom (no Raman features remaining), either from stochastic noise or residual effects of the spectral response of the instrument. As a result, a decreasing value of SAM –as a function of spatial offset– should be interpreted as a loss of detectability for a given material type but it will never reach a value of zero, even for large values of Δs . We hypothesize that the evolution of the SAM_{PDMS} and SAM_{Nylon} metrics as a function of Δs can be used as a mean to assess inelastic scattering sensing depth. In fact, as the spatial offset increases the major contributor to the measured spectrum is expected to shift from PDMS (top layer) to Nylon (bottom layer) with their SAM values decreasing and increasing, respectively.

4.4.5 Proof of concept: bi-layer biological phantoms

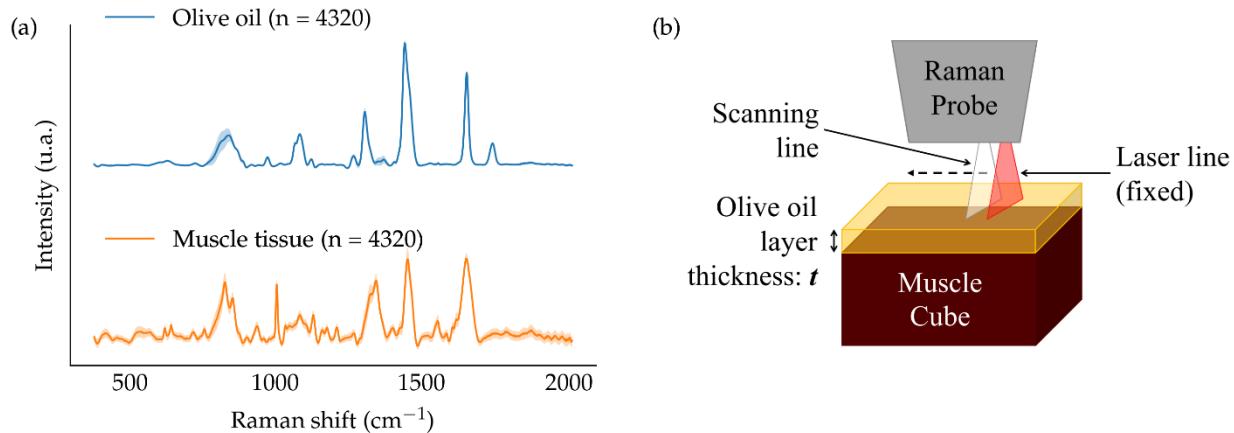


Figure 4.2 Proof-of-concept imaging protocol: (a) Average and standard deviation of pure spectrum of olive oil (top/blue) and muscle tissue (orange/bottom); (b) imaging protocol where the laser line is fixed, and the scanning line is progressively moved away from the laser line. The muscle cube is immersed in olive oil, and the oil layer thickness is measured by the difference in height of the two media.

A proof-of-concept experiment was designed to assess the performance of the system in samples more closely resembling biological tissues. A bi-layer sample made of a muscle tissue (beef meat purchased in a grocery store) underlayer, and a top layer of fat substitute (olive oil) provided a configuration with Raman optical properties, e.g. similar to a situation that could be encountered in fatty human tissue (Figure 4.2b). Pure spectra were initially acquired for each medium, i.e. meat and olive oil (Figure 4.2a). Olive oil and muscle tissue shared common spectral features but differed in several spectral regions, including the aromatic amino acid peak associated with proteins around 1004 cm^{-1} . The experimental setup is schematized in Figure 4.2b where a cube of beef meat was placed in a glass container and olive oil was poured over it. SORS images were acquired of tissue phantoms with olive oil thicknesses of t of 1, 3 and 10 mm. The imaging protocol was described in Section 4.4.3. The SAM values were computed for meat (SAM_{Meat}) and oil (SAM_{Oil}) and they were plotted as a function Δs as described in Section 4.4.4 for the PDMS/Nylon bi-layer phantoms.

4.5 Results

4.5.1 Bi-layer PDMS/Nylon phantoms

Table 4.2 List of all the PDMS layer thicknesses for each PDMS recipe. Letters A, D, or X in the recipe name refer to the presence of absorbing agent (A), diffusive agent (D), or if the respective agent is not present (X). PDMS layer thickness #1 is not shown because it was only used to measure optical properties and is not a dual layer optical phantom. Absorption coefficient μ_a and reduced scattering coefficient μ_s'

are evaluated at 785 nm, as the mean value between the values at 780 nm and 790 nm calculated by IAD software.

Recipe name	PDMS layer thicknesses t per recipe						μ_a (cm $^{-1}$)	μ_s' (cm $^{-1}$)		
	(μm)									
	#2	#3	#4	#5	#6	#7				
C01AX	370	810	1190	1700	2120	2640	2.35	0.06		
C02XD	430	600	1070	1650	2030	2500	0.09	6.94		
C03AD	450	840	990	1840	2320	2780	5.78	6.21		
C04AD	720	910	1510	1900	2360	3060	3.66	1.89		
C05AD	550	920	1220	1580	2290	2710	2.83	8.08		
C06AD	530	930	1360	1800	2290	2600	2.05	3.64		
C07AX	430	950	1790	2170	2700	3170	2.08	0.02		
C08XD	650	970	1640	1980	2470	2810	0.18	3.74		
C09AD	490	800	1190	1560	1900	2480	8.15	47.61		
C10AD	480	760	1090	1620	1990	2410	7.04	78.13		

Following the protocol described in Section 4.4.1, a set of 60 optical phantoms was created, made of 10 different PDMS recipes leading to 10 optical properties pairs, with 6 different PDMS layer thicknesses per PDMS recipe, ranging from 0.37 mm to 3.06 mm. Table 4.2 lists all measured thicknesses for the PDMS layer in all 60 optical phantoms, alongside the optical properties of each PDMS recipe, calculated with the IAD software. Absorption coefficient μ_a ranged from 0.09 cm $^{-1}$ (no absorbing agent) to 8.15 cm $^{-1}$, while scattering coefficient μ_s' ranges from 0.02 cm $^{-1}$ (no scattering agent) to 78.13 cm $^{-1}$, with most values distributed between 0.02 cm $^{-1}$ and 8.08 cm $^{-1}$. Absorption and scattering values were non-zero despite the absence of added agents because of the intrinsic optical properties of PDMS.

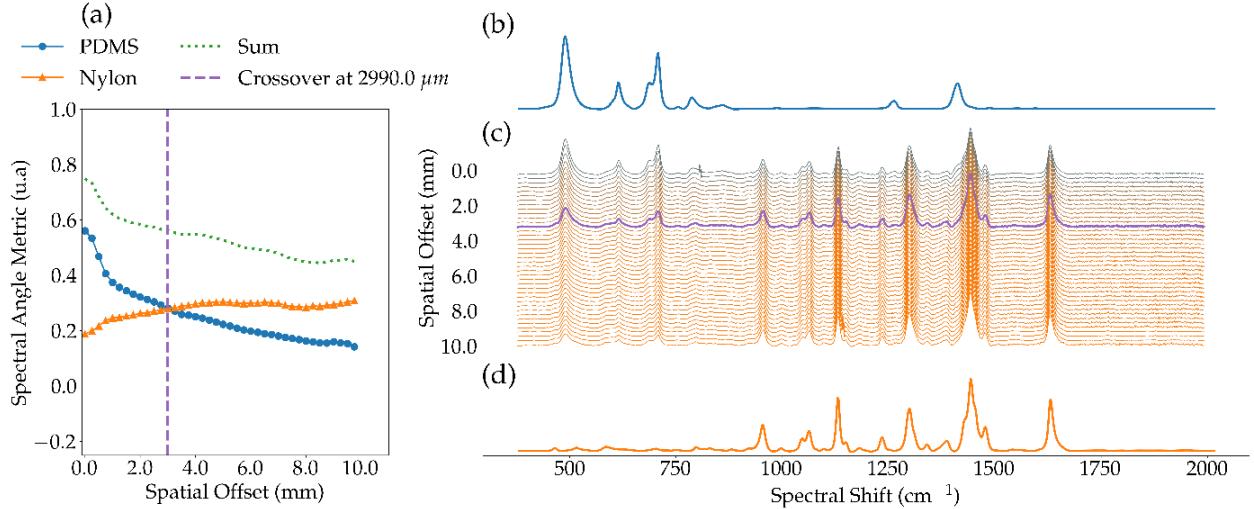


Figure 4.3 Spectral Angle Mapper (SAM) metric evaluated for PDMS and Nylon spectra for a representative optical phantom: C02XD5 ($t = 1650 \mu\text{m}$, $\mu_a = 0.09 \text{ cm}^{-1}$, $\mu_s' = 6.94 \text{ cm}^{-1}$): (a) evolution of SAM_{PDMS} (blue/circle) and $\text{SAM}_{\text{Nylon}}$ (orange/triangle) as well as the sum (green/dotted) of both SAM when increasing the spatial offset and the SAM cross-over offset labeled Δ_{SCO} (vertical dashed line); (b) pure spectrum of PDMS; (c) evolution of the measured spectrum when increasing spatial offset Δs , which was used to calculate the SAM (a). The purple trace highlights the spectrum at Δ_{SCO} , i.e. the SAM cross-over point; (d) pure spectrum of Nylon.

