

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

SONDE DE BIOPSIE OPTIQUE AFIN D'AMÉLIORER LA SÉCURITÉ ET LA PRÉCISION
DE DIAGNOSTIC DES BIOPSIES NEUROCHIRURGICALES

JOANNIE DESROCHES

INSTITUT DE GÉNIE BIOMÉDICAL
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

THÈSE PRÉSENTÉE EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE PHILOSOPHIAE DOCTOR
(GÉNIE BIOMÉDICAL)

AOÛT 2018

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Cette thèse intitulée :

SONDE DE BIOPSIE OPTIQUE AFIN D'AMÉLIORER LA SÉCURITÉ ET LA PRÉCISION
DE DIAGNOSTIC DES BIOPSIES NEUROCHIRURGICALES

présentée par : DESROCHES Joannie

en vue de l'obtention du diplôme de : Philosophiae Doctor

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

M. GODBOUT Nicolas, Ph. D., président

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

M. PETRECCA Kevin, Ph. D., membre et codirecteur de recherche

M. KADOURY Samuel, Ph. D., membre

M. CLOUTIER Guy, Ph. D., membre externe

DÉDICACE

À ma mère Denise!

REMERCIEMENTS

Ces dernières années ont été un grand défi personnel mais beaucoup de personnes ont contribué de près et de loin au succès de ce projet de recherche. Je ne pourrais commencer ces remerciements sans mentionner le support de mon directeur de recherche, Frédéric Leblond, d'avoir, une fois de plus, cru en mon potentiel de chercheuse et de m'avoir permis de faire un doctorat au sein du département de génie biomédical de l'École Polytechnique de Montréal. Malgré son horaire bien chargé, il a toujours fait preuve d'une grande générosité à mon égard et a toujours su offrir de précieux conseils et une écoute réconfortante. Sa rigueur exceptionnelle aura laissé sa trace dans la qualité de mes articles. Frédéric m'a permis de faire partie d'un projet de recherche d'envergure ayant un impact important autant pour la communauté scientifique que pour l'amélioration des soins de santé, dont le succès nous a permis de gagner plusieurs prix et d'obtenir beaucoup de visibilité. Merci!

Mon second remerciement est destiné à mon co-directeur Dr Kevin Petrecca pour avoir contribué à toutes les étapes du développement de l'instrument. Son engagement et dévouement à la recherche pour améliorer le sort des patients atteints de maladies cérébrales est admirable, et il restera une inspiration pour moi. De plus, sa vision clinique a été d'une importance fondamentale au succès de ce projet de recherche. Aussi, merci à Dr. Roberto Diaz pour avoir accepté de participer à l'étude clinique en utilisant l'aiguille de biopsie.

Je ne pourrais passer sous silence toute l'aide et le soutien (autant technique que mental) que m'a apporté mon ami et collègue Michael Pinto, qui a beaucoup contribué au succès de ce projet. Sa générosité, sa façon de trouver une solution à tout, sa présence et son écoute ont été d'une aide précieuse! Je remercie également Michael Jermyn pour son aide considérable au niveau du traitement de spectres, de la conception et de la validation des algorithmes de classification. J'aimerais également remercier tous mes collègues, passés et présents, avec lesquels j'ai eu bien du plaisir à échanger sur toutes sortes de sujets stimulants : Andréanne Goyette, Jeanne Mercier, Kelly Aubertin, Amélie St-Georges, Audrey Laurence, Jean-Philippe Tremblay, Karl St-Arnaud, Marie-Andrée Tremblay et tous les autres membres du Laboratoire de radiologie optique. Un merci spécial aux deux plus fous, Michael Pinto et François Daoust, pour avoir partagé notre passion de triathlon à travers l'aventure du Canadaman!

Je voudrais également remercier le support financier de Mitacs, de la fondation du CHUM ainsi que de la fondation Pierre Arbour pour le financement et le support durant mes années doctorales.

Je veux exprimer ma gratitude envers mes parents, Denise et Jacques, et envers mon frère et mes sœurs, Jonathan, Christine et Maude, pour leurs encouragements et leur écoute. Un gros merci à tous mes amis d'avoir cru en mon potentiel et de m'avoir soutenu lors des moments plus difficiles!

RÉSUMÉ

L'évolution de la médecine moderne tend de plus en plus vers une approche personnalisée, nécessitant l'échantillonnage des tumeurs par biopsie pour des analyses histologiques, moléculaires et génomiques menant à un diagnostic précis. Les limites de sensibilité des techniques d'imagerie, les erreurs de ciblage et l'hétérogénéité des lésions sont des limitations importantes à cette approche conduisant souvent à des échantillons de mauvaise qualité, et au besoin de biopsies répétées. Cette thèse vise à la conception d'une aiguille de biopsie guidée par spectroscopie Raman pour améliorer la sécurité et l'efficacité de la procédure de biopsie du cerveau. Le premier objectif consiste à valider l'utilisation de la spectroscopie Raman pour fins de caractérisation de tissus cérébraux. L'intégration d'un système de sonde Raman peropératoire au flux de travail chirurgical et son optimisation pour utilisation en salle d'opération a été effectuée. Une preuve de concept au cours de résections de tumeurs cérébrales sur 10 patients a démontré que le système peut distinguer les tissus vitaux et nécrotiques avec une sensibilité de 84% et une spécificité de 89%. Le second objectif vise à intégrer cette technique dans une aiguille de biopsie commerciale. Ceci impose des contraintes techniques importantes qui ont nécessité l'utilisation d'une différente plage spectrale, le *high wavenumber*. L'utilisation du *high wavenumber* a d'abord été validée en utilisant la sonde peropératoire. Cette étude a été effectuée sur 17 patients, démontrant une détection de régions denses en cellules cancéreuses (> 60%) avec une sensibilité de 80% et une spécificité de 90%. L'intégration a ensuite été effectuée sur un premier prototype d'aiguille Raman, et nous démontrons pour la première fois l'utilisation de ce système *in vivo* dans un modèle de biopsie cérébrale porcine. Finalement, un deuxième prototype utilisant plus d'information spectrale a été développé. Nous présentons une preuve de concept effectuée pour la première fois sur 3 patients humains pendant des procédures de biopsies cérébrales. L'utilisation de ce prototype est prévue dans le cadre d'une étude clinique multicentrique. Les résultats de cette thèse doctorale préparent le terrain pour la traduction clinique de cette méthode de caractérisation moléculaire optique en temps réel pour une biopsie sécuritaire et efficace.

ABSTRACT

The evolution of modern medicine is moving more and more towards a personalized approach, requiring the sampling of tumors with biopsy procedures for histological, molecular and genomic analyzes for an accurate diagnosis. Sensitivity limits of imaging techniques, targeting errors and lesion heterogeneity are important limitations to this approach often leading to poor quality samples, and the need for repeated biopsies. This thesis aims at the development of a biopsy needle guided with Raman spectroscopy to improve safety and efficiency of brain biopsy procedures. The first objective is the validation of Raman spectroscopy for the characterization of brain tissue. The integration of an intraoperative Raman probe system into the surgical workflow and optimization for use in the operating room was performed. A proof of concept was carried out during brain tumor resection in 10 patients demonstrating that the system can distinguish between vital and necrotic tissues with a sensitivity of 84% and a specificity of 89%. The second objective is to integrate the technique into a commercial biopsy needle. This imposes important technical constraints that required the use of a different spectral range, called the high wavenumber. The use of the high wavenumber was first validated using intraoperative probe. This study was carried out on 17 patients, demonstrating a detection of dense cancer (> 60% cancer cells) with a sensitivity of 80% and a specificity of 90%. The integration was then performed on a first prototype Raman needle, and we demonstrate for the first time the use of this system *in vivo* in a porcine brain biopsy model. Finally, a second prototype using more spectral information was developed. A proof of concept using the device to measure Raman spectra at the tip of the needle on 3 patients during cerebral biopsy procedures is presented for the first time. The use of this prototype is planned as part of a multi-center clinical study. The results of this doctoral thesis set the stage for the clinical translation of this real-time optical molecular characterization method for safe and efficient biopsy.

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE.....	III
REMERCIEMENTS	IV
RÉSUMÉ.....	VI
ABSTRACT	VII
TABLE DES MATIÈRES	VIII
LISTE DES TABLEAUX.....	XII
LISTE DES FIGURES.....	XIII
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XVIII
LISTE DES ANNEXES.....	XX
CHAPITRE 1 INTRODUCTION.....	1
1.1 Mise en contexte.....	1
1.2 Le cancer du cerveau, diagnostic et traitement	2
1.3 La procédure de prise de biopsies	3
1.4 Les risques associés aux procédures de biopsie du cerveau.....	5
1.5 Solution proposée.....	6
1.6 Hypothèses et objectifs du projet de recherche	6
CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE	9
2.1 La spectroscopie Raman.....	9
2.2 Interactions lumière-tissus.....	9
2.3 Stratégie expérimentale	11
2.4 Applications en oncologie.....	15
2.4.1 Applications aux tissus cérébraux	16
2.4.2 Contrainte pour l'intégration à une aiguille de biopsie	17

2.5	Biopsie guidée optiquement.....	19
CHAPITRE 3 DÉMARCHE SCIENTIFIQUE ET CONTRIBUTIONS		20
3.1	Évaluation du potentiel clinique de la spectroscopie Raman.....	20
3.2	Intégration en salle d’opération et étude de l’impact de la lumière ambiante.....	21
3.3	Intégration de la spectroscopie Raman dans une aiguille de biopsie commerciale – premier prototype	22
3.4	Deuxième prototype et étude clinique.....	24
CHAPITRE 4 ARTICLE 1: CHARACTERIZATION OF A RAMAN SPECTROSCOPY PROBE SYSTEM FOR INTRAOPERATIVE BRAIN CANCER TISSUE DETECTION AND CLASSIFICATION		26
4.1	Abstract	26
4.2	Introduction.....	26
4.3	System characterization procedure and results	28
4.3.1	System description	28
4.3.2	System calibration, instrument spectral response function and data pre-processing.....	30
4.3.3	Linearity of the signal with integration time and laser power.....	31
4.3.4	Signal to noise ratio.....	33
4.3.5	Sources of spectral artifacts: Ambient lights.....	37
4.4	Clinical application: classification of necrotic tissue, cancer and normal brain	41
4.5	Discussion	43
4.6	APPENDIX.....	46
CHAPITRE 5 ARTICLE 2: RAMAN SPECTROSCOPY IN MICROSURGERY: IMPACT OF OPERATING MICROSCOPE ILLUMINATION SOURCES ON DATA QUALITY AND TISSUE CLASSIFICATION		48
5.1	Abstract	48

5.2	Introduction	48
5.3	Experimental	50
5.3.1	Design of the filter adapter	50
5.3.2	<i>Ex vivo</i> experiments on calf brain	51
5.3.3	Intraoperative measurements.....	52
5.3.4	Data processing and analysis.....	53
5.4	Results	54
5.4.1	<i>Ex vivo</i> experiments on calf brain	54
5.4.2	Intraoperative <i>in vivo</i> measurements.....	58
5.5	Discussion	59
	Acknowledgements	61
	Competing Financial Interests.....	62
CHAPITRE 6 ARTICLE 3: A NEW METHOD USING RAMAN SPECTROSCOPY FOR <i>IN VIVO</i> TARGETED BRAIN CANCER TISSUE BIOPSY		63
6.1	Abstract	63
6.2	Introduction	63
6.3	Results	66
6.3.1	Core needle biopsy system for interstitial vibrational spectroscopy.....	66
6.3.2	Interstitial Raman spectroscopy measurements	68
6.3.3	Intraoperative Raman spectroscopy measurements during human glioma surgery.....	69
6.3.4	Vibrational molecular spectroscopy can differentiate cancer from normal brain ..	71
6.4	Discussion	73
6.5	Methods.....	76
6.5.1	Core needle biopsy system design and fabrication	76

6.5.2	Ex vivo tissue measurements	76
6.5.3	<i>In vivo</i> measurements in swine brain	77
6.5.4	High wavenumber Raman spectroscopy with intraoperative probe.....	78
6.5.5	Validation during brain tumor resection	79
6.5.6	Data analysis and tissue classification	80
	Data availability	81
	Acknowledgements	81
	Author contributions	81
	Competing financial interests.....	81
	Materials & correspondence.....	81
6.6	SUPPLEMENTAL.....	82
CHAPITRE 7	RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES	83
7.1	Limitations du premier prototype.....	83
7.2	Deuxième prototype : micro-sonde dans la canule interne	83
7.3	Protocole de l'étude clinique.....	86
7.4	Résultats	88
CHAPITRE 8	DISCUSSION GÉNÉRALE	93
8.1	Buts de l'étude.....	93
8.2	Spectroscopie Raman validée <i>in vivo</i> en salle d'opération	93
8.3	Développement de deux prototypes d'aiguilles Raman.....	94
CHAPITRE 9	CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS	97
	BIBLIOGRAPHIE	100
	ANNEXES	119

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1 : Principaux pics Raman utilisés dans les applications en oncologie, ainsi que les vibrations moléculaires correspondantes [19], [28], [33], [54]–[59].	12
Table 4.1: Ambient light sources and corresponding symbols, used in Figure 7	40
Table 5.1: Light conditions under which Raman spectroscopy measurements were made in calf brain (<i>ex vivo</i>) and human brain (<i>in vivo</i>), with corresponding number of measurements (<i>n</i>). <i>Ex vivo</i> “White light” measurements were made with and without the filter adapter installed on the operating microscope. White light intensities of 5, 25, 50 and 100% of maximum light output correspond to 9, 22, 39 and 74 mW/cm ² at 800 nm, respectively	53
Table 5.2: Difference in accuracy achieved when classifying white and gray matter measurements with SVM algorithm, when using filtered and unfiltered white light, using the spectra acquired under the condition no lights as a training dataset	56
Table 6.1: Patient histological diagnosis, indicating tumor grade and type as well as sample size information.	70
Table S6.1: Prominent Raman peaks. For each peak, a bootstrapping student t-test was applied for two categories (normal vs. cancer), and the corresponding p-value is provided.	82
Table S6.2: Comparison of the geometry of probes and acquisition parameters used in all experiments	82
Tableau 7.1: Répartition des échantillons et mesures optiques acquises dans le cadre de l'étude clinique	88

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 : Schéma de l'aiguille de biopsie commerciale pour le cerveau	4
Figure 1. 2 : Illustration schématique des étapes d'excision de tissu lors d'une biopsie du cerveau	4
Figure 2.1 : Diagramme de Jablonski illustrant les principales interactions exploitées en biophotonique. Les flèches vers le haut représentent les photons absorbés, tandis que les flèches vers le bas représentent les photons émis. Les traits pleins et les traits pointillés représentent les niveaux d'énergie réels et virtuels, respectivement. Courtoisie de Caroline Boudoux.	10
Figure 2.2 : Illustration des régions spectrales « fingerprint » et « high wavenumber ».	18
Figure 3.1 : Photo de la sonde portative utilisée pour la première partie du projet de recherche ..	20
Figure 3.2 : Photo et schéma du premier prototype d'aiguille Raman, montrant les 2 fibres optiques autour de la canule externe de l'aiguille.....	23
Figure 3. 3: Schéma illustratif du deuxième prototype de sonde intégrée à l'aiguille de biopsie commerciale (<i>Courtoisie de Eric Marple</i>)	25
Figure 4.1 : Raman spectroscopy system for intraoperative detection (A) Photograph of the hand-held contact probe, with the attached tracking unit. (B) Illustration of the probe being used intraoperatively, with the neuronavigation system showing the location of the tip of the probe (cross hairs) on the preoperative MR images.....	29
Figure 4.2 : (A) Intensity of 3 peaks on the Raman spectrum of Tylenol as a function of integration time, with linear fit with corresponding R^2 value for each curve (B) Ratios of Raman intensity peaks as a function of integration time. (C) Intensity of 3 peaks on the solid phantom Raman spectra as a function of laser power, with linear fit in the range of operation (40 to 60 mW) with corresponding R^2 value for each curve (D) Ratios of Raman intensity peaks as a function of laser power	32
Figure 4.3: Raman spectrum of a solid phantom (polyurethane), illustrating the definition of peak height, S, for the evaluation of SNR.	34

- Figure 4.4: Signal to noise ratio of three different peaks on the spectra of the solid phantom, as a function of integration time (laser intensity kept fixed), calculated with equation (3) on (A) raw spectra and (B) Raman spectra, without the intrinsic fluorescence background35
- Figure 4.5 : Signal to noise ratio of three different peaks on the spectra of the solid phantom, as a function of the camera temperature.....36
- Figure 4.6: Sources of ambient light in the operating room: (A) surgical lights (Dr Mach, model 380, Germany) (B) fluorescent light sources (C) liquid-crystal display (LCD) monitors (D) white-light source from the OPMI Pentero surgical microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) (E) windows with a view to the exterior of the building (F) neuronavigation system (Medtronic) infrared sources.....38
- Figure 4.7: (A) Representative spectra acquired on veal brain under the ambient light conditions that caused the largest spectral artifacts that are not specific to inelastic scattering. (B) PCA scatter plot of score 1 versus score 2 of Raman spectra of veal brain for every ambient light conditions considered: no lights (o), LCD monitor (+), IR source of the neuronavigation system ON (*), Microscope blue and white light with different intensities (>), surgical lights HD (x), surgical lights LD (square), surgical lights LI (diamond), surgical lights HI (^), fluorescent lights (v), external lights (<). K-means cluster analysis was used to group observations into 5 clusters, and the one including all the measurements with the condition “no lights” is represented by the circle. The radius of that circle is the largest distance between a point in the cluster and the centroid of that cluster. This is shown more clearly in the zoom of this section of the plot.39
- Figure 4.8: Image grabbed from the video (see Media 1) showing the surgeon handling the probe42
- Figure 4.9: Spectra of normal brain, cancer and necrotic tissue, averaged over all measurements.43
- Figure 4.10: Spectra illustrating steps of the data preprocessing: (A) Raman spectrum of Acteminophen used as a reference for calibration of the wave number axis (x-axis) (B) Correction factor to account for the system response, obtained from a calibrated white light and a reflectance standard (C) Spectrum of a mercury argon lamp, used as a reference for

calibration of the x-axis (D) Raw Raman spectrum from human grey matter (black line) with the corresponding polynomial fit used to remove the intrinsic fluorescence background.46

Figure 4.11: Comparison of the Raman spectra of veal brain (blue) and human brain (green) for (A) raw spectra and (B) spectra with intrinsic fluorescence background removed.47

Figure 5.1: Description of the filter holder inserted next to the front lens of a neurosurgical microscope: (A) bottom view showing the circular hole for the filters, (B) side view, (C) Transmission curves of the filters and detection range of the Raman spectroscopy system and (D) view of the adapter on the operating microscope51

