

Titre: Imagerie multimodale intégrant fluorescence et spectroscopie
Title: Raman pour l'étude du cancer

Auteur: Gabriel Beaudoin
Author:

Date: 2026

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Beaudoin, G. (2026). Imagerie multimodale intégrant fluorescence et spectroscopie Raman pour l'étude du cancer [Mémoire de maîtrise, Polytechnique Montréal]. PolyPublie. <https://publications.polymtl.ca/76109/>
Citation:

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

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/76109/>
PolyPublie URL:

Directeurs de recherche: Frédéric Leblond
Advisors:

Programme: Génie biomédical
Program:

POLYTECHNIQUE MONTRÉAL

affiliée à l'Université de Montréal

**Imagerie multimodale intégrant fluorescence et spectroscopie Raman pour
l'étude du cancer**

GABRIEL BEAUDOIN

Institut de génie biomédical

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

Génie biomédical

Mars 2026

POLYTECHNIQUE MONTRÉAL

affiliée à l'Université de Montréal

Ce mémoire intitulé :

**Imagerie multimodale intégrant fluorescence et spectroscopie Raman pour
l'étude du cancer**

présenté par **Gabriel BEAUDOIN**

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

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

Samuel KADOURY, président

Frédéric LEBLOND, membre et directeur de recherche

Arthur LALONDE, membre

DÉDICACE

Je dédie ce mémoire à toutes les personnes qui œuvrent au sein du réseau de la santé, et tout spécialement aux technologues en imagerie médicale. Vous accomplissez un travail exceptionnel, souvent sans recevoir toute la reconnaissance que vous méritez.

REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à remercier mon directeur de recherche, Pr Frédéric Leblond, qui m'a permis de prendre part à un projet motivant en pleine période de COVID-19, puis de poursuivre mon parcours en maîtrise au sein de son laboratoire. Merci pour ton enthousiasme, ta confiance et ta capacité à toujours proposer de nouvelles idées tout en restant attentif à nos intérêts et à nos objectifs professionnels.

Je souhaite également remercier l'ensemble de mes collègues du laboratoire LUMED pour avoir créé un environnement de travail accueillant, stimulant et marqué par de grandes réalisations collectives. Merci pour votre disponibilité, votre écoute et votre soutien tout au long de ce parcours. Une pensée toute particulière à Victor Blaquez-Yeste et Guillaume Sheehy pour le temps que vous m'avez consacré et pour les discussions qui ont enrichi ce projet et l'ont rendu d'autant plus pertinent.

Un merci tout spécial à Seung Soo Lee pour ton aide constante, tes encouragements et ton attitude toujours exemplaire. Tu as rendu le travail plus efficace et, surtout, plus agréable.

Je tiens également à remercier l'équipe du bloc opératoire du MNI pour leur accueil, leur collaboration et leur ouverture. Vous avez facilité la réalisation de ce projet, et je suis reconnaissant de la place que vous nous avez faite dans un milieu de travail aussi dynamique.

Enfin, un merci du fond du cœur à ma femme et à mes parents. Votre soutien, vos encouragements et votre présence ont fait toute la différence. Vous avez été ma source de motivation quotidienne, et je vous suis sincèrement reconnaissant pour tout l'amour et la patience que vous m'avez offerts tout au long de ce parcours.

RÉSUMÉ

L'imagerie dans le proche infrarouge offre des avantages importants en optique biomédicale grâce à différentes méthodes complémentaires permettant d'obtenir de l'information sur l'état des tissus biologiques de manière non invasive. Ce mémoire présente la conception et la validation d'une plateforme d'imagerie multimodale combinant la fluorescence endogène, la fluorescence exogène et une méthode d'imagerie Raman multispectrale. Il met en valeur le potentiel de recherche et la combinaison de diverses approches d'imagerie dans le proche infrarouge. Il applique ces possibilités à l'imagerie grand champ de tissus tumoraux cérébraux et intègre l'utilisation de marqueurs moléculaires tels que les nanotubes de carbone et leur combinaison avec des fluorophores exogènes. Il introduit aussi une méthode de correction du signal selon les propriétés optiques des tissus et une méthode multispectrale isolant le signal Raman à l'aide de seulement trois filtres. L'application de ces technologies pour l'identification de tissus cancéreux ou de marqueurs ciblant les tumeurs constitue son objectif principal.

La première modalité du système vise à imager la présence de nanotubes de carbone capables de cibler les tumeurs en s'y accumulant. Cette partie cherche à identifier la fluorescence émise par des fluorophores liés aux nanotubes ou à les détecter directement à partir de leur signal Raman, notamment dans les bandes D (1350 cm^{-1}) et G (1600 cm^{-1}). Le système est conçu pour minimiser les pertes de transmission du signal surtout à la longueur d'onde du Raman. Il cible un pic Raman à l'aide de trois filtres permettant d'observer l'intensité du signal tout en soustrayant l'autofluorescence.

La seconde modalité utilise la fluorescence endogène des tissus biologiques pour caractériser les tissus tumoraux du cerveau. Cette étude s'appuie sur des spectres Raman *in vivo* (430 mesures, 26 patients), avec une valeur prédictive positive de 85–88 % pour la détection tumorale et une valeur prédictive négative de 96 % pour le tissu cérébral normal. Le montage grand champ a été adapté pour l'acquisition *d'images* de fluorescence et de réflectance sur des échantillons *ex vivo*. Les résultats ont été obtenus sur 14 échantillons provenant de 5 patients lors de leur opération du cancer du cerveau. Le système élimine les réflexions spéculaires et applique une méthode de correction pour tenir compte des variations optiques et géométrique. Les résultats démontrent un contraste intrinsèque robuste, avec des différences significatives ($p < 0,05$), ouvrant la voie au développement d'outils optiques pour l'assistance à la visualisation des tissus tumoraux.

ABSTRACT

Near-infrared imaging offers significant advantages in biomedical optics through various complementary methods that enable the collection of information on the state of biological tissues in a non-invasive manner. This thesis presents the design and validation of a multimodal imaging platform combining endogenous fluorescence, exogenous fluorescence, and a multispectral Raman imaging method. It highlights the research potential and the combination of different near-infrared imaging approaches. It applies these capabilities to wide-field imaging of brain tumor tissues and integrates the use of molecular markers such as carbon nanotubes and their combination with exogenous fluorophores. It also introduces a signal-correction method based on the optical properties of tissues and a multispectral approach isolating the Raman signal using only three filters. The application of these technologies for identifying cancerous tissues or tumor-targeting markers constitutes its main objective.

The first modality of the system aims to image the presence of carbon nanotubes capable of targeting cancerous tumors by accumulating within them. This part of the project seeks to identify the fluorescence emitted by fluorophores linked with the nanotubes or to directly detect them through their Raman signal, particularly in the D (1350 cm^{-1}) and G (1600 cm^{-1}) bands. The system is designed to minimize overall signal losses especially at the Raman wavelength. It targets a Raman peak using three filters that allow both observation of signal intensity and subtraction of the autofluorescence component.

The second modality uses the endogenous fluorescence of biological tissues to characterize brain tumor tissues. This study is based on fluorescence signatures observed in *in vivo* Raman spectra from 430 measurements on 26 patients, yielding a positive predictive value (PPV) of 85–88% for tumor detection and a negative predictive value (NPV) of 96% for normal brain tissue. The wide-field setup was adapted for the acquisition of fluorescence and reflectance images on *ex vivo* samples. The results were obtained on 14 samples from 5 patients during their brain cancer surgery. The system eliminates specular reflections and applies a correction method to account for spatial variations in illumination, surface geometry, and tissue absorption and scattering properties. Overall, the results demonstrate a robust intrinsic contrast, with statistically significant differences ($p < 0.05$) across raw and corrected data as well as paired and grouped analyses, providing a foundation for the development of optical tools aimed at assisting tumor tissue visualization.

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE.....	III
REMERCIEMENTS	IV
RÉSUMÉ.....	V
ABSTRACT	VI
LISTE DES TABLEAUX.....	X
LISTE DES FIGURES.....	XI
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XV
CHAPITRE 1 INTRODUCTION	1
1.1 Hypothèses et objectifs.....	2
1.2 Plan du mémoire.....	3
CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE.....	4
2.1 Fluorescence	4
2.1.1 Spectres de fluorescence	5
2.1.2 Types de fluorophores.....	6
2.1.3 Facteurs de diminution du signal de fluorescence	7
2.1.4 Applications biomédicales de la fluorescence	9
2.2 Diffusion Raman.....	13
2.2.1 Spectroscopie Raman	16
2.2.2 Application et imagerie multispectrale Raman	19
CHAPITRE 3 PLATEFORME D'IMAGERIE POUR LA FLUORESCENCE ET LE RAMAN MULTISPECTRAL : CONCEPTION ET CONTRAINTES	22
3.1 Conception globale et principes optiques du système bimodale	22
3.1.1 Contraintes et objectifs.....	22

3.1.2	Choix de conception: épi-illumination.....	24
3.1.3	Calculs et validations	26
3.2	Imagerie par fluorescence.....	28
3.3	Déroulement expérimental de l'imagerie Raman multispectrale	33
3.3.1	Méthode de simulation de filtres	34
3.3.2	Mise en place et analyse des dysfonctionnements	36
CHAPITRE 4	ARTICLE 1: LABEL-FREE WIDE-FIELD IMAGING OF BRAIN TUMORS USING NEAR-INFRARED ENDOGENOUS FLUORESCENCE AND REFLECTANCE NORMALIZATION	39
4.1	Mise en contexte	39
4.2	Label-Free Wide-Field Imaging of Brain Tumors Using Near-Infrared Endogenous Fluorescence and Reflectance Normalization	40
4.2.1	Abstract	40
4.2.2	Introduction	41
4.2.3	Materials and Methods	44
4.2.4	Results	49
4.2.5	Discussion	56
4.2.6	Conclusion.....	59
4.2.7	Acknowledgments.....	59
4.2.8	Conflict of interest.....	60
4.2.9	Code, Data and Materials Availability	60
4.2.10	Supplementary Material:	60
CHAPITRE 5	DISCUSSION	62
5.1	Retour sur les objectifs	62
5.2	Avantages et désavantages du système obtenu.....	63

5.3	Défis rencontrés	64
5.4	Contributions	65
CHAPITRE 6	CONCLUSION.....	67
RÉFÉRENCES.....		69

LISTE DES TABLEAUX

Table 4.1 Summary of Patient Data, Diagnostics, and Pathologist Predictions

LISTE DES FIGURES

Figure 2.1 Diagramme de Jablonski de la fluorescence et la phosphorescence.....	5
Figure 2.2 Spectre de fluorescence classique.....	6
Figure 2.3 a) Système de microscopie grand champ b) Système de microscopie par point	10
Figure 2.4 Diagramme de Jablonski de la diffusion Raman	13
Figure 2.5 Spectre Raman traité d'un amas de cellules du cancer de la prostate.....	18
Figure 2.6 Schéma de spectre de fluorescence et de pics Raman	19
Figure 2.7 Schéma du positionnement des filtres pour la méthode de soustraction de la fluorescence	21
Figure 3.1 Schéma initial du système multimodal	25
Figure 3.2 Montage optique d'imagerie grand champ pour la fluorescence.....	30
Figure 3.3 Visualisation du montage optique sur son support mobile	31
Figure 3.4 Résultats des acquisitions sur des côtelettes de porc : images en grand champ pour (A) la section de muscle, (B) la section de gras, (C) la jonction entre le gras et le muscle, ainsi que les graphiques des distributions d'intensité pour chaque modalité	32
Figure 3.5 Expérience de combinaison de CNTs et de sphéroïdes de cancer de la prostate : (A) spectre Raman pour les CNTs ciblés, (B) évolution de la concentration pour les CNTs non ciblés, (C) évolution de la concentration pour les CNTs ciblés	34
Figure 3.6 Résultat de simulation pour les 3 filtres ciblant la bande D des CNTs	36
Figure 3.7 Acquisition brut de la source à 1064nm à travers le troisième filtre	37
Figure 4.1 Quantitative analysis of endogenous <i>in vivo</i> fluorescence extracted from the baseline (background) of Raman spectra acquired intraoperatively with a handheld Raman probe. (a) Boxplots show fluorescence intensity distributions for three tissue categories: bulk glioblastoma, bulk astrocytoma, and normal brain. The fluorescence intensity corresponds to the broad background signal underlying the Raman spectrum, reflecting endogenous tissue	

emission under 785 nm excitation. Univariate statistical analysis revealed statistically significant differences ($p < 0.001$) between normal brain and both tumor classes, with fluorescence consistently higher in normal tissue. (b) Receiver operating characteristic (ROC) curve obtained by grouping all tumor spectra versus normal brain, using endogenous fluorescence intensity as the classifier variable. The optimal operating point (upper-left corner of the ROC curve) yielded a positive predictive value (PPV) of 85-88% for tumor detection and a negative predictive value (NPV) of 96% for normal brain, confirming the discriminative power of endogenous fluorescence as a label-free biomarker *in vivo*..... 50

Figure 4.2 Validation of fluorescence detection performance using dilution experiments with inorganic near-infrared dyes. (a) Fluorescence intensity of Cy7.5 solutions serially diluted in MilliQ water, demonstrating linearity of signal response across concentrations until fluorescence quenching occurs at higher concentrations. The detection noise floor corresponds to approximately 6 μM . (b) Fluorescence intensity of indocyanine green (ICG) solutions prepared in intralipid with an absorption dye to simulate varying optical properties. Three distinct optical conditions were tested, each exhibiting linear fluorescence response across the measured range with a detection limit near 2 μM . These results confirm the imaging system's quantitative response and sensitivity under diverse scattering and absorption conditions. .. 51

Figure 4.3 Representative *ex vivo* images acquired from specimen 3 of patient 14 (glioblastoma) using the wide-field near-infrared fluorescence and reflectance imaging system. Panels show: (a) raw fluorescence image acquired under 808 nm excitation through the 850 nm long-pass filter; (b) corresponding diffuse reflectance image at 808 nm; (c) ratiometric fluorescence map obtained by dividing the fluorescence image by the normalized reflectance image, isolating intrinsic fluorescence contrast; (d) corresponding hematoxylin and eosin (H&E) histology section showing the spatial distribution of tumor and normal brain regions; and (e) gross photograph of the specimen surface after imaging. The ratiometric fluorescence image highlights reduced endogenous fluorescence intensity in tumor regions relative to surrounding normal tissue, consistent with the *in vivo* findings. 52

Figure 4.4 Quantitative analysis of optical signals from specimen 3 of patient 14 (glioblastoma) corresponding to the images shown in Figure 1. Boxplots display the distribution, median, interquartile range, and outliers for regions histologically classified as

tumor and normal brain. Panels show: (a) raw fluorescence intensity, (b) raw reflectance intensity, and (c) fluorescence normalized by reflectance (F/R). p -values from paired t -tests are indicated on each plot, demonstrating statistically significant differences between tumor and normal tissue across all normalization methods ($p < 0.05$). 53

Figure 4.5 Demonstration of illumination and geometry normalization using fluorescence-to-reflectance ratios in a specimen histologically confirmed as normal brain tissue. The right panels show the gross photograph and corresponding hematoxylin and eosin (H&E) histology image, with colored squares indicating the locations of three regions of interest (ROIs) (A–C). For each ROI, five image modalities are displayed: (a) raw fluorescence; (b) fluorescence normalized by reflectance; and (c) raw reflectance. Rows correspond to ROI A (top), ROI B (middle), and ROI C (bottom). Despite visible heterogeneities in the raw fluorescence and reflectance signals caused by surface height variations and optical property differences, the fluorescence-to-reflectance normalization yields a spatially homogeneous signal across all regions, demonstrating the effectiveness of ratiometric correction in compensating for illumination non-uniformity and surface geometry effects. 54

Figure 4.6 Quantitative analysis of *ex vivo* endogenous fluorescence and reflectance signals across all imaged specimens, grouped by histopathological classification. All pixels from the dataset were pooled and categorized as normal brain, tumor (glioblastoma and astrocytoma combined), necrosis, or blood, based on the neuropathologist’s assessment (see Table 1). Boxplots display the distribution, median, interquartile range, and outliers for each tissue class across five imaging-derived parameters: (a) raw fluorescence intensity, (b) fluorescence normalized by reflectance, and (c) raw reflectance intensity. p -values from mixed-effects ANOVA tests are indicated on each plot, demonstrating statistically significant differences ($p < 0.05$) between normal brain and tumor tissue across all modalities. 56

Figure 4.7 The *ex vivo* image panels acquired from all patients using the wide-field near-infrared fluorescence and reflectance imaging system. Panels show: (a) raw fluorescence image acquired under 808 nm excitation through the 850 nm long-pass filter; (b) corresponding diffuse reflectance image at 808 nm; (c) reflectance image normalized by the illumination profile obtained from a Spectralon standard, illustrating spatial correction for non-uniform excitation. The differences illustrated in this figure may appear less pronounced for some

samples than for the one shown as a representative example. Nevertheless, all images were included in the statistical analysis. Specifically, all available samples were used in the mixed ANOVA, and the five samples containing both tumor and healthy tissue were considered in the paired t-test. 60

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
CRCHUM	Centre de recherche du centre hospitalier de l'université de Montréal
CNTs	Nanotubes de carbone
Cy7.5	Cyanine 7.5-amine
EMP	Exposition maximal permissible
FAD	Flavine
FOV	Field of view
H&E	Hematoxyline and eosine
IAD	Inverse adding doubling
ICG	Indocyanine green
IRM	Imagerie par résonnance magnétique
LLM	Large language model
MNI	Institut-hôpital neurologique de Montréal
NP	Nanoparticule
NIR	Near infrared
NADH	Nicotinamide adenine dinucléotide réduit
NPV	Negative predictive value
PSMA	Antigène membranaire spécifique de la prostate
PpIX	Protoporphyrin IX
PBS	Phosphate-buffered saline
PDMS	Polydimethylsiloxane
PPV	Positive predictive value
ROC	Receiver operating characteristic

ROI	Region of interest
SWIR	Short-wave infrared
5-ALA	Acide 5-aminolévulinique

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

En 2025, un estimé de 254 800 Canadiens recevront un diagnostic de cancer.[1] Ces cancers prennent des formes variées, chacune présentant des défis cliniques nécessitant des traitements adaptés. Parmi celles-ci, le cancer de la prostate, principal diagnostic chez les hommes en 2023, et le cancer du cerveau, qui nécessitent des traitements particulièrement délicats.[2, 3] Ces deux exemples illustrent bien la diversité des enjeux associés à la résection de tumeur.

Pour le cancer de la prostate, le nouvel étalon d'or est d'effectuer une prostatectomie radicale robotique.[4] Cette méthode consiste en un retrait total de la prostate, signifiant qu'un grand nombre de cellules saines sont volontairement retirées en plus de la tumeur. À l'inverse, pour les tumeurs cérébrales, l'atteinte d'une résection maximale sécuritaire constitue l'un des facteurs pronostiques les plus importants pour la survie des patients et la réduction du risque de récurrence.[5, 6] Les décisions chirurgicales sont principalement guidées par des indices visuels et tactiles qui cherchent à équilibrer le retrait complet de la tumeur avec les risques de déficits neurologiques postopératoires touchant les fonctions motrices, visuelles ou cognitives.[7] Le lien commun, entre ces cancers et plusieurs autres, est la nécessité de développer de nouvelles méthodes distinguant les tissus sains et tumoraux, ou leur composition cellulaire, afin d'assister la résection chirurgicale ou d'autres traitements en limitant les pertes de tissus sains.[8]

Dans la dernière décennie, l'utilisation de nanoparticules (NPs) a permis d'améliorer les méthodes d'imagerie médicale conventionnelles comme l'imagerie par résonance magnétique et la tomographie par émission de positrons. Les NPs permettent le développement de technologies d'imagerie moléculaire. Elles contribuent également à la surveillance, à la quantification et à la visualisation de signaux physiologiques et à l'administration de médicaments, tout en permettant un ciblage thérapeutique précis grâce à leur capacité à relâcher ou favoriser l'accumulation d'agents pharmacologiques dans des régions ciblées de l'organisme.[9, 10] Les nanotubes de carbone (CNTs) sont des NPs présentant un intérêt particulier. Leur absorption dans le proche infrarouge (NIR, *near infrared*) et leur conductivité thermique les rendent adaptés à la photothérapie ciblée, où l'accumulation de CNTs dans les cellules tumorales permet de chauffer et d'éliminer sélectivement les cellules cancéreuses par ablation photothermique. Développée dans un laboratoire connexe, l'utilisation des CNTs dans le NIR sur des cellules du cancer de la prostate a fortement inspiré le développement des méthodes d'imagerie décrites dans ce mémoire.

La fenêtre spectrale du NIR, de 700 nm à 1000 nm, présente plusieurs avantages pour l'imagerie des tissus biologiques.[9] Elle réduit la diffusion de la lumière et minimise l'absorption par l'eau et l'hémoglobine. Cette réduction du signal de fond associée à ces molécules permet, par le fait même, une plus grande pénétration dans les tissus et laisse la place à la détection d'autres molécules ou marqueurs exogènes. Cette propriété est particulièrement intéressante pour l'imagerie des signaux endogènes, comme l'autofluorescence des tissus tumoraux cérébraux mais aussi pour rehausser des signaux exogènes. Pour améliorer la méthode d'imagerie, les CNTs peuvent être fonctionnalisés avec des fluorophores, tels que l'indocyanine green (ICG) pour améliorer la détection spécifique des cellules cancéreuses. De plus, leurs bandes Raman distinctives, D et G, permettent l'utilisation de la spectroscopie Raman pour détecter les cellules ciblées.

Ainsi, le développement des CNTs pour la photothérapie a servi de base conceptuelle pour le développement d'une plateforme d'imagerie combinant la visualisation des signaux endogènes des tissus, la détection de fluorophores exogènes et la localisation de cellules ciblées par la spectroscopie Raman.

1.1 Hypothèses et objectifs

L'objectif principal de ce projet est de développer et valider une plateforme d'imagerie pour la détection du cancer ou d'agents de ciblage moléculaires. Pour y arriver, nous fixons deux hypothèses et leur objectifs associés.

Hypothèse 1 : L'imagerie dans le proche infrarouge permet d'analyser les tissus biologiques à quelques millimètres de profondeur de manière non invasive, et le développement d'une méthode grand champ pourrait permettre une collecte plus rapide et étendue des données.

Objectif 1 : Développer un système d'imagerie proche infrarouge grand champ permettant la collecte rapide d'images d'échantillons biologiques cancéreux sur une surface de 1 à 2 cm².

Hypothèse 2 : Les nanotubes de carbones peuvent cibler les cellules cancéreuses et peuvent être imagés grâce à la conjugaison de fluorophores et la spectroscopie Raman des leurs bandes D et G.

Objectif 2 : Détecter la présence et la concentration de CNTs par une méthode d'imagerie bimodale en fluorescence et en spectroscopie Raman.

1.2 Plan du mémoire

En plus de ce chapitre, ce mémoire contient six chapitres. Le deuxième chapitre est une revue de littérature décrivant les principes physiques utilisés pour l'imagerie en fluorescence et la méthode multispectrale Raman ainsi qu'un état de l'art de ces technologies dans leurs applications médicales. Le troisième chapitre présente le système global et son utilisation dans ses différents modes d'illumination incluant l'utilisation de marqueurs reliés au CNTs. Le quatrième chapitre contient sous forme d'article la preuve de concept chez l'humain du système d'imagerie en fluorescence intrinsèque. Le cinquième chapitre sert de discussion pour revenir sur les résultats présentés et les méthodes utilisées. Le dernier chapitre souligne les résultats importants principaux et conclut en proposant des améliorations.

CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE

L'interaction d'une source d'excitation laser avec la matière produit trois processus optiques intéressants à expliquer pour ce projet. Les deux premiers qui nécessitent l'absorption d'un photon sont la fluorescence et la phosphorescence. Le troisième nécessite un niveau d'énergie dit virtuel et est surnommé la diffusion Raman. Nous commencerons par expliquer la fluorescence, car, même si elle est utilisée comme méthode d'imagerie, elle est souvent considérée comme un signal de bruit en spectroscopie Raman.