The data processing protocol described in Section 4.4.4 was applied to all bi-layer phantoms and the SAM values (SAM_{PDMS} , $\text{SAM}_{\text{Nylon}}$) were computed for all $\Delta s = 0 \text{ mm}$ and $\Delta s > 0 \text{ mm}$ spectra. Figure 4.3 showed the results for phantom C02XD5 which had parameters $t = 1.650 \text{ mm}$, $\mu_a = 0.09 \text{ cm}^{-1}$ and $\mu_s' = 6.94 \text{ cm}^{-1}$ (Table 4.2). Similar results were obtained for all phantoms. Figure 4.3a showed the evolution of the SAM when increasing the spatial offset and Figure 4.3c showed processed Raman spectra averaged for all spatial offset values. Figure 4.3b and Figure 4.3d showed the PDMS and Nylon spectra, respectively. The blue (circles) line showed the SAM_{PDMS} as a function of Δs , indicating that the similarity of the measurement with a pure PDMS spectrum decreased for larger spatial offset values. The trend was reversed for $\text{SAM}_{\text{Nylon}}$. In fact, the orange (triangles) line showed an increase of $\text{SAM}_{\text{Nylon}}$ with Δs , indicating an improved correspondence with Nylon as the spatial offset increased. These trends are consistent with an increased sensing depth for larger spatial offsets.

The green (dotted) line in Figure 4.3a showed the sum of the SAM values, i.e. $\text{SAM}_{\text{Total}} = \text{SAM}_{\text{PDMS}} + \text{SAM}_{\text{Nylon}}$, as a function spatial offset. As expected, the overall SAM value was high for $\Delta s = 0 \text{ mm}$ and decreased monotonically as the spatial offset increased. The $\text{SAM}_{\text{Total}}$ value decreased up to a point where the Raman spectrum neither showed the spectral features of PDMS or Nylon. As

a rule-of-thumb, loss of detectability of the Raman-active materials occurred when both SAM_{PDMS} and $\text{SAM}_{\text{Nylon}}$ started to decrease (as a function of Δs), i.e. at the turnover point where the SAM associated with the compound of the bottom layer plateaued out.

4.5.2 Estimated penetration depth in synthetic bi-layer phantoms

The vertical purple (dashed) line in Figure 4.3a identified a critical point in the SAM vs. Δs curves, i.e. the spatial offset value where SAM_{PDMS} and $\text{SAM}_{\text{Nylon}}$ intercepted. That point always occurred, for all phantoms, shortly before the plateauing point for $\text{SAM}_{\text{Nylon}}$, in term of Δs -value. Physically, the cross-over point corresponded to the spatial offset at which both PDMS and Nylon signals contributed equally to the measured spectrum. Moving forward, we are positing that the spatial offset associated with that cross-over point (Δs_{CO}) can be used as an estimator of the effective sensing depth reaching the bottom layer material (Nylon) for optical phantoms with different optical properties. Each phantom, with a given PDMS thickness t and specific optical properties μ_a and μ_s' , has a characteristic cross-over point value $\Delta s_{CO}(t, \mu_a, \mu_s')$. Figure 4.4 shows measured phantom thickness (y-axis) as a function of Δs_{CO} (x-axis) for all phantoms in Table 4.2. In the figure, different colors and symbols represent phantoms with the same optical properties μ_a and μ_s' of the PDMS top layer.

The data points in Figure 4.4 could be used as the basis for the development of a model predicting depth sensing from spatial offset for a given set of optical properties μ_a and μ_s' , under the hypothesis that the location of the cross-over points is an effective measure for this. To this end, a curve was fitted for each set optical properties with the following form:

$$t^* = A \cdot \Delta s_{CO}^\varphi, \quad (4.2)$$

where t^* is the estimated depth penetration, Δs_{CO} the spatial offset of the SAM cross-over point. The fitting parameters φ and A depend on the optical properties of the PDMS top layer. The fitted parameters for each PDMS recipe are presented in Table 4.3, alongside their respective optical properties.

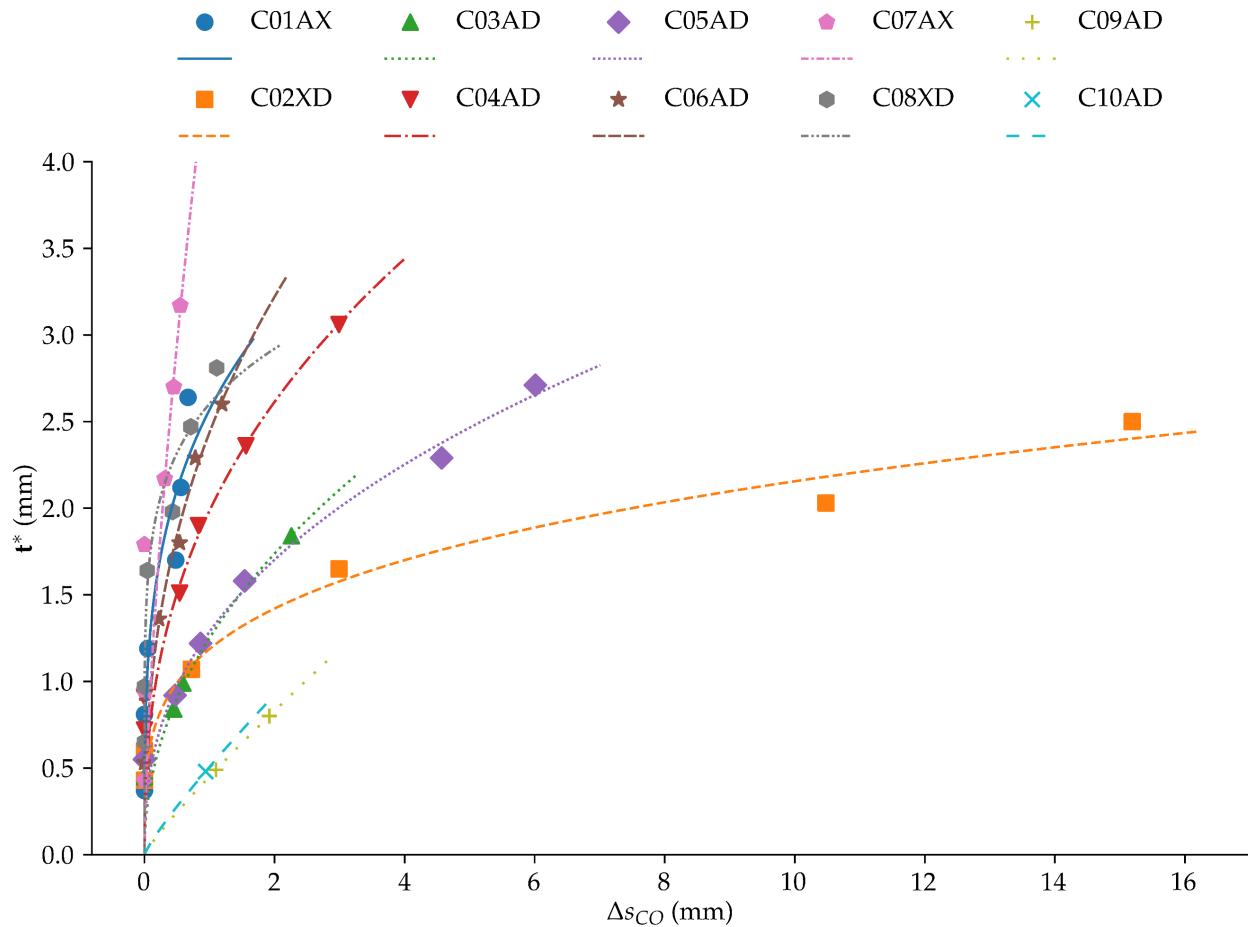


Figure 4.4 Estimated depth penetration (t^*) in relation with the spatial offset at the SAM cross-over (Δs_{CO}) for each PDMS recipe. Each sequence of data points represents the relation between the spatial

offset and the corresponding probed depth which depends on the optical properties of the top PDMS layer. Each curve was fitted with Equation 2 to highlight trends.