Figure 5.2: Average spectra for white and gray matter acquired with the operating microscope lights turned off. Sample spectral bands are identified corresponding to important brain tissue peaks associated with amino acids, lipids and proteins.54

Figure 5.3: Average gray matter Raman spectra of a calf brain for different processing and light conditions. (A) Normalized ambient light measurements taken with and without the filters on the microscope, showing the peaks of the microscope arc lamp still present in the ambient light measurement under filtered white light (B) Spectra of gray matter acquired with the filter, with and without subtraction of the ambient light measurement, compared with a measurement with no lights (C) Normalized and ambient light subtracted Raman spectra of gray matter measured under 5% white light with and without the filter adapter, 50% white light with the filter adapter and under no lights. Average spectra acquired under 50% white light without the filter adapter is not shown since the detector was saturated.55

Figure 5.4: (A) Score of the first principal component of the Raman spectra acquired under filtered and unfiltered white light and no lights (B) Cross correlation coefficient between spectra acquired under “no lights” condition, filtered and unfiltered white light for calf brain (white and gray matter) and human. Dotted lines represent the average correlation coefficient between measurements under no lights.....58

Figure 5.5: Average In-human normalized Raman spectra measured under the filtered microscope light at two intensities, and average residuals between the Raman spectra under filtered light - at 5% and 100% intensity - and under no lights. An offset has been added to the Raman spectra and residuals for clarity.....59

- Figure 6.1: Schematic representation of the optical core needle biopsy, with a magnified view of the tip showing the biopsy window and the beveled optical fibers used for illumination and detection. The fibers are located opposite to the biopsy window and the needle is rotated by exactly 180° to collect a tissue sample spatially co-localized with a spectral measurement. Figure produced by Dariush Bagheri.67
- Figure 6.2: RS measurements in normal brain. (a) Schematic of the *in vivo* acquisition steps: 1) needle insertion along the planned trajectory, 2) RS collection, 3) 180° rotation of the needle, and 4) tissue collection. (b) In vivo Raman spectra averaged over all measurements ($n=11$) and compared with ex vivo spectra for white matter and cortex.69
- Figure 6.3: (a) Schematic depiction of *in vivo* RS measurements taken in the surgical cavity during glioma resection using the handheld contact probe in dense cancer (red), infiltrated brain (yellow) and surrounding normal brain. (b) *In vivo* high wavenumber Raman spectra of dense cancer, infiltrated brain and normal brain, averaged over all samples. (c) Representative H&E-stained micrographs for each tissue type.....71
- Figure 6.4: (a) Boxplots of the ratio of the lipid and protein bands ($2930\text{ cm}^{-1}/2845\text{ cm}^{-1}$) for normal brain, infiltrated brain and dense cancer tissue in glioma patients. (b) Receiver operating characteristic (ROC) curve computed using the SVM algorithm and leave-one-out cross-validation. The indicated point at the minimal distance from the upper-left corner of the ROC curve was chosen for calculating the sensitivity and specificity values.72
- Figure 7.1: Vue explosée de la micro-sonde Raman s'insérant dans la canule interne de l'aiguille de biopsie commerciale.....84
- Figure 7.2: Système optique menant à l'acquisition de spectres Raman avec le deuxième prototype.85
- Figure 7.3: (A) La micro-sonde Raman s'insère dans l'aiguille de biopsie au début de la procédure (B) Photo de la sonde de 900 microns de diamètre. Des lignes circulaires sont présentes sur la sonde afin de faciliter l'alignement par rapport à l'aiguille de biopsie (C) Adaptateur permettant l'aspiration du tissu en présence de la sonde (D) Vue rapprochée de la fenêtre de biopsie ouverte montrant l'extrémité de la sonde optique86

Figure 7.4: Photographie montrant le cadre crânien passif et l'aiguille de biopsie insérée dans le cerveau du patient.....	87
Figure 7.5: Exemple d'acquisition Raman, et positionnement de l'aiguille dans l'image RM préopératoire.....	89
Figure 7.6 : Étapes de traitement pour un spectre Raman fingerprint in vivo de tissu normal (a) Spectre brut moyenné avec soustraction du background (b) Courbe de correction de la réponse spectrale du système, obtenue avec le standard NIST (c) Spectre brut multiplié par la courbe de correction (courbe bleue) et fit polynomial calculé pour correspondre aux contributions de fluorescence (courbe verte) (d) Soustraction de l'arrière-plan calculé en (c) (e) Spectre filtré avec un filtre gaussien pour éliminer le bruit (f) Spectre normalisé avec SNV	90
Figure 7.7: Étapes de traitement pour un spectre Raman fingerprint in vivo de tissus cancéreux (a) Spectre brut moyenné avec soustraction du background (b) Courbe de correction de la réponse spectrale du système, obtenue avec le standard NIST (c) Spectre brut multiplié par la courbe de correction (courbe bleue) et fit polynomial calculé pour correspondre aux contributions de fluorescence (courbe verte) (d) Soustraction de l'arrière-plan calculé en (c) (e) Spectre filtré avec un filtre gaussien pour éliminer le bruit (f) Spectre normalisé avec SNV	90
Figure 7.8: Spectres Raman FP et HWN du tissu normal (n=2 spectres) et de la tumeur (n=11 spectres) moyennés sur les trois patients. Les lignes verticales indiquent les principales caractéristiques spectrales présentes dans les spectres.....	91
Figure 7.9: Trois des spectres Raman de tissus tumoraux et d'un échantillon de sang provenant du patient #3	92

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ALA	5-aminolevulenic acid
CARS	Coherent Anti-Stokes Raman Spectroscopy
CCD	Charge Coupled Device
CHUM	Centre Hospitalier de l'Université de Montréal
CT	Computed Tomography
DWI	Diffusion-Weighted Imaging
FP	Fingerprint
GBM	Glioblastoma Multiforme
H&E	Hematoxylin & Eosin
HWN	High Wavenumber
IR	Infrarouge
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
LCD	Liquid Crystal Display
LOOCV	Leave-One-Out Cross-Validation
LRO	Laboratoire de Radiologie Optique
MRS	Magnetic Resonance Spectroscopy
MTP	Mechanical Transfer Push-on
NIR	Near Infrared

OCT	Optical Coherence Tomography
OD	Optical Density
OR	Operating Room
PCA	Principal Component Analysis
PD	Proton Density
PpIX	Protoporphyrin IX
ROC	Receiver Operating Characteristic
SERS	Surface enhanced Raman Spectroscopy
SNR	Signal to Noise Ratio
SR	Spectroscopie Raman
SVM	Support Vector Machine
US	Ultrasound
WHO	World Health Organisation

LISTE DES ANNEXES

ANNEXE 1	MÉTHODE DE CLASSIFICATION	119
ANNEXE 2	CURRICULUM VITAE	121

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

1.1 Mise en contexte

La chirurgie guidée par imagerie a révolutionné la médecine en permettant la substitution de chirurgies ouvertes par des procédures minimalement invasives. Il s'agit d'un domaine de recherche très actif, et les résultats cliniques ont un impact direct sur la survie et la qualité de vie des patients. La majorité des systèmes de guidage chirurgical utilisent des images de tomodensitométrie (communément appelé *computed tomography* ou *CT scan*) ou de résonance magnétique acquises avant l'opération et un système de localisation afin de positionner l'instrument chirurgical dans ces images de référence[1]–[4]. Toutefois, ces technologies sont limitées en termes de sensibilité et de spécificité moléculaire puisqu'ils fournissent de l'information majoritairement structurale sur les tissus. De plus, ces systèmes ne prennent pas en compte les changements dynamiques qui se produisent entre la séance d'imagerie et la procédure ou même pendant la procédure chirurgicale. Dans le cas de la neurochirurgie, ces changements peuvent être dus, par exemple, au déplacement du cerveau dû à l'œdème, au retrait de tissu ou à la perte de liquide céphalo-rachidien. Le ciblage précis des lésions est donc altéré et le risque de récolter un échantillon inapproprié peut augmenter. Par exemple, des échantillons de tissus nécrotiques ou des échantillons ne contenant pas suffisamment de cellules cancéreuses ne seront pas utiles au diagnostic.

Les différences de composition moléculaire des tissus pathologiques peuvent être utilisées pour le développement d'outils pour guider les procédures diagnostiques et thérapeutiques. La génomique et l'analyse moléculaire des tissus est de plus en plus utilisée en médecine moderne pour le traitement personnalisé. En revanche, la génomique est très dispendieuse et peu compatible avec des applications intraopératoires. Des outils de guidage chirurgical utilisant des techniques optiques sont constamment développés, avec beaucoup d'applications en oncologie. Une revue de ces techniques est détaillée au chapitre 2 de cette thèse. Cependant, un besoin existe pour une intégration plus fluide de ces techniques en clinique. Ce projet de recherche s'attarde particulièrement à la procédure de biopsie du cerveau, utilisée pour obtenir un diagnostic précis d'une lésion afin de décider du traitement optimal.

1.2 Le cancer du cerveau, diagnostic et traitement

Il est estimé qu'au Canada environ 1,5% des nouveaux cas de cancer seront des cancers du cerveau. Les gliomes représentent 80% des tumeurs cérébrales malignes primaires et envahissent agressivement le cerveau normal [5]. Selon l'Organisation mondiale de la santé (WHO de l'anglais World Health Organisation), les gliomes peuvent être classifiés en quatre catégories, soit les grades I à IV. Les gliomes de bas grade (I et II) sont normalement moins agressifs et sont associés à de meilleures chances de survie que les grades III et IV [6]. Il existe différents types de gliomes, dont l'astrocytome, l'oligodendrogliome et l'épendymome. Malgré un traitement agressif (chirurgie suivie traitements adjuvants tel que la radiothérapie et/ou chimiothérapie) le pronostic des gliomes reste faible; le glioblastome (grade IV), est la forme la plus courante et agressive de gliome avec un taux de survie moyen de 14,6 mois [7]. Bien que plus rares, il existe d'autres types de tumeurs cérébrales dont les méningiomes, le neurinome acoustique, le craniopharyngiome, l'hémangioblastome et le lymphome.

Pour les cancers du cerveau, le traitement choisi est considérablement influencé par le diagnostic, c'est à dire le type et le grade de la tumeur. Le diagnostic d'une tumeur au cerveau peut être assez complexe et implique quelques étapes. En général, la tomographie par ordinateur est premièrement effectuée pour détecter la présence de la tumeur, avec une zone d'hyper ou d'hypodensité (zone dont les valeurs d'intensité sur l'image sont anormalement élevées ou faibles). L'imagerie par résonance magnétique (IRM) est généralement effectuée lorsqu'une lésion est soupçonnée à partir des images CT ou d'autres examens, car l'IRM est plus sensible pour la détection de tumeurs. Un protocole diagnostique standard d'IRM pour les tumeurs comprend généralement une imagerie pondérée en intensité avec une ou plusieurs séquences standards : séquence pondérée T1 (T1W) avec agent de contraste (gadolinium, T1-Gd), séquence pondérée en T2 (T2W), densité de protons (PD) et T2 FLAIR. La spectroscopie par résonance magnétique (MRS) et l'imagerie par diffusion (DWI) sont également utilisées cliniquement, bien que majoritairement dans le cadre de protocoles de recherche. La différenciation entre les grades et types de tumeurs est faite en fonction de l'intensité du signal sur les images de différentes séquences (T1W, T2W et T1-Gd), l'indicateur principal étant l'image pondérée T1 avec le contraste du gadolinium. En outre, le classement des tumeurs est parfois basé sur MRS ou DWI. Lorsqu'un diagnostic neuropathologique précis est requis, une biopsie stéréotaxique du cerveau est réalisée

afin de prélever un échantillon de tissu pour obtenir de l'information pathologique (type de tumeur, grade, patron de croissance) plus sensible et spécifique que l'imagerie. Cette procédure est souvent choisie lorsque la santé du patient est fragile, dans le cas d'une tumeur inopérable (ex. : lésion profonde ou multiples lésions), ou lorsque la chirurgie à crâne ouvert est trop risquée. En se basant sur les informations pathologiques obtenues et sur une analyse des risques et bénéfices, le traitement le plus approprié est choisi. Le traitement le plus répandu est l'exérèse de la masse tumorale par chirurgie à crâne ouvert (craniotomie), suivie de traitements adjuvants tels que la radiothérapie et/ou la chimiothérapie.

1.3 La procédure de prise de biopsies

Comme mentionné dans la section précédente, une biopsie du cerveau peut être nécessaire lorsqu'une tumeur cérébrale est détectée par les méthodes d'imagerie conventionnelles. L'objectif de cette procédure minimalement invasive est de récolter au moins un échantillon représentatif de la tumeur afin d'obtenir de l'information pathologique précise sur laquelle sera basé le choix de traitement. La procédure implique une étape de planification, pendant laquelle le chirurgien établit une stratégie d'insertion de l'aiguille à l'aide d'images préopératoires afin de minimiser les risques (par exemple en évitant les principaux vaisseaux sanguins et les régions éloquentes). L'alignement entre la trajectoire réelle de l'aiguille pendant la procédure et la trajectoire planifiée se fait soit avec un cadre stéréotaxique fixé au crâne du patient, soit avec un système de neuronavigation [2], [3]. Ce système est basé sur la détection de l'instrument à l'aide de capteurs infrarouges et de sphères réfléchissantes, ainsi que le positionnement de celui-ci dans le système de coordonnées des images préopératoires à l'aide de repères anatomiques. Une aiguille de biopsie commerciale (diamètre de 2.1 mm) est constituée de deux tubes creux (appelés canules interne et externe) ayant chacune, à leur extrémité distale, une ouverture rectangulaire appelée *fenêtre* Figure 1.1.

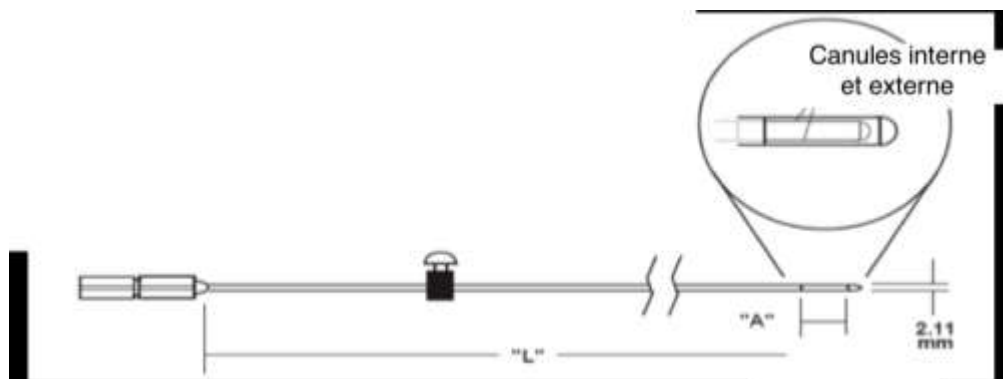


Figure 1.1 : Schéma de l'aiguille de biopsie commerciale pour le cerveau

Une fois la trajectoire calculée, un trou est creusé dans le crâne du patient. L'aiguille est premièrement insérée lentement avec la fenêtre fermée, et lorsque l'aiguille atteint la position voulue pour la récolte d'un échantillon, les deux ouvertures des canules sont alignées ayant pour effet d'ouvrir la fenêtre (figure 1.2A). Un petit volume de tissu est ensuite aspiré dans l'ouverture par succion (figure 1.2B), et le chirurgien effectue une rotation de la canule interne par rapport à la canule externe afin de couper l'échantillon (figure 1.2C). La canule interne est ensuite retirée et l'échantillon envoyé pour analyse en laboratoire de pathologie.

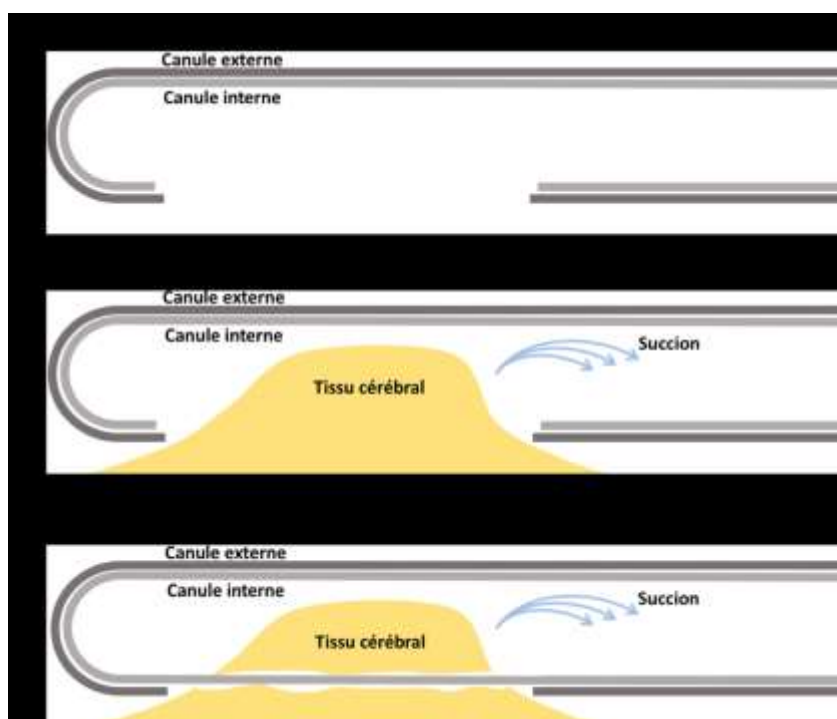


Figure 1.2 : Illustration schématique des étapes d'excision de tissu lors d'une biopsie du cerveau

Traditionnellement, les techniques basées sur un cadre stéréotaxique ont été la méthode standard utilisée pour obtenir un échantillonnage fiable et précis des lésions intracrâniennes et se sont révélées supérieures aux procédures de biopsie *à main levée* (sans système de fixation au crâne du patient) en termes de morbidité, de mortalité et de rendement diagnostique [4]. Récemment, des techniques plus avancées, basées sur des images préopératoires et utilisant des systèmes de neuronavigation ont été développées et sont couramment utilisées dans certains centres.