2.1 Fluorescence

La fluorescence correspond à l'émission spontanée rapide d'un photon par la désexcitation d'un électron ayant absorbé un photon incident. La fluorescence et la phosphorescence commencent donc par l'absorption nécessitant une source de lumière d'excitation. L'absorption présente un spectre continu couvrant plusieurs longueurs d'onde influencé par de multiples facteurs dont l'interaction du milieu avec l'énergie des photons. Le niveau d'énergie fondamentale et les niveaux excités possèdent plusieurs sous-niveaux d'énergie vibrationnelle. Cela permet des transitions correspondant à des niveaux d'énergie différents (E_t) et donc des longueurs d'onde différentes (λ_a) selon l'équation suivante :

$$E_t = \frac{hc}{\lambda_a} \quad (2.1)$$

L'émission est une désexcitation radiative qui dépend de l'état de l'électron excité. Dans un singulet excité, les deux électrons ont des spins opposés et la transition vers l'état fondamental est permise par le principe d'exclusion de Pauli. La transition vers l'état fondamental a lieu rapidement et on appelle ce phénomène la fluorescence. Le temps moyen entre l'excitation et le retour au niveau fondamental est appelé temps de vie et se trouve typiquement autour de 1 à 10 nanosecondes.[11] Pour un triplet d'électrons excités, le principe d'exclusion de Pauli empêche que deux électrons aient les mêmes quatre nombres quantiques. La transition est alors interdite, car les électrons ont le même spin et ils auraient les mêmes nombres quantiques après la transition. L'électron effectue alors une transition non-radiative vers un état de triplet en subissant une conversion de spin appelé conversion intersystème. Le spin change grâce aux interactions spin-orbital favorables pour des molécules aux atomes lourds qui sont le plus souvent phosphorescentes. Ce processus prend beaucoup plus de temps et est appelé phosphorescence. On peut voir la

différence entre la fluorescence et la phosphorescence dans le diagramme de Jablonski de la figure 2.1.

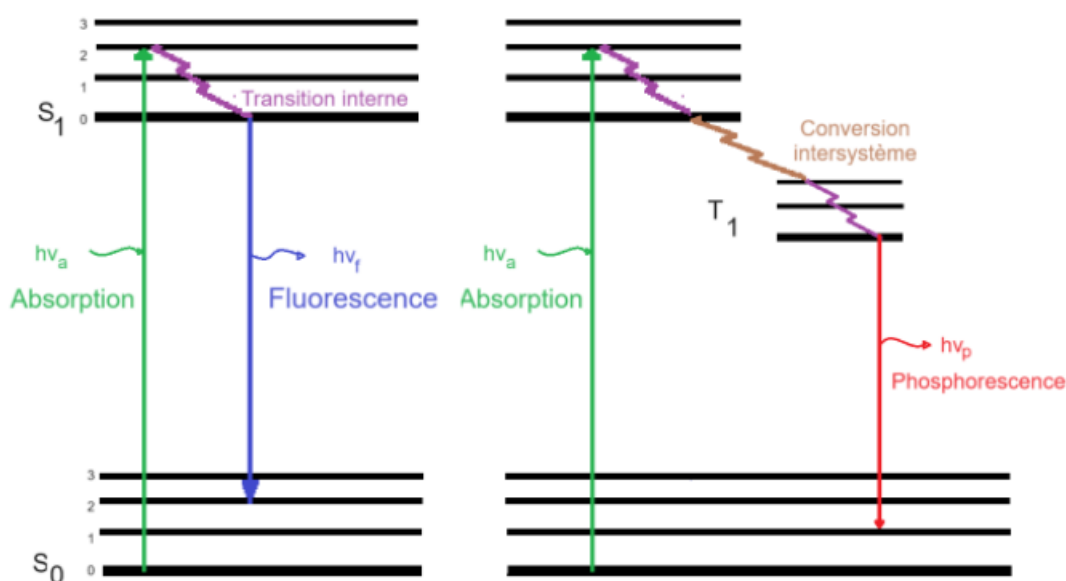


Figure 2.1 Diagramme de Jablonski de la fluorescence et la phosphorescence

Cet exemple d'un diagramme de Jablonski illustre le niveau fondamental S_0 et le premier état électronique S_1 . Ces deux niveaux sont les plus fréquents pour la fluorescence en plus du niveau triplet T_1 essentiel à la phosphorescence. Le diagramme ne présente pas l'ensemble des niveaux d'énergie complexes qui sont disponibles, mais il inclut les états d'énergie vibrationnelle qui sont pertinents à l'explication des spectres de fluorescence dans la sous-section suivante. Le diagramme révèle aussi les transitions internes qui mènent généralement vers le plus bas niveau d'énergie vibrationnelle. Ces transitions d'environ 10^{-12} secondes sont plus rapides que l'émission et, dans le plus fréquent des cas, ont lieu avant celle-ci.[11]

2.1.1 Spectres de fluorescence

Les spectres d'absorption décrivent l'intensité des photons absorbés en fonction de leurs longueurs d'onde. Plusieurs longueurs d'onde peuvent mener à l'absorption grâce aux différents niveaux d'énergie vibrationnelle illustrés à la figure 2.1. En effet, les électrons de l'état fondamental peuvent initialement se trouver dans plusieurs niveaux d'énergie excités thermiquement et ils peuvent transitionner vers n'importe quels des niveaux vibrationnels. Les spectres d'absorption et d'émission sont continus dus à plusieurs variations d'énergie comme les énergies rotationnelles, les énergies vibro-rotationnelles, les interactions avec le milieu et le principe d'incertitude

d'Heisenberg. Les spectres d'émission peuvent aussi utiliser différents niveaux vibrationnels, mais, pour des molécules, les émissions ont généralement lieu à partir du plus petit niveau vibrationnel du premier état électronique. C'est la loi de Kasha qui permet aussi d'expliquer que le spectre d'émission n'est pas dépendant de la longueur d'onde d'excitation.

Un des phénomènes les plus importants est le déplacement de Stokes ou Stokes *shift* en anglais. C'est le décalage des longueurs d'onde observées plus grandes que les longueurs d'onde d'excitation dû à une perte d'énergie. Dans le diagramme de Jablonski de la figure 2.1, nous voyons que les transitions internes diminuent l'énergie. Comme ces transitions ont majoritairement lieu avant l'émission, les photons émis auront une énergie plus faible que les photons absorbés donc une longueur d'onde plus élevée. La figure 2.2 présente un exemple de spectre d'absorption et d'émission classique.

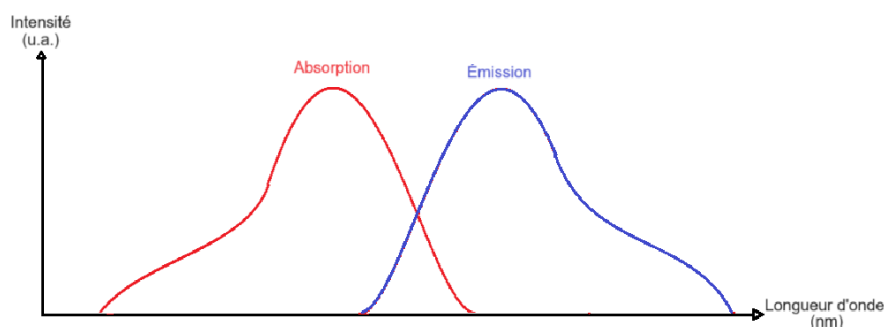


Figure 2.2 Spectre de fluorescence classique

Le graphique démontre le déplacement de Stokes entre les pics principaux. Le spectre d'absorption possède du signal dans la gauche de son pic principal, car les niveaux électroniques comme S2 peuvent aussi recevoir des électrons même si c'est moins fréquent. On peut apercevoir un effet miroir souvent présent dans les spectres de fluorescence. Les transitions qui sont les plus probables en absorption le sont aussi en émission selon le principe de Franck-Condon.

2.1.2 Types de fluorophores

Dans le domaine biomédical, les fluorophores peuvent être classés dans la catégorie intrinsèque ou extrinsèque. Les fluorophores extrinsèques ou exogènes sont des fluorophores ajoutés pour améliorer les méthodes d'imagerie. Ils peuvent être ajoutés si le milieu biologique ne possède pas les propriétés désirées. Ils peuvent servir à cibler des molécules ou des cellules dans l'organisme. Ils peuvent aussi servir à détecter des zones d'accumulation. Ces fluorophores sont donc

généralement en grande présence pour augmenter leur signal de détection. Ils peuvent être créés ou modifiés pour obtenir des liaisons ou des spectres désirés. Dans des méthodes d'imagerie précises, les fluorophores sont choisis pour obtenir un pic d'émission élevé avec une largeur de bande mince pour faciliter la détection. Les spectres d'absorption sont aussi sélectionnés selon les longueurs d'onde d'excitation.

La fluorescence intrinsèque ou endogène est aussi appelée autofluorescence. C'est la fluorescence naturellement produite par le milieu biologique à la suite de l'absorption d'une source de lumière dirigée ou ambiante. Tout comme la fluorescence extrinsèque, elle peut être utilisée pour la détection de structures biologiques. Nous y reviendrons dans la section 2.2, mais en spectroscopie Raman l'autofluorescence est considérée comme un bruit de fond ayant un effet négatif sur le signal que l'on essaie de détecter. Cet effet doit être considéré, car il fait naturellement partie du milieu à imager et est généralement plus intense que le signal Raman.

2.1.3 Facteurs de diminution du signal de fluorescence

Certains phénomènes physiques supplémentaires sont nécessaires pour expliquer l'intensité du signal de fluorescence. Nous avons vu précédemment le temps de vie de la fluorescence qui correspond aux temps moyens que les électrons passent dans l'état excité. Cependant cela n'est pas suffisant pour expliquer la dépendance dans le temps. L'équation 2.2 décrit l'intensité selon le temps de vie et le temps écoulé depuis l'absorption.

$$I(t) = I_0 e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (2.2)$$

Contrairement à ce que laisse croire le diagramme de Jablonski de la figure 2.1, les désexcitations des états électroniques ne produisent pas toujours de la fluorescence. L'ensemble de ces transitions sans radiation peut être combiné par un taux de décroissance k_{nr} alors que le taux de décroissance de la fluorescence est défini τ . Pour de 'bons' fluorophores, le taux k est bien plus petit que le taux Γ . L'équation 2.3 décrit la relation entre ces taux et le temps de vie.

$$\tau = \frac{1}{\Gamma + k_{nr}} \quad (2.3)$$

Pour caractériser un fluorophore, il est pertinent de définir le rendement quantique ou « quantum yield » en anglais. Il s'agit du ratio entre le nombre de photons absorbés et le nombre de photons

émis par la fluorescence. L'équation 2.4 décrit le rendement quantique à partir des taux de décroissance.

$$Q = \frac{\Gamma}{\Gamma + k_{nr}} \quad (2.4)$$

Le rendement tend vers 1 pour des fluorophores ayant très peu de transitions non-radiatives.

Un autre phénomène qui peut diminuer l'émission et changer l'intensité attendue est l'inhibition ou l'extinction de la fluorescence, ou « quenching » en anglais. Tout comme les transitions non-radiatives, les électrons dans les états excités n'émettent pas de photons en quittant l'état. Cela est causé par les interactions que les fluorophores possèdent avec le milieu. Ces interactions incluent plusieurs phénomènes de types différents. L'extinction peut être causée par un transfert d'énergie dû à une collision avec une molécule. L'extinction peut aussi être statique et ne nécessiter aucune diffusion ou collision avec la molécule inhibitrice.[11] Dans certains cas, l'atténuation peut avoir lieu sans mécanisme moléculaire et être causée directement par la présence du fluorophore sur lui-même. L'important ici est de comprendre que, dans ses applications, le fluorophore n'est pas seul et le milieu impacte son efficacité. L'extinction est susceptible d'être plus faible si le fluorophore est caché dans une macromolécule à l'abri des inhibiteurs solubles dans l'eau. Si les fluorophores sont libres ou à la surface des molécules, les fluorophores seront plus sujet à subir une forte inhibition de la fluorescence.

L'absorption peut aussi être minimisée par des facteurs physiques comme l'anisotropie. Nous verrons dans la section 3.1.2 qu'il est envisageable d'utiliser des polariseurs pour se débarrasser des réflexions spéculaires sur l'échantillon. Lorsque la lumière est polarisée, la direction du fluorophore a un effet sur son absorption et sa réémission. On appelle anisotropie de fluorescence le phénomène qui fait varier l'intensité de la fluorescence en fonction du positionnement. Il est démontré que les propriétés d'un fluorophore peuvent être décrites comme celles d'un dipôle.[12] En utilisant les lois de l'électromagnétisme, nous trouvons que la probabilité d'excitation dépend des orientations du champ électromagnétique incident et du dipôle. Ainsi, un dipôle orienté parallèlement à la polarisation de la lumière a une probabilité plus élevée d'absorption. Les fluorophores excités seront donc majoritairement polarisés dans cette orientation et l'émission sera plus intense dans cette polarisation. Pour calculer l'anisotropie, les intensités parallèles et

perpendiculaires sont donc utilisées et cela mènent à différentes applications. L'équation 2.5 présente le calcul de base de l'anisotropie à partir des intensités d'émission.

$$r = \frac{I_{||} - I_{\perp}}{I_{||} + 2I_{\perp}} \quad (2.5)$$

Pour une grande différence d'intensité, l'émission est hautement polarisée et l'anisotropie est élevée. En revanche, l'anisotropie est seulement mesurée par l'émission, donc elle n'est pas directement égale à l'absorption et est influencée par la vitesse de rotation de la molécule. Avec des fluorophores immobiles ou attachés à des macromolécules, on peut déduire qu'une faible anisotropie est caractéristique d'un fluorophore capable d'absorber dans toutes les directions de polarisation. Dans des solutions isotropes comme celle qui seront utilisées, l'anisotropie n'empêche pas la fluorescence, mais elle diminue les probabilités d'absorption de certaines molécules. En conclusion, ce phénomène peut être une des causes de la diminution d'intensité si la source est polarisée.

2.1.4 Applications biomédicales de la fluorescence

La liste des applications de la fluorescence est vaste et diversifiée même en ne considérant que les domaines biologiques et médicaux. Au début de cette section, certaines des applications seront nommées, mais nous nous attarderons spécialement aux techniques d'imagerie et de détection où les fluorophores sont utilisés comme marqueurs. Nous ne parlons pas de phosphorescence, car ce sont plutôt des fluorophores que le corps humain possède naturellement.

Nous avons expliqué dans la section 2.1.3 que l'anisotropie et l'extinction de fluorescence peuvent diminuer l'intensité de fluorescence, ces deux phénomènes permettent aussi des applications pour expliquer les dynamiques et les interactions moléculaires. Les changements apportés à la fluorescence permettent de déduire de l'information sur les molécules présentes avec les fluorophores. Un autre de ces changements donne naissance à l'application de la fluorescence résolue dans le temps. L'intensité de fluorescence décroît exponentiellement selon l'équation 2.1 et la fluorescence résolue dans le temps permet d'analyser les délais d'émission selon la composition du milieu.

La fluorescence peut être utilisée directement pour visualiser une substance dans un milieu, plutôt que d'analyser les émissions détectées dans ce milieu. Les méthodes d'imagerie en fluorescence permettent de différencier les structures où les fluorophores sont présents ou de les lier à des

molécules que nous souhaitons détecter et observer. En biologie, l'utilisation de microscopes pour l'imagerie est bien établie et joue un des rôles les plus importants. Avec la fluorescence, la microscopie a même permis de réaliser des images de molécules individuelles de fluorophores, ce qu'on appelle la microscopie à molécule unique. En optique microscopique, on distingue deux catégories d'imagerie principales qui possèdent chacune leurs avantages selon les objectifs des applications. La première est la microscopie par point qui effectue une répétition d'acquisitions de points précis en scannant la surface de l'échantillon. La deuxième méthode est la microscopie à grand champ qui effectue rapidement des images complètes de la surface de l'échantillon. La figure 2.3 illustre les différences dans les schémas d'acquisition et d'illumination des deux méthodes.

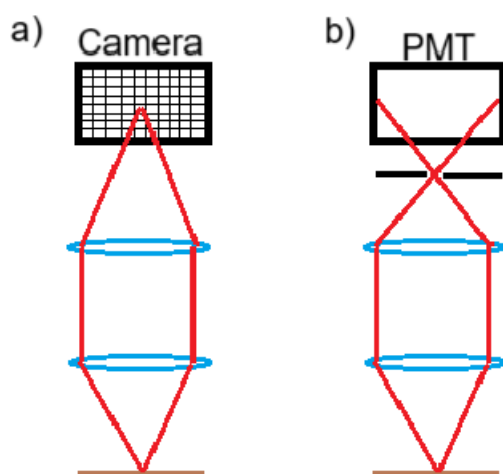


Figure 2.3 a) Système de microscopie grand champ b) Système de microscopie par point

La microscopie par point inclut comme exemple typique la microscopie confocale par scan laser. Le temps est généralement plus long pour ce type de microscopes qui doit balayer l'échantillon en plusieurs points. Ce type d'imagerie a l'avantage de mieux sélectionner la composante axiale de l'échantillon en diminuant la profondeur de champ. En microscopie, la profondeur de champ diminue la clarté de l'image en permettant à plusieurs plans de l'échantillon d'être au focus. Cet effet varie selon la taille des pixels et de l'ouverture numérique de l'objectif. La microscopie par point a l'avantage par rapport à l'imagerie grand champ de permettre une diminution significative de la profondeur de champ en utilisant une petite ouverture appelée trou d'épingle. Cette pupille, placée juste devant le détecteur, permet de bloquer les rayons qui se focalisent trop tôt ou trop tard et qui sont plus larges que l'ouverture.

La microscopie grand champ est une technologie moins coûteuse qui permet d'obtenir des images correspondant à celles observées dans des oculaires. La surface est visualisée simultanément, alors la source d'illumination doit couvrir une surface étendue. Cette approche utilise comme capteur une caméra généralement à grande vitesse et dotée d'une efficacité quantique élevée. Son principal avantage est la rapidité avec laquelle elle permet d'examiner la surface d'un échantillon. Pour certaines applications médicales comme la chirurgie, cet avantage est crucial à l'implémentation de la technologie. Pour les interventions médicales, il est essentiel que l'échantillon entier soit visible pour améliorer les prises de décisions. Le désavantage de la microscopie grand champ est sa faible résolution axiale. Contrairement à la microscopie confocale, l'utilisation d'un trou d'épingle n'est pas fonctionnelle, car elle limite grandement la quantité de lumière capturée. Avec les avancées faites sur la résolution de l'imagerie grand champ, il est probable que les deux méthodes subsistent en ayant chacune leurs applications. L'imagerie grand champ est particulièrement dynamique et, pour les besoins de ce mémoire, elle constitue une méthode utile pour observer des cellules vivantes ou des modèles animaux.

La fluorescence est grandement utilisée en imagerie grand champ pour marquer les tissus comme les tumeurs. En oncologie, elle peut être utilisée pour le dépistage de patients à haut risque de différents cancers, la surveillance de l'évolution des patients diagnostiqués et l'assistance des chirurgies. Plusieurs fluorophores extrinsèques sont utilisés dans des essais cliniques sur des lésions pré-cancéreuses et les cancers colorectal, de l'oesophage, de la bouche, de la vessie, de l'estomac et du col de l'utérus.[13] Certains de ces fluorophores pouvant être utilisés pour la chirurgie incluent le bleu de méthylène, ou chlorure de méthylthioninium, l'ICG et l'acide 5-aminolévulinique (5-ALA).

L'imagerie par fluorescence amène des progrès importants en oncologie par l'imagerie du système lymphatique et des ganglions lymphatiques. Le système lymphatique est essentiel en oncologie, car il transporte les globules blancs qui défendent l'organisme et peut contenir certaines cellules cancéreuses s'étant détachées de la tumeur. Plusieurs cancers peuvent se propager à travers le système lymphatique et se retrouver dans les ganglions lymphatiques qui emprisonnent les virus, les bactéries et les cellules problématiques. L'imagerie des ganglions et du système lymphatique joue donc un rôle crucial dans les diagnostics de métastases des différents cancers ayant été précédemment nommés. Cette imagerie joue un rôle prometteur notamment pour les cancers de la

vessie et de la prostate et plus précisément pour le guidage de chirurgie des ganglions sentinelles de ces cancers.

Le bleu de méthylène est utilisé pour la localisation de ganglions sentinelles de plusieurs cancers mais a démontré, pour le cancer du pénis, une sensibilité plus faible de 56% par rapport à l'utilisation d'ICG.[14] Son utilisation a montré des effets sur la peau mais pas à travers son utilisation dans l'imagerie du système lymphatique pour le cancer du sein.[15] Le 5-ALA n'est en fait pas un fluorophore mais plutôt une substance qui conduit à la production de protoporphyrine IX, un fluorophore qui s'accumule dans les tumeurs et peut mener à la mort de leurs cellules.[14] Il a été utilisé pour identifier des marges chirurgicales positives de prostatectomie radicale. [16] L'ICG possède des grands contrastes et une bonne résolution d'imagerie lui permettant d'être grandement utilisé en chirurgie. Il émet dans le proche infrarouge qui correspond à la fenêtre d'imagerie idéale pour les tissus biologiques. Ces tissus possèdent moins d'absorption dans la région de l'infrarouge proche, ce qui permet une pénétration de la lumière de quelques centimètres. Le milieu possède aussi moins d'autofluorescence, ce qui est idéal pour un meilleur contraste entre le signal de fluorescence et le bruit de fond.[17]

Les recherches reliant l'utilisation d'ICG et le cancer de la prostate sont fortement reliées à l'identification des ganglions sentinelles. Puisque le système lymphatique peut contenir une propagation des cellules cancéreuses, il est important d'éliminer les ganglions affectés lors des prostatectomies radicale. Des études cliniques ont permis de démontrer que l'ICG permet de guider la résection des ganglions sentinelles lors d'interventions chirurgicales de prostatectomie. L'ICG est aussi utilisé pour l'imagerie directe de la tumeur dans des recherches sur des souris. Une étude de 2019, servant à établir la présence de fluorescence d'ICG à travers le temps, a réussi à imager de manière sous-cutanée des cancers de la prostate de souris.

L'autofluorescence provient principalement de fluorophores endogènes tels que le nicotinamide adénine dinucléotide réduit (NADH), les flavines (FAD), les porphyrines, les lipopigments et des protéines structurales comme le collagène.[11] Les pics d'émission de ces fluorophores se situent majoritairement dans le visible et l'ultraviolet, ce qui rend les applications de l'autofluorescence dans le NIR beaucoup moins répandues. C'est la partie terminale du signal d'émission qui est détectée, ce qui nécessite des systèmes avec de bonnes capacités de détection malgré les avantages liés à la diminution de l'absorption et de la diffusion dans le NIR. En dépit de la faiblesse du signal,

certaines avancées permettent de détecter des variations dans les cellules anormales. Les données présentées dans le chapitre 4 utilisent la fluorescence obtenue dans les spectres Raman pour observer une différence d'intensité sur des acquisitions issues d'études précédentes sur le cancer du cerveau.[18, 19]

2.2 Diffusion Raman

L'effet Raman est l'un des deux concepts menant à deux méthodes complémentaires en spectroscopie vibrationnelle, utilisées pour étudier les niveaux d'énergie vibrationnelle des molécules. La première méthode est la spectroscopie infrarouge qui analyse les niveaux d'énergie vibrationnelle en trouvant les longueurs d'ondes infrarouges qui sont absorbées par les molécules. Tout comme la fluorescence, la spectroscopie infrarouge nécessite une absorption des photons ayant l'énergie exacte pour atteindre les niveaux énergétiques supérieurs. L'effet Raman découvert en 1928 ne nécessite quant à lui pas une excitation vers un niveau d'énergie quantifié. Un photon incident interagit avec une molécule pour l'exciter vers un niveau d'énergie intermédiaire, aussi appelé virtuel, car il correspond à une transition normalement interdite. La molécule ne reste pas à cette énergie et un photon est réémis de manière diffuse. Dans le cas le plus fréquent, le photon possède la même fréquence, ou énergie, que le photon incident. C'est une diffusion élastique plus communément appelée diffusion Rayleigh qui ne nous pas permet d'obtenir d'information sur la composition chimique de la molécule. Dans un cas plus rare, le photon possède une fréquence plus basse, il s'agit d'une diffusion Raman Stokes. Dans un cas encore plus rare, le photon possède une fréquence plus élevée, il s'agit d'une diffusion Raman Anti-Stokes. Ces trois types de diffusion sont illustrées dans le diagramme de Jablonski de la figure 2.4.