Table 4.3 List of the recipes used to achieved different optical properties (absorption, reduced elastic scattering) for the PDMS layer with corresponding parameters A and ϕ of the fitted curves in Figure 4.4

Recipe name	μ_a (cm ⁻¹)	μ_s' (cm ⁻¹)	Fitted parameters	
			A	ϕ
C01AX	2.35	0.06	355	0.286
C02XD	0.09	6.94	198	0.259
C03AD	5.78	6.21	47	0.475
C04AD	3.66	1.89	128	0.396
C05AD	2.83	8.08	79	0.404
C06AD	2.05	3.64	152	0.401
C07AX	2.08	0.02	48	0.663
C08XD	0.18	3.74	825	0.166
C09AD	8.15	47.61	1	0.880
C10AD	7.04	78.13	1	0.864

Inspection of the different curves in Figure 4.4 revealed a strong dependence of depth sensitivity in regards to spatial offset when the reduced scattering coefficient is weak. For example, in the case of phantoms C07AX and C01AX, which have low scattering ($\mu_s' < 0.07 \text{ cm}^{-1}$) for a relatively high absorption ($\mu_a = 2-3 \text{ cm}^{-1}$), the value of spatial offset Δs_{CO} necessary to reach up to a few millimeters of effective depth penetration remained below 0.5 mm. Therefore, even a small variation of the spatial offset increased probing depth sufficiently to detect the bottom Nylon layer. A different physical behavior was observed for phantoms with relatively high elastic scattering ($\mu_s' = 7-10 \text{ cm}^{-1}$), such as C02XD ($\mu_a = 0.09 \text{ cm}^{-1}$) and C05AD ($\mu_a = 2.83 \text{ cm}^{-1}$). For CO2XD, the depth sensitivity curve is as would be expected in the presence of higher diffusion. That is, a more gradual increase of the spatial offset cross-over point for thicker PDMS layers. For high scattering coefficients, including C09AD ($\mu_s' \sim 50 \text{ cm}^{-1}$) or C10AD ($\mu_s' \sim 80 \text{ cm}^{-1}$), diffusion is so strong that

the PDMS becomes effectively opaque, and photons are lost without ever reaching the deeper Nylon layer. As a results, no signal from the Nylon sublayer was collected and the cross-over point loses its physical interpretation. In those cases, the measured signal transitioned from PDMS to stochastic noise as spatial offset increased.

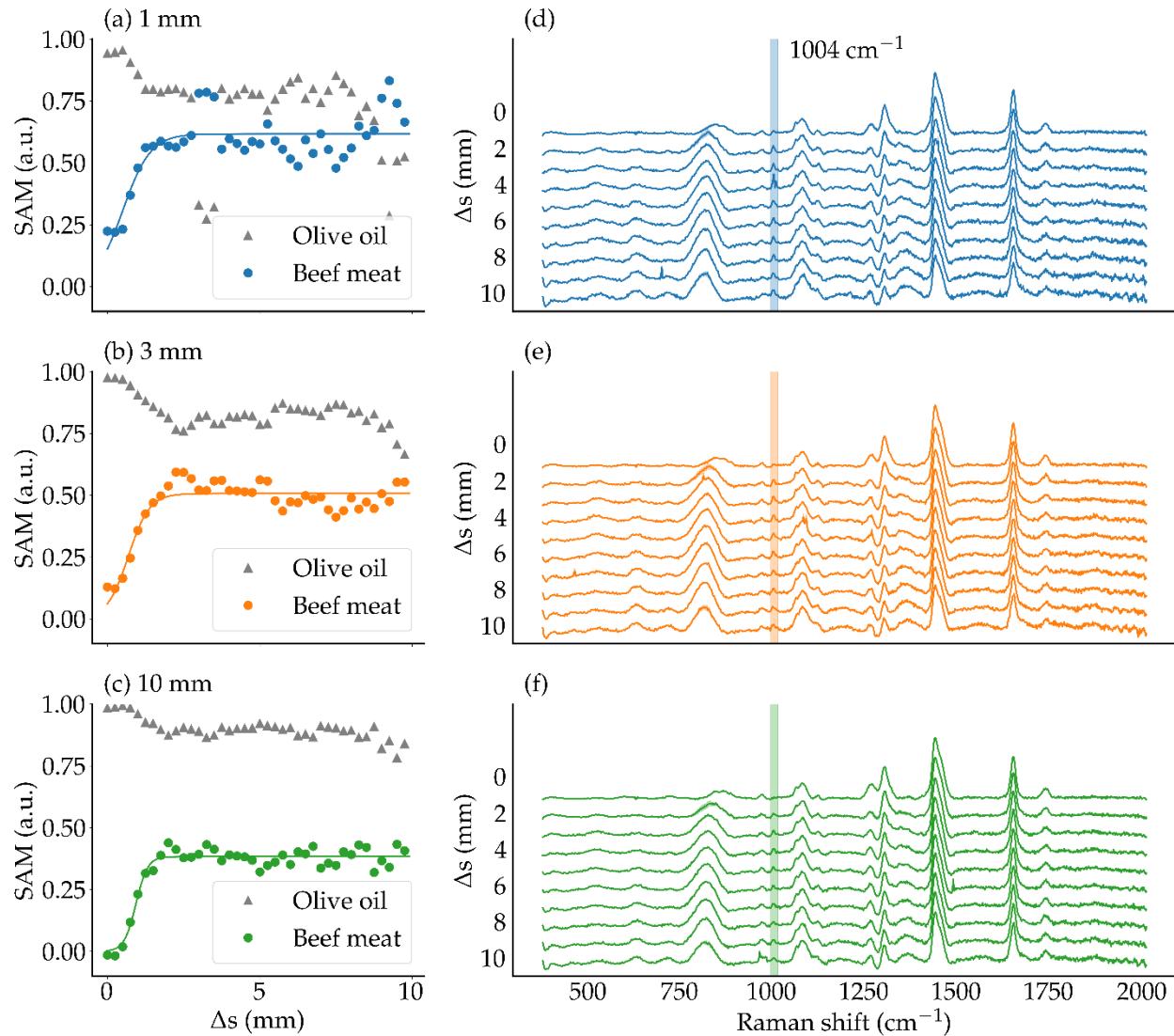


Figure 4.5 SAM metric evaluated for olive oil (triangles) and beef meat (circles) in a spectral window of 50 cm^{-1} centered at 1004 cm^{-1} for: (a) 1 mm oil layer thickness; (b) 3 mm oil layer thickness; (c) 10 mm oil layer thickness. A sigmoid fit function was applied to the beef meat data points to highlight their trend as a function of spatial offset. (d), (e) and (f) shows the corresponding measured Raman spectra for

different values of the spatial offset Δs . The spectral window used for SAM calculation is highlighted by the shaded vertical band.

4.5.3 Depth sensing proof-of-principle study in bi-layer biological phantoms

The SAM calculations were performed for the proof-of-concept experiment based on meat/oil bi-layer phantoms. Contrary to the PDMS/Nylon phantoms, the pure spectra of meat and olive oil showed several similar spectral features (Figure 4.2a). To assess depth sensitivity, the SAM values were thus computed only for the amino acid band around 1004 cm^{-1} which is known to be low in mostly fatty tissues (Figure 4.5). Specifically, a spectral window of 50 cm^{-1} width centered at 1004 cm^{-1} was used to calculate SAM_{Oil} and SAM_{Meat} , highlighted in Figure 4.5d, Figure 4.5e and Figure 4.5f. The SAM_{Meat} vs. Δs data points were shown for olive oil thicknesses of 1 mm (Figure 4.5a), 3 mm (Figure 4.5b) and 10 mm (Figure 4.5c). In all cases, SAM_{Meat} sharply increased for $\Delta s < 1.8\text{ mm}$, showcasing detection of the meat-specific phenylalanine peak through enhanced depth sensitivity. However, the curve plateaued for $\Delta s > 1.8\text{ mm}$, hinting that the limit imposed by the loss of photonic signal due to larger spatial offset values was met. The same behavior was observed for thicker layers of olive oil, albeit with smaller Δs values and depth sensitivity. The latter is not, however, significantly impacted by the olive oil thickness because of the relative transparency of the compound and the absence of elastic scattering agents. This is the same phenomena as was observed for the low scattering phantoms, C07AX and C01AX, in Section 4.5.2. The SAM_{Oil} vs. Δs data points were also presented in Figure 4.5, but unlike the PDMS/Nylon phantoms, no cross-over was observed between the SAM_{Oil} and SAM_{Meat} curves. The curves did, however, plateau at the same Δs value, showcasing a loss of detectability of the 1004 cm^{-1} band.