1.4 Les risques associés aux procédures de biopsie du cerveau

Comme toute procédure chirurgicale, les biopsies au cerveau ont leurs limitations et leurs risques, principalement liés aux hémorragies en raison des vaisseaux sanguins pouvant être endommagés lors de l'extraction de l'échantillon. Le cerveau est hautement vascularisé pour permettre l'apport en nutriments et en oxygène. Les cellules cancéreuses ont besoin d'une quantité soutenue de nutriments et d'oxygène, ce qui crée un environnement vasculaire dense et hautement désorganisé dans les tumeurs solides. Une autre caractéristique de certaines tumeurs est le développement d'une région nécrotique, c'est-à-dire composée de cellules mortes, dû à l'inaccessibilité aux nutriments et à l'oxygène. Par exemple, il est typique que les glioblastomes développent un cœur nécrotique entouré d'une capsule hautement vascularisée. Il a d'ailleurs été démontré que la présence de nécrose pour ce type de tumeurs est corrélée à une moyenne de survie considérablement plus courte que dans le cas des tumeurs sans nécrose [6]. De plus, des études cliniques suggèrent que des dommages aux vaisseaux se produisent dans environ 4,7% des cas, et jusqu'à 21,3%, et peuvent mener à une série de déficits neurologiques qui influencent directement la qualité de la vie des patients. De plus, dans certaines études, jusqu'à 3,9% des cas d'hémorragie cérébrales causées par la biopsie sont mortels [8], [9].

Le risque de récolter un échantillon non représentatif de la tumeur est aussi très important. Une biopsie peut entraîner un mauvais diagnostic en raison de : 1) la prise d'échantillons de zones non utiles au diagnostic (par exemple, manquer la capsule d'un gliome de haut grade et échantillonner seulement dans des zones nécrotiques) ; et 2) rater une lésion due à des inexactitudes dans le recalage et/ou les changements dans les tissus entre l'imagerie et la chirurgie. L'utilisation de systèmes de neuronavigation a amélioré la précision de la procédure, mais ces systèmes

présentent des limitations en précision dues, entre autres, au manque de spécificité des techniques d'imagerie préopératoire et du mouvement des tissus mous pendant la chirurgie. En pratique, jusqu'à 24% des cas nécessitent une deuxième procédure puisque les échantillons récoltés ne sont pas utiles au diagnostic [8], [10], [11]. En outre, les échantillons ne sont pas représentatifs du grade de la tumeur dans jusqu'à 64% des cas [12]–[14]. Des biopsies sérielles ou un examen extemporané (coupe congelée envoyée en pathologie pendant l'intervention) peuvent être effectués pour limiter les risques, mais ceci ajoute des délais importants à la procédure et les erreurs de diagnostic se produisent tout de même dans environ 10% à 30% des cas [4].

1.5 Solution proposée

La méthode proposée ici pour traiter les problèmes cliniques associés aux biopsies du cerveau est l'intégration de la spectroscopie Raman (SR), une technique optique non invasive utilisée pour observer les modes de rotation et de vibration des molécules composant un échantillon. Elle permet de caractériser et de différencier les tissus biologiques en se basant sur leurs différences de composition moléculaire. Cette technique est basée sur une interaction entre la lumière et la matière - la diffusion inélastique - qui a été observée pour la première fois par le récipiendaire du prix Nobel indien C. V. Raman en 1928[15], [16]. Cependant, le phénomène n'a été signalé pour les applications biomédicales qu'en 1970[17]. Le principal défi associé à la spectroscopie Raman de tissus biologiques est l'isolation du signal d'intérêt puisque les interactions lumière - tissus (tel que l'auto-fluorescence) sont de plusieurs ordres de grandeur plus importantes que le signal Raman. Des améliorations subséquentes dans les sources de lumière, les filtres optiques et la détection des signaux ont rendu possible l'émergence de ces techniques dans un large éventail d'applications biologiques. Les détails théoriques de la technique, ainsi que l'état de l'art actuel sont présentés dans le chapitre suivant.

1.6 Hypothèses et objectifs du projet de recherche

Ma question de recherche est donc : peut-on améliorer la sécurité et l'efficacité diagnostique des biopsies du cerveau en intégrant des mesures de spectroscopie optique à l'extrémité distale d'une aiguille de biopsie? Pour répondre au besoin clinique, un système de spectroscopie optique intégré sur une aiguille de biopsie commerciale est proposé. Le projet est basé sur les trois hypothèses

scientifiques suivantes :

1. La spectroscopie Raman permet de distinguer les tissus sains, les tissus nécrotiques et les tissus cancéreux avec une précision diagnostic de plus de 80% pour satisfaire les besoins cliniques.
2. Un système de spectroscopie Raman, intégré à l'aiguille de biopsie, permet le guidage de l'aiguille vers la zone représentative de la tumeur, là où le chirurgien désire récolter un échantillon afin de minimiser les échantillons non diagnostiques.
3. L'intégration de cette modalité optique dans un instrument commercial permettra l'acquisition de mesures pendant l'insertion de l'aiguille, et ce sans trop perturber le flux de travail chirurgical.

Afin de tester ces hypothèses, les objectifs de recherche suivants ont été énoncés :

Objectif 1 : Développer et tester différentes approches menant à la caractérisation de tissus à l'aide de mesures de spectroscopie Raman le long de la trajectoire d'insertion de l'aiguille de biopsie.

Sous-objectif 1.1 : Évaluer le potentiel d'une sonde de spectroscopie Raman peropératoire dans le régime moléculaire "fingerprint" (plage spectrale de détection près de la longueur d'onde d'illumination) pour la classification entre tissus sains, cancéreux et nécrotiques lors de procédures de résection de tumeurs au cerveau.

Sous-objectif 1.2 : Évaluer le potentiel de la spectroscopie Raman dans une plage spectrale de détection plus loin de la longueur d'onde d'illumination pour la discrimination de tissus cérébraux en utilisant une sonde Raman peropératoire. Cette plage spectrale, appelée "high wavenumber", permet de sonder des vibrations moléculaires de différentes énergies et donc d'acquérir de l'information complémentaire sur les tissus.

Sous-objectif 1.3 : Intégrer un système de spectroscopie Raman à une aiguille de biopsie commerciale basé sur les résultats des objectifs 1.2 et 1.3.

Sous-objectif 1.4 : Valider le potentiel de discrimination des tissus de l'aiguille de biopsie optique, sur des tissus cérébraux *ex vivo* (tissus en dehors de l'organisme) ainsi que sur des cerveaux d'animaux *in vivo* (sur l'être vivant).

Objectif 2 : Effectuer une évaluation clinique initiale utilisant l'approche de biopsie guidée optiquement avec une étude pilote sur 10 patients atteints de tumeurs cérébrales dans le but d'évaluer l'efficacité, la faisabilité technique et l'utilité potentielle du système.

Cette étude porte sur le développement d'un outil chirurgical guidé par spectroscopie Raman. Cet ouvrage présente le travail de développement et les résultats associés aux hypothèses et objectifs de recherche. À la suite de cette présente mise en contexte, une brève introduction des aspects théoriques de la technique optique utilisée, une revue de littérature couvrant la spectroscopie Raman appliquée aux tissus cérébraux, ainsi que différentes techniques de caractérisation de tissus à travers des aiguilles sont présentées au chapitre 2. Ensuite, le chapitre 3 explique la démarche de l'ensemble du travail de recherche, l'organisation générale du document et la cohérence des articles par rapport aux objectifs de recherche. Les chapitres 4, 5 et 6 présentent les articles publiés dans le cadre de ce doctorat et le chapitre 7 présente une discussion générale de l'ensemble de la thèse. Finalement, le chapitre 8 conclut cette étude doctorale en soulignant l'impact des résultats et les perspectives futures.

CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE

2.1 La spectroscopie Raman

Les techniques de spectroscopie et d'imagerie optique sont de plus en plus utilisées pour la détection du cancer ainsi que pour guider les chirurgies, en raison de leur potentiel d'identification de la signature moléculaire des tissus, du faible risque associé, des coûts relativement faibles et de la compatibilité avec la technologie clinique standard [18], [19]. La spectroscopie Raman est une modalité d'imagerie de surface non invasive basée sur la diffusion inélastique de la lumière lorsqu'elle interagit avec les molécules constituant un échantillon [20], [21]. Elle permet de mesurer les caractéristiques spectrales en fonction de la composition moléculaire des tissus, associés aux liens vibrationnels des composants tels que le cholestérol, les lipides, les protéines et les acides nucléiques. Cette modalité est donc très sensible aux changements moléculaires subtils dans les tissus associés à différentes pathologies. En effet, elle a été appliquée à la détection de divers types de cancers *in vivo*, notamment le cancer du sein [22]–[26], de la peau [27]–[31], du cerveau [32]–[39], gastro-intestinal [40]–[47], et le cancer du col de l'utérus [48]–[53]. Afin de bien comprendre cette technique, une brève introduction concernant les interactions entre la lumière et les tissus biologiques est présentée à la section suivante.

2.2 Interactions lumière-tissus

La lumière interagit avec la matière de différentes manières selon sa nature (par exemple, longueur d'onde, état de polarisation, densité photonique) ainsi que selon la composition moléculaire et l'organisation du milieu en interaction. En fait, selon la nature microscopique et macroscopique des échantillons interrogés, l'interaction entre la lumière et les atomes ou les molécules pourra entraîner des transitions électroniques ou moléculaires qui peuvent être caractérisées comme résonnantes (absorption sélective, fluorescence, phosphorescence) ou non résonnantes (diffusion élastique ou inélastique). Les transitions résonnantes impliquent l'absorption d'un photon et exigent que l'énergie du photon incident corresponde à l'écart d'énergie entre l'état fondamental d'une molécule et l'état excité. Dans le cas de l'absorption sélective, l'énergie est dissipée en chaleur. Les autres transitions résonnantes sont utilisées dans un large éventail de techniques spectroscopiques, tel que

la fluorescence standard et la fluorescence à deux ou trois photons. La fluorescence implique la réémission d'un photon d'énergie moindre que le photon incident, donc de longueur d'onde plus élevée. Dans le cas de la fluorescence à deux ou à trois photons, la longueur d'onde d'émission est plus faible que la longueur d'onde d'excitation puisque plusieurs photons sont absorbés pour atteindre l'état excité (Figure 2.2).

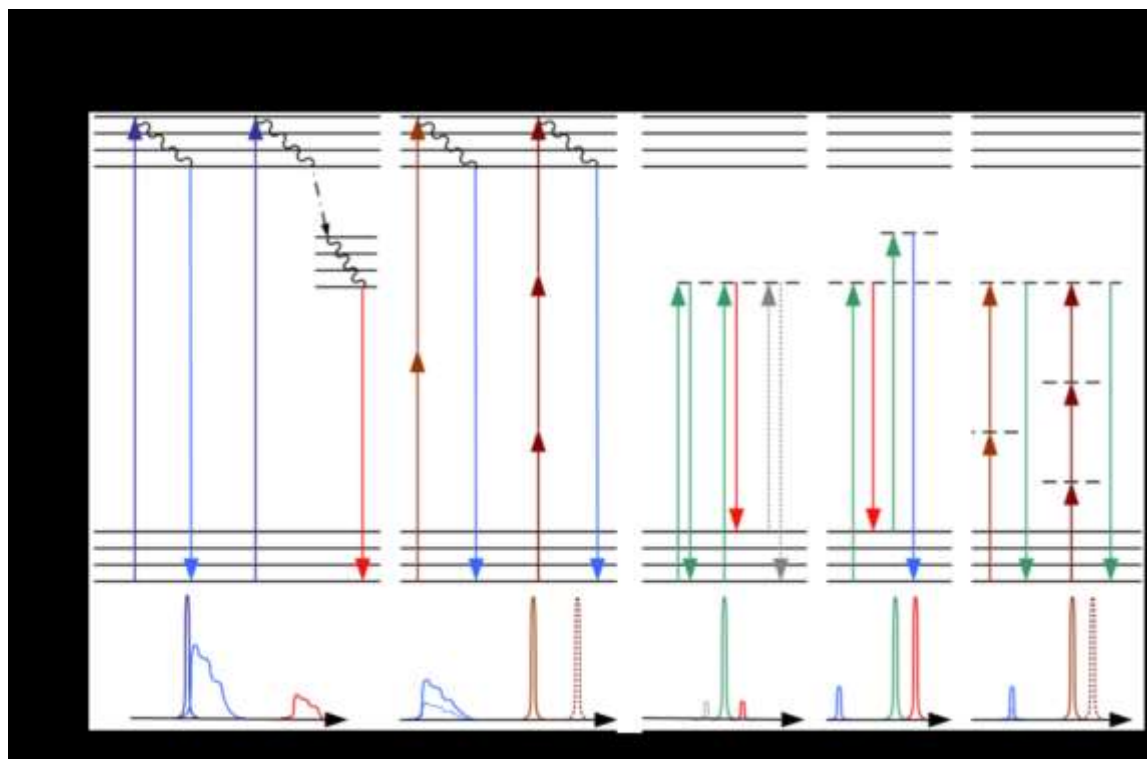


Figure 2.1 : Diagramme de Jablonski illustrant les principales interactions exploitées en biophotonique. Les flèches vers le haut représentent les photons absorbés, tandis que les flèches vers le bas représentent les photons émis. Les traits pleins et les traits pointillés représentent les niveaux d'énergie réels et virtuels, respectivement. Courtoisie de Caroline Boudoux.

La diffusion est un processus résultant d'un changement de direction des photons incidents individuels lorsqu'ils interagissent avec un atome ou une molécule. Contrairement aux transitions résonnantes, les états d'énergie impliqués dans ces transitions sont des états virtuels, comme représenté sur la Figure 2.2. L'état virtuel implique la distorsion d'une distribution de charge (nuage d'électrons, vibrations ou rotations de noyaux) et la réémission rapide d'un photon. Si ce n'est que le nuage d'électrons qui est déformé pendant l'interaction, les photons seront diffusés avec un très petit ou aucun changement d'énergie. Ce processus, appelé diffusion élastique, est généralement le processus d'interaction lumière-tissu dominant.

Contrairement au cas élastique, dans le cas d'un processus inélastique, le photon interagit avec les modes de vibrations des molécules et déforme son nuage électronique. L'énergie du photon diffusé est donc différente de celui du photon incident, et la différence correspond à un niveau d'énergie vibrationnel de l'atome ou de la molécule : il s'agit alors de diffusion Raman. Comme mentionné précédemment, l'interaction de la lumière avec une molécule provoquera une distorsion du nuage électronique. La distorsion résultante peut être dans toutes les directions en fonction de la direction de polarisation de la lumière. L'importance de la distorsion est proportionnelle à la polarisabilité α , qui est une mesure de la facilité avec laquelle la distribution de charge peut être polarisée. La diffusion Raman se produit uniquement pour les molécules dans lesquelles le rayonnement incident induit une variation de polarisabilité le long de l'axe des vibrations due aux mouvements relatifs des composants nucléaires. Il s'agit de la règle de sélection de base qui définit si une vibration spécifique est active en Raman.

La probabilité du processus inélastique est plusieurs ordres de grandeur plus faible que celle de la diffusion élastique (Rayleigh, Mie). En fait, typiquement 1 photon sur 10^6 - 10^8 des photons diffusés le sera de façon inélastique. Un photon diffusé Raman aura une énergie plus élevée (anti-Stokes) ou plus faible (Stokes) que le photon incident, dépendant de l'état vibrationnel initial de la molécule. Les transitions anti-stokes se produisent uniquement si la molécule est déjà dans un état vibrationnel excité. En conséquence, à l'équilibre thermique, la fraction des transitions anti-Stokes est intimement liée à la distribution de Boltzmann [20], [21] :

$$\frac{N_n}{N_m} = \frac{g_n}{g_m} e^{-\frac{(E_n - E_m)}{kT}},$$

où N_n et N_m sont respectivement le nombre d'atomes dans le niveau d'énergie vibrationnel excité (n) et dans le niveau fondamental (m), et g_n et g_m représentent les dégénérescences des niveaux n et m . La quantité $E_n - E_m$ est la différence d'énergie entre les niveaux, T est la température de l'échantillon et k est la constante de Boltzmann ($k = 1,3807 \times 10^{-23}$ J/K). La transition est donc beaucoup moins probable lorsque l'échantillon est à la température ambiante. C'est principalement pour cette raison que le décalage Stokes, et non anti-Stokes, est utilisé dans le cadre de ce projet.

2.3 Stratégie expérimentale

Pratiquement, un spectre Raman est obtenu en illuminant un échantillon avec un laser d'une

certaine longueur d'onde λ_0 , et en mesurant le spectre de la lumière diffusée. Cette technique est appelée spectroscopie Raman spontanée, référée ci-après en tant que spectroscopie Raman (SR) à des fins de simplicité. Le spectre représente donc une mesure de l'intensité de la lumière détectée en fonction de la longueur d'onde émise λ , ou plus précisément en fonction du décalage entre le photon émis et le photon incident. Ce décalage est appelé nombre d'onde k et s'exprime en cm^{-1} :

$$k (\text{cm}^{-1}) = \left(\frac{1}{\lambda_0} - \frac{1}{\lambda} \right)$$

Le spectre Raman d'une molécule complexe exprime donc une série de décalages spectraux où les pics et principales bandes spectrales sont associés aux modes de vibration de celle-ci. Dans le cas d'un tissu, les positions des pics dans un spectre sont caractéristiques de la composition moléculaire de celui-ci, et l'amplitude de chaque pic dépend de la concentration relative de chaque molécule. Les principaux pics présents dans les spectres de tissus biologiques proviennent majoritairement des lipides, protéines, acide nucléiques et du cholestérol Tableau 2.1.

Tableau 2.1 : Principaux pics Raman utilisés dans les applications en oncologie, ainsi que les vibrations moléculaires correspondantes [19], [28], [33], [54]–[59].