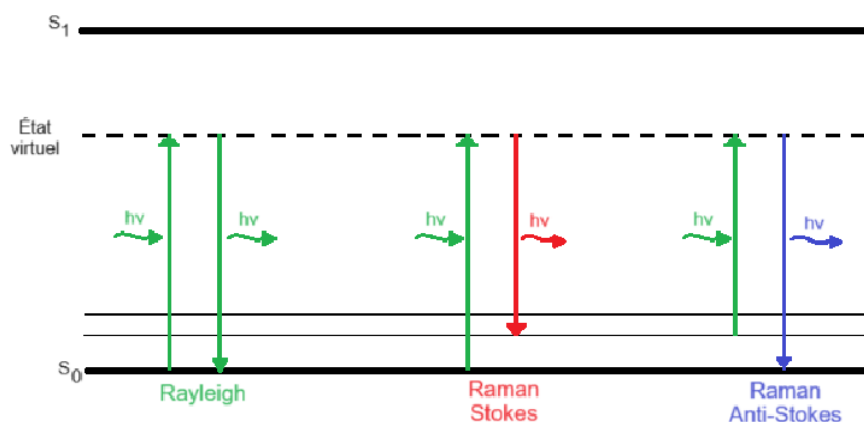


Figure 2.4 Diagramme de Jablonski de la diffusion Raman

La figure permet de comprendre les différences de fréquences entre les photons incidents et diffus pour l'effet Raman. Pour la diffusion Raman Stokes, la molécule a gardé une partie de l'énergie du photon pour atteindre les niveaux vibrationnels permis. Dans la diffusion Raman Anti-Stokes, la molécule était déjà dans un état vibrationnel et elle a perdu une partie de son énergie.

La particularité de l'effet Raman est que les états vibrationnels peuvent être atteints à partir de différents niveaux d'énergie virtuels. Cela permet de laisser un choix sur le laser utilisé comme le 785nm ou le 1064nm, les deux longueurs d'onde les plus utilisées dans la région du proche infrarouge. Pour comprendre comment les molécules sont excitées à différents niveaux d'énergie à partir de fréquences variées, il faut s'intéresser à l'interaction lumière-matière. La lumière est décrite sous sa forme d'onde électromagnétique et crée donc un champ électrique oscillant. Lorsqu'une molécule est soumise à ce champ électrique, elle produit temporairement un moment dipolaire induit qu'on exprime de manière simplifiée par l'équation 2.6.[20]

$$\mathbf{p} = \alpha \cdot \mathbf{E}_0 \cdot \cos(2\pi \cdot \nu_o \cdot t) \quad (2.6)$$

La fréquence de la lumière incidente est donnée par ν_o . La polarisabilité est exprimée par α qui est en fait un tenseur qui dépend des coordonnées normales associées aux ν modes de vibrations de la molécule. Le développement qui suit remplacera la polarisabilité par une expression plus exacte mais simplifiée qui permettra de comprendre l'influence de celle-ci sur le dipôle induit. On commence par exprimer, dans l'équation 2.7, la polarisabilité selon les deux premiers termes de sa série de Taylor où les modes normaux sont considérés indépendants.

$$\alpha_\nu = \alpha_0 + \alpha'_\nu \cdot Q_\nu \quad (2.7)$$

Q_ν est la coordonnée normale du ν -ème mode de vibration et α'_ν est la dérivée de la polarisabilité dans la direction de cette coordonnée normale. La coordonnée normale ν oscille dans le temps avec sa fréquence de vibration ν_ν selon l'équation 2.8.[20]

$$Q_\nu = Q_o \cdot \cos(2\pi \cdot \nu_\nu \cdot t + \phi_\nu) \quad (2.8)$$

En remplaçant l'équation 2.8 dans l'équation 2.7, on obtient l'équation 2.9 qui fournit un détail suffisant de la polarisabilité en fonction des modes de vibration.

$$\alpha_\nu = \alpha_0 + \alpha'_\nu \cdot Q_o \cdot \cos(2\pi \cdot \nu_\nu \cdot t + \phi_\nu) \quad (2.9)$$

L'équation du moment dipolaire induit peut alors être réécrite pour obtenir l'équation 2.10.

$$\mathbf{p} = \alpha_0 \cdot \mathbf{E}_0 \cdot \cos(2\pi \cdot \nu_o \cdot t) + \mathbf{E}_0 \cdot \alpha'_\nu \cdot Q_o \cdot \cos(2\pi \cdot \nu_v \cdot t + \phi_v) \cdot \cos(2\pi \cdot \nu_o \cdot t) \quad (2.10)$$

Cette équation peut être modifiée par l'identité trigonométrique de l'équation 2.11.

$$\cos(A) \cdot \cos(B) = \frac{1}{2} (\cos(A + B) + \cos(A - B)) \quad (2.11)$$

L'équation modifiée finale du moment dipolaire induit est présentée à l'équation 2.12.

$$\begin{aligned} \mathbf{p} = \alpha_0 \cdot \mathbf{E}_0 \cdot \cos(2\pi \cdot \nu_o \cdot t) + \frac{\mathbf{E}_0}{2} \cdot \alpha'_\nu \cdot Q_o \cdot \cos(2\pi \cdot (\nu_o - \nu_v) \cdot t - \phi_v) \\ + \frac{\mathbf{E}_0}{2} \cdot \alpha'_\nu \cdot Q_o \cdot \cos(2\pi \cdot (\nu_o + \nu_v) \cdot t + \phi_v) \end{aligned} \quad (2.12)$$

Le moment dipolaire induit dépend de trois termes oscillant à des fréquences différentes. Le premier $\mathbf{p}(\nu_o)$ dépend seulement de la fréquence de l'onde électromagnétique et est relié à la diffusion de Rayleigh. Le deuxième $\mathbf{p}(\nu_o - \nu_v)$ dépend aussi de la fréquence du mode de vibration et possède une fréquence diminuée associée à la diffusion Stokes. Le dernier $\mathbf{p}(\nu_o + \nu_v)$ dépend également des deux mêmes fréquences et possède une fréquence augmentée associée à la diffusion Anti-Stokes. Les deux derniers termes nécessitent que la dérivée de la polarisabilité soit non-nulle. Cela mène à la règle de sélection Raman de l'équation 2.13.

$$\alpha'_\nu = \frac{\partial \alpha}{\partial Q_\nu} \neq 0 \quad (2.13)$$

L'activation Raman d'une molécule ne dépend donc pas de sa polarisabilité mais de sa capacité à varier sa polarisabilité en fonction du champ électrique.

Avec cette démarche, nous avons pu expliquer trois phénomènes importants de la spectroscopie Raman. D'abord que l'on peut obtenir les mêmes variations d'énergie de la lumière en fonction des énergies vibrationnelles indépendamment de la fréquence de la lumière incidente. Ensuite, nous avons expliqué mathématiquement comment le moment dipolaire induit agit de trois manières différentes et symétriques et que l'on obtient trois régions d'intérêts correspondant à la diffusion Rayleigh, la diffusion Stokes et la diffusion Anti-Stokes. Et, finalement, que certains modes de vibration sont actifs en Raman selon la présence d'une variation de polarisabilité lors de l'influence du champ électrique. On conclut ainsi que l'on peut choisir la longueur d'onde du laser incident et

que la diffusion Stokes nous permettra d'obtenir de l'information sur les états vibrationnels des molécules présentes à condition que le mode vibrationnel soit actif.

2.2.1 Spectroscopie Raman

En spectroscopie Raman, on utilise la longueur d'onde de la lumière diffuse pour identifier les modes vibrationnels présents. Puisque les échantillons sont composés de différentes molécules ayant chacune des liaisons moléculaires pouvant être actives en Raman, un éventail de longueurs d'onde est diffusé par l'échantillon. Les photons sont captés par un spectromètre, qui permet de séparer les longueurs d'onde pour déterminer l'intensité de photons à chaque longueur d'onde. On obtient donc un profil d'intensités en fonction de la longueur d'onde. Ces longueurs d'onde permettent d'identifier les variations d'énergie entre les états vibrationnels en connaissant la longueur d'onde de la lumière incidente. L'équation 2.14 exprime la relation entre la variation de longueur et l'énergie gagnée ou perdue par la molécule en changeant d'état vibrationnel.

$$\Delta E = h(\nu_{\text{laser}} - \nu_{\text{diffusé}}) = hc \left(\frac{1}{\lambda_{\text{laser}}} - \frac{1}{\lambda_{\text{diffusée}}} \right) \quad (2.14)$$

Dans l'équation, la longueur d'onde des photons diffusés par l'échantillon et reçus par le spectromètre correspond à $\lambda_{\text{diffusée}}$ et la longueur d'onde d'excitation est donnée par λ_{laser} .

Comme mentionné précédemment, la diffusion Stokes se produit à partir d'un état vibrationnel moins énergétique, ce qui la rend plus probable et permet d'obtenir une meilleure intensité. Elle constitue, en général, un meilleur choix en spectroscopie Raman. Pour obtenir de l'information Raman, on déduit donc l'énergie gagnée par les molécules et on identifie ainsi leurs modes de vibration permis. Ces modes permis sont propres aux liaisons chimiques présentes dans l'échantillon. Chacune des liaisons chimiques possède une probabilité d'être activée et de diffuser un des photons détectés. Plus la molécule et ses liaisons sont présentes dans l'échantillon, plus il y aura de transitions diffusant la longueur d'onde reliée. L'intensité du signal Raman est ainsi proportionnelle à la concentration de la molécule dans l'échantillon, ce qui permet non seulement d'identifier les composés, mais aussi d'en estimer la quantité, d'où la pertinence de classer l'intensité en fonction de la longueur d'onde dans un spectre Raman.

Il est d'usage et bien plus pratique de représenter les spectres en fonction du décalage Raman. En utilisant la fréquence ou la longueur d'onde, on obtient des valeurs dépendantes de la source d'excitation utilisée donc différente d'une étude à l'autre. En revanche, en utilisant le décalage

Raman, on obtient des valeurs constantes d'une source de littérature à l'autre. Il est ainsi simple d'identifier l'origine d'un pic Raman en comparant sa valeur aux nombreuses sources de littérature qui énumèrent les liaisons moléculaires avec leur décalage Raman. L'équation 2.15 est semblable à la précédente mais présente comment obtenir la variation du nombre d'onde avec les longueurs d'onde impliquées.

$$\Delta\omega[\text{cm}^{-1}] = 10^7 \left(\frac{1}{\lambda_{\text{laser}}[\text{nm}]} - \frac{1}{\lambda_{\text{diffusé}}[\text{nm}]} \right) \quad (2.15)$$

L'équation utilise le nombre d'onde pour obtenir des valeurs simples qui sont reliées à une constante proche à des valeurs de fréquences. La décalage Raman est souvent exprimé en cm^{-1} , car il donne encore une fois des valeurs simples et peut facilement être calculé avec des longueurs d'onde en nanomètres.

Il existe en réalité une exception lors de laquelle le spectre observé est dépendant de la longueur d'excitation choisie : la diffusion Raman résonante. Lorsque le laser choisi atteint presque un niveau d'énergie électronique, comme lors de la fluorescence, la transition aura une probabilité plus élevée d'être effectuée, mais l'état redescend quand même à un niveau vibrationnel sans l'absorption d'un photon, comme pour la diffusion Raman classique. Le signal sera donc plus intense avec ce type de spectroscopie.[21] Nous n'utilisons pas de diffusion Raman résonante dans ce projet, mais il reste important d'en connaître l'existence lors du choix d'un laser.

La figure 2.5 présente un exemple de spectre traité pour isoler le signal Raman du signal de fluorescence. Il s'agit d'une mesure prise sur des cellules du cancer de la prostate.

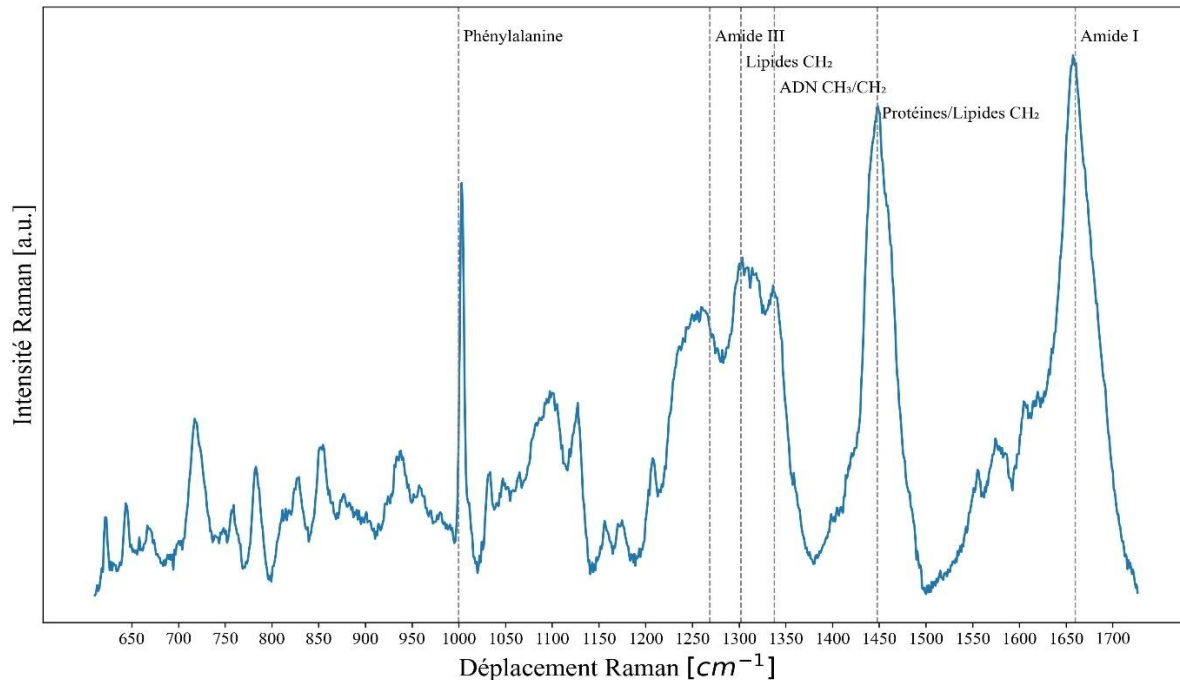


Figure 2.5 Spectre Raman traité d'un amas de cellules du cancer de la prostate

On y retrouve des pics d'intensité classiques des cellules comme la phénylalanine à 1000 cm^{-1} ou les déformations de CH_2 présentes dans les protéines et les lipides de l'ADN donnant des raies de 1447 à 1450 cm^{-1} . [22] La largeur des pics dans le spectre dépend de la largeur spectrale de la source de lumière. C'est pourquoi on utilise des lasers qui permettent d'avoir une résolution spectrale suffisante. L'utilisation de laser permet aussi d'augmenter la quantité de photons qui est affectée par la diffusion Raman.

Malgré la liberté dans le choix de la longueur d'onde du laser, il est essentiel de sélectionner celle-ci afin de maximiser l'intensité du signal Raman. En effet, l'intensité du signal diffusé est fortement dépendante de la longueur d'onde du faisceau laser incident. Cette dépendance s'explique par l'expression de la section efficace de diffusion Raman, qui indique la probabilité qu'un photon incident interagisse inélastiquement avec la molécule. On obtient, en analysant cette expression, une relation de proportionnalité décrite par l'équation 2.16. [23]

$$I_{\text{Raman}} \propto \frac{1}{\lambda^4} \quad (2.16)$$

Une légère variation de la longueur d'onde entre deux sources laser peut avoir un impact significatif sur l'intensité du signal Raman. Toutefois, l'utilisation de longueurs d'onde plus élevées présente

également certains avantages. L'un des effets à prendre en compte est l'autofluorescence, mentionnée précédemment. Les échantillons biologiques contiennent plusieurs fluorophores endogènes dont l'intensité d'émission peut largement surpasser celle du signal Raman. En effet, la section efficace d'excitation des fluorophores est généralement jusqu'à dix ordres de grandeur supérieures à celle du processus Raman spontané non amplifié en surface.[24]

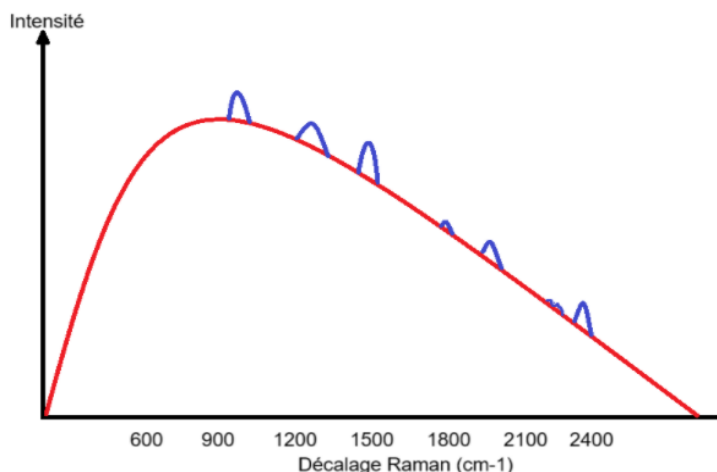


Figure 2.6 Schéma de spectre de fluorescence et de pics Raman

Les échantillons émettent ainsi une fluorescence importante, également détectée par le spectromètre, ce qui se traduit par la courbe illustrée dans le schéma de la figure 2.6. Les fluorophores intrinsèques les plus présents, comme les coenzymes NADH, la flavine ou le collagène, émettent dans le domaine du visible ou de l'ultraviolet.[25] C'est pourquoi des lasers infrarouges sont souvent utilisés en spectroscopie. Toutefois, la courbe de fluorescence diminue progressivement mais peut persister jusque dans l'infrarouge. Ainsi, en choisissant une longueur d'onde d'excitation encore plus élevée, on réduit la fluorescence intrinsèque qui interfère avec le signal mesuré. Ce choix implique néanmoins un compromis : en diminuant la fluorescence, on atténue également l'intensité du signal Raman.

2.2.2 Application et imagerie multispectrale Raman

La capacité de détection de différentes molécules par la spectroscopie Raman possède un grand nombre d'applications dans la littérature. Plus spécifiquement, la technologie Raman a permis de différencier des tissus sains et cancéreux lors de chirurgies du cancer du cerveau. À l'aide d'une sonde, les spectres Raman ont permis d'évaluer point par point la présence de cancer sur des zones précises avec une précision de plus de 90%.[26] Cette avancée ne se limite pas à la détection sur

un seul point. Un système développé dans le laboratoire où j'ai fait mes expériences a permis d'analyser les marges du cancer du cerveau sur une surface de 1 cm². Ce système utilise aussi un spectromètre pour recueillir les données d'un point de l'espace, mais il scanne 440 pixels pour obtenir de l'information sur la surface.[27] Ces études utilisent des spectromètres qui amassent plus de données que nécessaire, surtout lorsqu'on tente d'obtenir rapidement de l'information sur seulement quelques pics et sur une surface étendue. Pour obtenir l'information des pics précis que nous recherchons, l'imagerie multispectrale peut s'avérer plus propice.

En imagerie multispectrale, seulement certaines longueurs d'onde sont utilisées pour obtenir une partie des informations qui auraient été obtenues avec un spectre complet. On parle de multispectral lorsque moins d'une dizaine de longueurs d'onde sont observées, alors qu'on parle d'hyperspectral lorsqu'il y en a davantage. On perd une grande partie de l'information spectrale, souvent au profit d'un plus grand éventail de méthodes, de moins de restrictions sur le temps d'acquisition ou, dans le cas de l'imagerie, au profit de l'information spatiale. En utilisant un filtre à une longueur d'onde précise et une caméra, les images recueillent l'intensité de cette longueur d'onde sur un grand ensemble de pixels représentant les données spatiales. À l'inverse, un système d'imagerie Raman par point obtient un grand ensemble d'informations spectrales mais sur une seule zone spatiale. Lorsque l'information spatiale est plus importante que la nécessité d'un spectre complet, il peut être bénéfique d'amasser un plus petit nombre de longueurs d'onde en quelques acquisitions plutôt qu'un surplus d'informations sur un très grand nombre de points spatiaux. Cette méthode est donc intéressante lorsqu'on s'intéresse seulement à certains pics définis du spectre Raman.

Une des méthodes les plus simples pour un système multispectral est d'utiliser un ensemble de filtres de différentes longueurs d'onde équivalents au nombre de raies spectrales dont on veut obtenir l'intensité. Bien sûr, lorsqu'on s'intéresse aux raies spectrales de diffusion Raman, il faut des filtres avec des largeurs de bande très étroites. Tout comme avec l'utilisation d'un spectromètre, une grande partie du signal obtenu est produite par un signal de fond de fluorescence. Pour obtenir une méthode efficace, il ne suffit donc pas d'utiliser un seul filtre centré sur la position du pic d'intérêt. Une nouvelle méthode de soustraction de la fluorescence permet d'isoler le signal Raman avec seulement trois filtres par pic. Cette technique a été utilisée pour imager la bande CH₂/CH₃ des protéines et des lipides d'échantillons de porc.[28] Le chapitre 3 présente l'application de cette méthode sur des nanotubes de carbone. Parmi les trois filtres nécessaires, deux servent à estimer le

niveau de fluorescence, alors que l'autre permet de mesurer l'intensité au centre du pic étudié. La figure 2.7 illustre l'estimation effectuée par les trois filtres, ici nommés A, B et C.

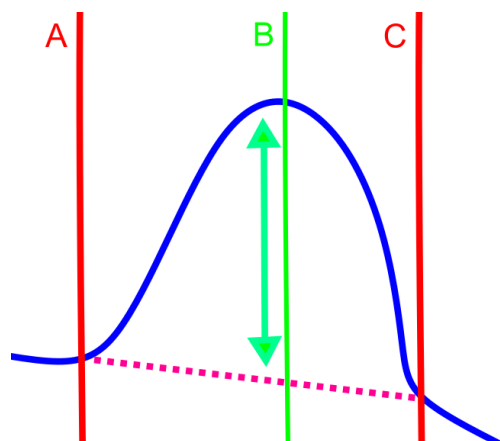


Figure 2.7 Schéma du positionnement des filtres pour la méthode de soustraction de la fluorescence

Les filtres A et C permettent de trouver la moyenne des intensités de part et d'autre du pic Raman, dans une zone où l'on considère le signal comme étant uniquement de la fluorescence. Comme décrit dans l'équation 2.17, la moyenne du signal est soustraite du signal du filtre B pour obtenir l'estimation du signal provenant de la diffusion Raman.

$$I_{Raman} = I_B - \frac{I_A + I_C}{2} \quad (2.17)$$

Une moyenne pondérée peut aussi être utilisée si le filtre central n'est pas suffisamment centré par rapport à la distance des deux autres. En bref, cette méthode multispectrale permet d'isoler le signal Raman sans traitement de données complexe.

CHAPITRE 3 PLATEFORME D'IMAGERIE POUR LA FLUORESCENCE ET LE RAMAN MULTISPECTRAL : CONCEPTION ET CONTRAINTES

Ce chapitre décrit le développement expérimental du système combinant fluorescence endogène et exogène avec de l'imagerie Raman multispectral. La plateforme d'imagerie grand champ a considérablement évolué au cours des expériences, en fonction des opportunités qui se sont présentées et des objectifs qui se sont précisés. Le système est présenté à travers plusieurs de ses modèles au fil des itérations. À partir du concept initial, il est montré tel qu'il aurait dû être optimisé, jusqu'à sa forme finale, telle qu'elle a été utilisée lors de l'étude présentée au chapitre 4.

3.1 Conception globale et principes optiques du système bimodale

Pour répondre à l'objectif principal d'obtenir une plateforme d'imagerie infrarouge grand champ pour le cancer, deux méthodes ont été considérées : la fluorescence et la spectroscopie Raman. La fluorescence devait initialement inclure des fluorophores exogènes spécialement conçus pour le NIR, mais l'utilisation de fluorophores endogènes a été ajoutée afin de détecter la queue de fluorescence naturellement produite par les tissus biologiques dans le spectre visible. La spectroscopie Raman s'est orientée vers une approche multispectrale afin de réduire les temps d'acquisition.

Au cours de mes travaux sur cette plateforme d'imagerie, j'ai travaillé sur des systèmes visant à repérer directement des pics Raman influencés par le cancer, mais dans le cadre de mon projet, j'ai plutôt cherché à détecter des pics provenant de nanotubes de carbone, c'est-à-dire d'un autre type d'agents exogènes.

Avant d'aborder les sections spécifiques à chacune de ces méthodes, cette section met en évidence les calculs, ajustements apportés et contraintes pratiques rencontrées lors du développement du système d'imagerie et de la combinaison de ces deux méthodes.