4.6 Discussion

We developed a protocol, in tissue phantoms, that allowed the creation of curves predicting sensing depth for a particular spatial offset in spatially offset Raman spectroscopy, when prior information is known relating to the optical properties μ_a and μ_s' . A set of bi-layer PDMS/Nylon tissue phantoms were produced, as well as a proof-of-concept experiment in biological phantoms made of protein-rich tissue and a fatty substance. The results obtained in the scope of this study suggest that a model-based approach could be developed whereby this sampling depth can be modulated through spatial offset changes if the absorption and elastic scattering properties of the sample are known.

The prediction of the optimal spatial offset in a SORS imaging system to probe a specific depth was done using bi-layer solid optical phantoms, for various optical properties combination of the top layer. The availability of predictive curves for SORS imaging systems could help developed more robust and standardized depth-resolved Raman spectroscopy approaches in a clinical context. As an example, breast cancer is the most common and deadliest cancer among women worldwide [77]. Standard treatment procedures for breast cancer include surgical excision of the tumor, followed by radiotherapy of various degrees of aggressiveness. Breast-conserving surgeries are usually the preferred surgical approach but there is still up to a 40% recurrence rate, needing a second surgical procedure associated with higher risks of complications and higher costs [78], [79]. As this procedure implies removing only the tumor from the breast, the challenge lies in the assessment of surgical margins of the excised tissue. Cancer cells may be left in the patient if the margin is too close to the surface, even if the surface of the excised tumor is associated with normal tissue. Our group already developed a margins inspection technique using the hyperspectral line-scanning system. However, the depth-resolution potential of the system, based on SORS, had not been considered. In fact, the method was shown to be mostly superficial, being able to achieve no more than half-a-millimeter sensing depth. However, in breast-conserving surgery there could be cases where tissue remains underneath a layer of fat and may be detectable with SORS. This work preliminarily demonstrated the potential of SORS to detect non-fat tissue under a layer of a fatty substance, opening the door to the development of depth-resolved tumor detection in breast cancer. Future work is needed however to assess the real-world potential of the technique based on more realistic tissue phantoms. Moreover, the impact of interference of the Raman signal from the top layer on predictive tumor detection machine learning models will need to be assessed.

The choice of the SAM metric and the cross-over spatial offset to assess depth sensitivity comes from an approximation of the diffusion theory of photon propagation in turbid media. Considering a SORS measured spectrum is a linear combination of both material spectra and ever-present stochastic noise, we assumed that when the SAM metric gives an equal value for both reference spectra, then each material has an equal contribution in the measured signal. This suggests that half of the backscattered photons came from each material and that the overall depth penetration of the banana-shaped diffusion path must be at the interlayer interface. This simplification of the diffusion theory may not represent the true behavior of photons, and a more complex analysis will be needed to predict the depth penetration from spatial offset more precisely. Related to diffusion theory, the

choice of the fitted curve equation is not universally accepted, even if experimental data point tends to confirm it. Some PDMS recipes do not fit well with the hypothesised relationship due to the lack of data point, reinforcing the need for a more complete set of optical phantoms.

Although the SAM performed well with the Nylon-PDMS phantoms, it was difficult to apply to the proof-of-concept beef-oil phantom when computing over the entire spectra. This was because beef and oil shared more common spectral features than Nylon and PDMS, which possesses almost exclusively unique spectral features. Limiting the spectral window used to compute SAM_{Meat} and SAM_{Oil} helped mitigate this issue but revealed another limitation of the current setup. Muscle tissue signal is inherently weaker than fat signal and increasing the spatial offset directly results in a lower level of signal because the signal is collected farther away from the source. The detection of the sublayer signal is then limited to the smaller range of $\Delta s < 1.8$ mm in this case.

4.7 Acknowledgments

This work is supported by the Discovery Grant program and the Alliance grant program from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), the Fonds de recherche du Québec (Nature et Technologies), the TransMedTech Institute and the Ministère Économie, Science et Innovation du Québec (PSR-SIIRI Program).

4.8 Conflict of interest

No conflict of interest to disclose.

4.9 Code, Data and Materials Availability

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

CHAPITRE 5 DISCUSSION GÉNÉRALE

À l'aide des diverses contributions aux études cliniques, l'efficacité du système d'imagerie Raman macroscopique à balayage linéaire pour la détection de cellules cancéreuses a pu être démontrée pour la détection de tumeurs associées au cancer du sein et du cerveau. De plus, un groupe de 60 fantômes optiques solides à deux couches ont été fabriqués, puis mesurés à l'aide du même système, démontrant par la même occasion sa capacité d'effectuer des mesures SORS. Une preuve de concept réalisée avec des échantillons biologiques a permis de vérifier les mesures SORS des fantômes. Dans ce chapitre, nous reviendrons sur les hypothèses et objectifs de cette maîtrise et leur lien avec les travaux de recherche effectués. Les avantages du protocole développé au chapitre 4 seront brièvement décrits, ainsi que les défis rencontrés tout au long de ce travail de recherche. Finalement, des pistes pour des travaux futurs seront énoncées.

5.1 Retour sur les objectifs

L'objectif 1 visait l'élaboration de protocoles d'imagerie et de détection cellulaire d'échantillons de patients atteints du cancer du sein et du cancer du cerveau. Cet objectif a été atteint par la contribution à des études cliniques servant à démontrer l'efficacité d'un système de spectroscopie Raman macroscopique à balayage linéaire. Le protocole d'imagerie a été utilisé lors des deux études, tandis que le protocole de détection cellulaire n'a été applicable qu'à l'étude du cancer du cerveau. Les données obtenues à l'aide de ces différents protocoles ont pu être publiées dans deux articles de revue à comité de lecture [72], [73]. Ces résultats ont aussi permis de valider l'hypothèse 1, en démontrant l'applicabilité des modèles de classifications préalablement entraînés sur les données du système macroscopique.

L'objectif 2 visait quant à lui la prise de mesures SORS avec le système de spectroscopie Raman macroscopique. Pour l'atteindre, les deux sous-objectifs suivants ont été réalisés. Le sous-objectif 1 avait pour but de développer un protocole de fabrication de fantômes optiques solides à deux couches pour les mesures SORS. Cet objectif a aussi été atteint par la fabrication et les mesures de 60 fantômes optiques à deux couches. La couche supérieure est composée de PDMS comme matrice, et l'ajout d'encre de Chine et de poudre de TiO₂ modifie les propriétés optiques du PDMS en jouant le rôle d'agent absorbant et diffusif, respectivement. La couche inférieure est composée d'un disque de Nylon, de sorte que les signaux Raman des deux couches aient des pics Raman significativement différents. Les 60 fantômes optiques ont alors pu être mesurés et des courbes

prédictives de la profondeur de pénétration des photons en fonction du décalage spatial ont pu être réalisées pour différentes propriétés optiques (absorption et diffusion élastique) du PDMS. Finalement, le sous-objectif 2 avait pour but de développer une preuve de concept afin de valider les capacités de mesure SORS du système d'imagerie à balayage linéaire. La preuve de concept a été réalisée à l'aide de tissus biologiques, d'un cube de viande de bœuf comme couche inférieure, et de l'huile d'olive comme couche supérieure. Les résultats de la preuve de concept, présentés dans l'article au chapitre 4, ont démontré la réussite de ce sous-objectif. Aussi, par la réussite de l'objectif 2, l'hypothèse 2 est validée et les capacités du système de spectroscopie Raman macroscopique à balayage linéaire permettent d'effectuer des mesures SORS sur du tissu biologique.