Décalage Raman (cm^{-1})	Mode vibrationnel	Molécule correspondante
481		Glycogène
558	C-C	Acide urique
600	N-CH ₃ , C—O ring vibrations	Créatinine
621	C-C	Phénylalanine
650	C-C	Tryptophane, Acide urique
678	N-CH ₂ , C=O ring vibrations	Créatinine
685	C-S	

692	O-C=O	Créatinine
798	N-H	Acide urique
825	O-P-O	Squelette de l'ADN
840	N-CH ₂	Créatinine
903	C-C-N	Créatinine
912	C-C	Calcium oxalate dihydrate
960	PO ₄	Calcium hydroxyapatite
1004	C-C ring breathing	Phenylalanine
1049	C-O, C-N	Protéines
1064	C-C	Lipides
1155		β-Carotene
1176	C-H	Tyrosine
1217	C-C ₆ H ₅	Tyrosine, phenylalanine
1265	C-N, NH, amide III	Proteins, hélice α, collagène
1310	C-H	Lipides
1340	CH ₃ CH ₂	Collagène, lipides
1440	CH ₂	Collagène, lipides
1477	C-O	Calcium oxalate dihydrate
1523		β-caroten
1586	C=C	Phenylalanine

1602	C=C	Phénylalanine
1620	C=C	Porphyrine
1640	Amide I	Protéines
1654	C=C	Acides gras
1655	C=O amide I	Protéines, hélice α , collagène
1739	C=O	Esters de cholestérol
2850	CH ₂	Lipides
2930	CH ₃	Protéines, lipides

Contrairement à l'imagerie nucléaire et aux rayons X, les longueurs d'onde utilisées en optique biomédicale sont plus élevées et vont de l'ultraviolet au proche infrarouge (NIR), incluant ce qu'on appelle la fenêtre thérapeutique où le rayonnement est non ionisant. Cette dernière est une région allant de la partie rouge foncé du spectre (~ 630 nm) jusqu'à environ 1200 nm dans l'infrarouge. Cette région est caractérisée par une faible absorption tissulaire de la lumière qui se traduit par des profondeurs de pénétration souvent mesurées en millimètres et en centimètres selon la concentration des principaux chromophores tissulaires incluant l'hémoglobine, l'eau, les lipides et la mélanine. Dans le cas de la diffusion Raman, la faible probabilité relative d'interaction rend la détection de ce signal difficile, en particulier dans le cas de tissus biologiques pour lesquels la diffusion élastique, la fluorescence et la phosphorescence sont très importants [60], [61]. La section efficace du processus Raman varie proportionnellement à $1/\lambda^4$, où λ est la longueur d'onde de la lumière incidente. Ainsi, la lumière visible UV ou à courte longueur d'onde donne le plus grand signal Raman. Cependant, cet avantage est annulé par l'augmentation de la fluorescence intrinsèque des tissus (vers l'UV) et la faible profondeur de pénétration de la lumière dû à l'absorption de chromophores présents dans les tissus [20], [21], [62]. Par conséquent, les longueurs d'onde typiquement utilisées en spectroscopie sont 670, 785, 830 et 1064 nm pour les raisons mentionnées et la disponibilité des sources laser [63].

Le choix de la longueur d'onde d'excitation implique donc typiquement un compromis entre l'intensité du signal Raman et l'autofluorescence du tissu impliqué en fonction de l'application recherchée. Contrairement à la fluorescence des biomolécules, qui présente des caractéristiques spectrales plutôt larges (dizaines de nm, basses fréquences), les spectres Raman des tissus ont typiquement plusieurs pics plutôt pointus (quelques nm de large, hautes fréquences), permettant d'isoler les contributions Raman en soustrayant la contribution de la fluorescence dans le signal.

Le décalage spectral entre la lumière incidente et la lumière détectée est également faible, ce qui rend la séparation spectrale entre les photons diffusés élastiquement et les photons diffusés inélastiquement difficile. Cependant, les progrès technologiques au cours des 20 dernières années ont conduit à une augmentation du signal et du contraste, permettant des temps d'acquisition plus courts et donc cliniquement pratiques. Par exemple, des sources de diode laser stables, des filtres à haute atténuation, des spectrographes à haut débit et à haute résolution et des détecteurs à matrice sensibles sont maintenant disponibles sur le marché. La praticabilité clinique a également été nettement améliorée par l'utilisation de la fibre optique pour le transport de lumière entre l'échantillon et le détecteur, ainsi que de filtres spectraux miniaturisés efficaces pour éliminer le signal non spécifique au tissu. De plus, de puissants algorithmes d'analyse spectrale et de classification ont été développés et implémentés sur des ordinateurs portables, facilitant l'interprétation des données en temps réel.

2.4 Applications en oncologie

La nature minimalement invasive de la spectroscopie Raman et l'utilisation du contraste intrinsèque (sans agent de contraste) en font une approche pratique pour une utilisation *in vivo*. Cependant, des défis importants subsistent pour l'intégration de la technique en clinique. La rareté du processus de diffusion inélastique dans le tissu rend l'obtention d'un signal Raman avec un rapport signal sur bruit suffisant pour permettre d'isoler la contribution Raman du signal brut difficile. Le signal Raman peut être augmenté de manière significative par l'utilisation de nanoparticules métalliques (diffusion Raman de surface exaltée, SERS [54], [64]–[71]) ou en exploitant des interactions de diffusion non linéaires avec des sources laser à impulsions ultracourtes (diffusion Raman anti-Stokes cohérente (CARS) [72]–[77], diffusion Raman stimulée (SRS) [39], [78]–[83]). Dans cette

thèse, la spectroscopie Raman spontanée a été choisie pour des raisons d'applicabilité en clinique et sera référée sous le terme « spectroscopie Raman ».

2.4.1 Applications aux tissus cérébraux

La littérature concernant la spectroscopie Raman appliquée au cancer du cerveau démontre que cette technique pourrait être utile pour le guidage d'interventions neurochirurgicales en augmentant la capacité de détecter du tissu contenant des cellules cancéreuses. De nombreux groupes ont étudié les différences spectrales entre les tissus normaux et cancéreux en utilisant des tissus humains *ex vivo* ou des modèles de gliomes chez les rongeurs, démontrant d'importantes différences biochimiques [84]–[91]. Par exemple, Beljebbar *et al.* ont implanté un modèle de glioblastome multiforme (GBM) chez des rats et ont utilisé un spectromètre Raman portatif couplé à une microsonde afin d'obtenir une précision de classification de 100% en distinguant le tissu normal, le tissu cancéreux et le tissu normal présentant des invasions tumorales [85]. Koljenovic *et al.* ont utilisé un microscope Raman pour analyser des coupes congelées de GBM humain de 20 patients, qui contenaient à la fois des tissus tumoraux vitaux et nécrotiques. Un modèle de classification basé sur l'analyse discriminante linéaire a été utilisé pour distinguer le GBM de la nécrose avec une précision de classification de 100% [33]. Récemment, Kalkanis *et al.* ont également utilisé un microscope Raman avec des coupes de tissus humains congelés, et des spectres mesurés à partir de régions du cerveau normal, GBM, et la nécrose. Une précision de 97,8% a été atteinte pour différencier ces types de tissus, en utilisant 95 régions de 40 sections de tissus congelés [90]. Kirsch *et al.* ont utilisé un microscope Raman pour l'imagerie *in vivo* de métastases cérébrales chez les souris, avec des temps d'acquisition de 4 secondes par spectre, ou plusieurs minutes par image [89].

Dans notre groupe de recherche, un système utilisant une sonde Raman a été développé et optimisé pour une utilisation peropératoire dans le cadre de procédures menant à la résection de la tumeur du cerveau avec un temps d'acquisition de 0,2 seconde [92]. Le système a été utilisé *in vivo* sur 17 patients atteints de gliomes de grade II à IV pour un total de 161 spectres, et a atteint une sensibilité de 93% et une spécificité de 91% pour distinguer les tissus normaux des tissus contenant des cellules cancéreuses pour des tumeurs de grade I à IV, même dans les régions de faible densité de cellules cancéreuses. Il s'agit de la première étude utilisant la spectroscopie Raman *in vivo* chez

les humains pour distinguer les tissus cérébraux. Ce système a aussi été utilisé pour démontrer, chez les patients humains, la détection de cellules cancéreuses invasives à des centimètres de la zone cancéreuse détectée sur les images IRM pondérées en T1 et en T2 [93]. Nous avons aussi démontré que les réseaux de neurones peuvent augmenter la robustesse de la classification en surmontant des artefacts spectraux créés par certaines sources de lumière ambiante en salle d'opération [94]. De plus, le groupe a développé un système combinant la spectroscopie Raman, la spectroscopie de fluorescence et la spectroscopie par réflectance diffuse dans une même sonde. Nous avons utilisé ce système multimodal afin de démontrer que les cancers du cerveau, du poumon, du colon et de la peau pouvaient être détectés *in situ* avec une précision, sensibilité et spécificité de 97%, 100% et 93% respectivement [95].

Comme mentionné précédemment, les différences moléculaires subtiles entre les différents types de tissus sont utilisées afin de les discriminer. Le tissu cérébral normal est composé principalement d'eau (70-83%), mais aussi de protéines (7,5-8,5%) et de lipides (5-15%), avec une concentration en lipides plus élevée dans la matière blanche lorsque comparé à la matière grise [96]. Il a été démontré que le glioblastome a une teneur en lipides inférieure à celle du tissu cérébral normal et une teneur plus élevée en acide nucléique (ADN) [84], [85], [90], [97]–[99]. Une diminution de l'intensité des bandes lipidiques et une augmentation de l'intensité des bandes d'acide nucléique ont donc été observées dans le spectre Raman du glioblastome par rapport à celui du tissu cérébral normal. Des contributions spectrales supplémentaires dues au pigment mélanine ont également été observées dans le tissu tumoral par rapport au tissu cérébral normal [89]. Certains groupes qui ont étudié la nécrose ont aussi observé une augmentation de la teneur en protéines ainsi que de la concentration de cartonoïdes, de l'hémoglobine et du cholestérol par rapport au GBM [84], [90].

2.4.2 Contrainte pour l'intégration à une aiguille de biopsie

L'intégration de la spectroscopie Raman à l'échelle d'une aiguille de biopsie pose un défi de taille. La majorité des études appliquant la spectroscopie Raman aux tissus biologiques utilisent la plage spectrale entre $k = 400$ et $k = 1800 \text{ cm}^{-1}$, communément appelée la région « fingerprint » (FP), puisqu'elle est riche en information moléculaire. Cependant, pour le design de sondes Raman

intégrées, la détection de la plage FP requiert un design complexe de par le fait que les fibres optiques (faites de silice) présentent un signal Raman intense dans cette région. L'utilisation de filtres à l'extrémité distale des sondes Raman est donc nécessaire afin d'éliminer cette contribution au signal qui n'est pas propre aux tissus interrogés. La plage spectrale entre 2400 à 3800 cm^{-1} , appelée la région « *high wavenumber* » (HWN), n'est quant à elle pas affectée par le signal intrinsèque de la fibre optique Figure 2.2. Il existe donc un intérêt important pour son utilisation puisqu'elle permet la simplification du design de sondes Raman en éliminant la nécessité d'intégrer des micro-filtres optiques dans la sonde.

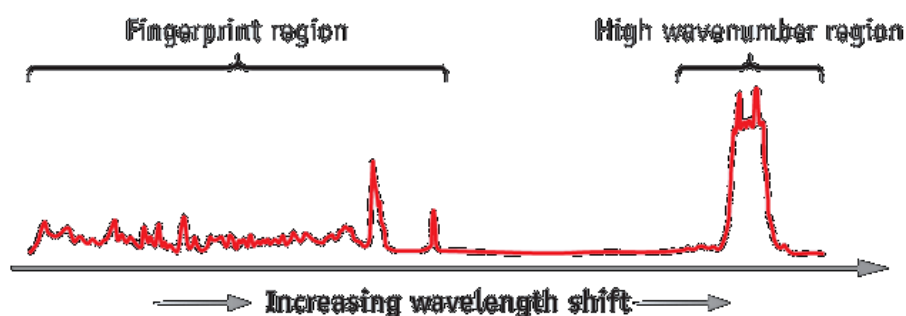


Figure 2.2 : Illustration des régions spectrales « fingerprint » et « high wavenumber ».

La région spectrale HWN a été utilisée pour discriminer différents types de tissus cérébraux, notamment le cortex et la matière grise [88], [100]. Récemment, la microscopie par diffusion Raman stimulée (SRS) a été utilisée pour différencier les tumeurs des tissus normaux dans les xénogreffes de glioblastome humain dans des cerveaux de souris, en utilisant le contraste entre les intensités du signal à 2930 et 2845 cm^{-1} . Au cours des procédures de résection *in vivo*, un microscope SRS a été en mesure de révéler une infiltration tumorale non détectable par microscopie standard [101]. Certains groupes ont aussi démontré que la combinaison des deux plages spectrales pouvait augmenter la précision du diagnostic, notamment pour le cancer du col de l'utérus et la détection de polypes [102], [103].

2.5 Biopsie guidée optiquement

L'application de techniques optiques pour guider des procédures de biopsies est prometteuse car elle pourrait permettre l'interrogation du tissu en temps réel au bout de l'instrument chirurgical, avant la collecte d'échantillon. Ces mesures peuvent fournir à l'utilisateur de l'information spécifique sur le contenu moléculaire du tissu afin de détecter les régions cancéreuses, d'éviter d'abimer les principaux vaisseaux sanguins et de prévenir l'échantillonnage dans les tissus nécrotiques ou les régions tumorales qui sont peu représentatives de la maladie du patient. Des techniques optiques ont été développées à cet effet, y compris l'utilisation du biomarqueur fluorescent métabolique protoporphyrine IX (PpIX) qui est synthétisé de manière endogène dans des cellules tumorales après l'administration d'acide 5-aminolévulinique (ALA). La fluorescence du PpIX pourrait alors être utilisée pour guider l'insertion d'une aiguille de biopsie, tel que démontré cliniquement dans le cerveau sur un tissu de biopsie *ex vivo* et *in vivo* dans des modèles de souris[104]–[106]. Cependant, contrairement à l'imagerie intrinsèque (telle que la spectroscopie Raman), la technique nécessite l'utilisation d'un agent de contraste, ce qui est limitant en termes d'utilité clinique. Premièrement, l'utilisation du ALA nécessite une approbation réglementaire pour l'injection chez l'humain et ce pour chaque application contemplée, cerveau et autres. Aussi, il peut y avoir un contraste généré dans les tissus normaux (perte de spécificité) et le marqueur doit être en mesure de se rendre spécifiquement aux tissus tumoraux. Ceci est particulièrement problématique pour l'application en cancer du cerveau, à cause de la sélectivité de la barrière hémato-encéphalique.

La tomographie par cohérence optique (OCT) est également étudiée pour le guidage des biopsies pour le cancer du sein, de la prostate et du poumon[107]–[111]. Récemment, une sonde Raman qui s'insère dans une aiguille hypodermique a été développée pour le guidage de la biopsie des ganglions lymphatiques[112], [113]. Bien que ces progrès soient impressionnants, l'OCT n'a pas encore démontré sa capacité à détecter le cancer *in vivo*.

CHAPITRE 3 DÉMARCHE SCIENTIFIQUE ET CONTRIBUTIONS

3.1 Évaluation du potentiel clinique de la spectroscopie Raman

Suivant le premier objectif, la première étape du projet a été de démontrer que la spectroscopie Raman pouvait être utilisée pour la différenciation de tissus cérébraux in situ. Pour ce faire, une sonde Raman peropératoire (figure 3.1) a été utilisée pour la collection de données au cours de résections de tumeurs au cerveau en collaboration avec mon co-superviseur, le Dr Kevin Petrecca.



Figure 3.1 : Photo de la sonde portable utilisée pour la première partie du projet de recherche

Des mesures en salle d'opération comportent un lot de défis. Premièrement, la qualité du signal étant très importante en spectroscopie Raman, bien comprendre l'influence de tous les paramètres d'acquisition sur celle-ci est cruciale afin d'établir des méthodes d'acquisition de données optimales. Une étude détaillée de caractérisation et d'optimisation de l'acquisition de données visant à déterminer les paramètres optimaux du fonctionnement du système a été effectuée et présentée dans le premier article «Characterization of a Raman spectroscopy probe system for intraoperative brain tissue classification» (*Biomedical Optics Express*, Facteur d'impact = 3.34). Les caractéristiques suivantes ont été étudiées afin de trouver le régime de fonctionnement optimal

de notre système pour la caractérisation du tissu intracrânien *in situ*: 1) la linéarité du signal avec la puissance du laser et le temps d'intégration, 2) le niveau de rapport signal sur bruit (SNR) requis pour la classification des tissus. Au-delà de ces considérations, les principales sources de bruit intra-opératoire ont été évaluées et l'influence du temps d'intégration et de la température de la caméra sur le SNR a été évaluée. Des étalonnages spectral et d'intensité du système ont également été réalisés afin d'assurer la validité et la fiabilité des mesures. Dans le même article, ce même système a été utilisé afin de démontrer que la technique permet de différencier les tissus vitaux des tissus nécrotiques. La détection de tissus nécrotiques est importante pour l'intégration de la technique dans une aiguille de biopsie, car ces tissus ne sont pas désirables lors de la prise d'échantillon, car non utiles au diagnostic.

Ma contribution spécifique à cet article est l'acquisition des mesures en laboratoire et en salle d'opération, sur les fantômes et *in vivo* dans les patients. Aussi, j'ai effectué le traitement des spectres et l'analyse de l'impact de tous les paramètres étudiés sur le système. J'ai collaboré avec Michael Jermyn (postdoc du LRO) pour développer des modèles mathématiques (classificateurs) capables de distinguer les spectres de tissus vitaux et tissus nécrotiques. J'ai aussi contribué de façon majoritaire à la rédaction de l'article et à sa publication.

3.2 Intégration en salle d'opération et étude de l'impact de la lumière ambiante

Dans le même but d'intégration de la spectroscopie Raman dans des instruments chirurgicaux, l'influence de différentes sources de lumière ambiante dans une salle d'opération a été évaluée afin d'optimiser la qualité des données acquises tout en minimisant l'impact des mesures sur le flux de travail chirurgical. En effet, les artefacts de lumière ambiante présentent une source de bruit significative lors de l'acquisition de spectres Raman dans un cadre clinique tel qu'une chirurgie ouverte. Les lumières sont régulièrement éteintes pendant les acquisitions spectrales, ce qui ralentit la procédure et oblige temporairement le chirurgien à opérer dans des conditions plus sombres. Une étude détaillée a été effectuée, présentée dans le deuxième article et quatrième chapitre de cet ouvrage, intitulé « Raman spectroscopy in microsurgery: impact of operating microscope illumination sources on data quality and tissue classification » (*The Analyst*, Facteur d'impact = 3.89). Un système de filtre a été introduit pour l'acquisition de spectres Raman *in vivo* sous la

lumière blanche d'un microscope neurochirurgical, sans interférer avec le drapage conventionnel (couverture du microscope avec une housse stérile) ou son fonctionnement normal. Les résultats démontrent qu'il n'y a pas de différence significative entre les spectres acquis sans la lumière blanche du microscope et sous la lumière blanche filtrée. Ceci est une amélioration importante puisque le temps total pour une mesure peut être diminué de manière significative et le chirurgien peut garder l'illumination sur la cavité chirurgicale à tout moment. Des recommandations ont été faites pour intégrer de manière transparente cette technique dans le flux de travail neurochirurgical sans artefacts spectraux dans les données mesurées. Une procédure clinique a aussi été développée afin d'assurer la répétabilité des données.

Le design du système de filtres et sa fabrication ont été effectués en collaboration avec Audrey Laurence, et j'ai effectué l'acquisition des mesures *ex vivo* et *in vivo* en salle d'opération. Aussi, j'ai effectué le traitement des spectres et l'analyse. J'ai collaboré avec Michael Jermyn pour développer des classificateurs capables de distinguer les spectres de matière blanche et de matière grise. J'ai aussi contribué majoritairement à la rédaction de l'article et à sa publication.