3.1.1 Contraintes et objectifs

Dès le départ, les décisions techniques et les choix de composants étaient guidés par la présence de trois éléments donnés pour le système. D'abord, le système a été conçu pour obtenir des images sur une caméra InGaAs à infrarouge à ondes courtes (short-wave infrared, SWIR). La caméra, de

640 × 512 pixels, possède un refroidissement à -50 °C, permettant une plage spectrale de 500 à 1700 nm, idéale pour des acquisitions grand champ dans le NIR. Le poids de la caméra ainsi que la position et la robustesse de ses points d'ancrage limitent le système uniquement dans son orientation et sa position horizontale.

Le deuxième élément donné pour le système est la diode laser de 808 nm, utilisée pour l'excitation en fluorescence. Même si cette longueur d'onde a été imposée par la disponibilité d'un laser NIR, elle est idéale pour l'utilisation de fluorophores classiques comme l'ICG et pour la détection dans l'infrarouge d'autofluorophores présents dans le spectre visible. Ce laser limite le choix et le positionnement des polariseurs ainsi que certaines lentilles et détermine les longueurs d'onde des filtres de fluorescence, de réflectance et de blocage. C'est un laser de classe 4, ce qui augmente les précautions nécessaires pour l'utilisation du système et les mesures de sécurité mises en place dans sa conception.

Le dernier élément déterminant pour la construction du système est le second laser, utilisé pour les mesures Raman. Il s'agit d'un laser fibré de classe 4, ce qui renforce encore les contraintes de sécurité liées au montage. Comme présenté à la section 2.2.1, cette longueur d'onde permet de diminuer l'autofluorescence présente dans le signal, mais réduit également l'intensité des pics Raman. Ce laser dicte la majorité des lentilles utilisées dans le système et influence fortement la conception de l'épi-illumination afin de minimiser les pertes de signal. Il définit également la position des pics Raman observés et les valeurs nécessaires pour les filtres passe-bandes étroits.

À partir de ces éléments, le reste du système a été développé pour répondre à des contraintes fonctionnelles, mécaniques, optiques et de sécurité laser. Le système devait être compact, capable d'être déposé sur un chariot et transporté d'une salle de rangement vers une salle de chirurgie, un laboratoire ou une salle d'expérience animale selon les besoins du projet. Pour le bloc opératoire, il doit occuper un minimum d'espace, être capable d'accéder au réseau électrique et pouvoir se nettoyer facilement sans nécessiter de stérilisation complète.

Concernant la sécurité laser, le trajet optique est fermé, isolant le laser de classe 4, ce qui permet d'éviter la mise en place de multiples précautions pour les personnes présentes qui ne participent pas à la prise de mesures et assure un niveau de sécurité optimal. Sur le plan optique, le système vise à minimiser les pertes globales du signal, tout en priorisant la partie Raman. Il doit également

éliminer le bruit provenant de la lumière ambiante, notamment dans des salles comme le bloc opératoire, où il est impossible de couper complètement l'éclairage.

Le système est conçu pour un champ de vue de 1,5 à 2 cm, correspondant à un grossissement d'environ 1,6 pour un capteur de 0,96 cm. Enfin, les deux modes d'acquisition, fluorescence et Raman, ainsi que les mesures de réflectance, doivent pouvoir être réalisées sur le même échantillon. Il est donc nécessaire que la transition entre les différents modes soit rapide et minimale.

3.1.2 Choix de conception: épi-illumination

Pour obtenir un système simple, compact et multimodal, capable de changements rapides, offrant une illumination uniforme et minimisant les reflets inégaux, nous avons opté pour un système en épi-illumination. Cette méthode d'illumination permet également de faire correspondre directement les différentes modalités, telles que la fluorescence et la réflectance, sans déplacer le champ de vue ni l'échantillon. Le premier défi d'envergure apparaît alors pour la conception du système. L'utilisation de deux lasers dans deux modes d'acquisition oblige à gérer des trajets optiques dans quatre régions du spectre. Pour la lumière à 808 nm, nous avons le laser lui-même ainsi que la réflectance qui passent à 808 nm. La fluorescence est captée séparément au-dessus de 850 nm. Le laser de 1064 nm possède également son propre trajet optique, tandis que le signal Raman est réémis entre 1210 nm et 1260 nm pour le pic d'intérêt.

Pour l'épi-illumination en réflectance, la lumière spéculaire et diffuse revient de l'échantillon à la même longueur d'onde. La lumière diffuse dépend des coefficients optiques de l'échantillon, tandis que la lumière spéculaire provient directement de la source laser. Pour éliminer les réflexions spéculaires, nous pouvons polariser la lumière d'excitation et placer un deuxième polariseur avant la détection. La lumière polarisée orthogonalement est ainsi éliminée, tandis que la lumière diffuse, non polarisée, est réduite de moitié. Ces pertes importantes sont jugées nécessaires et contribuent également à diminuer les pertes dans les miroirs dichroïques. En plus de situer ces polariseurs et les composantes optiques, la figure 3.1 illustre le plan initial du système et les différents trajets optiques.

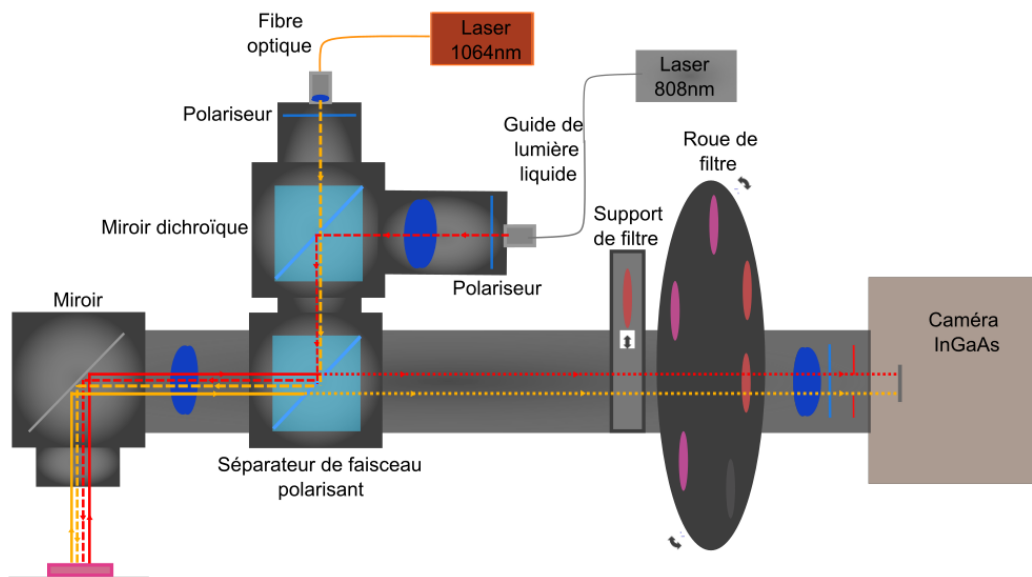


Figure 3.1 Schéma initial du système multimodal

Pour composer les différents chemins optiques, plusieurs combinaisons sont possibles. Un système utilisant deux séparateurs de faisceau classiques 50:50 diviserait l'illumination et la collecte à chaque passage de la lumière en détection et excitation. Avec les pertes déjà présentes dues à la polarisation, l'impact devient trop important. En utilisant des miroirs dichroïques Thorlabs, il est possible d'obtenir des transmissions et réflexions atteignant 90 % et 95 %. Cependant, la combinaison de deux miroirs dichroïques ne permet pas d'obtenir les bonnes combinaisons de transmissions et réflexions pour les quatre régions du spectre. Il est donc seulement possible d'utiliser ce type de miroir pour les parties du trajet réservées à l'excitation. Comme visible sur la figure 3.1, nous utilisons un miroir dichroïque qui transmet une longueur d'onde et en reflète une autre. Pour l'axe de collecte, un miroir dichroïque polarisant est utilisé. Les polarisations des sources d'excitation sont identiques et peuvent être réfléchies. Pour la collecte, la lumière diffuse ou réémise possède les deux polarisations, et il est possible de collecter la composante orthogonale. Cette méthode permet également d'éliminer la réflectance spéculaire qui conserve sa polarisation et retourne vers la source, sans ajouter de composante supplémentaire. En théorie, le cube dichroïque devrait jouer le rôle du miroir et du polariseur avec une perte combinée du signal, mais en pratique, il est préférable d'utiliser un polariseur pour contrôler précisément les angles de polarisation et s'assurer que la polarisation est adéquate malgré les angles d'incidence sur les parois internes et externes du cube.

Avec ce système en épi-illumination, les modes d'utilisation sont facilement accessibles simplement en changeant les filtres. La première roue de filtres permet d'ajouter une densité optique avec des *filtres coupe-bande* lors des mesures, tandis que la deuxième roue sert à choisir spécifiquement les longueurs d'onde à observer dans les quatre sections du spectre. Pour les lentilles, nous avons choisi des lentilles Thorlabs C optimisées pour la plage de 1050 nm à 1700 nm, afin de minimiser les pertes en Raman plus critiques. Pour la fluorescence, nous avons utilisé des lentilles B optimisées de 650 nm à 1050 nm.

Pour introduire les sources d'illumination, deux types de guides optiques ont été utilisés en raison des différentes sorties laser. Pour la fluorescence, une lentille converge le faisceau de 3 mm dans un guide d'onde liquide LLG3-4Z pour le visible et le NIR. La sortie étant conique et divergente, nous avons coupé les marges du faisceau et réduit sa dispersion pour atteindre le rayon d'illumination souhaité. Pour la source de 1064 nm, nous avons utilisé une fibre optique de $NA = 0,48$. Un convergateur est placé à la sortie du faisceau.

3.1.3 Calculs et validations

La première étape du montage du système, avant d'ajouter les branches d'illumination, était de créer le système optique de détection entre l'échantillon et la caméra. Il existe de nombreuses combinaisons de paramètres qui peuvent permettre d'atteindre le grossissement que l'on vise. Pour déterminer la relation entre ces variables, nous avons calculé un système de matrices en fonction de la distance : la distance lentille-échantillon D_e , la distance entre les deux lentilles D_x , la distance entre la lentille et la caméra D_c , ainsi que les focales de chaque lentille (voir équation 3.1).

Dans ce système à cinq inconnus, nous avons deux équations (3.2 et 3.4), établies d'abord par le grossissement désiré de 0,32, puis par la contrainte d'obtenir une image focalisée. Nous avons rempli un document Excel dans lequel la distance entre les deux lentilles est la variable indépendante, tandis que les focales de chaque lentille étaient fixées et modifiables en fonction des lentilles disponibles dans le laboratoire et chez le fabricant. Nous obtenons ainsi les équations 3.3 et 3.5, respectivement pour la distance de l'échantillon et pour la distance de la caméra.

$$M_{sys} = \begin{bmatrix} 1 & D_c \\ 0 & 1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 1 & 0 \\ -\frac{1}{f_2} & 1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 1 & D_x \\ 0 & 1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 1 & 0 \\ -\frac{1}{f_1} & 1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 1 & D_e \\ 0 & 1 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A & B \\ C & D \end{bmatrix} \quad (3.1)$$

$$A = 0.32 = \frac{-D_x f_2 + D_x D_c - f_2 D_c + f_2 f_1 - f_1 D_c}{f_2 f_1} \quad (3.2)$$

$$D_c(D_x) = \frac{A f_2 f_1 + f_2 D_x - f_2 f_1}{D_x - f_1 - f_2} \quad (3.3)$$

$$B = 0 = \frac{D_c(D_x D_e - D_x f_2 - f_2 D_e + f_1 f_2 - D_e f_1) + f_1(D_x f_2 - D_x D_e + f_2 D_e)}{f_2 f_1} \quad (3.4)$$

$$D_e(D_x) = \frac{D_c f_1 D_x - f_2 f_1 D_x - f_2 f_1 D_c}{D_x D_c - D_x f_2 - D_c f_2 + f_2 f_1 - D_c f_1} \quad (3.5)$$

On cherche ensuite à minimiser le volume de système en choisissant la valeur de D_x qui donne la plus petite longueur totale de $D_c + D_x + D_e$. Pour deux lentilles de focales de 5cm, nous obtenons un minimum de 43.34 cm à $D_x = 21.75$ cm lorsque nous incrémentons D_x de 0.25 cm. Après avoir calculé qu'il n'y aurait pas de vignettage à ces distances, nous avons visé ces valeurs en sachant qu'en augmentant D_x les variations deviennent plus difficiles à contrôler et qu'en prenant un D_x plus petit nous introduisons des aberrations sphériques.

Dans la sous-section précédente, nous avons discuté des choix de miroirs dichroïques qui permettent le fonctionnement du système et la diminution des pertes. Ici, nous élaborons les calculs qui permettent de constater les différences apportées par de tels choix. Les équations suivantes démontrent l'approximation des pertes totales du système de la figure 3.1, causées par les éléments optiques autres que les lentilles. L'équation 3.6 utilise la configuration par défaut avec des séparateurs de faisceau, tandis que l'équation 3.7 présente la solution choisie, avec une combinaison de miroirs dichroïques et d'un dichroïque polarisant.

$$1 - p_1 * b_1 * b_2 * b_2 * p_2 = 1 - 0.5^5 = 96.875\% \quad (3.6)$$

$$\begin{aligned} 1 - p_1 * d_{1,r} * b_{1,r} * b_{2,t} * p_2 &= 1 - 0.5 * 0.95 * 0.95 * 0.9 * 0.5 = 79.69\% \\ 1 - p_1 * d_{1,t} * b_{1,r} * b_{2,t} * p_2 &= 1 - 0.5 * 0.90 * 0.95 * 0.9 * 0.5 = 80.76\% \end{aligned} \quad (3.7)$$

Nous observons une diminution importante des pertes, mais celles-ci restent élevées. En fait, les polariseurs à eux seuls correspondent à 75 % des pertes nécessaires pour polariser le système et éliminer les réflexions spéculaires dans les images de réflectance. L'équation 3.8 permet de comparer avec un système à illumination unique utilisant un séparateur de faisceau polarisant.

$$1 - p_1 * b_{1,r} * b_{2,t} * p_2 = 1 - 0.5 * 0.95 * 0.9 * 0.5 = 78.625\% \quad (3.8)$$

Nous constatons que même en utilisant un système épi-illumination unique les pertes ne descendent pas plus bas. Cet ensemble permet toutefois d'obtenir un système plus efficace sans augmenter considérablement les pertes déjà importantes.

Les premiers tests de ce système d'illumination ont détecté des zones circulaires d'intensité sur le bruit de fond, plus petites que le cercle d'illumination. C'est l'un des premiers problèmes techniques rencontrés. Après quelques tests, ce signal varie légèrement lorsque l'on modifie l'angle des polariseurs. La méthode la plus simple pour résoudre ce problème a été d'effectuer une soustraction de fond sur les images. Ce signal est relativement faible, mais pourrait causer des problèmes importants pour le signal Raman, qui présente lui aussi des variations très faibles. Nous faisons l'hypothèse que ce problème provient de la géométrie du cube polarisant, qui crée une fuite de signal de la polarisation orthogonale à celle transmise. Puisque nous détectons la polarisation transverse, nous détectons ce signal de bruit, même s'il peut être légèrement réduit en modifiant la polarisation de quelques degrés, ce qui réduit également le signal transmis. Aucune autre solution que le traitement des images n'a été évaluée, mais l'utilisation d'un séparateur de faisceau polarisant en plaque pourrait éliminer ou réduire ce problème.

3.2 Imagerie par fluorescence

L'expérience principale du mode fluorescence est détaillée dans le chapitre 4 sur l'imagerie *ex vivo* en autofluorescence du cancer du cerveau. Cette sous-section décrit plus brièvement les aspects de l'expérience moins discutés, les expériences réalisées sur d'autres spécimens et la configuration du système utilisée pour cette expérience. Le mode de fluorescence repose entièrement sur l'excitation à 808 nm. Au début du projet, le montage était conçu dans le contexte d'un projet sur les nanotubes de carbone. Un laboratoire connexe travaillait sur un projet de thérapie photothermique du cancer de la prostate, utilisant les CNTs pour cibler les cellules cancéreuses, mais aussi pour les chauffer et détruire les cellules ciblées.

Dans ce cadre, la modalité d'imagerie principale était la spectroscopie Raman, tandis que la fluorescence servait d'ajout pour enrichir l'imagerie des cellules ciblées et introduire la possibilité d'utiliser le laser 808 nm pour simultanément imager et effectuer l'intervention photothermique. En effet, les CNTs présentent une absorption importante à 808 nm, ce qui permet d'utiliser cette longueur d'onde pour appliquer une chaleur significative à l'échantillon. L'utilisation du laser à 808 nm demande donc une précaution supplémentaire pour ne pas induire trop de chaleur lors de

la phase d'imagerie, mais elle offre la possibilité d'un système unifié capable d'imager avant et éventuellement après l'intervention. Nous avons donc exploité la capacité de ciblage des CNTs pour transporter des fluorophores sur les régions tumorales.

Deux fluorophores exogènes ont été considérés. D'abord, l'ICG, qui possède un spectre idéal pour cette longueur d'onde en plus des qualités décrites précédemment. Ensuite, nous avons utilisé le Cy7.5, dont le spectre voisin de l'ICG permet ces capacités de liaison avec les nanotubes de carbone via une molécule d'amine NH. Les spectres d'émission sont centrés sur la longueur d'onde d'excitation, nous avons donc choisi d'observer avec un filtre passe-long détectant la queue de la fluorescence au-dessus de 850 nm. La réflectance sur l'échantillon possède un signal significativement plus élevé que la fluorescence. Nous avons ajouté deux filtres coupe-bande centrés à 808 nm, avec une largeur à mi-hauteur de 34 nm et une densité optique minimale de 5,5 et 6,5 à 808 nm.

À un stade plus avancé, nous avons eu l'opportunité de tester le système sur des tissus *ex vivo* de cancer du cerveau, plutôt que sur des cellules de cancer de la prostate cultivées en laboratoire ou dans des souris vivantes, comme initialement prévu. Plutôt que de viser des marqueurs, nous avons dû imager les fluorophores naturels dans les tissus. L'autofluorescence provient principalement de fluorophores endogènes tels que le nicotinamide adénine dinucléotide réduit (NADH), les flavines (FAD), les porphyrines, les lipopigments et les protéines structurales comme le collagène. Ils ont tous des pics d'émission dans le visible ou l'UV. Nous détectons donc encore les queues d'émission avec notre filtre à 850 nm.

Pour ce stade du projet, nous avons décidé de concentrer le système sur la partie fluorescence pour assurer le fonctionnement du système et faire suite à certains problèmes rencontrés dans la partie multispectrale Raman, c'est-à-dire que nous avons modifié le système en retirant l'illumination à 1064 nm. La figure 3.2 montre le schéma final du système lors de son utilisation au bloc opératoire. Le dichroïque a été retiré et les lentilles C remplacées par des lentilles Thorlabs B mieux conçues pour cet intervalle.

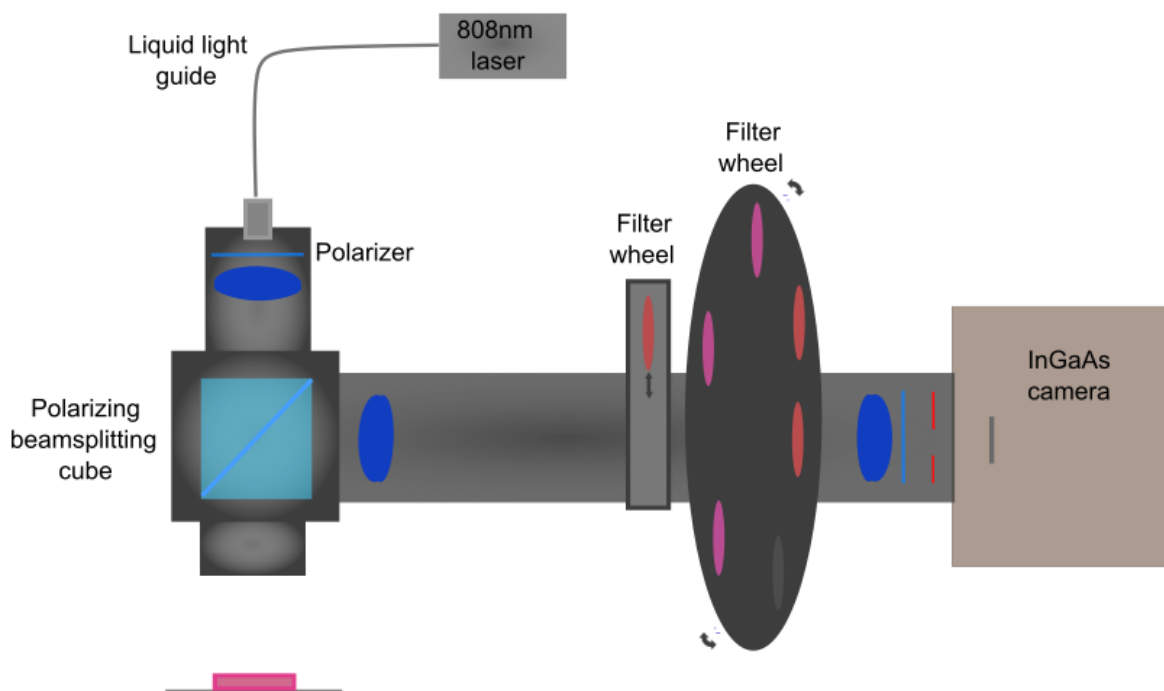


Figure 3.2 Montage optique d'imagerie grand champ pour la fluorescence

Pour faciliter les déplacements entre un espace de rangement et une salle d'opération inutilisée du bloc opératoire, le système a été monté sur un chariot Thorlabs équipé d'une table d'optique. Le chariot contient le système d'imagerie, l'ordinateur et ses contrôles, les rallonges électriques adaptées aux prises spécialisées en suspension ou murales, ainsi qu'un tiroir regroupant l'ensemble des supports, produits et marqueurs nécessaires au protocole. Pour une sécurité laser accrue et une réduction des lumières ambiantes, l'extrémité du système est encagée dans une boîte munie d'une porte permettant le dépôt des échantillons. La figure 3.3 présente une photographie de ce support mobile sans le couvert.



Figure 3.3 Visualisation du montage optique sur son support mobile

Nous avons fait des calculs sur la puissance laser utilisée pour les acquisitions. Il n'y avait pas de risques à dépasser le seuil d'exposition maximal permissible (EMP) pour la peau puisque les échantillons sont *ex vivo*. Cependant, nous voulions utiliser des niveaux d'intensité raisonnables pour la pertinence des données, mais aussi dans l'optique que le système pourrait évoluer vers une approche *in vivo*. L'EMP est un standard qui fixe le niveau de rayonnement laser le plus élevé auquel la peau peut être exposée sans effet biologique indésirable. Pour un laser à 808 nm avec des temps d'exposition supérieures à 10 secondes, l'équation 3.9 décrit l'intensité en W/cm² permise par ce seuil.[29, 30]

$$0,2 * 10^{0,002(808-700)} = 328 \frac{mW}{cm^2} \quad (3.9)$$

Pour l'étude, nous avons utilisé 176,8 mW/cm² pour garder une stabilité entre les cas et laisser un intervalle qui nous permet d'augmenter l'intensité au besoin sans trop nous approcher du seuil. En effectuant des tests à plus basse intensité, nous diminuons la vitesse de dessiccation de l'échantillon et gardons la possibilité de faire des tests sur des CNTs avec des valeurs d'intensité équivalentes, car les CNTs chauffent rapidement à cette longueur d'onde.

Avant les tests sur les tissus cérébraux, nous avons réalisé une série de mesures préliminaires sur du tissu porcin, non présentée dans le chapitre suivant. Ces essais avaient pour objectif d'évaluer

concrètement le fonctionnement de la méthode de correction par réflectance décrite dans l'article. Pour ce faire, nous avons imagé du muscle et du tissu adipeux porcin provenant d'une source commerciale. Trois régions d'intérêt ont été analysées : une zone musculaire, une zone adipeuse et une interface mixte entre les deux. Les résultats, directement liés aux différences biologiques entre tissu adipeux et tissu musculaire, ont été jugés hors de la portée d'un article orienté vers la discrimination entre tissus normaux et cancéreux ; toutefois, ils demeurent pertinents pour évaluer la robustesse de la méthode de correction par réflectance.