5.2 Avantages de la solution proposée

L'avantage principal de la modalité d'imagerie SORS est sa capacité de détection du spectre Raman en profondeur de manière non invasive. Aucune coupe de l'échantillon ni d'agents de détection (fluorophore, nanoparticules, éléments radioactifs) n'est nécessaire. Cela est très utile dans le contexte du vivant, où la sécurité du patient est très importante. La détection d'anomalies telles que des cellules cancéreuses au sein de l'organisme dans des endroits peu accessibles devient alors possible, sans mettre en danger la vie des patients.

L'utilisation de fantômes optiques solides en PDMS a l'avantage d'être simple de fabrication, d'entreposage et les fantômes sont très stables dans le temps. Le PDMS est un polymère inerte chimiquement, isolant, stable thermiquement [80] et transparent dans les plages spectrales de l'UV, du visible et du proche-infrarouge, avec une transmission supérieure à 80 % à partir de 300 nm [81]. Les propriétés optiques du PDMS sont alors simplement contrôlées par les agents d'absorption et de diffusion inclus lors de la fabrication des fantômes. Il est ainsi possible de contrôler avec précision les propriétés optiques désirées, en comparaison de fantômes optiques biologiques, provenant d'animaux par exemple. La variation de l'absorption et de la diffusion interéchantillons provenant du même tissu initial est beaucoup plus grande dans ce dernier cas. De ce fait, l'homogénéité des agents ajoutés au PDMS est aussi meilleure que le mélange des différents tissus qui peuvent composer un fantôme animal.

Les fantômes optiques sont aussi avantageux par rapport aux simulations numériques, car ils représentent toute la complexité de l'interaction lumière-matière, qui doit être simplifiée dans les

simulations numériques à cause du coût de calcul trop important. Les résultats représentent alors mieux le comportement attendu dans les tissus biologiques réels. De plus, à l'aide de ces résultats empiriques, il est possible de créer des courbes prédictives sur l'évolution de la profondeur de pénétration des photons en fonction du décalage spatial, et ce, pour chaque paire de propriétés optiques réalisées dans la couche de PDMS des fantômes. De telles courbes prédictives réalisées à partir de résultats empiriques n'ont encore jamais été réalisées. Elles permettraient d'accélérer la recherche clinique en SORS en fournissant le décalage spatial requis pour imager une profondeur ciblée, en fonction des propriétés optiques du tissu en surface. De plus, le système utilisé permet de combiner la spectroscopie Raman conventionnelle sur un large champ de vue, en plus d'intégrer la capacité d'effectuer de l'imagerie SORS. Un tel système serait donc capable de cartographier en 3D la composition chimique d'un échantillon grâce à son signal Raman.

5.3 Défis rencontrés

Plusieurs défis majeurs ont été rencontrés et ont retardé l'avancement prévu des différents projets. Notamment, la manutention difficile du système nous a posé un problème à plusieurs reprises. Le système d'imagerie, mesurant $1 \times 0.6 \times 2$ m est très encombrant, et la multiplicité des équipements en font un système très lourd (~ 200 kg). Les roues du chariot pouvant se coincer dans les aspérités du sol, l'inertie totale du système a fait casser l'axe de pivot des roues du chariot à plusieurs reprises lors du transport du système sur les stationnements ou aux portes des hôpitaux de destination du système. L'achat et le temps de livraison des roues de rechange ont donc posé un sérieux obstacle financier et temporel, puisqu'il a fallu annuler l'arrivée du système lors du premier bris en attente des pièces de rechange. Malheureusement, aucun autre chariot de transport ayant les bonnes dimensions et contraintes techniques n'était disponible sur le marché pour complètement remplacer le chariot de transport. Des précautions particulières ont alors été prises à chaque déplacement du système pour éviter de casser les roues une nouvelle fois. De plus, la logistique de déplacement du système d'imagerie a retardé le début des études cliniques, notamment à cause de la création des cartes d'accès nécessaires pour avoir les blouses médicales et accès aux salles dans lesquelles les mesures peuvent être prises. Le manque d'espace de stockage du système sur place a aussi été un frein aux déplacements du système.

Le projet des fantômes optiques n'a pas été sans problèmes non plus. Plusieurs itérations du processus de production des fantômes ont été nécessaires avant d'obtenir le protocole final.

Initialement, les fantômes optiques étaient composés de différents tissus biologiques provenant d'une boucherie. Ils étaient choisis de sorte à représenter les différents types de tissus que l'on peut retrouver dans l'humain, c'est-à-dire des échantillons de gras, de muscles et d'os. Ces tissus biologiques constituaient la couche inférieure des fantômes. De l'encre de pathologie devait jouer le rôle de la couche supérieure, à travers laquelle le signal Raman du tissu biologique devait être détecté. Cependant, l'encre, même à de très faibles épaisseurs, était trop opaque pour le laser et aucun signal n'a pu être mesuré. De plus, il était impossible d'appliquer une couche d'épaisseur constante et homogène à cause de l'irrégularité de la surface des échantillons biologiques. L'utilisation d'un polymère transparent dans lequel l'ajout d'agents absorbant et diffusif indépendants a donc rapidement été adopté, d'autant plus que des fantômes optiques en PDMS ont déjà été utilisés pour d'autres projets du Lumed Lab. Puisque c'est la couche supérieure qui influe sur le décalage spatial requis pour atteindre une certaine profondeur, le PDMS est donc tout indiqué. La couche inférieure a été choisie de manière à représenter un milieu diffusif semi-infini, donc le spectre Raman se différencie largement du spectre du PDMS. Le Nylon a donc été choisi. Finalement, le temps d'acquisition des mesures sur les fantômes optiques a été le dernier frein à l'accomplissement de ce projet. Nous avons vu précédemment que l'augmentation du décalage spatial diminue l'intensité du signal mesuré. Un temps d'exposition de 20 secondes par ligne était minimalement requis pour obtenir un signal d'une qualité suffisante aux décalages spatiaux les plus grands. Chaque fantôme optique prenait alors 13 minutes pour imager une seule tranche en profondeur de l'échantillon. La cartographie complète 3D à l'aide des 40 lignes aurait requis presque 9h d'imagerie pour 1 seul échantillon. Un temps d'acquisition aussi long n'est pas réalisable, seulement une tranche en profondeur a été mesurée par échantillon. La totalité des fantômes représente alors 13 heures de mesures consécutives, contre 540 heures pour une cartographie 3D complète de chacun des 60 fantômes optiques. Dans un cadre clinique, un temps d'acquisition d'une dizaine de minutes est considéré comme long. Il ne devrait pas dépasser en toutes circonstances 30 minutes *in-vivo* et 1 heure pour les échantillons *ex-vivo*. Les temps d'acquisition actuels sont donc encore beaucoup trop élevés pour une implémentation dans un contexte clinique.

CHAPITRE 6 CONCLUSION

En conclusion, ces travaux de recherches ont permis de démontrer que le système de spectroscopie Raman macroscopique à balayage linéaire avait les capacités d'effectuer des mesures SORS. De plus, ce système a aussi prouvé son efficacité dans un contexte clinique. En effet, les protocoles d'imagerie développés dans ce mémoire ont permis d'imager par spectroscopie Raman conventionnelle divers tissus biologiques avec succès. Après plusieurs itérations, un protocole de fabrication de fantômes optiques solides à 2 couches actifs en Raman a permis de créer 60 fantômes optiques pour les mesures SORS. Le groupe de fantômes optiques est composé de 10 paires de propriétés optiques différentes pour la couche supérieure, comprises dans les intervalles suivants : $\mu_a = [0; \sim 8] \text{ cm}^{-1}$ et $\mu'_s = [0; \sim 80] \text{ cm}^{-1}$. Chaque famille de fantômes optiques ayant les mêmes propriétés optiques se décline en 6 épaisseurs différentes de la couche supérieure, comprise entre 0.4 mm et 3 mm. Les mesures SORS de ces fantômes optiques ont permis de tracer des courbes prédictives de la profondeur de pénétration des photons dans les fantômes en fonction du décalage spatial. Une preuve de concept réalisée avec des tissus biologiques réels a permis de valider la détectabilité du tissu de la couche inférieure grâce au SORS.