3.3 Intégration de la spectroscopie Raman dans une aiguille de biopsie commerciale – premier prototype

Les deux premiers articles ont permis d'intégrer de façon optimale les mesures de spectroscopie Raman pendant les résections de tumeurs au cerveau. Cette étape était essentielle afin de faire une preuve de concept démontrant que la spectroscopie Raman peut être utilisée pour la caractérisation de tissus, ce qui est crucial avant l'intégration dans une aiguille de biopsie. Dans le cas d'une aiguille de biopsie, la collecte de donnée est limitée à la trajectoire de l'aiguille dans le cerveau. Par contre, la collecte de spectres Raman de différents tissus (cerveau normal, cancer, tissu nécrotique) est facilitée pendant la résection de tumeur car la craniotomie expose les tissus, les rendant disponibles pour des mesures avec la sonde contact.

L'objectif suivant du projet de recherche est l'intégration de la technologie dans une aiguille de biopsie commerciale. Au cours de mon doctorat, plusieurs designs ont été considérés, ayant comme critère principal l'intégration harmonieuse au flux de travail chirurgical. Le premier prototype fabriqué dans le cadre de ce projet (figure 3.2) consiste en l'intégration de 12 fibres

optiques autour de la canule externe de l'aiguille de biopsie commerciale.

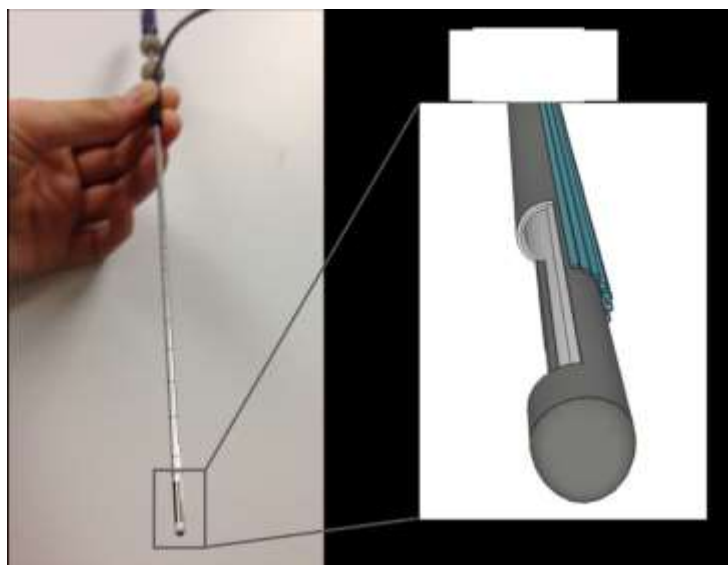


Figure 3.2 : Photo et schéma du premier prototype d'aiguille Raman, montrant les 2 fibres optiques autour de la canule externe de l'aiguille

De plus, un des objectifs initiaux de ce projet de recherche était l'intégration de la tomographie par optique diffuse au même instrument afin de détecter les vaisseaux sanguins. La conception de ce premier prototype a donc été effectuée en considérant cet objectif, justifiant le nombre de fibres et la géométrie utilisée (fibres à l'extérieur de la canule externe). Cependant, cet objectif n'a pas été maintenu pour des raisons de complexité et de difficulté à l'intégration clinique. Tel que mentionné dans l'introduction, l'utilisation de filtres optiques à l'extrémité des sondes est nécessaire afin d'isoler le signal Raman du tissu biologique, car la fibre optique produit un signal Raman intense. Puisque ces filtres ont une taille minimale, la plage spectrale HWN a été choisie pour ce design afin de limiter l'augmentation du diamètre de l'aiguille. Puisque la spectroscopie Raman HWN n'a jamais démontré son efficacité pour distinguer le cerveau normal du cancer *in vivo*, une preuve de concept a été effectuée utilisant la sonde peropératoire. Les différents aspects liés à cette étude, ainsi que le design du premier prototype d'aiguille de biopsie optique, sont présentés dans le troisième article ainsi que dans le cinquième chapitre de cette thèse. L'article est intitulé « A New Method Using Raman Spectroscopy For *In Vivo* Targeted Brain Cancer Tissue Biopsy » (Scientific Reports: Facteur d'impact = 4.12). Une étude animale dans des cerveaux porcins, démontrant la capacité d'acquisition de spectres Raman *in vivo* ainsi que l'extraction d'échantillons spatialement colocalisés avec la mesure spectroscopique, est aussi présentée dans

ce manuscrit. L'article présente également des spectres de matière blanche et de matière grise de cerveaux de veau *ex vivo*, démontrant que le système est capable de différencier les tissus cérébraux basé sur leurs différences moléculaires. Les mesures optiques *in vivo* avec la sonde chez les patients ont été acquises par moi-même et Michael Pinto (étudiant à la maîtrise). J'ai collaboré avec Michael Jermyn pour développer des classifieurs capables de distinguer les spectres de tissus normaux et de tissus cancéreux. La conception du premier prototype de l'aiguille Raman a été un travail collaboratif entre moi, Eric Marple, Kirk Urmey (Emvision Inc, FL, USA) et le neurochirurgien Kevin Petrecca. La fabrication a été effectuée par la firme EMVision. L'étude animale a été effectuée en collaboration avec Gilles Soulez (chercheur au centre de recherche du CHUM) et Sami Obaid (neurochirurgien au CHUM). J'ai effectué toutes les acquisitions avec l'aiguille Raman, le traitement des spectres et leur analyse. J'ai aussi contribué majoritairement à la rédaction de l'article et à sa publication.

3.4 Deuxième prototype et étude clinique

À la suite de cette preuve de concept, le focus du projet de recherche a été la translation clinique (chez l'humain) de l'instrument. Pour ce faire, des mesures *in vivo* lors de procédures de biopsies sont nécessaires. Le premier prototype présente plusieurs inconvénients. Premièrement, le fait qu'il ne soit pas stérilisable est un obstacle majeur à une étude humaine. Aussi, bien que le design soit fonctionnel cliniquement, la fabrication de l'instrument (particulièrement l'alignement des fibres optiques polies à angle) rend sa manufacture irréaliste. De plus, les résultats de classification en utilisant la plage spectrale HWN sont légèrement plus faibles que ceux obtenus en utilisant le Raman FP. Un nouveau prototype a donc été conçu, sous la forme d'une micro-sonde pouvant s'insérer dans la canule interne de l'aiguille de biopsie commerciale (figure 3.3).

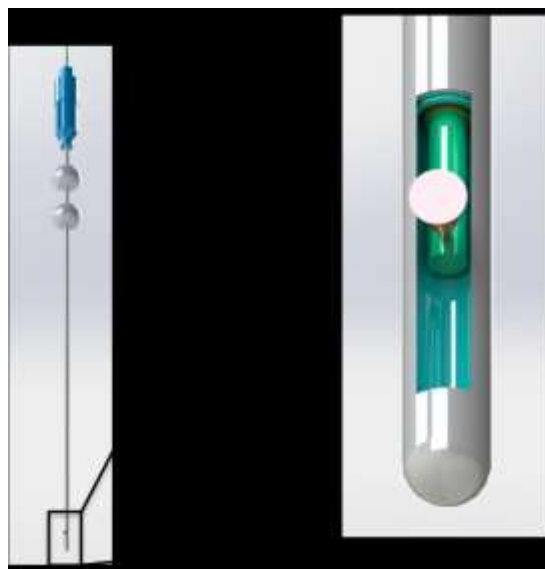


Figure 3. 3: Schéma illustratif du deuxième prototype de sonde intégrée à l'aiguille de biopsie commerciale (*Courtoisie de Eric Marple*)

Afin d'optimiser la sensibilité et la spécificité du système (pour la détection de tissu contenu des cellules cancéreuses), le prototype suivant a été conçu avec les capacités de mesurer les spectres Raman dans les deux plages spectrales. Cet instrument est présenté dans le chapitre 8 de cet ouvrage, ainsi que les résultats préliminaires liés à son utilisation dans une étude clinique lors de biopsies cérébrales chez 3 patients atteints de tumeurs au cerveau. Cette étude est toujours en cours, et a pour but de démontrer que la technique a le potentiel d'améliorer l'intervention chirurgicale. La conception du deuxième prototype de l'aiguille Raman a été un travail collaboratif entre moi, Eric Marple, Kirk Urmev et le neurochirurgien Kevin Petrecca. La fabrication a été effectuée par la firme EMVision. J'ai contribué en majorité au développement du système optique qui combine l'acquisition de spectres HWN et FP, et à la soumission d'un dossier au comité éthique de l'Institut neurologique de Montréal. Les acquisitions optiques *in vivo* chez les patients ont été acquises par moi-même et Michael Pinto Ces travaux feront l'objet d'un autre article dont la soumission est prévue à l'automne 2018.

CHAPITRE 4 ARTICLE 1: CHARACTERIZATION OF A RAMAN SPECTROSCOPY PROBE SYSTEM FOR INTRAOPERATIVE BRAIN CANCER TISSUE DETECTION AND CLASSIFICATION

**Joannie Desroches, Michael Jermyn, Kelvin Mok, Cédric Lemieux-Leduc, Jeanne Mercier,
Karl St-Arnaud, Kirk Urmey, Marie-Christine Guiot, Eric Marple, Kevin Petrecca,
Frédéric Leblond**

BIOMEDICAL OPTICS EXPRESS

4.1 Abstract

A detailed characterization study is presented of a Raman spectroscopy system that will be used in the scope of a clinical trial evaluating the impact of maximizing volume of resected cancer tissue in glioma surgery. The detection system consists of a hand-held probe system designed and optimized for *in vivo* tissue characterization. Factors such as linearity of the signal with integration time and laser power, and their impact on signal to noise ratio, are studied leading to optimal data acquisition parameters. The impact of ambient light sources in the operating room is assessed and recommendations made for optimal operating conditions. *In vivo* Raman spectra of normal brain, cancer and necrotic tissue were measured in 10 patients demonstrating real-time inelastic scattering measurements can distinguish necrosis from vital tissue (including tumor and normal brain tissue) with an accuracy of 87%, a sensitivity of 84% and a specificity of 89%.

4.2 Introduction

Gliomas are aggressive brain cancers, and are characterized by diffuse infiltrating borders with cancer cells invading the surrounding normal brain tissue. Despite intensive therapy, the prognosis for gliomas remains poor; glioblastoma multiforme (GBM) is the most common and aggressive form of glioma, median survival time is 14.6 months [114]. The standard of care for treatment of gliomas is surgical resection along with adjuvant radiotherapy and chemotherapy. Most brain tumor surgeries are performed with a craniotomy, and are done in order to remove as much of the tumor volume as possible. A craniotomy is the surgical removal of a section of the bone from the

skull (bone flap) to access intracranial structures. Craniotomy procedures in modern medical centers are carried out with the use of intraoperative guidance. This is usually achieved by using pre-operative magnetic resonance (MR) images as a navigational aide to surgery, with navigation systems such as the Medtronic StealthStation (Medtronic, CO, USA). The system may use infrared (IR) sources to co-localize the position of surgical tools (equipped with appropriate IR-detectable fiducial markers) with preoperative (or in some cases intraoperative) volumetric images of the patient head.

The primary clinical goal in glioma surgery is to resect as much of the cancer as possible to minimize the volume of residual tumor cells post-op. Several studies demonstrated that surgical metrics, such as volume of resected tumor or completeness of resection based on observed residual contrast on post-operative MR scans, correlate with progression-free and overall survival [115]–[118]. This is because residual invasive cancer cells invariably remain following surgery, very often leading to disease recurrence. Glioma surgery differs from several other surgical oncology procedures (e.g., skin, breast, mouth & throat cancer) in that no safety margins can be removed since unnecessary removal of normal brain tissue can often lead to neurological deficits with a direct negative impact on patient health such as impaired cognition, memory, strength and vision [118], [119]. To address this clinical problem, we have developed a hand-held contact Raman spectroscopy (RS) probe technique for real-time molecular characterization in terms of the intrinsic inelastic scattering contrast. Specifically, RS provides a specific tissue fingerprint of tissue based on its local biochemical composition [120]. Recently, this system was used in 17 patients by our group with an accuracy of 92% in distinguishing normal brain from tissue containing cancer cells. This study showed that the technique could detect previously undetectable invasive brain cancer cells in patients with World Health Organization (WHO) grade 2-4 gliomas [121].

Here we present a detailed data acquisition characterization and optimization study aimed at determining the optimal system operation parameters prior to the initiation of a clinical trial to evaluate the impact of the system on patient outcome. Specifically, the following characteristics were studied in order to find the optimal operating regime of our system for *in vivo* intracranial tissue characterization: 1) signal linearity with laser power and integration time, 2) level of signal to noise ratio (SNR) required for tissue classification. Beyond these considerations, the principal sources of intraoperative noise were assessed, and the influence of integration time and camera

temperature on the SNR evaluated. Spectral and intensity calibrations of the system were also performed in order to ensure the validity and the reliability of the measurements. The influence of different sources of ambient light in the operating room was addressed, and recommendations made for seamless integration into the neurosurgical workflow without spectral artifacts on the measured data. A clinical procedure was developed in order to ensure the repeatability of the data. As a complement to our past intraoperative work classifying normal brain tissue from cancerous tissue, here we are also presenting a study demonstrating the ability of the system to further discriminate cancer and normal brain from necrotic tissue. The rationale for presenting this work here is to demonstrate that the newly established data acquisition procedure is effective, but also bears relevance for on-going research by our group to develop an optical brain needle biopsy to guide the site of specimen collection in order to improve diagnostic yield. In fact, for brain needle biopsy procedures, collecting necrotic samples is not desirable since they are not diagnostic, and can lead to the need for a second biopsy procedure unnecessarily exposing patients to complications [122]–[126]. This is why insuring biopsy samples are not collected in a necrotic area is essential.

4.3 System characterization procedure and results

A description of the system is provided in this section, as well as a brief description of the measurements made for characterization. Assessment of the linearity of the measured signal with integration time and laser power is done to evaluate the reproducibility of the system for different acquisition parameters. Also, the signal-to-noise ratio (SNR) of the system is evaluated as a function of integration time and detector temperature, to find the optimal acquisition parameters for intraoperative measurements. The influence of different sources of radiation in the operating room is assessed to find the optimal setup in preparation for a clinical trial to follow-up the proof-of-concept study presented in [121].

4.3.1 System description

The Raman spectroscopy system has been described in detail elsewhere [121]. Briefly, it consists of a hand-held probe (EmVision LLC, FL, USA), a spectrally stabilized laser emitting in the near-

infrared (NIR) at 785 nm (Innovative Photonic Solutions, NJ, USA), a navigation attachment (Medtronic Suretrack) installed on the probe (Medtronic, CO, USA), a high speed and high-resolution charge-coupled device (CCD) spectrometer (ANDOR Technology, Belfast, UK), and a computer controlling all of the optical hardware for intraoperative data acquisition. As illustrated in Figure 4.1, the neuronavigation attachment on the probe allows the surgeon to navigate in the brain with the instrument, using the spatially-registered preoperative MR images as a reference. The cross-hairs on the MR slices shown in Figure 4.1B represent the location of the tip of the probe. This localization system also allows the recording of the position of the probe at each spectrum measurement. Therefore, the information provided by the preoperative MR images can be related to the measured Raman spectrum at that particular location, up to spatially registration inaccuracies associated, e.g., with brain shift.

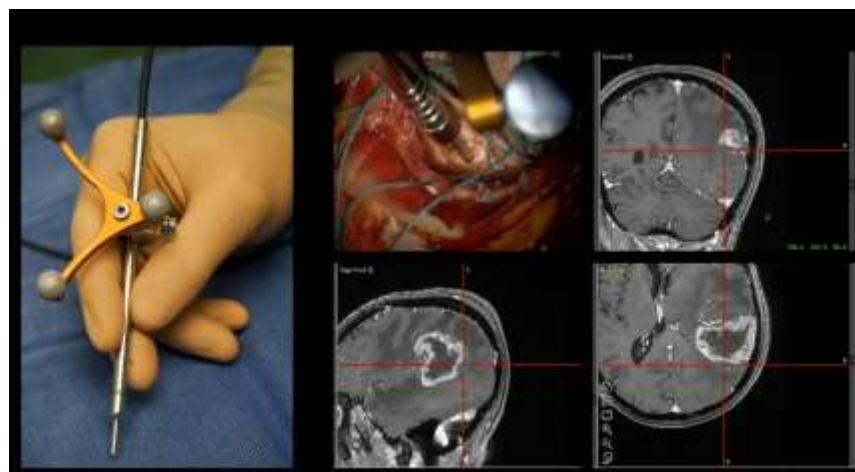


Figure 4.1 : Raman spectroscopy system for intraoperative detection (A) Photograph of the hand-held contact probe, with the attached tracking unit. (B) Illustration of the probe being used intraoperatively, with the neuronavigation system showing the location of the tip of the probe (cross hairs) on the preoperative MR images.

The laser and the spectrometer are connected to a computer. A data acquisition and analysis LabView interface was developed for acquisition and real-time visualization of the Raman spectra and classification result. The acquired spectra are composed of wave-number shifts ranging from 381 cm^{-1} to 1653 cm^{-1} , with a spectral resolution varying between 1.6 cm^{-1} and 2.1 cm^{-1} across the spectral domain. This area is consistent with the spectral shift region often referred to as the fingerprint region of biological samples [120]. The circular illumination spot size at the tip of the probe has a diameter of 0.5 mm (area of 0.2 mm^2), determined using the optical and illumination design software Zemax (Zemax, LLC, WA, USA).

4.3.2 System calibration, instrument spectral response function and data pre-processing

Intensity calibration is necessary to ensure that the results from different instruments and laser sources are comparable. It corrects for the spectral response of the system, which depends on optics, the grating, filters and the detector. For example, the sensitivity of the CCD detector, as well as the transmission efficiency of the fiber optic cables in the probe, are dependent on the wavelength of the signal. A Deuterium Tungsten Halogen calibration standard (Ocean Optics, Dunedin, FL, USA) was used with a diffuse reflectance standard (Spectralon®), which has a spectrally flat reflectance (99%) over the visible and near-infrared range. The reflectance standard was illuminated by the white light lamp, and the measurement was taken with the probe pointing towards the Spectralon®. The instrument's response R can be defined by

$$R = \frac{I_{measured}}{I_{true}} \quad (1)$$

where $I_{measured}$ and I_{true} are the measured and true spectra (company-provided) of the spectrally calibrated white lamp, respectively. In order to obtain a Raman spectrum corrected for the instrument's spectral response, the measured spectrum is multiplied by the correction factor $1/R$.