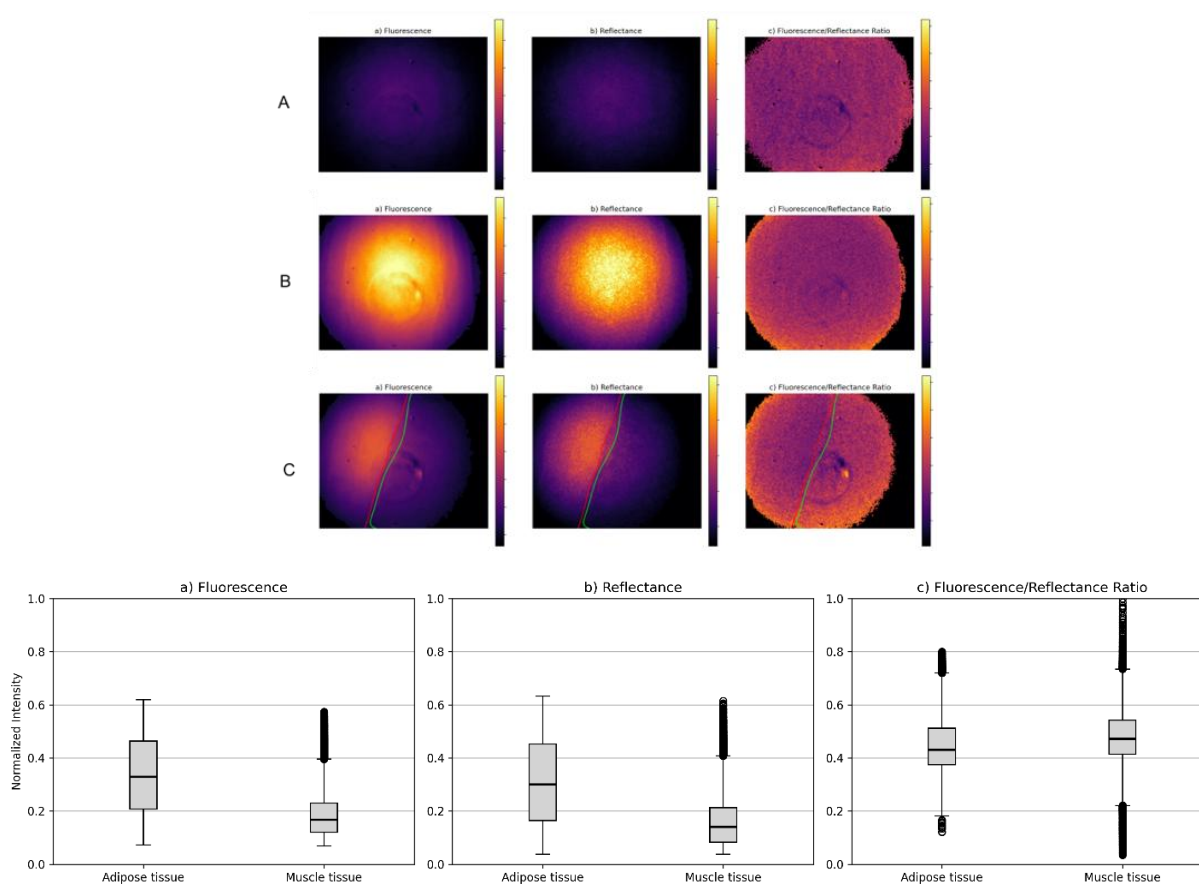


Figure 3.4 Résultats des acquisitions sur des côtelettes de porc : images en grand champ pour (A) la section de muscle, (B) la section de gras, (C) la jonction entre le gras et le muscle, ainsi que les graphiques des distributions d'intensité pour chaque modalité

La figure 3.4 montre les résultats obtenus pour chaque région d'intérêt avant et après normalisation par la réflectance. Les intensités de fluorescence étaient bien plus élevées dans le tissu adipeux, alors qu'après la correction, les deux zones présentent des signaux d'intensité uniforme. En temps normal, on s'attendrait à conserver une intensité supérieure dans le tissu adipeux en raison de la

présence de NADH et de porphyrines. Mais la méthode actuelle semble indiquer que les intensités de fluorescence sont les mêmes et que l'image non corrigée reflétait uniquement les variations de signal causées par l'absorption et la diffusion naturellement plus élevées dans le muscle. Nous émettons donc l'hypothèse que, pour un tissu mort et entreposé, le métabolisme a modifié la composition des fluorophores présents. Cette hypothèse est en accord avec certaines observations notées dans des articles d'analyse du porc dans le NIR.

3.3 Déroulement expérimental de l'imagerie Raman multispectrale

Contrairement à plusieurs systèmes sur lesquels j'ai travaillé dans le laboratoire, la détection Raman de mon projet n'avait pas pour but de détecter des pics naturellement présents dans les échantillons biologiques présentant des pathologies comme le cancer ou la COVID-19. Je souhaitais identifier directement les pics Raman des nanotubes de carbone présents dans les tissus pathologiques. Les nanotubes de carbone possèdent deux pics principaux avec un signal très élevé. Le premier pic est relié à la bande D, c'est le pic à 1350 cm^{-1} qui dépend du niveau de déformation des nanotubes. Il est causé par le mouvement de respiration des anneaux de carbone. Le deuxième pic est la bande G, un pic à 1600 cm^{-1} causé par l'étirement du CNT.[31]

Les premières expériences réalisées avec les CNTs ont été effectuées sur des cellules issues d'un carcinome de la prostate métastasé aux ganglions lymphatiques, en raison de leur forte expression de l'antigène membranaire spécifique de la prostate (Prostate-Specific Membrane Antigen, PSMA). Les mesures de spectres Raman ont été prises à partir du microscope confocal Raman calibré de 600 cm^{-1} à 1750 cm^{-1} . Nous avons testé la tendance de liaison des CNTs aux cellules du cancer de la prostate. Plus précisément, nous avons comparé l'utilisation de CNTs avec et sans ciblage du PSMA.

Les CNTs non ciblés étaient recouverts d'un groupe polyéthylène glycol servant de contrôle pour l'accumulation des nanotubes dans l'amas de cellules. Les CNTs ciblés utilisaient un ligand Glu-urea-Lys, classiquement utilisé pour son affinité pour le PSMA. Cette expérience avait pour objectif d'évaluer la nécessité du ligand et les quantités requises de nanotubes de carbone avant nettoyage. La figure 3.5 présente un exemple de spectre Raman pour différentes concentrations de CNTs ciblés et les relations d'intensité liées à chaque type de CNTs.

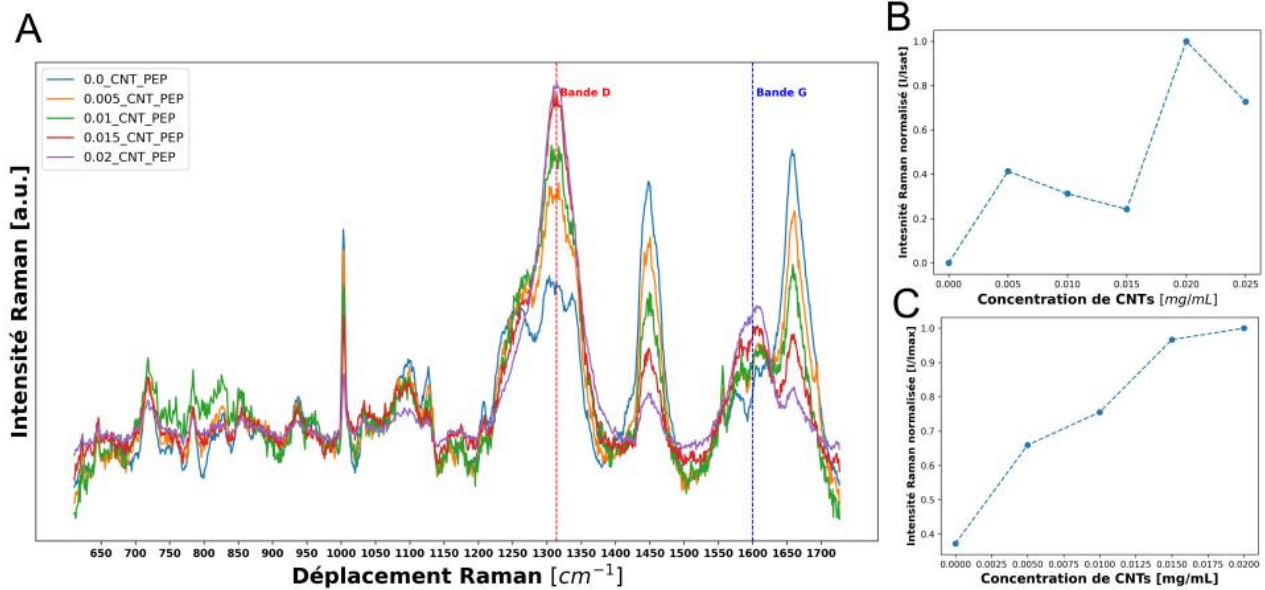


Figure 3.5 Expérience de combinaison de CNTs et de sphéroïdes de cancer de la prostate : (A) spectre Raman pour les CNTs ciblés, (B) évolution de la concentration pour les CNTs non ciblés, (C) évolution de la concentration pour les CNTs ciblés

Avec cette expérience, nous avons établi qu'une concentration de 0,015 mg/mL permet d'atteindre une saturation des CNTs liés dans l'amas de cellules. Pour les CNTs non ciblés, la tendance observée est beaucoup moins linéaire et n'est pas représentative des concentrations utilisées.

3.3.1 Méthode de simulation de filtres

À partir des spectres obtenus dans les expériences précédentes, nous avons déterminé les filtres optimaux. Étant donné l'intensité de la bande D sur ces spectres, c'est ce pic que nous tenterons de détecter avec le système multispectral. Le système utilise un laser de 1064 nm, suffisamment éloigné du laser de 808 nm qui produit la fluorescence. Pour la bande D à 1350 cm^{-1} , cela représente une longueur d'onde de 1242,5 nm pour un laser de 1064 nm selon l'équation 2.11. Pour appliquer la méthode multispectrale décrite dans la section 2.2.2, nous avons besoin de déterminer la position de trois filtres. Nous avons choisi des filtres passe-bande étroits, avec une largeur à mi-hauteur de 1 nm, afin d'assurer la précision du système.

La première étape pour effectuer une simulation sur un spectre en décalage Raman consiste à déterminer la largeur de bande du filtre en cm^{-1} . Le filtre est représenté par une gaussienne, dont la largeur est fixe en longueur d'onde, mais qui varie dans le référentiel du décalage Raman. Nous

prenons sa valeur au niveau du pic central à 1242,5 nm et la considérons comme constante afin de simplifier le calcul, sans modifier significativement les résultats. La variation correspondant à 1 nm dans l'espace du décalage Raman peut être obtenue en calculant la dérivée de l'équation 2.12 par rapport à la longueur d'onde diffusée, puis en appliquant la relation linéaire de conversion présentée à l'équation 3.10.

$$\Delta(\Delta\omega[\text{cm}^{-1}]) = \frac{d(\Delta\omega)}{d(\lambda)} \Delta\lambda \quad (3.10)$$

$$\Delta(\Delta\omega[\text{cm}^{-1}]) = \frac{10^7}{(1242.5 \text{ nm})^2} * 1 \text{ nm} = 6.47 \text{ cm}^{-1}$$

La largeur à mi-hauteur est donc de 6,47 cm^{-1} , ce qui correspond à un écart type de 2,72 cm^{-1} . Les données du spectre Raman possèdent des points tous les 1,2 cm^{-1} , ce qui signifie que nous devons évaluer les valeurs d'intensité d'une gaussienne discrétisée à toutes les valeurs de l'axe x, pour un minimum de points allant de chaque côté de la gaussienne sur au moins trois fois l'écart type.

Dans l'environnement Jupyter Notebook, nous effectuons la convolution de la gaussienne sur les valeurs d'intensité obtenues du spectre Raman. En itérant pour chaque point sur l'axe x dans la région du pic et en calculant la différence entre le spectre avec et sans CNTs, on obtient les valeurs centrées des filtres qui optimisent leur position. Pour le filtre central, on maximise la différence entre les deux spectres, tandis qu'on la minimise pour les filtres adjacents. La figure 3.6 illustre les résultats de la simulation pour la position des trois filtres.

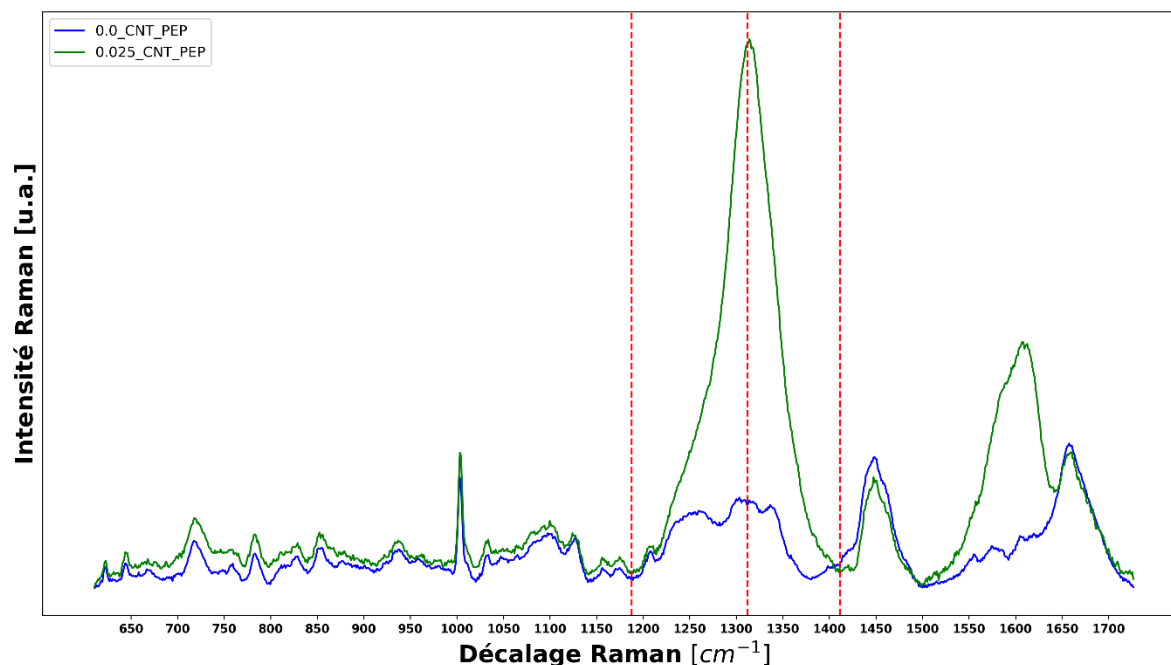


Figure 3.6 Résultat de simulation pour les 3 filtres ciblant la bande D des CNTs

Les filtres nécessaires sont donc : 1218 nm ($1187,9 \text{ cm}^{-1}$), 1236,6 nm (1312 cm^{-1}) et 1252 nm ($1411,15 \text{ cm}^{-1}$).

3.3.2 Mise en place et analyse des dysfonctionnements

Les expériences liées au multispectral ne se sont pas déroulées aussi loin que désiré. Le montage a rapidement rencontré des problèmes et l'opportunité de travailler sur des échantillons du cancer du cerveau a modifié la priorité des objectifs du projet. Les premiers tests effectués avec des CNTs ont donné des images contenant des défauts importants, dont l'intensité du signal était fortement supérieure à celle du signal Raman que l'on tentait d'observer. Dans ces conditions, il n'était même pas possible d'envisager une correction par traitement des images ou de tenter d'observer des variations de signal dans les acquisitions collectées.

En utilisant les filtres, les images présentaient un cercle avec des lignes parallèles dont l'intensité variait par bandes claires et sombres, semblables à des motifs d'interférence constructive ou destructive. La figure 3.7 présente une image prise lors d'une acquisition sur le troisième filtre.

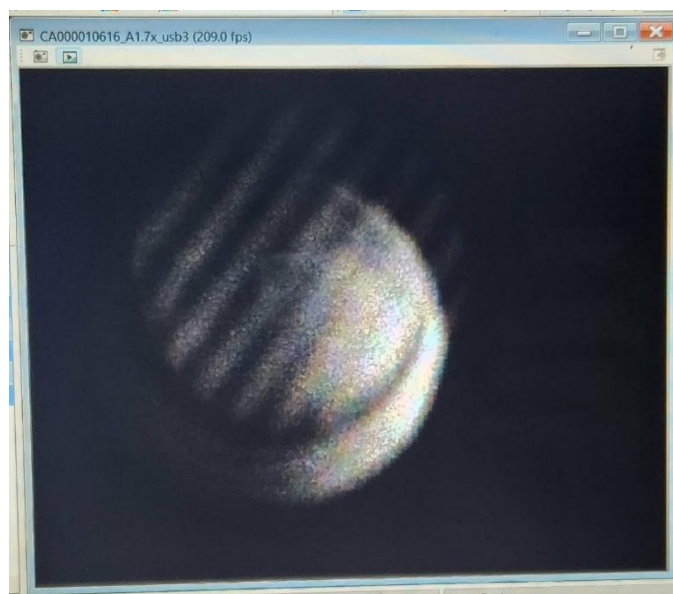


Figure 3.7 Acquisition brut de la source à 1064nm à travers le troisième filtre

Après plusieurs tests, afin d'identifier l'origine du problème, il est apparu que celui-ci provenait non seulement des filtres, mais également d'une interaction à l'intérieur du trajet optique. Le problème ne survenait qu'en utilisant les trois filtres choisis pour la partie Raman du système. Cependant, l'orientation du motif lumineux n'était pas influencée par l'orientation des filtres, mais plutôt par la différence d'angle entre les filtres et le miroir dichroïque polarisant. À noter ici que la méthode sur laquelle le système est basé utilisait originalement un séparateur de faisceau non polarisant.

Pour rappel, pour des raisons de pertes de signal et d'amélioration du système en double épillumination, qui permet également de développer une méthode de correction pour les coefficients optiques du milieu comme présenté dans le chapitre précédent, les problèmes semblaient plus ou moins importants selon le filtre utilisé. L'hypothèse émise pour expliquer ce problème est donc une interaction entre les filtres et le cube polarisant. Soit la lumière polarisée pose un problème pour ce type de filtre, soit les réflexions internes liées aux cubes polarisants, plutôt qu'à une lame polarisante, pourraient créer un déphasage variable selon la position par rapport à l'axe, donnant ce type de forme d'interférence constructive et destructive.

Dans tous les cas, les filtres laissaient passer une grande partie de la lumière provenant directement de la source. Ce dernier problème a également été réglé dans la partie fluorescence du système en ajoutant des filtres de densité optique élevée pour la longueur d'excitation. Cette partie aurait

probablement pu être réglée pour le Raman, mais les inégalités de transmission selon la distance des bords des filtres auraient probablement entraîné d'autres problèmes en cours de route

À la suite des différents tests, les fabricants ont été contactés pour tenter d'obtenir une explication sur le dysfonctionnement des filtres de 2500 \$ chacun. Leur conclusion était simplement que les filtres n'avaient pas un grade suffisant pour l'imagerie, malgré les demandes et descriptions d'utilisation fournies lors de l'achat. Cette réponse n'explique pas pourquoi un système très similaire développé précédemment dans le laboratoire ne présentait pas ces problèmes. L'hypothèse d'une combinaison de problèmes avec le miroir dichroïque reste donc valable.

Cette partie du projet était financée par Mitacs et nos partenaires dans le but de développer l'utilisation des nanotubes de carbone. À ce stade du développement, les partenaires n'assuraient plus le financement qui nous aurait permis d'acheter de meilleurs filtres. Plutôt que d'acquérir de nouveaux filtres ou de consacrer plus de temps à cette partie du projet, nous avons concentré les objectifs sur l'atteinte de la partie fluorescence. Le système aurait probablement pu fonctionner sans changements pour sa deuxième modalité, mais par souci de précaution, nous avons modifié le système tel que présenté précédemment avant le début de l'étude sur le cerveau.

CHAPITRE 4 ARTICLE 1: LABEL-FREE WIDE-FIELD IMAGING OF BRAIN TUMORS USING NEAR-INFRARED ENDOGENOUS FLUORESCENCE AND REFLECTANCE NORMALIZATION

Gabriel Beaudoin, Victor Blanquez-Yeste, Frédérick Dallaire, Seung Soo Lee, Romain Cayrol, Marie-Christine Guiot, Mark A Trifiro, Miltiadis Paliouras, Kevin Petrecca, Frédéric Leblond

Publié dans : Journal of Biomedical Optics

Date de soumission : 14 novembre 2025

4.1 Mise en contexte

L'expérience présentée dans ce chapitre a pour objectif de tester le fonctionnement du système pour la modalité de fluorescence sans produit exogène. L'article décrit également l'application d'une nouvelle méthode de correction par le milieu, appliquée sur le domaine spatial. Cette méthode permet de corriger la diffusion et l'absorption de l'échantillon, en complément de la correction habituelle liée à l'illumination. L'expérience a été réalisée dans le cadre d'une étude sur le cancer du cerveau, impliquant plusieurs systèmes du même laboratoire. Les patients étaient d'abord approuvés pour une étude *in vivo* avec une sonde Raman et ont été traités de façon habituelle par excision de leur tumeur. Après les mesures *in vivo* et l'excision, une partie de la tumeur a été fournie par le chirurgien pour l'expérience de cet article ainsi que pour une autre étude multispectrale Raman.

Les résultats présentés dans cet article ne concernent que les données acquises par l'auteur principal. Des mesures de sondes Raman ont été prises à la suite des étapes du protocole présenté, mais n'ont pas été incluses dans l'article par manque de résultats concluants et afin de concentrer le message de celui-ci sur l'imagerie de fluorescence. Globalement, les résultats des mesures de sondes ne correspondaient pas de manière constante aux pathologies obtenues, potentiellement en raison d'un algorithme adapté à des conditions d'imagerie différentes et à des tissus *in vivo*. L'article a été soumis le 14 novembre 2025 au *Journal of Biomedical Optics*. La contribution du premier auteur est estimée à plus de 85 % pour la réalisation des expériences et la production de l'article. Il a développé et monté le système, collecté, traité et analysé les données avant de produire les figures. L'article a été rédigé par l'auteur principal, puis modifié pour la publication finale par l'auteur correspondant.

4.2 Label-Free Wide-Field Imaging of Brain Tumors Using Near-Infrared Endogenous Fluorescence and Reflectance Normalization

Journal: Journal of Biomedical Optics

Gabriel Beaudoin^{a,b}, Victor Blanquez-Yeste^{a,b}, Frédérick Dallaire^{a,b}, Seung Soo Lee^{f,g}, Romain Cayrol^{b,c}, Marie-Christine Guiot^{d,e}, Mark A Trifiro^{f,g,h}, Miltiadis Paliouras^f, Kevin Petrecca^e, Frédéric Leblond^{a,b*}

^a Department of Physics Engineering, Polytechnique Montréal, Quebec, Canada

^b Centre de recherche du centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Québec, Canada

^c Department of Pathology, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal(CHUM), Quebec, Canada

^d Department of Pathology, McGill University, Montreal, Quebec, Canada

^e Montreal Neurological Institute-Hospital, McGill University, Montreal, Quebec Canada

^f Division of Clinical and Translational Research, Department of Medicine, McGill University, Montreal, Quebec, Canada

^g Lady Davis Institute for Medical Research, Jewish General Hospital, Montreal, Quebec, Canada

^h Division of Endocrinology, Jewish General Hospital, Montreal, Quebec, Canada

4.2.1 Abstract

Significance: Maximizing safe tumor resection remains a major challenge in brain tumor surgery due to the lack of reliable real-time intraoperative contrast between tumor and healthy brain tissue. Label-free optical methods based on endogenous tissue fluorescence could provide simple, non-invasive feedback to guide resection while avoiding the logistical and regulatory limitations of exogenous fluorophores.

Aim: To investigate whether endogenous near-infrared (NIR) fluorescence can differentiate tumor from normal brain tissue *in vivo*, and to develop a wide-field fluorescence and reflectance imaging system for label-free visualization of brain tumor specimens *ex vivo*.

Approach: We analyzed *in vivo* data acquired with a hand-held near-infrared spectroscopy probe from 26 patients (430 measurements) to quantify endogenous fluorescence differences between glioblastoma or astrocytoma and normal brain. Based on these findings, we built a wide-field imaging prototype using 808-nm laser excitation, red-shifted fluorescence detection with an InGaAs short-wave infrared camera, and co-registered reflectance imaging for ratiometric normalization. The system was validated with tissue-mimicking phantoms containing indocyanine green (ICG) or Cy7.5 dyes, porcine tissue analogs, and *ex vivo* human surgical specimens (14 samples from 5 patients).

Results: Endogenous fluorescence intensity measured *in vivo* was significantly higher in normal brain tissue compared with tumor, yielding positive predictive values of 85-88% for tumor and a negative predictive value of 96% for normal tissue. *Ex vivo* wide-field imaging reproduced this contrast: normalized fluorescence as lower in tumor regions than in histologically confirmed normal areas, consistent with metabolic differences observed *in vivo*. Phantom and tissue experiments confirmed the system's linearity and sensitivity to NIR fluorescence signals.