Des travaux futurs sont requis pour obtenir plus de données empiriques de fantômes optiques ayant des propriétés optiques différentes de ceux présentés ici et améliorer les courbes prédictives de décalage spatial. Le groupe des fantômes optiques réalisés dans ce projet reste préliminaire, et comporte certaines lacunes, notamment pour les valeurs de coefficients optiques extrêmes. De plus, le système de spectroscopie possède un potentiel d'amélioration non négligeable, dans le but de réduire les pertes optiques. Le temps d'acquisition du système est encore trop long pour un usage réel en salle opératoire (quelques minutes par mesure). De manière plus générale, le développement des techniques de spectroscopie SORS et, par conséquent, leur caractérisation grâce à l'usage de fantômes optiques est très importante. La spectroscopie Raman est un outil extrêmement puissant grâce à sa capacité de caractérisation moléculaire, déjà largement utilisée comme outil de diagnostic non invasif en oncologie [2]. Le développement de spectroscopie Raman pour la caractérisation en profondeur des tissus par le SORS ouvrirait une nouvelle dimension de diagnostic pour les tissus dont la surface est difficilement accessible ou l'estimation de marges chirurgicales après excision.

Finalement, la technologie SORS nécessite d'être plus approfondie. Elle repose sur un processus de diffusion aléatoire des photons, alors la profondeur d'origine des photons Raman n'est jamais précise. En connaissant le coefficient de diffusion du tissu, il n'est possible que d'estimer la profondeur d'origine moyenne des photons. Certains photons ayant suivi une trajectoire moins courbée proviennent ainsi d'une couche moins profonde, et à l'inverse, une trajectoire plus courbée indique une origine de diffusion Raman plus profonde. Il est donc très difficile d'obtenir le signal d'une couche précise, le spectre sera toujours contaminé par le signal des couches légèrement inférieure et supérieure. Le développement de modèles d'intelligence artificielle pourrait aider à déconvoluer les signaux. Ces modèles pourraient ainsi prédire la participation du signal de surface sur le spectre mesurée en fonction de plusieurs paramètres, tels que le décalage spatial et les propriétés optiques des tissus. L'incertitude sur la profondeur d'origine du spectre serait alors grandement réduite, et les systèmes de spectroscopie Raman spatialement décalée seraient beaucoup plus précis.

RÉFÉRENCES

- [1] « Cancer ». Consulté le: 14 avril 2025. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- [2] S. Cui, S. Zhang, et S. Yue, « Raman Spectroscopy and Imaging for Cancer Diagnosis », *J. Healthc. Eng.*, vol. 2018, p. 8619342, juin 2018, doi: 10.1155/2018/8619342.
- [3] S. David *et al.*, « In situ Raman spectroscopy and machine learning unveil biomolecular alterations in invasive breast cancer », *J. Biomed. Opt.*, vol. 28, n° 03, mars 2023, doi: 10.1117/1.JBO.28.3.036009.
- [4] M. A. Silva, A. P. See, W. I. Essayed, A. J. Golby, et Y. Tie, « Challenges and techniques for presurgical brain mapping with functional MRI », *NeuroImage Clin.*, vol. 17, p. 794-803, 2018, doi: 10.1016/j.nicl.2017.12.008.
- [5] J. Desroches *et al.*, « Characterization of a Raman spectroscopy probe system for intraoperative brain tissue classification », *Biomed. Opt. Express*, vol. 6, n° 7, p. 2380, juill. 2015, doi: 10.1364/BOE.6.002380.
- [6] M. Jermyn *et al.*, « Intraoperative brain cancer detection with Raman spectroscopy in humans », *Sci. Transl. Med.*, vol. 7, n° 274, p. 274ra19-274ra19, févr. 2015, doi: 10.1126/scitranslmed.aaa2384.
- [7] M. Jermyn *et al.*, « Raman spectroscopy detects distant invasive brain cancer cells centimeters beyond MRI capability in humans », *Biomed. Opt. Express*, vol. 7, n° 12, p. 5129-5137, déc. 2016, doi: 10.1364/BOE.7.005129.
- [8] F. Picot *et al.*, « Image-guided Raman spectroscopy navigation system to improve transperineal prostate cancer detection. Part 1: Raman spectroscopy fiber-optics system and in situ tissue characterization », *J. Biomed. Opt.*, vol. 27, n° 9, p. 095003, sept. 2022, doi: 10.1117/1.JBO.27.9.095003.
- [9] D. O. Grajales Lopera *et al.*, « Image-guided Raman spectroscopy navigation system to improve transperineal prostate cancer detection. Part 2: in-vivo tumor-targeting using a classification model combining spectral and MRI-radiomics features », *J. Biomed. Opt.*, vol. 27, n° 9, p. 095004, sept. 2022, doi: 10.1117/1.JBO.27.9.095004.

- [10] K. Ember *et al.*, « In situ brain tumor detection using a Raman spectroscopy system—results of a multicenter study », *Sci. Rep.*, vol. 14, n° 1, p. 13309, juin 2024, doi: 10.1038/s41598-024-62543-9.
- [11] J. R. Ferraro, K. Nakamoto, et C. W. Brown, *Introductory Raman spectroscopy*, 2nd ed. Amsterdam Boston: Academic Press, 2003.
- [12] L. V. Wang et H. Wu, *Biomedical optics: principles and imaging*. Hoboken, N.J: Wiley-Interscience, 2007.
- [13] C. Boudoux, *Fundamentals of Biomedical Optics*. 2016.
- [14] « Raman: Theory », Chemistry LibreTexts. Consulté le: 20 avril 2025. [En ligne]. Disponible sur: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_\(Physical_and_Theoretical_Chemistry\)/Spectroscopy/Vibrational_Spectroscopy/Raman_Spectroscopy/Raman%3A_Theory](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Spectroscopy/Vibrational_Spectroscopy/Raman_Spectroscopy/Raman%3A_Theory)
- [15] M. Nouri, « Développement d’éléments en biocomposite à base de fibre végétale pour la réhabilitation énergétique des bâtiments. ».
- [16] K. Hamada, K. Fujita, N. I. Smith, M. Kobayashi, Y. Inouye, et S. Kawata, « Raman microscopy for dynamic molecular imaging of living cells », *J. Biomed. Opt.*, vol. 13, n° 04, p. 1, juill. 2008, doi: 10.11117/1.2952192.
- [17] S. Hříbalová et W. Pabst, « Modeling light scattering by spherical pores for calculating the transmittance of transparent ceramics – All you need to know », *J. Eur. Ceram. Soc.*, vol. 41, n° 4, p. 2169-2192, avr. 2021, doi: 10.1016/j.jeurceramsoc.2020.11.046.
- [18] D. Fukutomi, K. Ishii, et K. Awazu, « Determination of the scattering coefficient of biological tissue considering the wavelength and absorption dependence of the anisotropy factor », *Opt. Rev.*, vol. 23, n° 2, p. 291-298, avr. 2016, doi: 10.1007/s10043-015-0161-y.
- [19] « Overview of Fluorescence | Omega - Custom Optical Filters ». Consulté le: 9 avril 2025. [En ligne]. Disponible sur: https://www.omegafilters.com/fluorescence_overview

- [20] S. Palmer, K. Litvinova, A. Dunaev, S. Fleming, D. McGloin, et G. Nabi, « Changes in autofluorescence based organoid model of muscle invasive urinary bladder cancer », *Biomed. Opt. Express*, vol. 7, n° 4, p. 1193, avr. 2016, doi: 10.1364/BOE.7.001193.
- [21] E. Yakubovskaya, T. Zaliznyak, J. Martínez Martínez, et G. T. Taylor, « Tear Down the Fluorescent Curtain: A New Fluorescence Suppression Method for Raman Microspectroscopic Analyses », *Sci. Rep.*, vol. 9, n° 1, p. 15785, oct. 2019, doi: 10.1038/s41598-019-52321-3.
- [22] « Tryptophan ». Consulté le: 9 avril 2025. [En ligne]. Disponible sur: <https://omlc.org/spectra/PhotochemCAD/html/091.html>
- [23] « Tyrosine ». Consulté le: 9 avril 2025. [En ligne]. Disponible sur: <https://omlc.org/spectra/PhotochemCAD/html/092.html>
- [24] L. Scarfe *et al.*, « Preclinical imaging methods for assessing the safety and efficacy of regenerative medicine therapies », *Npj Regen. Med.*, vol. 2, n° 1, p. 28, oct. 2017, doi: 10.1038/s41536-017-0029-9.
- [25] M. Jermyn *et al.*, « Intraoperative brain cancer detection with Raman spectroscopy in humans », *Sci. Transl. Med.*, vol. 7, n° 274, févr. 2015, doi: 10.1126/scitranslmed.aaa2384.
- [26] F. Daoust *et al.*, « Handheld macroscopic Raman spectroscopy imaging instrument for machine-learning-based molecular tissue margins characterization », *J. Biomed. Opt.*, vol. 26, n° 2, p. 022911, févr. 2021, doi: 10.1117/1.JBO.26.2.022911.
- [27] F. Daoust *et al.*, « A clinical Raman spectroscopy imaging system and safety requirements for *in situ* intraoperative tissue characterization », *The Analyst*, vol. 148, n° 9, p. 1991-2001, 2023, doi: 10.1039/D2AN01946A.
- [28] A. C. S. Talari, Z. Movasaghi, S. Rehman, et I. U. Rehman, « Raman Spectroscopy of Biological Tissues », *Appl. Spectrosc. Rev.*, vol. 50, n° 1, p. 46-111, janv. 2015, doi: 10.1080/05704928.2014.923902.
- [29] D. I. Ellis, D. P. Cowcher, L. Ashton, S. O'Hagan, et R. Goodacre, « Illuminating disease and enlightening biomedicine: Raman spectroscopy as a diagnostic tool », *The Analyst*, vol. 138, n° 14, p. 3871, 2013, doi: 10.1039/c3an00698k.