Linearization is defined as the calibration of the wavenumber axis of the measurements. This calibration makes the correspondence between the CCD's pixel position and the wavelength. A Mercury Argon (HgAr) spectral calibration lamp (Newport, Irvine, CA, USA) was used for this purpose, because it has emission peaks in the spectral range of the system. The lamp was positioned close to the Spectralon®, and the measurement was taken with the probe pointing towards it. A correlation curve between the known peaks wavelengths and the pixel positions was done and used to calibrate the wavenumber axis of the spectrometer. A correlation was also made with the Raman spectrum of the molecule acetaminophen (generic form Tylenol, McNeil Consumer Healthcare, Fort Washington, PA, USA), for verification purposes. The spectrum of acetaminophen, the correction factor and the spectrum of the HgAr lamp are shown in Figure 4.10 A, B and C of the appendix, respectively.

In order to acquire a Raman spectrum from the raw measurement, preprocessing procedures must be applied to remove non-specific contributions including a dark count subtraction to account for differences in ambient light conditions (the different contributions will be analyzed in the next section), as well as background removal due to intrinsic tissue fluorescence. The former is done by making a measurement with the laser turned off but with the same integration time, while the latter is accomplished using an iterative polynomial fit method whereby the low frequency components of the signal are isolated and removed [127]. An example of a raw spectrum with the corresponding polynomial fit is provided in the appendix in Fig.10 D of the appendix. The resulting spectra is then filtered with a Gaussian filter, and normalized by subtracting the mean and dividing by the variance of the spectrum.

4.3.3 Linearity of the signal with integration time and laser power

Linearity of the signal with output laser power and CCD exposure time (henceforth referred to as integration time) was verified by measuring the Raman spectrum of the molecule acetaminophen (generic form Tylenol, McNeil Consumer Healthcare, Fort Washington, PA, USA) while varying these two parameters. Three peaks were chosen (853 , 792 and 1320 cm^{-1}) for reference and the intensity of these peaks were measured as a function of laser power and integration time. Three ratios between peaks were also evaluated for each laser power and integration time, in order to validate that the shape of the spectra does not change.

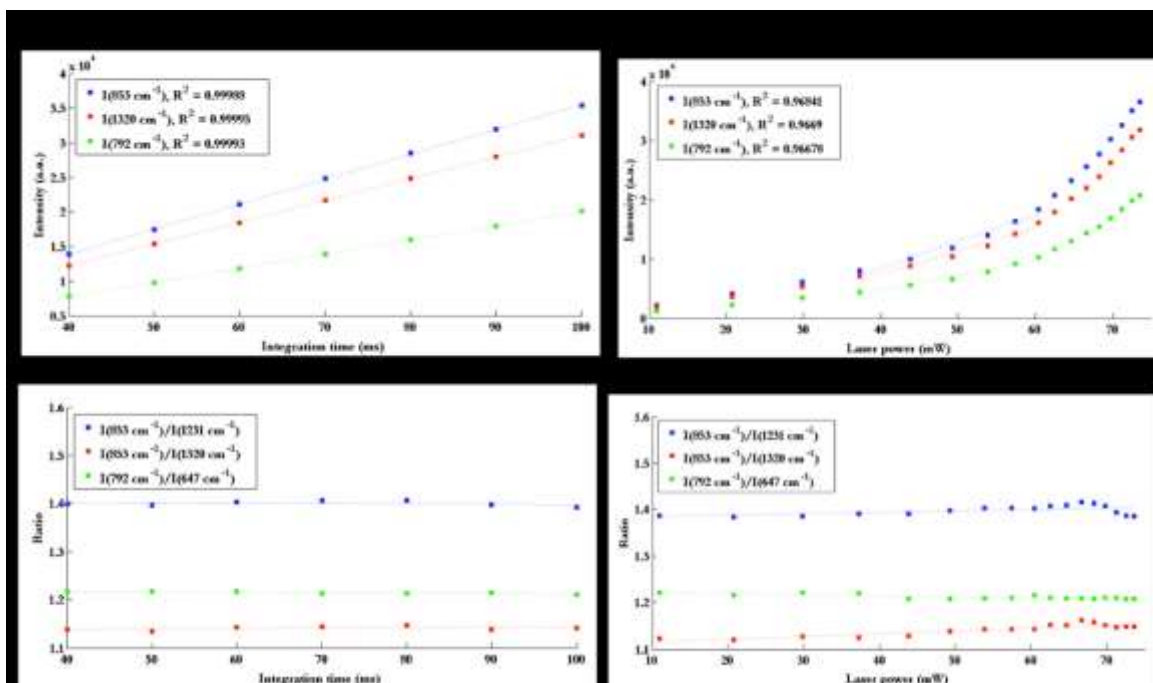


Figure 4.2 : (A) Intensity of 3 peaks on the Raman spectrum of Tylenol as a function of integration time, with linear fit with corresponding R^2 value for each curve (B) Ratios of Raman intensity peaks as a function of integration time. (C) Intensity of 3 peaks on the solid phantom Raman spectra as a function of laser power, with linear fit in the range of operation (40 to 60 mW) with corresponding R^2 value for each curve (D) Ratios of Raman intensity peaks as a function of laser power

Figure 4.2A reveals that the intensity of peaks is linear with integration time ($R^2 > 0.99$). Also, the ratios of peaks are constant with integration time – with a coefficient of variation of 0.77% (average over the three ratios), which means that the shape of the spectrum is stable (Figure 4.2B). Non-linearity occurs when varying laser power. As seen on Figure 4.2C, the curve is approximately linear before 60 mW but does not follow the linear trend at high laser power. One possible explanation for this non-linearity is that the shape of the laser beam could change with power, which would lead to a reduced coupling efficiency between the probe and the laser, as well as between the probe and the spectrometer. It is also possible that there was an issue with the measurement of laser power at the tip of the probe. However, in the range of operation, which ranges from 40 to 60 mW, the data shows linearity ($R^2 > 0.96$) between peak intensity and laser power. Consequently, this is not an issue for the use of the system for *in vivo* Raman spectra

measurements. Also, the ratios of peaks are stable with laser power – with a coefficient of variation of 0.53% (average over the three ratios) between 40 and 60 mW, which means that the shape of the spectrum is stable in that operating range (Fig.2D).

4.3.4 Signal to noise ratio

Numerous studies have proven the potential of Raman spectroscopy for the analysis of biological samples, more specifically for cancer diagnosis [128]–[131]. However, the signal associated with inelastically scattered light is weak i.e. several orders of magnitude smaller when compared to elastic scattering and intrinsic tissue fluorescence. As a result, one of the limiting factors for biological applications is stochastic noise, which can overwhelm the Raman-specific signal [132]–[136]. Consequently, the inelastic scattering signal-to-noise ratio (SNR) is a very important concept in Raman spectroscopy, to understand the signal and evaluate the quality of the measurements. Characterization of the noise is particularly important for *in vivo* applications, where integration time is limited for a seamless integration into clinical practice. Here we want to determine the SNR of the system, for different integration times with the objective of finding the optimal optical data acquisition procedure for *in vivo* measurements. One way to evaluate the SNR of a spectrum is to take a large number of measurements of the same sample, and to analyze the variation of one or more specific peaks. The SNR for the peak intensity of a Raman band is defined as the average peak height (\bar{S}), divided by the standard deviation of the peak height (σ_y) [137]:

$$SNR = \frac{\bar{S}}{\sigma_y} \quad (3)$$

The peak height is defined as the difference between the peak intensity and the baseline intensity (example shown in Fig.3). The baseline is chosen at a spectral shift where there is no peak in the spectrum, so only noise is present in the signal. In Figure 4.3, SNR is calculated with the Raman signal only, after the intrinsic fluorescence background removal.

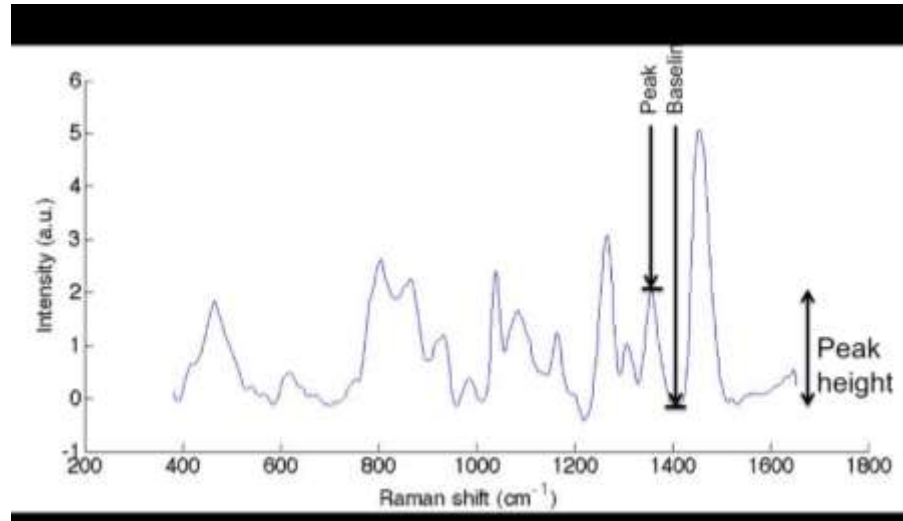


Figure 4.3: Raman spectrum of a solid phantom (polyurethane), illustrating the definition of peak height, S , for the evaluation of SNR.

One important noise source is shot noise, which comes from the discrete nature of the photons being measured by the detector (CCD). Since the signal is a stream of discrete events, its standard deviation is proportional to the square root of the signal intensity (Poisson statistics) [138]. Therefore, if shot noise is dominant, SNR should depend on signal intensity as

$$SNR \propto \sqrt{S}. \quad (4)$$

Note that this is only valid for the raw signal, i.e. the number of photons measured on the detector. Other sources of noise that can affect the signal, which depend on temperature of the detector, are thermal noise and dark current. A Biomimic polyurethane-based phantom (INO, Quebec, CA) was used for the measurement of SNR for different integration times, and the peaks chosen for the calculation were based on their similar amplitude to the ones associated with *in vivo* Raman spectra measurements [121]. $N = 50$ spectra were measured for each acquisition time, ranging from 0.01 seconds to 0.1 seconds with increments of 0.01 seconds. The signal to noise ratio was calculated for different integration times using Eq. (4) based on three peaks of the solid phantom's spectra, namely wavenumber shifts 983cm^{-1} , 1266cm^{-1} and 1358cm^{-1} . Since the average peak height is proportional to the integration time, a square root function was fitted to the data

(with laser power kept fixed) in order to evaluate the correspondence with equation (4) (Figure 4.4A). The same peaks were used for the measurement of SNR on the Raman spectra, with the intrinsic fluorescence background not removed in order to verify whether or not the same trend was maintained and this to insure that Eq. (3) could be used to estimate SNR independent of whether the intrinsic fluorescence background was removed or not (Figure 4.4B).

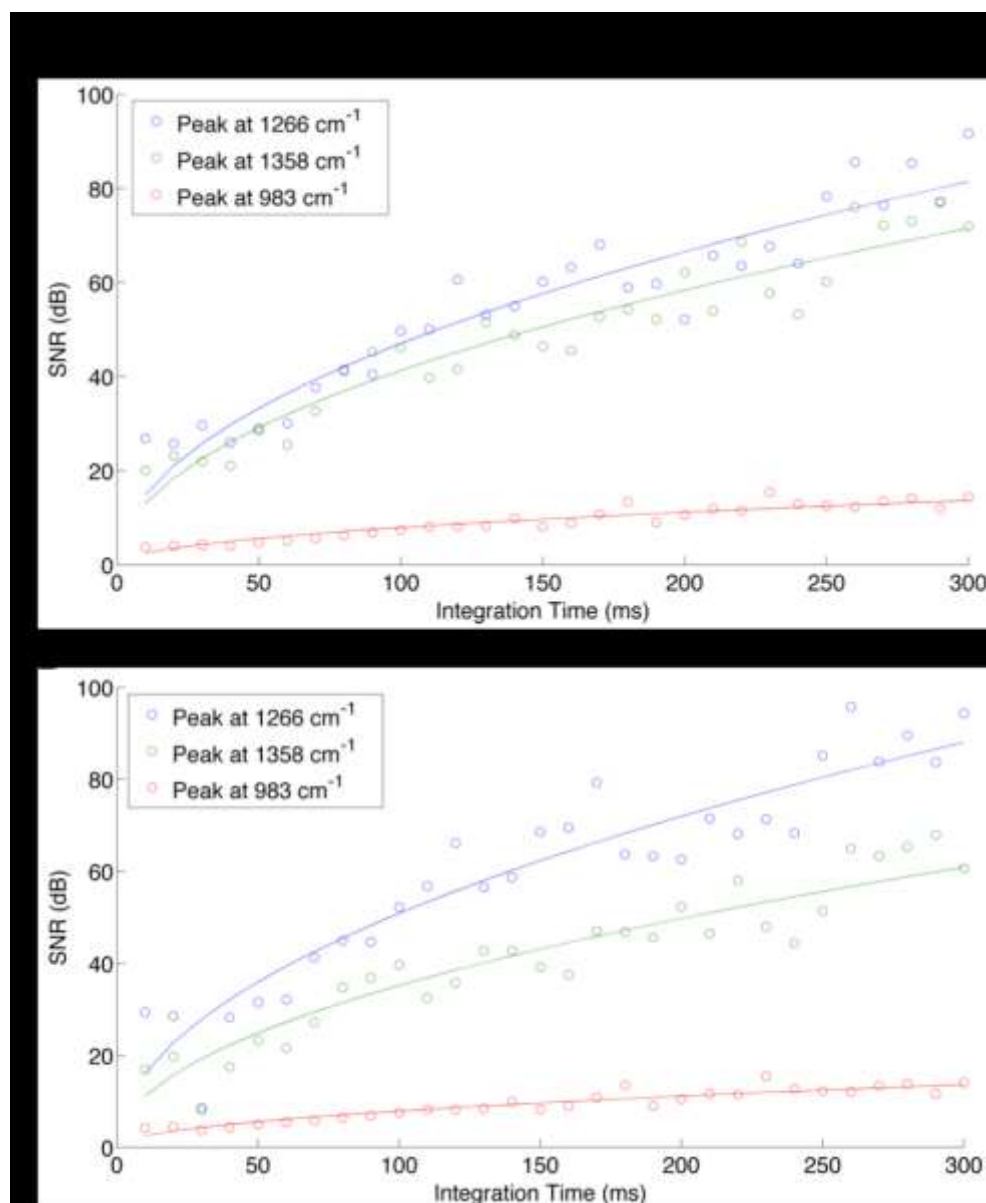


Figure 4.4: Signal to noise ratio of three different peaks on the spectra of the solid phantom, as a function of integration time (laser intensity kept fixed), calculated with equation (3) on (A) raw spectra and (B) Raman spectra, without the intrinsic fluorescence background

An increase of the SNR with integration time is observed for the raw signal, which is consistent with Poisson statistics. We observe the same increasing trend for the SNR of the Raman spectra, which reveals that the detectability of Raman peaks also depends highly on integration time. However, it is important to note that the intensity of the intrinsic fluorescence background can vary for different tissue types. For instance, if the measured spectrum has a very high level of intrinsic fluorescence, the shot noise will be higher, so the SNR of the Raman signal will decrease. Also, note that the SNR depends on the height of the particular peak chosen, which explains the difference between the SNR of different peaks. Even if the peaks were chosen in order to represent the peak's height on the spectra acquired *in vivo*, the SNR value might be slightly different. The relatively good fit of the data to the square root function tells us that shot noise is an important source of noise in our system, which depends on signal intensity.

Temperature-dependent noise was also assessed, by evaluating SNR for different cooling temperatures of the CCD. The same phantom was used for this experiment, with 50 spectra measured for every camera temperature ranging from -20°C to -80°C .

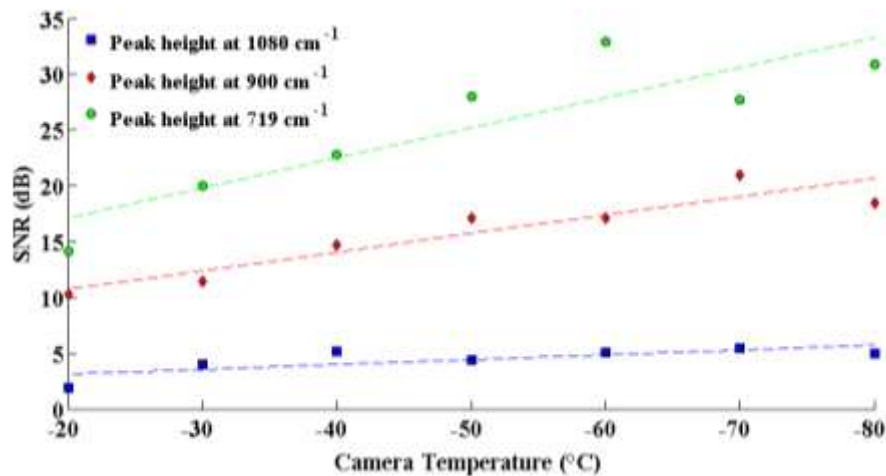


Figure 4.5 : Signal to noise ratio of three different peaks on the spectra of the solid phantom, as a function of the camera temperature

Decreasing the temperature causes an increase in SNR. Since the increase is relative to the SNR of a peak (multiplicative), peaks with higher SNR will have a larger increase, which explains

why the peaks with higher SNR have larger slopes in Figure 4.5. Therefore, thermal noise and dark current are sources of noise in the measured signal, which can be reduced by cooling the camera.

4.3.5 Sources of spectral artifacts: Ambient lights

The use of Raman spectroscopy in the operating room (OR) presents many opportunities for optimization. One challenge is the use of the system with different sources of electromagnetic radiation overlapping with the detection range of the Raman system. These sources are represented in the photograph in Figure 4.6, which is showing a typical OR. Common sources include: light passing through (A) surgical lights (Dr Mach, model 380, Germany) that provide lighting in and around the operative field, (B) conventional fluorescent light sources used to light-up the room, (C) liquid-crystal display (LCD) monitors used, e.g., to provide live images of the field of view of the microscope, (D) white-light source from the OPMI Pentero surgical microscope system directly exposing the surgical cavity (Zeiss, Oberkochen, Germany), (E) windows with a view to the exterior of the building, i.e. natural light, and (F) neuronavigation system (Medtronic) infrared sources (Figure 4.6).