Conclusions: Endogenous NIR fluorescence provides intrinsic contrast between normal and tumoral brain tissue. The demonstrated corrected wide-field fluorescence imaging approach could offer a feasible, label-free method for real-time visualization of tumor margins, supporting its future clinical translation as an intraoperative guidance tool.

Keywords: Endogenous fluorescence, Near-infrared imaging, Wide-field imaging, Label-free contrast, Spectroscopy, Neurosurgery, Astrocytoma, Glioblastoma, Intraoperative guidance

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

4.2.2 Introduction

Surgical resection remains a cornerstone of treatment for brain tumors, including glioblastoma and astrocytoma[32-34]. Achieving maximal safe resection is one of the most important prognostic factors for patient survival and recurrence-free outcome[5, 6]. However, complete tumor removal is often limited by the difficulty to differentiate tumor margins from normal brain tissue using

standard white-light microscopy[35]. For navigation, neurosurgeons must rely on preoperative magnetic resonance imaging (MRI), but these maps do not update intraoperatively and are impacted by brain shift during surgery, which results in loss of spatial accuracy[36, 37]. Consequently, resection decisions are guided primarily by visual and tactile cues, balancing oncologic completeness with the risk of postoperative neurological deficits involving motor, visual, or cognitive functions[38]. Real-time intraoperative imaging tools that provide objective, label-free, and spatially resolved contrast between tumor and normal tissue could therefore greatly improve surgical precision and patient outcomes.

A wide-field optical imaging method is particularly appealing in this context. Wide-field systems can provide real-time spatial maps over the surgical field, maintaining anatomical context and supporting continuous surgical workflow. The ability to rapidly visualize large surface areas without contact would allow for effective intraoperative assessment of tissue boundaries and complements existing guidance modalities. Endogenous near-infrared (NIR) imaging could provide benefits in that respect. The NIR spectral window (700-1000 nm) minimizes absorption by hemoglobin and water, reduces scattering, and enables deeper light penetration into tissue[37]. However, endogenous NIR fluorescence remains relatively underexplored due to the technical challenges of detecting weak signals at these wavelengths. Combining autofluorescence with reflectance imaging could also provide an opportunity to improve and normalize this intrinsic contrast[39]. Reflectance images acquired at the excitation wavelength can correct spatial variations in illumination, tissue topography, and optical attenuation, giving a ratiometric fluorescence-to-reflectance signal that isolates biochemical differences from purely structural or geometric effects[40].

Endogenous tissue fluorescence offers a promising, label-free source of contrast. Autofluorescence arises primarily from endogenous fluorophores such as reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH), flavins (FAD), porphyrins, lipopigments, and structural proteins like collagen[11]. Alterations in their relative concentrations and oxidation states coming from malignant transformation reflect changes in cellular metabolism and tissue composition[41]. Exogenous fluorophores have been used to demonstrate the clinical utility of fluorescence guidance in oncology, especially in neurosurgery[42]. Five-aminolevulinic acid (5-ALA), which induces accumulation of protoporphyrin IX (PpIX) in tumor cells, is frequently used in fluorescence-guided glioblastoma surgery and has improved resection rates and survival outcomes[43]. Other agents

such as methylene blue and indocyanine green (ICG) have been explored for a variety of surgical applications[43], with ICG offering strong NIR emission and favorable biocompatibility. However, the adoption of all labeled approaches can be limited because they require preoperative preparation, regulatory approval, and patient-specific dosing. Label-free methods based on endogenous contrast would therefore provide a simpler and safer alternative for intraoperative use.

In this study, we present a two-part investigation of label-free NIR fluorescence imaging for brain tumor discrimination. First, we analyze *in vivo* endogenous fluorescence data collected from 26 patients using a spectroscopy probe optimized for inelastic scattering detection, comprising 430 measurements in glioblastoma and astrocytoma[18, 19]. These results demonstrate that endogenous fluorescence can effectively differentiate tumor from normal brain, with positive predictive values of 85–88% for tumor and a negative predictive value of 96% for normal brain. Fluorescence intensity was consistently higher in normal tissue, suggesting differences in metabolic profiles between healthy and neoplastic regions.

Building on these findings, we developed a custom wide-field NIR fluorescence and reflectance imaging system designed for *ex vivo* evaluation of brain tumor specimens. The system uses 808 nm laser excitation with expanded-beam illumination to capture red-shifted emission with an InGaAs short-wave infrared (SWIR) camera (also sensitive in the NIR, with a spectral range from 500 to 1700 nm) through a high-pass filter. Corresponding reflectance images at the excitation wavelength to make ratiometric normalization of fluorescence signals possible and compensate for spatial illumination and surface variations. We report imaging results from 14 specimens obtained from 5 patients with glioblastoma and astrocytoma, along with corresponding histological analyses. Significant differences in normalized fluorescence between tumor and normal regions were observed, consistent with *in vivo* probe data, although with smaller contrast magnitude, likely reflecting post-resection metabolic changes. To validate the system's technical performance and detection sensitivity, we also conducted phantom experiments using ICG and Cyanine 7.5-amine (Cy7.5). These tests established the system's linear response and applicability to both label-free and labeled imaging modes.

Together, these studies demonstrate that endogenous NIR fluorescence provides contrast between tumor and normal brain tissue, both *in vivo* and *ex vivo*, and that wide-field imaging of this signal is feasible using simple hardware. This work establishes a foundation for future intraoperative

translation of wide-field endogenous fluorescence imaging as a complementary tool for real-time surgical guidance.

4.2.3 Materials and Methods

In vivo optical spectroscopy data acquisition and analysis

We reanalyzed a subset of *in vivo* spectroscopy data acquired during a previously published clinical study on intraoperative brain tumor detection at the Montreal Neurological Institute–Hospital (MNI-H, Montreal, Canada)[18, 19]. The study was a prospective observational trial evaluating the diagnostic performance of inelastic scattering signals (Raman spectroscopy) during open-craniotomy tumor resections. All patients provided informed consent, and all procedures adhered to institutional ethical guidelines.

The previous study focused on a subset of 26 patients, either with glioblastoma ($n = 24$) or astrocytoma ($n = 2$). Data from other patients with either meningioma or metastases to the brain were excluded, as no *ex vivo* specimen imaging was performed for these conditions in the current study. The dataset contained 430 Raman spectra collected intraoperatively from histologically confirmed sites of glioblastoma, astrocytoma, and normal brain. In total, 287 measurements were made in glioblastoma bulk tumor, 18 in astrocytoma bulk tumor, and 125 in normal brain. The Raman system (Sentry Research Unit; Reveal Surgical and LUMEDLAB) consisted of a sterilizable handheld probe illuminated by a 785-nm continuous-wave laser. The device collected scattered light through nine surrounding optical fibers coupled to a compact spectrometer equipped with a thermoelectrically cooled CCD. Each spectrum spanned 400–2000 cm^{-1} at $\sim 1.8 \text{ cm}^{-1}$ resolution. Regions of interest for measurements were defined using preoperative MRI: contrast-enhancing T1-weighted regions corresponding to bulk tumor and non-enhancing brain areas representing normal brain.

Spectral preprocessing followed the standardized pipeline reported in our previous work[44]. Briefly, each acquisition underwent dark-count subtraction, cosmic-ray removal, wavenumber calibration, instrument-response correction, and averaging of repeated spectra. A fluorescence baseline was extracted using the BubbleFill algorithm (minimum bubble parameter = 50 cm^{-1}) and stored separately prior to subtraction of the Raman-specific component. In the present analysis,

this extracted baseline, corresponding to the broad unstructured background of each spectrum, was interpreted as endogenous *in vivo* fluorescence.

For each measurement, the mean fluorescence intensity was computed across the baseline-fitted curve, providing a quantitative parameter representing endogenous NIR emission following 785 nm tissue excitation. Spectra were grouped into three categories: glioblastoma (bulk tumor), astrocytoma (bulk tumor), and normal brain. Data were pooled across patients within each category. Boxplots were generated to visualize fluorescence intensity distributions, and Mann-Whitney U testing was applied to assess differences between tumor and normal tissue for each tumor type independently. Positive and negative predictive values were derived using histopathology as the reference standard, based on a receiver operating characteristic analysis.

This analysis provided the foundation for the current imaging study by confirming that endogenous fluorescence, derived directly from Raman background intensity, differentiates tumor from normal brain with high sensitivity and specificity. These quantitative *in vivo* results guided the design and optimization of the wide-field NIR fluorescence imaging system described in the following sections.

Imaging system design

A custom multimodal imaging platform was developed to acquire wide-field images of biological tissues in the NIR range, supporting two modes of operation: fluorescence and reflectance imaging. The system was designed to provide flexible spatial coverage, minimize optical losses and artifacts, and allow modular integration of additional illumination wavelengths within the NIR spectrum. Mechanical distances between components were optimized to facilitate rapid changes in field of view while leaving sufficient space for interchangeable filters, neutral density elements, and auxiliary illumination modules.

The excitation source consisted of an 808-nm LED laser(*Arktis Laser*, LRD-0808 Series, 5000mW maximum output) coupled to a 3-mm-core liquid light guide (LLG3-4Z). The diverging output from the light guide was collimated using a focusing lens and directed through a linear polarizer (Thorlabs LPNIRE100-B, N-BK7 windows). The beam was then transmitted through a polarizing dichroic mirror (Thorlabs, PBS255) resulting in an epi-illumination setup compatible with single or multiple NIR excitation wavelengths. This geometry minimized specular reflections from the tissue surface and stopped back-reflected light from reaching the detector[45]. The use of crossed

polarizers further suppressed surface glare and ensured well-defined relative polarization of the incident and detected light.

On the detection side, a pair of Thorlabs NIR achromatic doublets provided $5\times$ magnification, corresponding to a field of view of approximately 7×8 mm. Rapid transitions between fluorescence and reflectance modes were made possible by two motorized filter wheels. 1) Reflectance mode: diffusely reflected illumination at the excitation wavelength was captured using an 800-nm long-pass filter (Thorlabs, FELH0800). A secondary polarizer was positioned orthogonally to the illumination polarization to reject specular reflection and suppress internal optical interference. 2) Fluorescence mode: an 850-nm long-pass filter (Thorlabs, FELH0850) collected red-shifted emission from endogenous or exogenous fluorophores, while two notch filters (Thorlabs, 808 nm center wavelength, 34-nm half-width, optical density 5.5) blocked residual excitation light and further attenuated specular reflections. Images were acquired using a Photon etc. Alizé 1.7v InGaAs camera cooled to -50 °C to minimize dark noise.

Table 1 Clinical and pathological characteristics of the patient cohort included in this study. The table summarizes patient identifiers, histopathological diagnosis (glioblastoma or astrocytoma), treatments applied before the surgery, number of *ex vivo* specimens obtained per patient, and the predominant tissue types identified within each specimen based on histopathological assessment. Tissue categories include tumor, normal brain, necrotic regions, and blood contamination.

Table 1: Summary of Patient Data, Diagnostics, and Pathologist Predictions

Patient ID	Diagnosis	# Samples	Pathologist Prediction	Included
P2	Meningioma	2	Necrosis, normal and tumour tissue	No
P3	Meningioma	2	Necrosis and tumour tissue	No
P6	Glioblastoma	2	Tumour tissue	No
P7	Glioblastoma	2	Normal and tumour tissue	Yes
P8	Glioblastoma	2	Necrosis and tumour tissue	Yes
P11	Astrocytoma	2	Blood and tumour tissue	Yes
P12	Astrocytoma	3	Normal tissue	Yes
P14	Glioblastoma	5	Normal and tumour tissue	Yes

Patient inclusion and ex vivo brain tissue samples

Patients were recruited from an ongoing *in vivo* brain tumor spectroscopy study approved by the institutional ethics committee. Candidates for *ex vivo* imaging were selected intraoperatively by the neurosurgeon based on tumor size and accessibility for safe tissue sampling. Among the first 14 enrolled patients, 9 provided *ex vivo* samples. All underwent open-cranium resections for histologically confirmed brain tumors, either glioblastoma or astrocytoma. The first three *ex vivo* specimens were excluded from analysis due to excessive specular reflections observed in early imaging trials. Subsequent system modifications eliminated this issue. **Table 1** summarizes the clinical and pathological characteristics of all patients that provided *ex vivo* tissue.

Following resection, fresh tissue specimens were collected, placed in phosphate-buffered saline (PBS) to avoid dehydration, and immediately transferred to the imaging station. Each specimen (typically 1–2 cm in size) was bisected along its longitudinal axis to produce two flat surfaces suitable for imaging. Minimal PBS coverage was maintained to prevent desiccation while avoiding excess liquid that could increase surface scattering and glare. After imaging, the sides of each specimen were inked to preserve orientation for histopathological correlation. The ink was fixed using mordant before formalin fixation. Samples were fixed in 10% formalin for up to 24 h prior to paraffin embedding and subsequent histological processing.

Label-free imaging procedures

Once the InGaAs detector reached its operating temperature of -50°C , samples were put under ambient white-light illumination for orientation. First, imaging was done in fluorescence mode. The filter wheels were placed in the fluorescence configuration (an 850 nm long-pass filter plus two 808 nm notch filters), and the excitation source was set to give 200 mW at the imaging plane for $176\text{mW}/\text{cm}^2$. Fluorescence images were taken with exposure times of 30, 60, 150, and 300 s, each with up to four accumulations to improve signal-to-noise ratio.

Subsequently, the system was switched to reflectance mode (800 nm long-pass filter only), and a single reflectance image was acquired with 1 ms exposure. Immediately afterward, a dark image was captured with the laser turned off and the same exposure time as the reflectance acquisition to record camera noise. A Spectralon diffuse reflectance standard (Labsphere Inc.) reference image was then acquired in the same configuration to map the illumination distribution and enable spatial normalization of the reflectance data. The entire imaging sequence was performed in a fixed order

to minimize sample motion between acquisitions and reduce the total time before fixing the specimen. All images, except the initial white-light photographs used for orientation, were stored, containing pixel intensity data (640×512 pixels $\times$ 1 accumulation) and acquisition metadata, including exposure time.

Phantom preparation and exogenous fluorophore experiments

To validate the imaging system's performance and sensitivity, tissue-mimicking phantoms were fabricated using polydimethylsiloxane (PDMS) doped with controlled amounts of India ink and titanium dioxide (TiO_2) to independently adjust absorption and scattering. The absorption stock solution was prepared by dissolving black India ink in ethanol at 48 mg/mL, and the scattering stock solution was TiO_2 in ethanol at 42 mg/mL.

Multiple PDMS batches were cast into one-inch diameter Petri dishes to a final depth of 2 mm, corresponding to approximately 4 mL per sample. Precise volumes of the absorption and scattering stock solutions were added to achieve three target absorption coefficients ($\mu_a = 0.1, 0.5, 1 \text{ mm}^{-1}$) and two target reduced scattering coefficients ($\mu_s' = 5, 10 \text{ mm}^{-1}$), resulting in phantoms with defined optical properties.

After mixing, the phantoms were degassed in a vacuum chamber for 1 hour to remove trapped air bubbles, then cured in an oven at 80°C for 2 hours. Total reflectance and transmittance were measured using a spectrophotometer (model: Lambda 1050 UV/Vis/NIR, PerkinElmer) over the 400–1000 nm wavelength range at 10 nm increments. The absorption (μ_a) and reduced scattering coefficients (μ_s') were calculated using the Inverse Adding-Doubling (IAD) software.

Because the actual phantoms exhibited substantial variability, two samples were selected for imaging experiments that had similar scattering ($\mu_s' \approx 4 \text{ mm}^{-1}$) but markedly different absorption ($\mu_a = 0.134$ and 3.45 mm^{-1}).

Indocyanine green (ICG, TCI Chemicals, Tokyo, Japan), and Cyanine 7.5-amine (Cy7.5, Lumiprobe, MD, USA) were each dissolved in anhydrous dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) to prepare 10 mM stock solutions. The stock solutions were aliquoted and stored at -80°C until use. Prior to each experiment, the stocks were thawed and serially diluted with Milli-Q water to the desired concentrations. All fluorophore dilutions were freshly prepared on the day of measurement and kept protected from light. For fluorescence measurements, 30 μL of each diluted fluorophore solution was loaded under the surface of the

PDMS phantom. The concentration was reduced by half at each step. Between measurements, the surface of the phantom was rinsed with 70% ethanol and deionized water, then dried to remove any residual fluorophores.

Data processing and statistical analysis

Raw images were processed using a standardized pipeline. For each acquisition, a median dark frame was subtracted to remove detector background noise. Both fluorescence and reflectance images were smoothed using median and Gaussian filters to suppress high-frequency noise. Fluorescence images were then normalized by reflectance intensity on a pixel-wise basis to produce radiometric fluorescence maps that compensate for surface geometry and illumination variability. A binary mask was generated for each specimen to exclude pixels corresponding to non-tissue regions or low-signal areas near image edges.

Histopathological annotations were used to segment each image into tumor, necrotic and normal regions. Areas associated with blood vessels were also identified. Corresponding masks were registered to the imaging data to extract mean fluorescence and reflectance intensities per tissue class. Normality of the data was assessed separately for each pathology using the Shapiro-Wilk test on the distributions of mean fluorescence and reflectance values across samples. Due to the limited number of samples, normality could not be reliably assessed for Blood and Necrosis, and these tissue types were therefore excluded from parametric statistical analyses. Statistical analysis was performed using two parametric approaches: (1) paired *t-test* comparing tumor versus normal regions within each specimen, and (2) mixed-effects ANOVA models with tissue type as a fixed effect and specimen as a random effect to account for inter-patient variability. In an attempt to include results from Necrosis, non-parametric tests were also considered, but these are limited by small sample size and non-independence of observations. All statistical computations were performed using Python (SciPy, StatsModels).

4.2.4 Results

Endogenous in vivo fluorescence derived from Raman spectra

Endogenous fluorescence extracted from the baseline of intraoperative Raman spectra demonstrated clear differences between tumor and normal brain tissue. **Figure 1a** presents boxplots of the background fluorescence intensity for bulk glioblastoma, bulk astrocytoma, and normal

brain, showing consistently higher fluorescence in normal tissue than in both tumor types ($p < 0.01$). A receiver operating characteristic (ROC) analysis performed by grouping all tumor spectra against normal brain (**Figure 1b**) yielded a positive predictive value (PPV) of 85–88 % for tumor and a negative predictive value (NPV) of 96 % for normal tissue. These results confirm that the broadband fluorescence underlying the Raman signal serves as a reliable, label-free optical biomarker that distinguishes malignant from normal brain tissue *in vivo*.

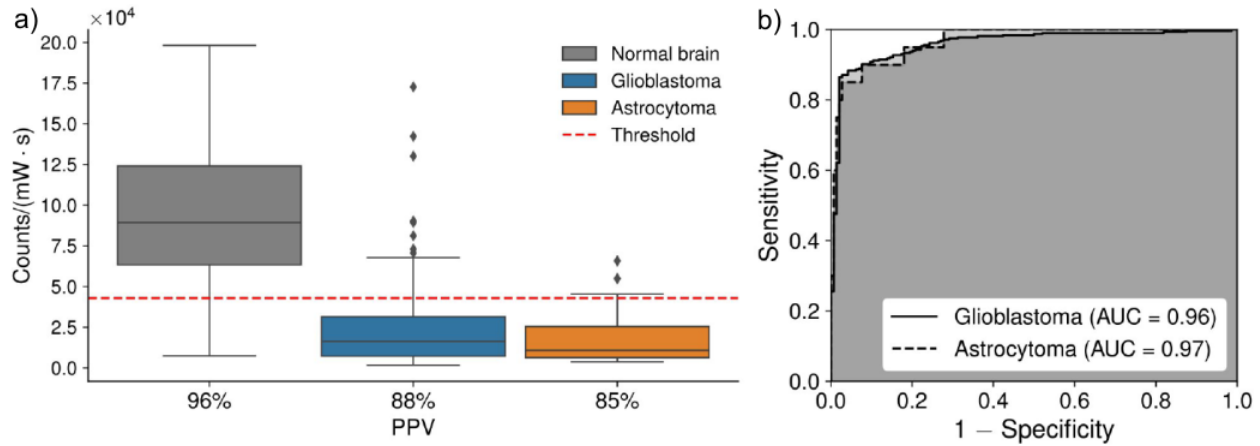


Figure 4.1 Quantitative analysis of endogenous *in vivo* fluorescence extracted from the baseline (background) of Raman spectra acquired intraoperatively with a handheld Raman probe. (a) Boxplots show fluorescence intensity distributions for three tissue categories: bulk glioblastoma, bulk astrocytoma, and normal brain. The fluorescence intensity corresponds to the broad background signal underlying the Raman spectrum, reflecting endogenous tissue emission under 785 nm excitation. Univariate statistical analysis revealed statistically significant differences ($p < 0.001$) between normal brain and both tumor classes, with fluorescence consistently higher in normal tissue. (b) Receiver operating characteristic (ROC) curve obtained by grouping all tumor spectra versus normal brain, using endogenous fluorescence intensity as the classifier variable. The optimal operating point (upper-left corner of the ROC curve) yielded a positive predictive value (PPV) of 85–88% for tumor detection and a negative predictive value (NPV) of 96% for normal brain, confirming the discriminative power of endogenous fluorescence as a label-free biomarker *in vivo*.

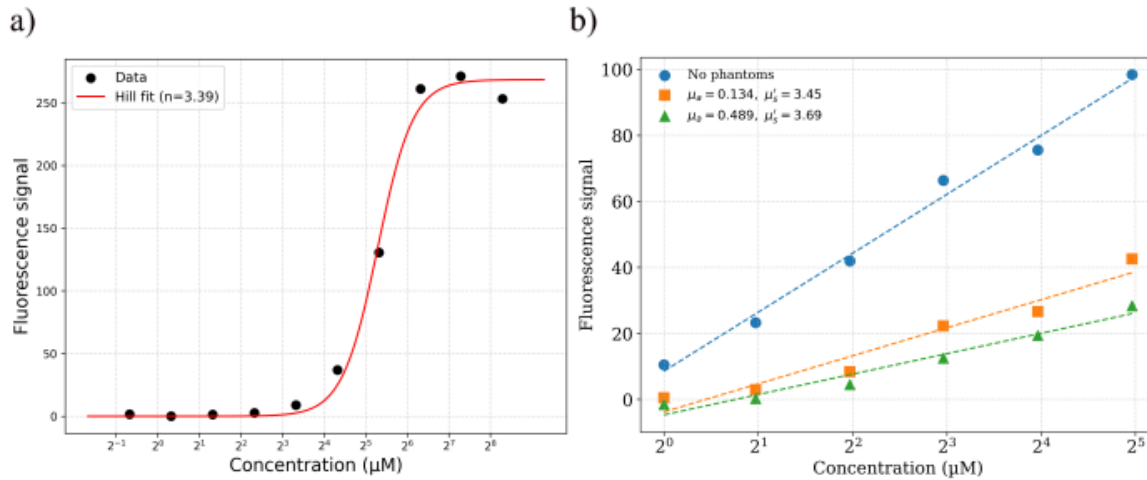


Figure 4.2 Validation of fluorescence detection performance using dilution experiments with inorganic near-infrared dyes. (a) Fluorescence intensity of Cy7.5 solutions serially diluted in MilliQ water, demonstrating linearity of signal response across concentrations until fluorescence quenching occurs at higher concentrations. The detection noise floor corresponds to approximately 6 μM . (b) Fluorescence intensity of indocyanine green (ICG) solutions prepared in intralipid with an absorption dye to simulate varying optical properties. Three distinct optical conditions were tested, each exhibiting linear fluorescence response across the measured range with a detection limit near 2 μM . These results confirm the imaging system’s quantitative response and sensitivity under diverse scattering and absorption conditions.

System validation with exogenous fluorophores

The sensitivity and linearity of the wide-field imaging system were first validated using near-infrared fluorophores as references (**Figure 4.2**). Serial dilutions of Cyanine 7.5-amine (Cy7.5) produced a linear fluorescence response ranging several orders of magnitude, with signal quenching observed at higher concentrations ($> 0.3 \text{ mM}$) and a detection noise floor near 6 μM (**Figure 4.2a**). The quenching behavior is consistent with concentration-dependent π stacking and H aggregation of cyanine dyes in aqueous environments. Based on the Cy7.5 calibration, optimal working concentrations were determined for indocyanine green (ICG) and placed under PDMS phantoms containing ink and TiO_2 to mimic tissue optical properties. Data analysis showed linear signal response under three scattering/absorption conditions, with a testing detection depth of 2 mm (**Figure 4.2b**). These experiments confirm that the imaging channel exhibits linear,

quantitative behavior and sufficient sensitivity to detect weak NIR fluorescence signals under variable optical conditions.