- [30] I. Pence et A. Mahadevan-Jansen, « Clinical instrumentation and applications of Raman spectroscopy », *Chem. Soc. Rev.*, vol. 45, n° 7, p. 1958-1979, 2016, doi: 10.1039/C5CS00581G.
- [31] P. Matousek *et al.*, « Subsurface Probing in Diffusely Scattering Media Using Spatially Offset Raman Spectroscopy », *Appl. Spectrosc.*, vol. 59, n° 4, p. 393-400, avr. 2005, doi: 10.1366/0003702053641450.
- [32] K. Buckley et P. Matousek, « Non-invasive analysis of turbid samples using deep Raman spectroscopy », *The Analyst*, vol. 136, n° 15, p. 3039-3050, 2011, doi: 10.1039/C0AN00723D.
- [33] P. Matousek et N. Stone, « Development of deep subsurface Raman spectroscopy for medical diagnosis and disease monitoring », *Chem. Soc. Rev.*, vol. 45, n° 7, p. 1794-1802, 2016, doi: 10.1039/C5CS00466G.
- [34] S. Mosca, C. Conti, N. Stone, et P. Matousek, « Spatially offset Raman spectroscopy », *Nat. Rev. Methods Primer*, vol. 1, n° 1, p. 21, mars 2021, doi: 10.1038/s43586-021-00019-0.
- [35] F. Nicolson, M. F. Kircher, N. Stone, et P. Matousek, « Spatially offset Raman spectroscopy for biomedical applications », *Chem. Soc. Rev.*, vol. 50, n° 1, p. 556-568, 2021, doi: 10.1039/D0CS00855A.
- [36] N. A. Macleod et P. Matousek, « Deep Noninvasive Raman Spectroscopy of Turbid Media », *Appl. Spectrosc.*, vol. 62, n° 11, p. 291A-304A, nov. 2008, doi: 10.1366/000370208786401527.
- [37] P. Matousek, « Inverse Spatially Offset Raman Spectroscopy for Deep Noninvasive Probing of Turbid Media », *Appl. Spectrosc.*, vol. 60, n° 11, p. 1341-1347, nov. 2006, doi: 10.1366/000370206778999102.
- [38] K. Mohd. Khan *et al.*, « Inverse spatially-offset Raman spectroscopy using optical fibers: An axicon lens-free approach », *J. Biophotonics*, vol. 12, n° 11, p. e201900140, nov. 2019, doi: 10.1002/jbio.201900140.
- [39] E. Cordero, « In-vivo Raman spectroscopy: from basics to applications », *J. Biomed. Opt.*, vol. 23, n° 07, p. 1, juin 2018, doi: 10.1117/1.JBO.23.7.071210.

- [40] R. Gautam *et al.*, « Assessment of spatially offset Raman spectroscopy to detect differences in bone matrix quality », *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 303, p. 123240, déc. 2023, doi: 10.1016/j.saa.2023.123240.
- [41] R. Ahmed *et al.*, « Sensitivity of the amide I band to matrix manipulation in bone: a Raman micro-spectroscopy and spatially offset Raman spectroscopy study », *The Analyst*, vol. 148, n° 19, p. 4799-4809, 2023, doi: 10.1039/D3AN00527E.
- [42] P. Raj *et al.*, « Shining Light on Osteoarthritis: Spatially Offset Raman Spectroscopy as a Window into Cartilage Health », *ACS Sens.*, vol. 9, n° 7, p. 3794-3804, juill. 2024, doi: 10.1021/acssensors.4c01242.
- [43] R. K. Surowiec, M. D. Does, et J. S. Nyman, « In Vivo Assessment of Bone Quality Without X-rays », *Curr. Osteoporos. Rep.*, vol. 22, n° 1, p. 56-68, févr. 2024, doi: 10.1007/s11914-023-00856-w.
- [44] M. Z. Vardaki *et al.*, « Defocused Spatially Offset Raman Spectroscopy in Media of Different Optical Properties for Biomedical Applications Using a Commercial Spatially Offset Raman Spectroscopy Device », *Appl. Spectrosc.*, vol. 74, n° 2, p. 223-232, févr. 2020, doi: 10.1177/0003702819884625.
- [45] M. Z. Vardaki, H. Georg Schulze, K. Serrano, M. W. Blades, D. V. Devine, et R. F. B. Turner, « Assessing the quality of stored red blood cells using handheld Spatially Offset Raman spectroscopy with multisource correlation analysis », *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 276, p. 121220, août 2022, doi: 10.1016/j.saa.2022.121220.
- [46] R. E. Kast, S. C. Tucker, K. Killian, M. Trexler, K. V. Honn, et G. W. Auner, « Emerging technology: applications of Raman spectroscopy for prostate cancer », *Cancer Metastasis Rev.*, vol. 33, n° 2-3, p. 673-693, sept. 2014, doi: 10.1007/s10555-013-9489-6.
- [47] M. Z. Vardaki, E. Pavlou, N. Simantiris, E. Lampri, K. Seretis, et N. Kourkoumelis, « Towards non-invasive monitoring of non-melanoma skin cancer using spatially offset Raman spectroscopy », *The Analyst*, vol. 148, n° 18, p. 4386-4395, 2023, doi: 10.1039/D3AN00684K.
- [48] N. Stone, R. Baker, K. Rogers, A. W. Parker, et P. Matousek, « Subsurface probing of calcifications with spatially offset Raman spectroscopy (SORS): future possibilities for the diagnosis of breast cancer », *The Analyst*, vol. 132, n° 9, p. 899, 2007, doi: 10.1039/b705029a.

- [49] N. Stone, M. Kerssens, G. R. Lloyd, K. Faulds, D. Graham, et P. Matousek, « Surface enhanced spatially offset Raman spectroscopic (SEORS) imaging – the next dimension », *Chem. Sci.*, vol. 2, n° 4, p. 776, 2011, doi: 10.1039/c0sc00570c.
- [50] S. M. Asiala, N. C. Shand, K. Faulds, et D. Graham, « Surface-Enhanced, Spatially Offset Raman Spectroscopy (SEORS) in Tissue Analogue », *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 9, n° 30, p. 25488-25494, août 2017, doi: 10.1021/acsami.7b09197.
- [51] F. Nicolson *et al.*, « Multiplex imaging of live breast cancer tumour models through tissue using handheld surface enhanced spatially offset resonance Raman spectroscopy (SEORRS) », *Chem. Commun.*, vol. 54, n° 61, p. 8530-8533, 2018, doi: 10.1039/C8CC04267E.
- [52] F. Nicolson *et al.*, « Through tissue imaging of a live breast cancer tumour model using handheld surface enhanced spatially offset resonance Raman spectroscopy (SEORRS) », *Chem. Sci.*, vol. 9, n° 15, p. 3788-3792, 2018, doi: 10.1039/C8SC00994E.
- [53] R. Boudries *et al.*, « Surface-Enhanced Raman Scattering Nanosensing and Imaging in Neuroscience », *ACS Nano*, vol. 18, n° 34, p. 22620-22647, août 2024, doi: 10.1021/acsnano.4c05200.
- [54] B. Gardner, N. Stone, et P. Matousek, « Non-invasive chemically specific measurement of subsurface temperature in biological tissues using surface-enhanced spatially offset Raman spectroscopy », *Faraday Discuss.*, vol. 187, p. 329-339, 2016, doi: 10.1039/C5FD00154D.
- [55] P. Matousek *et al.*, « Numerical Simulations of Subsurface Probing in Diffusely Scattering Media Using Spatially Offset Raman Spectroscopy », *Appl. Spectrosc.*, vol. 59, n° 12, p. 1485-1492, déc. 2005, doi: 10.1366/000370205775142548.
- [56] M. D. Keller, R. H. Wilson, M.-A. Mycek, et A. Mahadevan-Jansen, « Monte Carlo Model of Spatially Offset Raman Spectroscopy for Breast Tumor Margin Analysis », *Appl. Spectrosc.*, vol. 64, n° 6, p. 607-614, juin 2010, doi: 10.1366/000370210791414407.
- [57] K. Chen, M. Sun, et S. Chen, « Determining ideal offsets of spatially offset Raman spectroscopy for transcutaneous measurements—A Monte Carlo study », *J. Biophotonics*, p. e202300564, juin 2024, doi: 10.1002/jbio.202300564.
- [58] S. Mosca *et al.*, « Spatially Offset Raman Spectroscopy—How Deep? », *Anal. Chem.*, vol. 93, n° 17, p. 6755-6762, mai 2021, doi: 10.1021/acs.analchem.1c00490.