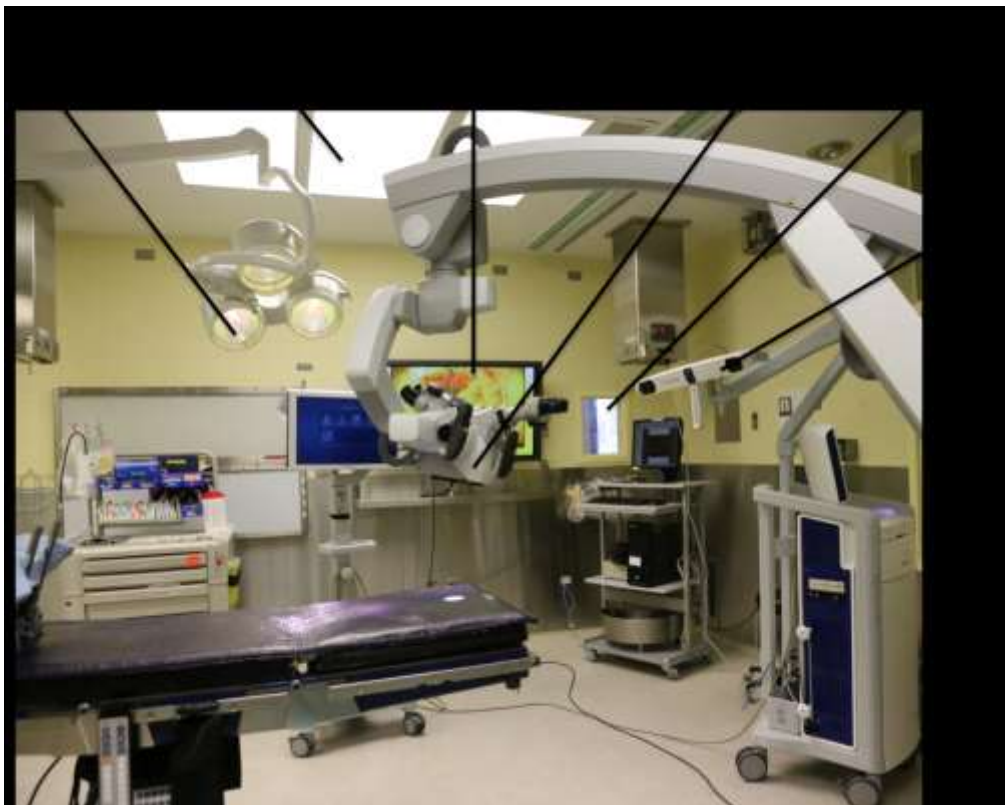


Figure 4.6: Sources of ambient light in the operating room: (A) surgical lights (Dr Mach, model 380, Germany) (B) fluorescent light sources (C) liquid-crystal display (LCD) monitors (D) white-light source from the OPMI Pentero surgical microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) (E) windows with a view to the exterior of the building (F) neuronavigation system (Medtronic) infrared sources

Here we present a detailed quantitative assessment of the impact of these light sources on our ability to detect the inelastic scattering signature of tissue with the Raman spectroscopy instrument. Veal brain was used for this experiment, since it has been determined to have a Raman signature (and intrinsic fluorescence background) consistent with that of human brain tissue (see Figure 4.11 in appendix comparing both spectra – raw and processed data). The veal brain was placed on the operating table in the OR, and the probe was placed in a fixed position in contact with the surface of the brain (on gray matter). A spectrum was measured with the probe under every ambient light source separately, varying the intensity of the sources whenever possible. The intensity of the surgical lights (C) can be varied from 1/7 to 7/7 intensity, and a high intensity (7/7) was used as well as a low intensity (3/7) for the measurements. They can also be moved, so that lights point toward the sample (direct) or away from the sample (indirect). Therefore, four states of the surgical

light were used in this experiment, including: high direct (HD), low direct (LD), high indirect (HI) and low indirect (LI). The light source of the microscope is a white xenon source, and a blue low pass filter can be used for fluorescence-guided surgery. The intensity of the light can be adjusted from 0 to 100%, and intensities of 30%, 60% and 100% were used for this analysis. In order to evaluate the change of the spectrum in the course of the experiment, a control measurement was acquired between every measurement of the different sources turned on. The latter consists of a spectrum acquired on veal brain with absolutely no light sources turned on, including black covers blocking light passage through the windows.

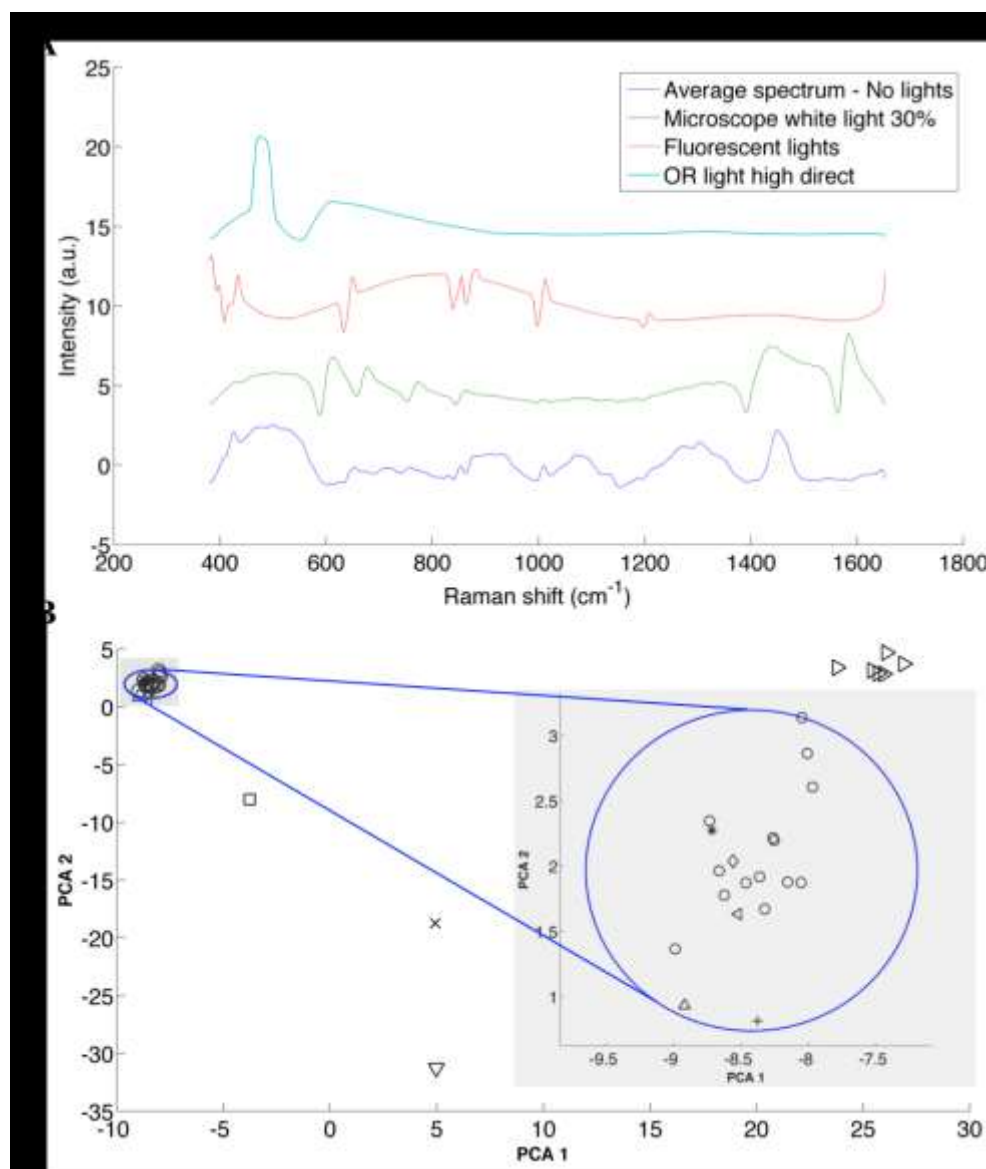
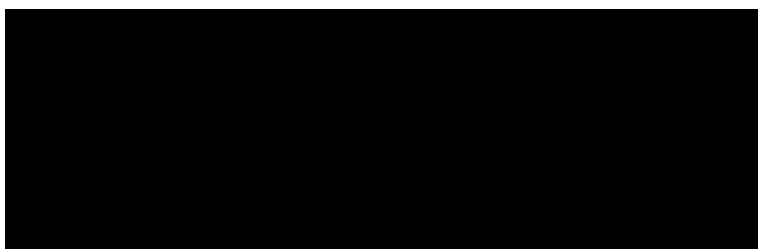


Figure 4.7: (A) Representative spectra acquired on veal brain under the ambient light conditions that caused the largest spectral artifacts that are not specific to inelastic scattering. (B) PCA

scatter plot of score 1 versus score 2 of Raman spectra of veal brain for every ambient light conditions considered: no lights (o), LCD monitor (+), IR source of the neuronavigation system ON (*), Microscope blue and white light with different intensities (>), surgical lights HD (x), surgical lights LD (square), surgical lights LI (diamond), surgical lights HI (^), fluorescent lights (v), external lights (<). K-means cluster analysis was used to group observations into 5 clusters, and the one including all the measurements with the condition “no lights” is represented by the circle. The radius of that circle is the largest distance between a point in the cluster and the centroid of that cluster. This is shown more clearly in the zoom of this section of the plot.

Table 4.1: Ambient light sources and corresponding symbols, used in Figure 7



Visual analysis of the spectra (Figure 4.7A) was first done in order to qualitatively evaluate the impact on the spectra of different ambient light conditions. Secondly, a principal component analysis (PCA) technique was used in order to quantitatively assess the level with which different sources could affect and compromise the detection of the inelastic scattering signal. Briefly, PCA is a statistical technique that uses an orthogonal transformation to convert a set of observations of variables (here, wavenumbers) into principal components. The principal components are a set of values of linearly uncorrelated variables, from which we can obtain the measured spectra by a weighted linear combination. The transformation is such that the first principal components account for the most variability in the data, and each following component has the highest variance possible with the condition that it is orthogonal to the preceding component [139]. In our case, the scores of principal components 1 and 2 captured 65% and 18% of the spectral variance, respectively. Since these components altogether capture more than 80% of the information contained in the spectra, for simplicity here we are only considering the first 2 components.

The PCA plot of these 2 scores (associated with the first 2 principal components) shows that all the spectra that were acquired with the condition no lights are grouped in a cluster with the spectra acquired with external lights, Medtronic system, LCD monitor and OR light when pointed away from the sample (circle in Figure 4.7B). A K-means clustering technique was used to group

the observations (spectra) into different clusters in such a way that objects in the same cluster are very similar and objects in different clusters are very distinct. The algorithm was used to determine the position of the centroid of the clusters, and the circle in Figure 4.7B has its origin on the centroid of that cluster, and its radius is the largest distance between a point in the cluster and the centroid of that particular cluster. The plot also shows that the spectra acquired with the other sources (microscope, fluorescent lights, OR lights pointed directly at the sample) are significantly different. The spectra of veal brain altered by these most significant light sources, as well as the control (no light sources) are shown in Figure 4.7A. An artificial shift in the intensity (y -axis) was added to each spectrum in order for them to be separated, for clarity. The sources that are inside the circle have an insignificant impact on the measurements, since they don't produce larger differences than those observed between measurements under the same condition (no light). Therefore, OR lights pointed indirectly, LCD screens, and exterior lights coming through the windows can be used during Raman spectroscopic measurements in the operating room. However, the ones that are outside the blue circle should not be used during Raman spectrum measurements (microscope light, fluorescent lights and OR light point directly at the sample), since they affect the signal significantly. Despite the fact that the neuronavigation IR source is inside the circle, it can cause saturation of the signal, which we observed previously during intraoperative measurements. Consequently, these sources must be pointed away during the measurements.

4.4 Clinical application: classification of necrotic tissue, cancer and normal brain

The previous sections demonstrate that our detection system is reproducible, and can provide reliable Raman spectra measurement when used during brain surgery. Specifically, we have determined that the laser with operating at powers between 40 to 60 mW in order to be in the linear range, and that integration time will be set to 0.05 seconds which is chosen to be the best compromise between clinical practicality and SNR. The temperature of the camera was set to -40°C for this study since it was a faster cooling, but will be set to the minimum (-80°C) for the larger clinical trial since it has been shown to improve SNR significantly. All the light sources mentioned in the previous section were turned off while the measurements were taken, except the ones that showed to have an insignificant impact on the measurement, namely: exterior lights,

surgical light at low intensity and pointed away from the measurement location, and LCD monitors. Here, we use those operating conditions for acquisition of Raman spectra of different types of brain and cancer tissues intraoperatively with the clinical objective to determine the system's ability to differentiate necrotic tissue from normal brain and cancer. We chose this application in order to evaluate the feasibility of a brain biopsy guided by Raman spectroscopy, as explained in the Section 4.1.

The intraoperative data acquisition procedure is described elsewhere [121]. Briefly, before each surgical procedure, the probe is sterilized using the STERRAD system. The navigation attachment on the probe (Medtronic SureTrak) allows the surgeon to use the neuronavigation system (Medtronic, MN, USA) with pre-operative MR-images to choose measurement locations of normal brain, cancer and necrotic tissue. Even though state-of-art neuronavigation techniques are used in this study, MRI information is used only qualitatively for visualization and estimation of the location of each Raman measurement on the pre-operative images. The location is first recorded on the MRI using the Medtronic StealthStation. A background spectrum with an integration time of 0.05s was first taken with the probe in direct contact with the tissue, but with the laser off. Then, 3 spectra were taken with the laser on with an integration time of 0.05s each. Laser power is adjusted prior to each procedure to account for the differences in tissue intrinsic fluorescence levels, to avoid saturation of the CCD. The surgeon collected a tissue sample (average size of $\sim 0.5\text{mm} \times \sim 0.5\text{mm}$ and depth of $\sim 3\text{mm}$) immediately following the measurement and at the same location. A figure showing the surgeon handling the probe is shown in Figure 4.8 with the corresponding video presented as supplemental material.



Figure 4.8: Image grabbed from the video (see Media 1) showing the surgeon handling the probe

Each sample was preserved in Formalin, and sent to pathology for H&E staining and analysis. A neuropathologist categorized each sample, based on WHO pathological criteria, which was used as a reference for this study [140]. The data was then pre-processed and analyzed with a classification algorithm, Boosted trees [121]. Samples were excluded from analysis if the spectra were saturated. A total number of 70 spectra were measured in 10 patients (12 normal brain, 28 cancer and 30 necrotic samples). The spectra of normal brain, cancer and necrosis, averaged over all measurements, are shown in Figure 4.9.

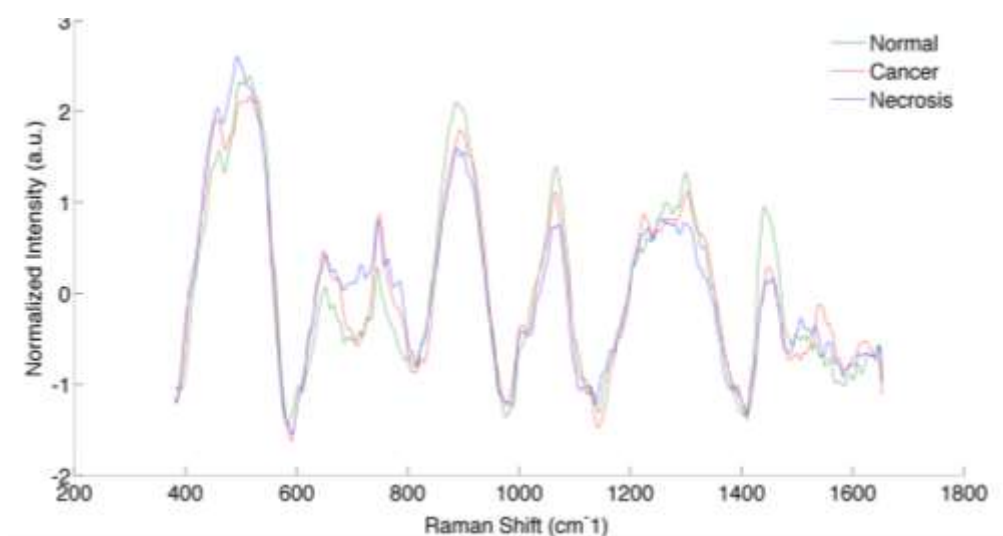


Figure 4.9: Spectra of normal brain, cancer and necrotic tissue, averaged over all measurements.

The tissue types were divided into two categories in order to evaluate the performance of the algorithm: necrosis and vital tissue (including cancer and normal tissue). Using a leave-one-out cross-validation approach with the Boosted trees algorithm, we achieved a classification accuracy of 87%, sensitivity of 84% and specificity of 89%.

4.5 Discussion

A probe system and data analysis methods for Raman spectroscopic measurements have been previously developed and tested in 17 glioma patients [121]. The system has already been

demonstrated to be well-suited for intraoperative decision making during brain cancer surgery. Here we have presented specific details pertaining to the calibration and required data pre-processing steps for that system as well as an analysis of factors leading to optimal data acquisition parameters in preparation for a large scale clinical trial. The system was first calibrated and its spectral response precisely measured. The data pre-processing steps used with the system are: dark count subtraction, intrinsic fluorescence background removal using an iterative polynomial method, filtering and normalization. The measured Raman signal shows linearity with integration time, and the spectral shape of the spectra remain unchanged when varying integration time. A linear relationship was shown between Raman-specific signal (after data pre-processing steps were applied) and laser power in the range operation, from 40 mW to 60 mW. The observed non-linearity at higher laser power could be explained by the change in shape of the laser at high powers, or by the measurement of the power at the output of the probe.

Specifically, the SNR of the system was measured with different samples, by taking multiple measurements and evaluating the mean and standard deviation of the peak height (equation 2.1). A typical square root relationship between integration time and SNR was observed (before and after data pre-processing steps were applied), revealing stochastic photonic noise as a dominant source of noise in the signal. From previous work, an integration time of 0.05s is sufficient to discriminate between tissue containing cancer cells and normal brain with accuracy >90% [121]. Here it has been demonstrated that modest increases in integration time can improve SNR and thus potentially further improve diagnostic accuracy. In fact, as shown in Figure 4, increasing the integration time from 0.05s to 0.1s or 0.2s would increase the SNR by 41% or 73%, respectively. However longer integration times can limit the clinical practicality of the technique, which needs to be real-time in order to minimize disruption to the neurosurgical workflow. Thus a trade-off must be made between integration time and SNR implying efforts made on other fronts to fully exploit the diagnostic potential of the Raman effect. A higher SNR would be helpful, for example, if a chemometrics analysis was performed with *in vivo* Raman spectrum. Also, distinguishing between different tumor grades, which potentially have subtle spectral differences, might be possible with higher SNRs. The relationship between noise and camera temperature was also assessed, by measuring multiple measurements on a phantom, at different cooling temperatures. It was revealed that there is a linear relationship between SNR and temperature, and that the SNR could be increased by up to 35% by simply decreasing the detector's temperature from -40°C to -

80°C. Therefore, the camera must be cooled to the minimum temperature in order to minimize thermal noise, hence increase the quality (SNR) of the measured data.