Ex vivo imaging of human brain tumor specimens

Figure 4.3 illustrates representative *ex vivo* images from specimen 3 of patient 14 (glioblastoma). The raw fluorescence image (**Figure 4.3a**) reveals regional contrast corresponding to histologically distinct zones. Diffuse reflectance at 808 nm (**Figure 4.3b**) captures spatial variations in illumination and surface geometry, particularly near edges. The ratiometric fluorescence-to-reflectance image (**Figure 4.3c**) highlights reduced fluorescence intensity in tumor regions relative to surrounding normal tissue. Comparison with the gross photograph (**Figure 4.3e**) and the corresponding H&E histology (**Figure 4.3d**) confirms spatial alignment between areas of diminished fluorescence and tumor infiltration identified by pathology. These qualitative findings are consistent with the *in vivo* Raman results, reinforcing that endogenous fluorescence decreases in malignant tissue.

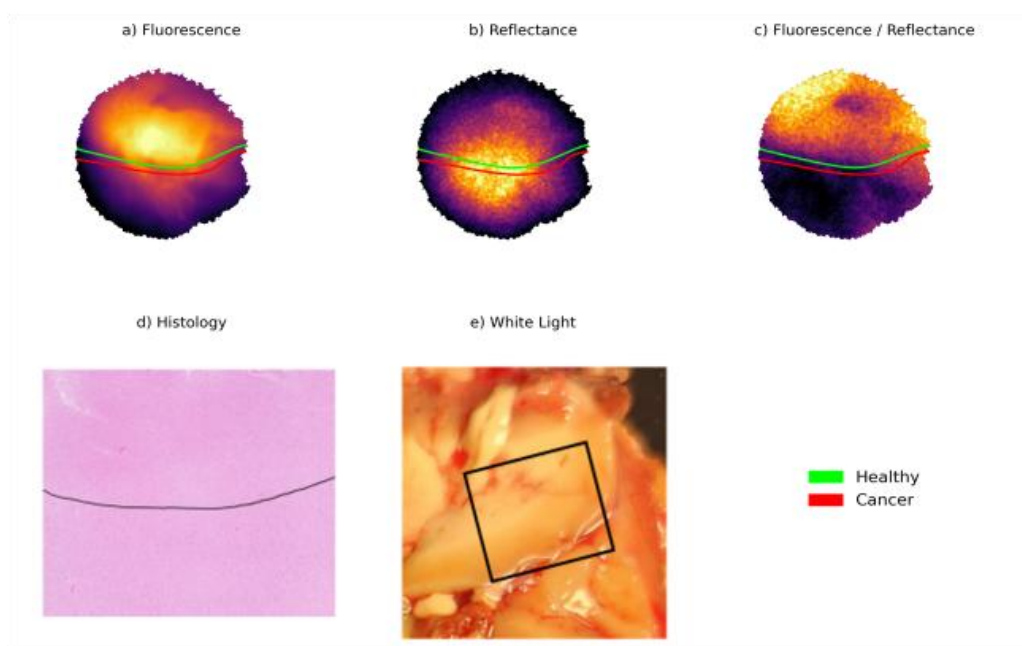


Figure 4.3 Representative *ex vivo* images acquired from specimen 3 of patient 14 (glioblastoma) using the wide-field near-infrared fluorescence and reflectance imaging system. Panels show: (a) raw fluorescence image acquired under 808 nm excitation through the 850 nm long-pass filter; (b) corresponding diffuse reflectance image at 808 nm; (c) ratiometric fluorescence map obtained by dividing the fluorescence image by the normalized reflectance

image, isolating intrinsic fluorescence contrast; (d) corresponding hematoxylin and eosin (H&E) histology section showing the spatial distribution of tumor and normal brain regions; and (e) gross photograph of the specimen surface after imaging. The ratiometric fluorescence image highlights reduced endogenous fluorescence intensity in tumor regions relative to surrounding normal tissue, consistent with the *in vivo* findings.

Boxplots summarizing pixel intensity distributions for tumor and normal regions from the same specimen are shown in **Figure 4.4**. While reflectance correction slightly reduces absolute contrast, it improves signal uniformity and mitigates the influence of uneven illumination or surface curvature. The two main imaging parameters, raw fluorescence and fluorescence/reflectance, show statistically significant differences between tumor and normal tissue across samples containing both tissue types in the field of view (paired t-test, $p < 0.01$ for raw fluorescence and $p < 0.05$ for reflectance-corrected fluorescence). Paired t-tests were performed by comparing the mean intensity of each tumor–normal pair within a specimen. Non-parametric tests (Wilcoxon) were also considered to illustrate the direction of the effect ($W = 0$, tumor < normal), but the test is limited by the small sample size ($n = 5$), which constrains the minimum achievable p-value. These results demonstrate that both raw and normalized fluorescence metrics reliably distinguish tumor from normal brain within a single specimen.

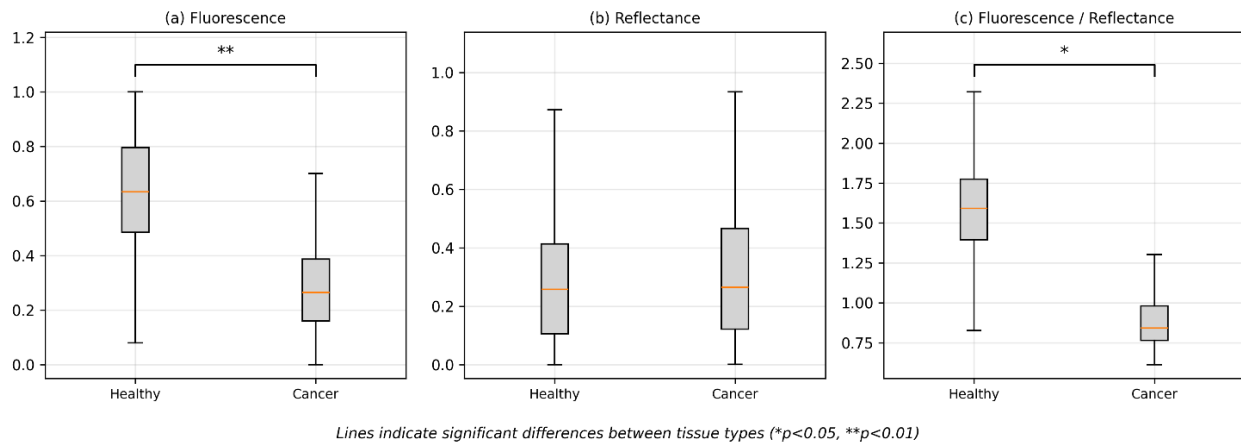


Figure 4.4 Quantitative analysis of optical signals from specimen 3 of patient 14 (glioblastoma) corresponding to the images shown in Figure 1. Boxplots display the distribution, median, interquartile range, and outliers for regions histologically classified as tumor and normal brain. Panels show: (a) raw fluorescence intensity, (b) raw reflectance intensity, and (c) fluorescence normalized by reflectance (F/R). p-values from paired t-tests are indicated on each

plot, demonstrating statistically significant differences between tumor and normal tissue across all normalization methods ($p < 0.05$).

Evaluation of normalization strategy in normal brain tissue

To assess the normalization procedure in samples without pathology-related contrast, we analyzed specimens classified entirely as normal brain (Figure 4.5). Three regions of interest (ROIs A-C) were selected from different areas of a single specimen. Raw fluorescence and reflectance images exhibited modest spatial variations caused by illumination profile and sample curvature. Normalization using reflectance substantially reduced these gradients, resulting in homogeneous fluorescence-to-reflectance maps across all ROIs. This confirms that the ratiometric correction effectively compensates for spatial heterogeneities in excitation and collection geometry, providing a more uniform signal baseline for comparison across specimens.

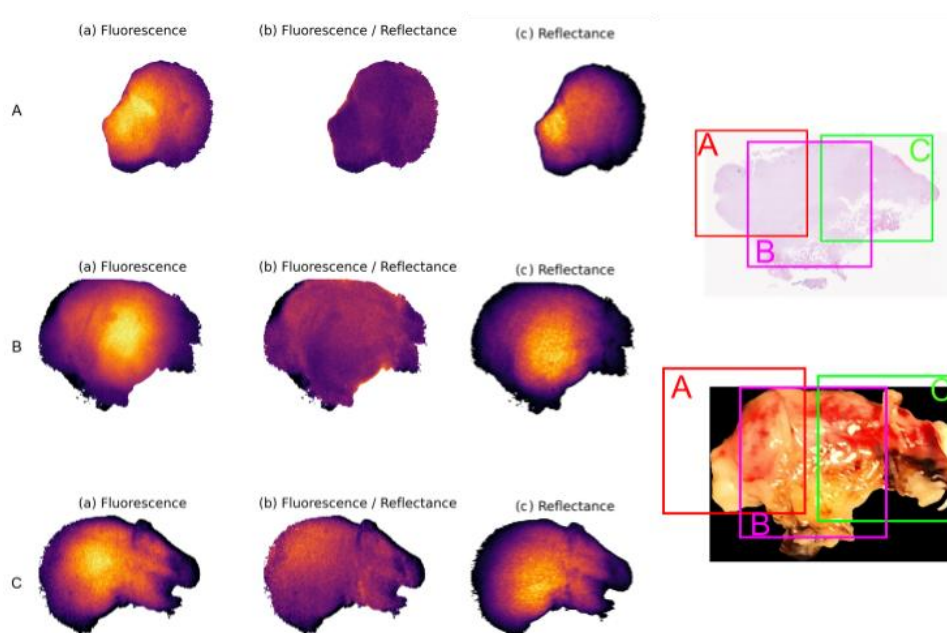


Figure 4.5 Demonstration of illumination and geometry normalization using fluorescence-to-reflectance ratios in a specimen histologically confirmed as normal brain tissue. The right panels show the gross photograph and corresponding hematoxylin and eosin (H&E) histology image, with colored squares indicating the locations of three regions of interest (ROIs) (A–C). For each ROI, five image modalities are displayed: (a) raw fluorescence; (b) fluorescence normalized by reflectance; and (c) raw reflectance. Rows correspond to ROI A (top), ROI B (middle), and ROI C (bottom). Despite visible heterogeneities in the raw fluorescence and reflectance signals caused

by surface height variations and optical property differences, the fluorescence-to-reflectance normalization yields a spatially homogeneous signal across all regions, demonstrating the effectiveness of ratiometric correction in compensating for illumination non-uniformity and surface geometry effects.

Aggregate statistical analysis across all ex vivo specimens

To illustrate the imaging performance of the system, **Figure 4.3** presented a representative example of *ex vivo* imaging results obtained from one glioblastoma specimen, showing fluorescence, reflectance, and normalized maps alongside the corresponding histology. For clarity and space considerations, representative images for all imaged specimens are provided in **Supplementary Figure 4.7**. The specimen shown in **Figure 4.3** was selected because it best demonstrates the expected contrast trends between normal brain and bulk tumor regions, consistent with the overall dataset. In other specimens, the visual distinction between tissue types was sometimes less pronounced. Nevertheless, when aggregating data from all patients and specimens (**Figure 4.6**), statistically significant differences were observed between normal brain, tumor, necrotic, and blood-containing regions, confirming that the trends illustrated in the representative example are consistent across the full dataset.

To assess global trends, all imaged pixels from all patients were pooled and classified according to the neuropathologists' annotations in **Table 4.1** as normal brain, tumor, necrosis, or blood. Boxplots for each imaging parameter are shown in **Figure 4.6**. Normal brain consistently exhibited higher fluorescence intensity than tumor and necrotic regions across all modalities ($p < 0.05$, mixed-effects ANOVA). Normalization using reflectance reduced inter-sample variability while preserving statistically significant differences between tissue classes. Necrotic regions displayed an initial high signal in both reflectance and fluorescence images, which could correlate with lower tissue absorption. After reflectance correction, the tendency reversed, and necrosis showed the lowest signal, related to further disrupted cells. Blood-containing regions displayed the lowest reflectance, consistent with strong absorption at 808 nm. These findings corroborate the *in vivo* observations and confirm that endogenous NIR fluorescence provides intrinsic contrast between healthy and pathological brain tissue *ex vivo*.

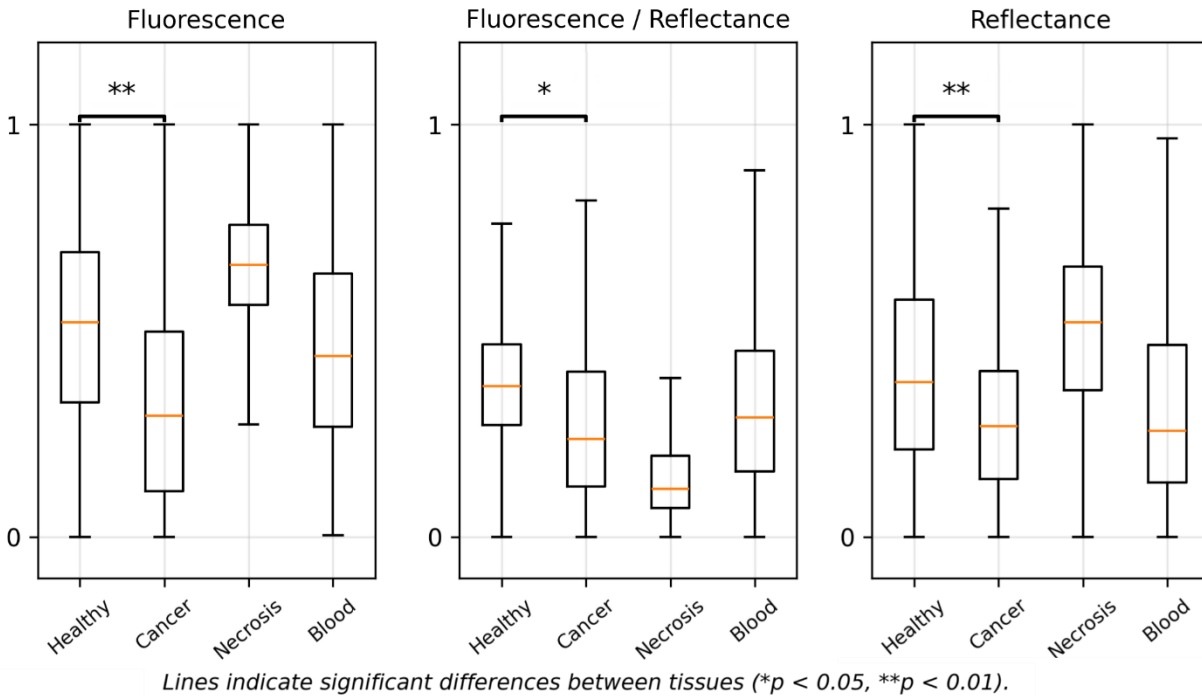


Figure 4.6 Quantitative analysis of *ex vivo* endogenous fluorescence and reflectance signals across all imaged specimens, grouped by histopathological classification. All pixels from the dataset were pooled and categorized as normal brain, tumor (glioblastoma and astrocytoma combined), necrosis, or blood, based on the neuropathologist’s assessment (see Table 1). Boxplots display the distribution, median, interquartile range, and outliers for each tissue class across five imaging-derived parameters: (a) raw fluorescence intensity, (b) fluorescence normalized by reflectance, and (c) raw reflectance intensity. p -values from mixed-effects ANOVA tests are indicated on each plot, demonstrating statistically significant differences ($p < 0.05$) between normal brain and tumor tissue across all modalities.

4.2.5 Discussion

This study investigated whether NIR endogenous fluorescence can serve as a label-free optical marker to distinguish tumor from normal brain tissue, using both *in vivo* point-based spectroscopy measurements and *ex vivo* wide-field imaging. Together, these results demonstrate that endogenous fluorescence, whether extracted from the broadband background of Raman spectra or captured directly through imaging, provides consistent contrast between tumor and normal brain. The findings establish a foundation for future development of real-time intraoperative imaging tools.

In vivo Raman measurements revealed that the broadband fluorescence background underlying the Raman signal was consistently higher in normal brain than in tumor for both glioblastoma and astrocytoma. The resulting positive and negative predictive values (85-88% and 96%, respectively) suggest that endogenous fluorescence may serve as a sensitive marker for tumor detection. However, because these single-point measurements were obtained from bulk tumor regions corresponding to T1 contrast-enhancing zones, no conclusion can be drawn regarding the invasive margins, where previous Raman spectroscopy studies demonstrated sensitivity to molecular infiltration signatures[26, 46]. Instead, the present fluorescence data suggest that endogenous emission may act as a bulk tumor marker, analogous in spatial specificity to contrast-enhancing MRI.

The *in vivo* Raman-based measurements were performed in contact mode, which eliminates certain optical artifacts, such as illumination inhomogeneity and surface curvature, that affect imaging systems. However, these single-point fluorescence intensities were not normalized for absorption or scattering. As a result, the measured fluorescence represents a compound index influenced by both intrinsic fluorophore concentration and tissue optical attenuation. The consistency across multiple patients, despite this limitation, indicates that even this mixed signal reflects the structural and metabolic differences between normal and malignant tissue and contains diagnostically significant information.

Unlike contact Raman measurements, wide-field fluorescence imaging is highly sensitive to illumination and geometric heterogeneities. To address this, the present imaging system implemented a reflectance-based normalization strategy. Our approach is based on the methodology proposed in previous work by Valdés et al., where reflectance-based normalization is used to bring fluorescence measurements closer to a corrected representation of tissue response. The goal of this method is not to retrieve absolute fluorescence intensity values, but rather to obtain a normalized metric that better reflects relative signal variations across tissue regions. By dividing the fluorescence image by the co-registered reflectance image acquired at the excitation wavelength, the approach at least partially compensates for variations in excitation intensity, sample curvature, and local optical properties. The corrected ratios are computed prior to any subtraction-based processing steps (such as background subtraction or normalization procedures involving subtraction), which can affect both numerator and denominator differently, potentially leading to over- or under-correction. In contrast, multiplicative factors under identical acquisition

parameters only rescale the ratio image globally, without altering its spatial structure or relative contrast. The results demonstrated that normalization by reflectance produced spatially homogeneous fluorescence maps for tissue regions with uniform composition. The fluorescence-to-reflectance ratio produced more interpretable contrast than raw fluorescence. This finding highlights the importance of considering for both illumination geometry and intrinsic tissue optics when quantifying fluorescence. Residual edge effects remained in samples smaller than the field of view or with pronounced curvature, reflecting limitations in the optical depth of field. Nonetheless, the ratiometric correction significantly reduced variability and improved correspondence between fluorescence maps and histologically defined regions.

Differences in physiological state between *in vivo* and *ex vivo* tissue are expected to influence fluorescence contrast. Following surgical resection, loss of perfusion and oxygenation alters hemoglobin absorption and scattering[47], while reduced metabolic activity might slightly lower levels of endogenous fluorophores such as NADH and flavins[48]. These changes likely contribute, in part, to the reduced absolute fluorescence and smaller tumor-to-normal contrast observed *ex vivo* compared with *in vivo* measurements. Despite these shifts, the directionality of contrast remained consistent: normal brain exhibited higher fluorescence than tumor in both datasets. This stability suggests that at least part of the observed fluorescence contrast arises from fundamental biochemical and metabolic differences, not from transient hemodynamic effects alone.

The mechanisms underlying endogenous NIR fluorescence contrast between tumor and normal brain likely reflect differences in tissue composition and metabolic state. Autofluorescence in the NIR region appears to arise primarily from porphyrins and lipopigments, with minor contributions from structural proteins such as collagen, while weak emission from metabolic cofactors like NADH and FAD contributes minimally[49]. In normal brain cells, higher oxidative metabolism and intact mitochondrial function may indirectly influence fluorescence through the abundance of certain fluorophores, potentially contributing to stronger NIR emission. In contrast, malignant regions, particularly glioblastomas, exhibit necrosis and hypoxia, which reduce NIR fluorescence primarily through loss of intact fluorophores, tissue structural changes, and increased absorption by blood[50, 51]. Metabolic reprogramming (Warburg effect) alters NADH and FAD levels, which contribute less to NIR autofluorescence than porphyrins and lipopigments, though they may still exert minor effects on this spectral region[51]. The lower fluorescence observed in necrotic and blood-contaminated regions is therefore consistent with structural and optical attenuation. Thus,

the reduced fluorescence signal in tumors likely reflects a combination of altered fluorophore content, tissue structure, and optical properties, which align with the histopathological characteristics of malignant tissue.

This work has several limitations. The *ex vivo* study included a limited number of patient specimens and tumor types, and no direct intraoperative wide-field measurements were performed. The delay between resection and imaging may have introduced metabolic and optical changes. The *in vivo* fluorescence data derived from Raman spectra were not normalized for scattering or absorption, preventing quantitative cross-comparison with imaging results. Nevertheless, the overall consistency between the *in vivo* and *ex vivo* datasets demonstrate the robustness of the fluorescence contrast. Future research will concentrate on implementing real-time reflectance normalization within the Raman probe and adapting the wide-field system to intraoperative imaging in living tissue. Correlation with metabolic and perfusion MRI, as well as with exogenous fluorescence-guided surgery techniques (e.g., 5-ALA), could further clarify the biological mechanisms of the observed contrast. Larger patient cohorts and inclusion of infiltrative tumor margins will be essential to assess sensitivity to invasion and to optimize the technology for clinical translation.

4.2.6 Conclusion

Endogenous near-infrared fluorescence measured either from point-based Raman spectra or through wide-field imaging could provide robust, label-free contrast between normal and tumor brain tissue. While *in vivo* fluorescence primarily reflects a compound optical index influenced by tissue attenuation, reflectance-normalized fluorescence imaging gives a reliable, spatially uniform metric sensitive to intrinsic biochemical differences. These findings indicate that endogenous NIR fluorescence could serve as a bulk tumor marker, complementing contrast-enhanced MRI and potentially guiding real-time surgical decision-making without the need for exogenous agents.

4.2.7 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).

An AI-based large language model (LLM; OpenAI ChatGPT) was used during early stages of manuscript preparation to assist with language refinement, formatting consistency, and improvement of grammar and readability. The LLM was not used to generate new scientific content, perform data analysis, or propose original ideas. All scientific content, interpretations, and conclusions were conceived and written by the authors. The complete manuscript was critically reviewed, edited, and approved by all authors prior to submission.

4.2.8 Conflict of interest

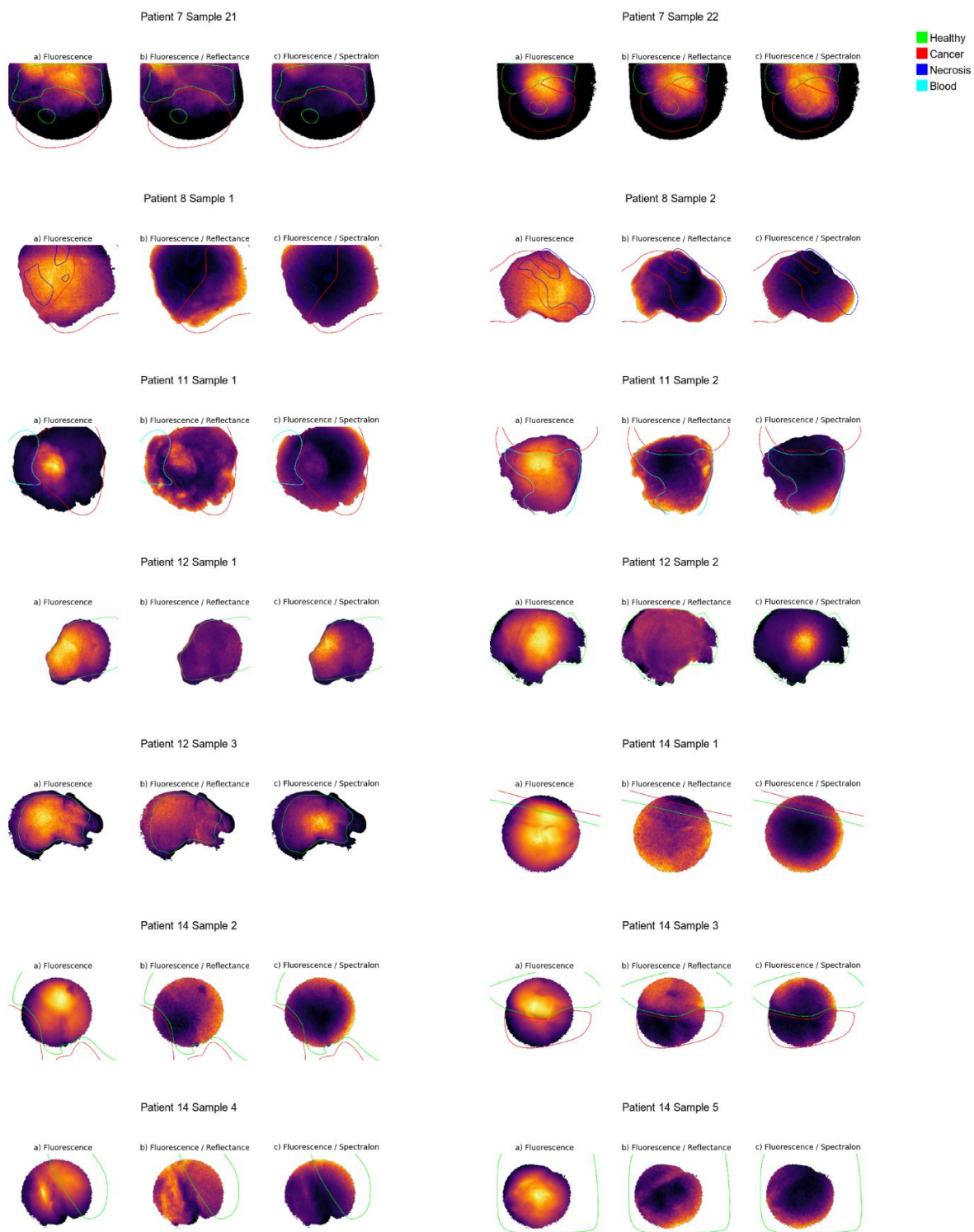
No conflict of interest to disclose.