- [59] A. Akbarzadeh *et al.*, « Experimental validation of a spectroscopic Monte Carlo light transport simulation technique and Raman scattering depth sensing analysis in biological tissue », *J. Biomed. Opt.*, vol. 25, n° 10, oct. 2020, doi: 10.1117/1.JBO.25.10.105002.
- [60] M. Z. Vardaki et N. Kourkoumelis, « Tissue Phantoms for Biomedical Applications in Raman Spectroscopy: A Review », *Biomed. Eng. Comput. Biol.*, vol. 11, p. 117959722094810, janv. 2020, doi: 10.1177/1179597220948100.
- [61] J. R. Maher et A. J. Berger, « Determination of Ideal Offset for Spatially Offset Raman Spectroscopy », *Appl. Spectrosc.*, vol. 64, n° 1, p. 61-65, janv. 2010, doi: 10.1366/000370210790571936.
- [62] A. S. Moody, P. C. Baghernejad, K. R. Webb, et B. Sharma, « Surface Enhanced Spatially Offset Raman Spectroscopy Detection of Neurochemicals Through the Skull », *Anal. Chem.*, vol. 89, n° 11, p. 5688-5692, juin 2017, doi: 10.1021/acs.analchem.7b00985.
- [63] F. Nicolson, B. Andreiuk, C. Andreou, H.-T. Hsu, S. Rudder, et M. F. Kircher, « Non-invasive *In Vivo* Imaging of Cancer Using Surface-Enhanced Spatially Offset Raman Spectroscopy (SESORS) », *Theranostics*, vol. 9, n° 20, p. 5899-5913, 2019, doi: 10.7150/thno.36321.
- [64] I. E. Ipingletterson, F. W. L. Esmonde-White, W. De Wilde, M. D. Morris, et F. Ariese, « Tissue phantoms to compare spatial and temporal offset modes of deep Raman spectroscopy », *The Analyst*, vol. 140, n° 7, p. 2504-2512, 2015, doi: 10.1039/C4AN01889C.
- [65] S. Mosca, P. Dey, T. A. Tabish, F. Palombo, N. Stone, et P. Matousek, « Spatially Offset and Transmission Raman Spectroscopy for Determination of Depth of Inclusion in Turbid Matrix », *Anal. Chem.*, vol. 91, n° 14, p. 8994-9000, juill. 2019, doi: 10.1021/acs.analchem.9b01222.
- [66] M. Dooley *et al.*, « Spatially-offset Raman spectroscopy for monitoring mineralization of bone tissue engineering scaffolds: feasibility study based on phantom samples », *Biomed. Opt. Express*, vol. 10, n° 4, p. 1678, avr. 2019, doi: 10.1364/BOE.10.001678.
- [67] S. Mosca, P. Dey, T. A. Tabish, F. Palombo, N. Stone, et P. Matousek, « Determination of inclusion depth in ex vivo animal tissues using surface enhanced deep Raman spectroscopy », *J. Biophotonics*, vol. 13, n° 1, p. e201960092, janv. 2020, doi: 10.1002/jbio.201960092.

- [68] H. Xie, R. Stevenson, N. Stone, A. Hernandez-Santana, K. Faulds, et D. Graham, « Tracking Bisphosphonates through a 20 mm Thick Porcine Tissue by Using Surface-Enhanced Spatially Offset Raman Spectroscopy », *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 51, n° 34, p. 8509-8511, août 2012, doi: 10.1002/anie.201203728.
- [69] P. Dey, W. Olds, I. Blakey, K. J. Thurecht, E. L. Izake, et P. M. Fredericks, « SERS-based detection of barcoded gold nanoparticle assemblies from within animal tissue », *J. Raman Spectrosc.*, vol. 44, n° 12, p. 1659-1665, déc. 2013, doi: 10.1002/jrs.4399.
- [70] B. Sharma, K. Ma, M. R. Glucksberg, et R. P. Van Duyne, « Seeing through Bone with Surface-Enhanced Spatially Offset Raman Spectroscopy », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 135, n° 46, p. 17290-17293, nov. 2013, doi: 10.1021/ja409378f.
- [71] Z. Wang, H. Yang, H. Ding, G. Lu, H. Jiang, et X. Bi, « Area-detection fibre-optic system for spatially offset Raman spectroscopy and Raman tomography in reflection mode », *Electron. Lett.*, vol. 51, n° 21, p. 1684-1686, oct. 2015, doi: 10.1049/el.2015.2449.
- [72] S. David *et al.*, « Macroscopic inelastic scattering imaging using a hyperspectral line-scanning system identifies invasive breast cancer in lumpectomy and mastectomy specimens », *J. Biomed. Opt.*, vol. 29, n° 06, juin 2024, doi: 10.1117/1.JBO.29.6.065004.
- [73] F. Daoust *et al.*, « Preliminary study demonstrating cancer cells detection at the margins of whole glioblastoma specimens with Raman spectroscopy imaging », *Sci. Rep.*, vol. 15, n° 1, p. 6453, févr. 2025, doi: 10.1038/s41598-025-87109-1.
- [74] F. C. P. Sales, R. M. Ariati, V. T. Noronha, et J. E. Ribeiro, « Mechanical Characterization of PDMS with Different Mixing Ratios », *Procedia Struct. Integr.*, vol. 37, p. 383-388, 2022, doi: 10.1016/j.prostr.2022.01.099.
- [75] S. Prahl, *iad: C code for Forward and Inverse Radiative Transport using the Adding-Doubling method*. (15 mai 2024). Zenodo. doi: 10.5281/zenodo.11200806.
- [76] G. Sheehy *et al.*, « Open-sourced Raman spectroscopy data processing package implementing a baseline removal algorithm validated from multiple datasets acquired in human tissue and biofluids », *J. Biomed. Opt.*, vol. 28, n° 2, p. 025002, févr. 2023, doi: 10.1117/1.JBO.28.2.025002.

- [77] T. I. A. for R. on Cancer (IARC), « Global Cancer Observatory ». Consulté le: 17 février 2025. [En ligne]. Disponible sur: <https://gco.iarc.fr/>
- [78] L. Jacobs, « Positive Margins: The Challenge Continues for Breast Surgeons », *Ann. Surg. Oncol.*, vol. 15, n° 5, p. 1271-1272, mai 2008, doi: 10.1245/s10434-007-9766-0.
- [79] F. J. Fleming, A. D. K. Hill, E. W. Mc Dermott, A. O'Doherty, N. J. O'Higgins, et C. M. Quinn, « Intraoperative margin assessment and re-excision rate in breast conserving surgery », *Eur. J. Surg. Oncol. EJSO*, vol. 30, n° 3, p. 233-237, avr. 2004, doi: 10.1016/j.ejso.2003.11.008.
- [80] I. Miranda *et al.*, « Properties and Applications of PDMS for Biomedical Engineering: A Review », *J. Funct. Biomater.*, vol. 13, n° 1, p. 2, déc. 2021, doi: 10.3390/jfb13010002.
- [81] N. E. Stankova *et al.*, « Optical properties of polydimethylsiloxane (PDMS) during nanosecond laser processing », *Appl. Surf. Sci.*, vol. 374, p. 96-103, juin 2016, doi: 10.1016/j.apsusc.2015.10.016.