4.2.9 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.

4.2.10 Supplementary Material:

Figure 4.7 The *ex vivo* image panels acquired from all patients using the wide-field near-infrared fluorescence and reflectance imaging system. Panels show: (a) raw fluorescence image acquired under 808 nm excitation through the 850 nm long-pass filter; (b) corresponding diffuse reflectance image at 808 nm; (c) reflectance image normalized by the illumination profile obtained from a Spectralon standard, illustrating spatial correction for non-uniform excitation. The differences illustrated in this figure may appear less pronounced for some samples than for the one shown as a representative example. Nevertheless, all images were included in the statistical analysis. Specifically, all available samples were used in the mixed ANOVA, and the five samples containing both tumor and healthy tissue were considered in the paired t-test.



CHAPITRE 5 DISCUSSION

À la suite de la présentation du système sous ses différentes configurations, ce chapitre commence avec un retour sur les objectifs initiaux du projet. Il fait un retour sur chaque partie du projet et ses sections de résultats. Puis finalement, il présente les principaux défis rencontrés, comment ils ont été rencontrés et surmontés.

5.1 Retour sur les objectifs

Le premier objectif était de développer un système d'imagerie proche infrarouge grand champ pour la collecte rapide d'échantillons de cancer de quelques centimètres. Nous avons réussi cet objectif en fabriquant un système dans au moins un des deux modes d'illumination que nous avons établis. La modalité de fluorescence à 808nm a réussi à prendre des images grand champ de fluorescence et s'est rendu jusqu'à l'acquisition d'images d'échantillons du cancer dans les dimensions désirées. Cependant les mesures ont été prises à la surface d'échantillons extraits, et seulement les mesures de fluorophores exogènes ont été faites à travers des surfaces absorbantes servant à tester la capacité d'imager en profondeur. L'hypothèse de la capacité de l'infrarouge d'imager en profondeur de manière non invasive n'a donc pas été totalement vérifiée. Le système a toutefois réussi à imager à travers des petites profondeurs de fantôme optique imitant les propriétés des tissus. Les mesures sur le cerveau ont présenté des zones d'intensité qui laisse croire que le signal endogène ne provenait pas seulement de la surface.

Le second objectif était d'atteindre une seconde modalité permettant la détection de CNTs en fluorescence et en spectroscopie Raman. Cet objectif n'a pas été atteint puisque les expériences de fluorescence n'ont pas utilisé de CNTs et que la méthode multispectrale n'a pas atteint l'étape des expérimentations suite à des problèmes pendant la vérification des filtres. Cependant, nous avons testé avec succès l'utilisation du fluorophore permettant l'attachement avec des CNTs qui a aussi été effectuée. De plus, les pics principaux des CNTs ont bien été détectés avec le système de microscopie Raman. Rien ne laisse donc croire que leur détection n'aurait pas pu être effectuée avec un système possédant les bonnes combinaisons d'optique.

Finalement, l'objectif principal du projet était de développer une plateforme d'imagerie pour la détection du cancer et d'agents de ciblage moléculaires. Quoique seulement en fluorescence, le

système a démontré pouvoir détecter des variations d'intensité pour les zones cancéreuses et il a détecté un fluorophore exogène en profondeur.

Le projet a permis de combiner plusieurs approches d'imagerie grand champ appliquées au cancer, incluant des méthodes endogènes et exogènes, ainsi que des techniques basées sur la diffusion Raman et la fluorescence. Il intègre également des traitements d'image fondés sur la réflectance et une approche d'imagerie Raman multispectrale. Chacun de ces axes constitue, à lui seul, un projet pouvant justifier des développements approfondis afin d'exploiter pleinement les avantages spécifiques de chaque méthode.

Les résultats obtenus à partir de la fluorescence endogène des tissus de cancers cérébraux suggèrent une technologie facile à implémenter et encore peu exploitée dans le proche infrarouge. Ces observations invitent également à reconsidérer les approches basées sur les sondes Raman, dans lesquelles le signal de fluorescence est habituellement soustrait, alors qu'il pourrait être exploité de manière complémentaire afin d'enrichir l'information diagnostique.

L'imagerie multispectrale, quant à elle, demeure en théorie une méthode efficace pour l'imagerie grand champ. Elle pourrait tirer parti de l'intensité des signaux associés aux nanotubes de carbone, tout en étant potentiellement adaptée à des approches sans agent de ciblage, en exploitant plutôt des signaux endogènes à l'aide de dispositifs hyperspectraux. Cette perspective ouvre la voie à des développements futurs visant à concilier sensibilité, spécificité et applicabilité clinique.

5.2 Avantages et désavantages du système obtenu

En développant ce système en épi-illumination, nous avons pu obtenir une configuration compacte offrant une illumination uniforme des échantillons et un alignement naturel entre la zone éclairée et la zone observée. Les pertes de signal liées à cette méthode, même si diminuées par la solution obtenue, sont importantes mais facilement balancées par la fiabilité des images qui correspondent au profil d'illumination, plutôt que d'obtenir des zones d'ombre liées à l'angle entre les trajets optiques sur des échantillons qui ne sont, dans la majorité des cas, pas parfaitement plats. Ces pertes peuvent nécessiter l'utilisation d'un temps d'acquisition plus élevé. Avec des accumulations de 30 secondes, le système reste relativement rapide et la méthode est restée conservatrice en tentant d'assurer un bon retrait de l'information en ajoutant du signal, donc le temps d'acquisition n'est pas à son minimum et l'intensité du laser divergent peut être presque doublée sans dépasser le seuil d'exposition maximum permissible.

La méthode utilisée permet un système d'apparence simple qui peut facilement être intégré dans différents environnements de travail, comme le milieu clinique, tout en assurant la constance du système après déplacement. Le produit final a pu intégrer une nouvelle méthode de correction du signal par les propriétés optiques des tissus tout en éliminant simplement les réflexions spéculaires, qui sont à la fois parasites pour le signal de fluorescence et pour la méthode de correction par réflectance.

Malgré certains objectifs qui n'ont pas atteint leur plein potentiel, le système a l'avantage de posséder une configuration qui permet des changements simples et rapides entre ses modalités d'illumination. L'utilisation globale du système, sa mise en fonction, son démarrage d'acquisition et la transition entre ses modalités ne nécessite que quelques interactions simples. Son utilisation est sécuritaire quant à l'emploi des lasers et la grandeur du champ de vue ne demande pas un alignement rigoureux pour imager une zone particulière.

5.3 Défis rencontrés

Le premier défi auquel la conception du système devait faire face était la gestion de deux sources d'illumination distinctes sans perte trop significative de signal. Dès le début, nous aurions pu partir avec un système classique d'épi-illumination avec l'ajout d'un deuxième séparateur de faisceau, mais, comme nous avons vu, cela aurait donné un système avec énormément de perte avant d'atteindre l'échantillon. En fin de compte, en naviguant les options, celle du séparateur de faisceau est arrivée à la fois comme solution idéale pour les différentes longueurs d'onde mais aussi une méthode avantageuse pour l'ajout d'une méthode de correction intéressante. Le défi restait, malgré tout, de trouver l'ordre et le positionnement des composantes optimales parmi beaucoup de possibilités. Le résultat final perd tout de même beaucoup de signal, mais les résultats ont surmonté ce problème. Le système pourrait encore être amélioré en utilisant une seule entrée d'épi-illumination avec un système de rotation des lasers semblable aux roues de filtres qui passent d'une modalité à l'autre. La différence de perte serait présente mais pas énormément différente, puisque le deuxième polariseur ne perd qu'environ 5% d'intensité supplémentaire lors de la transmission.

L'un des défis mineurs rencontrés fut lors des premiers cas au bloc opératoire. Le système possédait une quantité de signal de fuite importante. La situation a facilement été réglée avec l'agent de densité optique à la longueur d'onde d'excitation. Cependant, les premiers cas n'ont pas pu servir pour les données présentées. Cela représente du temps perdu mais aussi de l'information pertinente

perdue, ce qui a eu pour effet de diminuer le nombre de cas et l'impact des résultats en termes de signification statistique.

Le premier problème fut, quant à lui, directement relié au dysfonctionnement de la partie multispectrale. Ce problème n'a pas été complètement surmonté, mais il n'a pas empêché le succès de l'autre partie du système. L'analyse de la situation a toutefois permis d'identifier la qualité d'imagerie des filtres comme source d'erreur. Ceci permet de garder la méthode multispectrale comme une option pertinente à investiguer davantage pour ce type d'application.

Le défi principal a été rencontré lors du traitement de données en autofluorescence qui ont mené à l'article. Le protocole de préparation des échantillons prévoyait des moyens de marquage pour identifier l'orientation des échantillons. Cependant, l'encre n'apparaissait pas souvent sur les scans d'histologie, ce qui rendait la corroboration des résultats difficile avec les images grand champ obtenues. Malgré les photos prises, les changements d'application de l'encre et les recherches de solutions avec le département d'histologie, la solution optimale fut de découper les échantillons de façon à obtenir des contours ou sections facilement reconnaissables pour faire correspondre les images avec les scans. Ce problème n'affecte pas l'efficacité ou la qualité du système obtenu mais a créé un problème important dans l'évaluation des résultats pour qualifier la réussite du système.

5.4 Contributions

Cette section détaille les contributions de l'auteur aux différentes étapes du projet, incluant la conception du système, la préparation des expériences, l'acquisition et le traitement des données, ainsi que la rédaction et la présentation du mémoire et de l'article.

D'abord, le système a été entièrement conçu par l'auteur. À l'exception du choix initial de la caméra, les composantes ont été sélectionnées et commandées par celui-ci. Les calculs ainsi que les décisions concernant les dimensions et le positionnement des éléments ont également été réalisés par l'auteur.

Le matériel utilisé pour les expérimentations a nécessité des collaborations externes. Les fluorophores, les nanoparticules et les cellules de cancer de la prostate cultivées en laboratoire ont été fournis par un doctorant d'un laboratoire partenaire, qui a également apporté son soutien pour leur manipulation. Les fantômes de PDMS ont été fabriqués et mesurés par l'auteur sous les

conseils d'un collègue de laboratoire. Les échantillons et le matériel chirurgical humain ont été fournis par l'équipe opératoire du MNI.

Les acquisitions en fluorescence exogène et endogène ainsi qu'en spectroscopie Raman ont été réalisées par l'auteur, de même que la préparation des échantillons (mise en formaline, encrage et envoi au département d'histologie). L'ensemble des données a été traité par l'auteur, à l'exception de la figure liée à la fluorescence endogène issue des sondes Raman, présentée en Figure 4.1 de l'article. Ce travail inclut le traitement d'image, l'analyse des résultats et les analyses statistiques.

Enfin, l'article a été rédigé par l'auteur principal, puis bonifié par le dernier auteur, avec quelques ajustements de formulation effectués à l'aide d'un modèle de langage basé sur l'intelligence artificielle (LLM). Les figures ont été générées à l'aide de scripts Python, tandis que les schémas ont été réalisés par l'auteur avec Inkscape et BioRender.

CHAPITRE 6 CONCLUSION

En somme, ce mémoire démontre l'utilité du proche infrarouge en imagerie grand champ pour le domaine biomédical. Nous avons obtenu un système capable de capturer des images de 2 cm² d'échantillons avec différentes modalités. Le système a démontré, par les images de tumeurs cérébrales, la capacité du NIR à différencier l'état de tissus biologiques grâce à la fluorescence endogène. Avec l'imagerie par réflectance, il a également mis en évidence l'effet d'une méthode de correction de l'illumination et des coefficients optiques des tissus. Dans une perspective de travaux futurs, il serait pertinent d'augmenter le nombre d'échantillons provenant de patients différents afin d'améliorer la significativité statistique des résultats. Une telle augmentation de la cohorte permettrait également de disposer d'un ensemble de données suffisant pour explorer la variabilité des réponses selon différents types de tumeurs cérébrales, notamment les astrocytomes, les glioblastomes et les métastases.

Bien que nous n'ayons pas directement imagé des CNTs avec ce montage, nous avons présenté leur forte intensité de détection en diffusion Raman et proposé une alternative par la détection de fluorophores exogènes liés à un agent de ciblage tumoral. En plus d'illustrer l'étendue des options offertes par le NIR, cette seconde approche a permis de montrer la dépendance de l'intensité de fluorescence de produits exogènes à travers une surface d'environ 2 mm d'épaisseur imitant les propriétés optiques du cancer du cerveau. Cette section a permis de présenter les contraintes associées à l'application d'une nouvelle méthode d'imagerie multispectrale pouvant mener à une technologie Raman capable de détecter la présence de cancer.

Pour le développement futur d'une plateforme multimodale utilisant différentes longueurs d'onde, l'utilisation de deux lasers partageant les mêmes guides de lumière est suggérée. Cette approche permettrait un contrôle uniformisé des faisceaux à travers une seule entrée d'épi-illumination, avec la possibilité d'alterner facilement entre les sources. Cela aurait pour effet de diminuer légèrement les pertes, mais surtout de simplifier l'architecture du système et le contrôle du profil d'illumination.

Pour les recherches liées à la méthode multispectrale présentée, la recommandation principale concerne la qualité des filtres utilisés. De bons filtres peuvent être coûteux, mais puisque le signal recherché est très faible, il est impératif d'obtenir un filtrage uniforme selon l'axe des filtres. Cela

est d'autant plus essentiel en imagerie grand champ, où la qualité optique influe directement sur la netteté des images.

RÉFÉRENCES

1. Canada, S., *Statistiques canadiennes sur le cancer 2025*. 2025: Toronto (Ontario).
2. Leslie, S.W., et al., *Prostate Cancer*, in *StatPearls*. 2024, StatPearls Publishing
Copyright © 2024, StatPearls Publishing LLC.: Treasure Island (FL).
3. Lara-Velazquez, M., et al., *Advances in Brain Tumor Surgery for Glioblastoma in Adults*. Brain Sciences, 2017. **7**(12): p. 166.
4. Smith Jr, J.A., *Principles of open radical prostatectomy: Applied to Robotic-assisted laparoscopic prostatectomy*, in *Robotics in Urologic Surgery*. 2008, Elsevier. p. 69-78.
5. Patel, V. and V. Chavda, *Intraoperative glioblastoma surgery-current challenges and clinical trials: An update*. Cancer Pathog Ther, 2024. **2**(4): p. 256-267.
6. Mondal, S.B., et al., *Real-time fluorescence image-guided oncologic surgery*. Adv Cancer Res, 2014. **124**: p. 171-211.
7. Price, S.J., et al., *Precision Surgery for Glioblastomas*. J Pers Med, 2025. **15**(3).
8. Keereweer, S., et al., *Optical Image-Guided Cancer Surgery: Challenges and Limitations*. Clinical Cancer Research, 2013. **19**(14): p. 3745-3754.
9. Chow, J.C., *Application of nanomaterials in biomedical imaging and cancer therapy*. 2022, MDPI. p. 726.
10. McNamara, K. and S.A.M. Tofail, *Nanoparticles in biomedical applications*. Advances in Physics: X, 2017. **2**(1): p. 54-88.
11. Croce, A.C. and G. Bottiroli, *Autofluorescence spectroscopy and imaging: a tool for biomedical research and diagnosis*. Eur J Histochem, 2014. **58**(4): p. 2461.
12. Selényi, P., *Wide-Angle Interferences and the Nature of the Elementary Light Sources*. Physical Review, 1939. **56**(5): p. 477-479.
13. Tipirneni, K.E., et al., *Fluorescence Imaging for Cancer Screening and Surveillance*. Molecular Imaging and Biology, 2017. **19**(5): p. 645-655.
14. 郭, 馨., et al., *Progress of fluorescence imaging in lymph node dissection surgery for prostate and bladder cancer*. Frontiers in Oncology, 2024. **14**.

15. Masannat, Y., et al., *Properties and characteristics of the dyes injected to assist axillary sentinel node localization in breast surgery*. European Journal of Surgical Oncology (EJSO), 2006. **32**(4): p. 381-384.
16. Ganzer, R., et al., *Intraoperative Photodynamic Evaluation of Surgical Margins During Endoscopic Extraperitoneal Radical Prostatectomy with the Use of 5-Aminolevulinic Acid*. Journal of Endourology, 2009. **23**(9): p. 1387-1394.
17. Cai, Y., et al., *Optical nano-agents in the second near-infrared window for biomedical applications*. Chem Soc Rev, 2019. **48**(1): p. 22-37.
18. Leblond, F., et al., *Quantitative assessment of the generalizability of a brain tumor Raman spectroscopy machine learning model to various tumor types including astrocytoma and oligodendroglioma*. J Biomed Opt, 2025. **30**(1): p. 010501.
19. Ember, K., et al., *In situ brain tumor detection using a Raman spectroscopy system—results of a multicenter study*. Scientific Reports, 2024. **14**(1): p. 13309.
20. Vandenabeele, P., *Practical Raman spectroscopy : an introduction*. 2013, Wiley: Chichester, West Sussex, United Kingdom.
21. Crichton, R., *Chapter 6 - Methods to Study Metals in Biological Systems*, in *Biological Inorganic Chemistry (Third Edition)*, R. Crichton, Editor. 2019, Academic Press. p. 149-169.
22. Kar, S., et al., *Label-free discrimination of tumorigenesis stages using in vitro prostate cancer bone metastasis model by Raman imaging*. Scientific Reports, 2022. **12**(1): p. 8050.
23. *Sources of Electromagnetic Radiation*, in *The Raman Effect*. 2002. p. 555-564.
24. Hang, Y., J. Boryczka, and N. Wu, *Visible-light and near-infrared fluorescence and surface-enhanced Raman scattering point-of-care sensing and bio-imaging: a review*. Chem Soc Rev, 2022. **51**(1): p. 329-375.
25. Gooz, M. and E.N. Maldonado, *Fluorescence microscopy imaging of mitochondrial metabolism in cancer cells*. Frontiers in Oncology, 2023. **Volume 13 - 2023**.
26. Jermyn, M., et al., *Intraoperative brain cancer detection with Raman spectroscopy in humans*. Sci Transl Med, 2015. **7**(274): p. 274ra19.

27. Daoust, F., et al., *Preliminary study demonstrating cancer cells detection at the margins of whole glioblastoma specimens with Raman spectroscopy imaging*. Scientific Reports, 2025. **15**(1): p. 6453.
28. David, S., et al., *Toward noncontact macroscopic imaging of multiple cancers using multi-spectral inelastic scattering detection*. Journal of Biophotonics, 2024. **17**(9): p. e202400087.
29. Institute, A.N.S. *ANSI Z136.1: Safe Use of Lasers*. 2014; Available from: <https://www.ansi.org/>.
30. Institute, A.N.S. *ANSI Z136.3: Safe Use of Lasers in Health Care*. 2014; Available from: <https://www.ansi.org/>.
31. Dresselhaus, M.S., et al., *Raman spectroscopy of carbon nanotubes*. Physics Reports, 2005. **409**(2): p. 47-99.
32. Brown, T.J., et al., *Association of the Extent of Resection With Survival in Glioblastoma: A Systematic Review and Meta-analysis*. JAMA Oncol, 2016. **2**(11): p. 1460-1469.
33. Gessler, F., et al., *Surgery for Glioblastoma in Light of Molecular Markers: Impact of Resection and MGMT Promoter Methylation in Newly Diagnosed IDH-1 Wild-Type Glioblastomas*. Neurosurgery, 2019. **84**(1): p. 190-197.
34. Incekara, F., et al., *The Association Between the Extent of Glioblastoma Resection and Survival in Light of MGMT Promoter Methylation in 326 Patients With Newly Diagnosed IDH-Wildtype Glioblastoma*. Front Oncol, 2020. **10**: p. 1087.
35. Nguyen, T.T.T., et al., *Current and Emerging Fluorescence-Guided Techniques in Glioma to Enhance Resection*. Cancers (Basel), 2025. **17**(16).
36. Stewart, H.L. and D.J.S. Birch, *Fluorescence Guided Surgery*. Methods and Applications in Fluorescence, 2021. **9**(4): p. 042002.
37. Belykh, E., et al., *Intraoperative Fluorescence Imaging for Personalized Brain Tumor Resection: Current State and Future Directions*. Front Surg, 2016. **3**: p. 55.
38. Price, S.J., et al., *Precision Surgery for Glioblastomas*. Journal of Personalized Medicine, 2025. **15**(3): p. 96.

39. Valdes, P.A., et al., *System and methods for wide-field quantitative fluorescence imaging during neurosurgery*. Optics Letters, 2013. **38**(15): p. 2786-2788.
40. Valdés, P.A., et al., *Quantitative, spectrally-resolved intraoperative fluorescence imaging*. Scientific Reports, 2012. **2**(1): p. 798.
41. Chance, B., et al., *Oxidation-reduction ratio studies of mitochondria in freeze-trapped samples. NADH and flavoprotein fluorescence signals*. Journal of Biological Chemistry, 1979. **254**(11): p. 4764-4771.
42. Pogue, B.W., et al., *Review of Neurosurgical Fluorescence Imaging Methodologies*. IEEE J Sel Top Quantum Electron, 2010. **16**(3): p. 493-505.
43. Xu, M., et al., *Progress of fluorescence imaging in lymph node dissection surgery for prostate and bladder cancer*. Frontiers in Oncology, 2024. **Volume 14 - 2024**.
44. Sheehy, G., 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, 2023. **28**(2): p. 025002.
45. Beaulieu, E., et al., *Wide-field optical spectroscopy system integrating reflectance and spatial frequency domain imaging to measure attenuation-corrected intrinsic tissue fluorescence in radical prostatectomy specimens*. Biomed Opt Express, 2020. **11**(4): p. 2052-2072.
46. Jermyn, M., et al., *Raman spectroscopy detects distant invasive brain cancer cells centimeters beyond MRI capability in humans*. Biomed Opt Express, 2016. **7**(12): p. 5129-5137.
47. Faber, D.J., et al., *Oxygen Saturation-Dependent Absorption and Scattering of Blood*. Physical Review Letters, 2004. **93**(2): p. 028102.
48. Heikal, A.A., *Intracellular coenzymes as natural biomarkers for metabolic activities and mitochondrial anomalies*. Biomark Med, 2010. **4**(2): p. 241-63.
49. Fürtjes, G., et al., *Intraoperative microscopic autofluorescence detection and characterization in brain tumors using stimulated Raman histology and two-photon fluorescence*. Front Oncol, 2023. **13**: p. 1146031.

50. Mehidine, H., et al., *Molecular changes tracking through multiscale fluorescence microscopy differentiate Meningioma grades and non-tumoral brain tissues*. Scientific Reports, 2021. **11**(1): p. 3816.
51. Mathew, M., et al., *Metabolic Signature of Warburg Effect in Cancer: An Effective and Obligatory Interplay between Nutrient Transporters and Catabolic/Anabolic Pathways to Promote Tumor Growth*. Cancers (Basel), 2024. **16**(3).