The influence of potential sources of ambient light in operating rooms was evaluated in order to find the optimal conditions for the measurement of Raman spectra *in vivo*. The sources that have the most influence on the measurements were determined to be the surgical microscope light sources (white or blue), ambient fluorescent lights and standard operating room (OR) lights when they are pointed directly at the measured sample. As a result: (i) the microscope light source and the fluorescent lights must always be turned off while the spectroscopic measurements are taken, (ii) standard OR lights can be left turned on as long as they are pointed away from the sample.. Moreover, the IR source of the Medtronic neuronavigation system has been shown to have little impact on the measured spectra. This is due to the fact that the IR source's spectrum has no distinguishable peaks (*i.e.*, the spectrum is smooth and monotonically increasing as a function of frequency), and despite it contributing to the raw spectra, removal is achieved, as with intrinsic fluorescence, using the polynomial fitting technique (see section 2.2). However, in some instances it was observed that this source of ambient light caused detector saturation when the IR source was pointed directly at the measurement location. For this reason, the IR source should preferably be pointed away (or momentarily deactivated) while the measurement is taken. The exterior lights (light passing through the windows) showed little impact on the Raman spectra, so there is in most cases no need for window covers. However, if some measurements are made in operating rooms in which more exterior light is coming in, tests are needed to see if it influences the results. The LCD monitors did not appear to have a significant influence on the measured spectra, but care must be taken to insure that the screens are not too close to the measured samples.

To conclude, a small in-human clinical study was performed where *in vivo* spectroscopic data acquisition was achieved under the experimental conditions determined to be optimal for the probe system operation and acceptable ambient light conditions. The results of this study provide evidence that necrotic tissue can be detected using inelastic scattering. This is an important result for the on-going development by our groups [126] of optical biopsy techniques where the detection of necrosis is crucial to insure biopsy samples are collected in tumor areas thus improving the diagnostic yield of the procedure.

4.6 APPENDIX

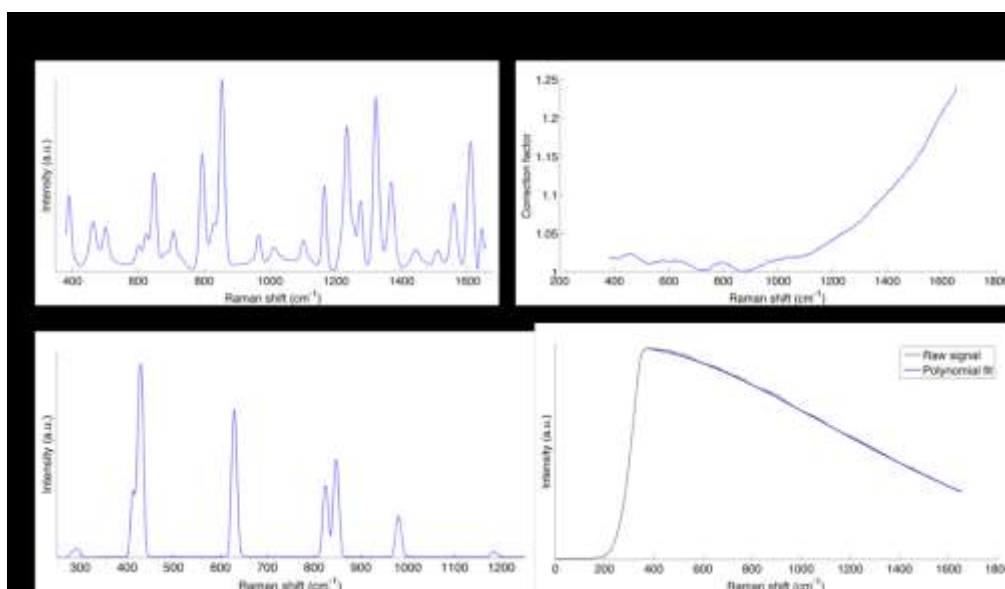


Figure 4.10: Spectra illustrating steps of the data preprocessing: (A) Raman spectrum of Acteminophen used as a reference for calibration of the wave number axis (x-axis) (B) Correction factor to account for the system response, obtained from a calibrated white light and a reflectance standard (C) Spectrum of a mercury argon lamp, used as a reference for calibration of the x-axis (D) Raw Raman spectrum from human grey matter (black line) with the corresponding polynomial fit used to remove the intrinsic fluorescence background.

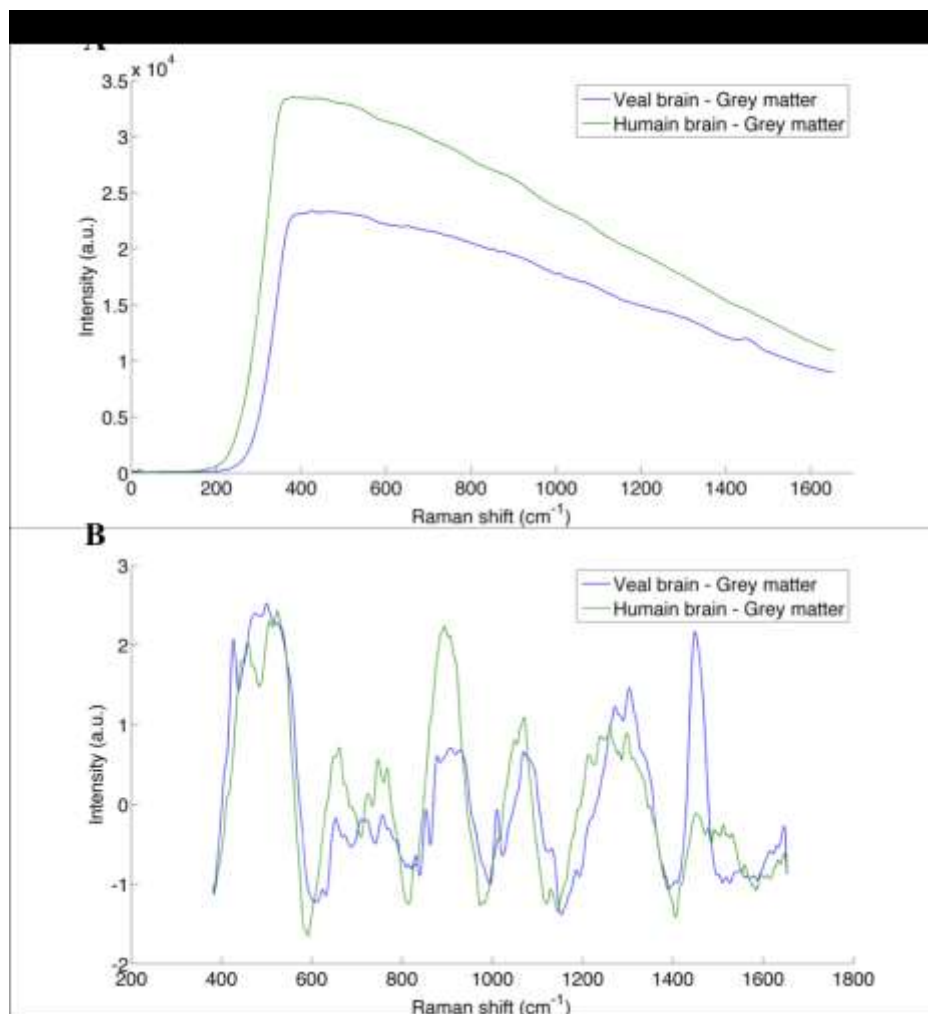


Figure 4.11: Comparison of the Raman spectra of veal brain (blue) and human brain (green) for (A) raw spectra and (B) spectra with intrinsic fluorescence background removed.

CHAPITRE 5 ARTICLE 2: RAMAN SPECTROSCOPY IN MICROSURGERY: IMPACT OF OPERATING MICROSCOPE ILLUMINATION SOURCES ON DATA QUALITY AND TISSUE CLASSIFICATION

Joannie Desroches, Audrey Laurence, Michael Jermyn, Michael Pinto, Marie-Andrée Tremblay, Kevin Petrecca, and Frédéric Leblond

THE ANALYST

5.1 Abstract

Ambient light artifacts present a significant source of noise when performing Raman Spectroscopy in a clinical setting such as open surgery. Lights are routinely turned off during spectral acquisitions which slows down the surgical procedure and temporarily forces the surgeon to operate in darker conditions. Here a filter system is introduced to perform *in vivo* Raman spectroscopy measurements under the white light of a neurosurgical microscope, without interfering with conventional draping or function of the microscope. Ex vivo and *in vivo* results on calf and human brain, respectively, show that there is no significant difference between Raman spectra under the microscope white light off and under the filtered white light. This is an important improvement since the total time for a measurement can be decreased significantly and the surgeon can keep illumination on the surgical cavity at all times.

5.2 Introduction

Tissue interrogation using Raman spectroscopy has been exploited to develop surgical guidance tools that can help improve the safety of tissue resection procedures as well as to minimize the volume of residual pathological tissue[141], [142]. This is especially important for applications involving microsurgical techniques where tissue information is typically required at sub-millimeter scales in critical areas at or close to margins between normal and pathological tissue. Microsurgery involves the use of an operating microscope providing surgeons with a magnified view of the surgical field under white-light illumination using powerful incandescent arc lamps with spectral

power densities in the visible as well as in the near-infrared regions of the electromagnetic spectrum. The level of visible light associated with these microscopes can be controlled by the surgeon up to ~ 10 mW/cm²/nm within the imaging plane. Microscopes with different technical specifications (e.g., spatial footprint, field of view, magnification, illumination sources) were made for specific medical applications including ophthalmology, orthopedic surgery, gynecological surgery, otolaryngology, neurosurgery, oral & maxillofacial surgery, plastic surgery and podiatric surgery[141], [143]–[147]. A difficulty associated with the seamless integration of Raman spectroscopy in the surgical workflow is that emission from the microscope lamps can introduce broad or sharp spectral artefacts depending on the illumination source, which is usually a LED, halogen or arc lamp. The artifacts in the detected signals can corrupt the inelastic scattering spectra, thus preventing Raman tissue information associated with amino acids, lipids, proteins and DNA to be used quantitatively. Those artefacts can either appear directly or indirectly in the spectra. Direct spectral corruption will be associated with visible or near-IR light from the microscope lamp resulting from wavelengths within the spectral window of detection of the Raman system. For example, fingerprint Raman systems with excitation lasers peaked around λ_{ex} (typically 660, 785, 830 or 1064 nm for biomedical applications[148]) are susceptible to microscope lamp excitation peaks above λ_{ex} since those spectral components are unaffected by the high-pass filters responsible for rejecting elastically scattered Rayleigh light. On the other hand, indirect Raman signal corruption can result from microscope lamp wavelength below λ_{ex} despite the presence of the high-pass filters. This can be attributable to the interplay between interference filters bleed-through associated with imperfect light attenuation (individual filters can typically have up to optical density OD = 6 attenuation) and the weak amplitude of the inelastic light contribution relative to the strong intensity of the illumination at wavelengths above λ_{ex} .

Here the development and validation of a simple technique that can be implemented in any operating theatre is presented to allow intraoperative Raman spectroscopy to be performed under operating microscope illumination and thus facilitate integration into surgical workflows. The proposed method consists in a custom optical filter adapter seamlessly integrated on the front lens of an operating microscope to filter light emitted from the source with wavelengths above λ_{ex} . The design of the adapter is presented as well as its detailed evaluation for different levels of operating microscope light intensities based on ex vivo calf brain measurements. The illumination conditions

under which the distinguishing molecular features of white and gray matter can be detected are presented, as well as the conditions under which support vector machine (SVM) automated tissue classification can be realized with sensitivity and specificity comparable with ideal conditions when operating microscope lights are turned off. *In vivo* intraoperative measurements made during human glioma surgery are presented to further confirm the conditions under which Raman spectroscopy under operating microscope lights can be achieved.

5.3 Experimental

5.3.1 Design of the filter adapter

An adapter was designed to hold the filters in the light path of a Zeiss Pentero operating microscope (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany). Two shortpass filters (cut-off at 675nm, Edmund Optics, United-States) of optical density (OD) 4 and one longpass (cut-off at 400nm, Edmund Optics, United-States) filter of OD 4 (all with a diameter of 25 mm and a thickness of 3 mm) were fixed under the microscope's head using a custom 3D printed holder (Figure 6.1). The holder was positioned in front of the white-light source (Xenon short-arc lamp, OSRAM, Germany) to insure light is filtered before illuminating the tissue. The adapter piece was printed using white ABS plastic and was designed not to interfere with the sterile drapes used during neurosurgical procedures (see the 3D modelling in the supplemental material). A rubber cap taken from an unused microscope drape (Ecolab, Mississippi) was glued to the 3D-printed part in order to stick it onto the microscope head as shown in Figure 5.1. The operating microscope in Figure 5.1 is equipped with a white-light lamp that can be operated at variable electronically-controlled output power values.

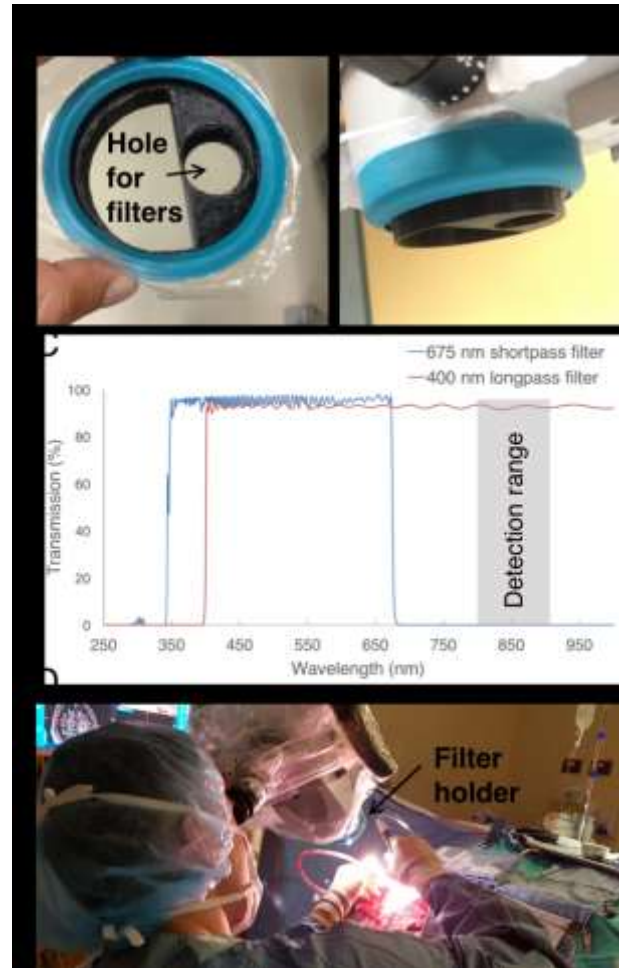


Figure 5.1: Description of the filter holder inserted next to the front lens of a neurosurgical microscope: (A) bottom view showing the circular hole for the filters, (B) side view, (C) Transmission curves of the filters and detection range of the Raman spectroscopy system and (D) view of the adapter on the operating microscope

5.3.2 *Ex vivo* experiments on calf brain

The Raman spectroscopy system, described in details previously [92], [149], consists of a 785 nm excitation laser (Innovative Photonic Solutions, NH, USA), a hand-held fiberoptic probe (EMVision LLC, FL, USA), and a spectrometer coupled to a high-resolution charged coupled device spectroscopic detector (ANDOR Technology, Belfast, UK). The probe was used to acquire spectra *ex vivo* on white and gray matter locations of a calf brain. For each measurement, an ambient light measurement was taken without the laser excitation source, then three spectra were acquired each with an acquisition time $T = 50$ ms. For each probe location, the measurements were made with the probe in contact with tissue under the range of different light conditions summarized

in table 5.1. The measurements labelled “No lights” in the table (operating microscope light off) were acquired before and after the “white light” measurements to be used as controls. Overall 94 ex vivo control measurements were made on calf brain (50% in gray matter, 50% in white matter), with corresponding measurements made (at the same tissue location) under white light illumination (9, 22, 39 and 74 mW/cm² at 800 nm) with and without the filter adapter.

The reason for making measurements in white and gray matter with the microscope light turned off is that they will be used to evaluate the impact of the filter adapter on Raman spectra as well as tissue classification. For classification, a support vector machine (SVM) algorithm with principal component analysis (PCA) was used, which uses mathematical optimization to find the hyperplane (in principal components space) maximizing the separation of spectra from different tissue types[150]. A classifier was trained using the dataset consisting of all Raman spectra acquired with the operating microscope light turned off. Classification (white matter vs. gray matter) results were obtained using the two testing datasets composed of all spectra acquired with the microscope light turned on with and without the filter adapter. Sensitivity, specificity and accuracy in detecting white or gray matter were computed for both testing datasets.

5.3.3 Intraoperative measurements

The Raman spectroscopy probe was used during brain tumor resection for one patient with a oligodendroglioma grade III tumor at the Montreal Neurological Institute and Hospital. The study was approved by Ethics Review Board and informed consent was obtained. The filter adapter was installed on the operating microscope prior to covering the microscope with drapes isolating it from the sterile surgical environment. During the procedure, the probe was placed in contact with tissue at three different brain parenchyma locations and Raman spectra were acquired under tissue exposed with white-light associated with 9 and 74 mW/cm² at 800 nm (Table 5.1).

Table 5.1: Light conditions under which Raman spectroscopy measurements were made in calf brain (*ex vivo*) and human brain (*in vivo*), with corresponding number of measurements (n). *Ex vivo* “White light” measurements were made with and without the filter adapter installed on the operating microscope. White light intensities of 5, 25, 50 and 100% of maximum light output correspond to 9, 22, 39 and 74 mW/cm² at 800 nm, respectively

Light condition	Gray matter (calf brain) n	White matter (calf brain) n	Human brain n
White light			
5% intensity	5	5	
25% intensity	5	5	
50% intensity	5	5	
5% intensity with filter	5	5	3
25% intensity with filter	5	5	
50% intensity with filter	5	5	
100% intensity with filter			3
No lights	47	47	3

5.3.4 Data processing and analysis

The following data processing steps were applied to the raw spectroscopic probe measurements: (1) ambient light subtraction, which consists in the subtraction of the measurement acquired with the 785 nm laser source turned off, (2) spectral correction accounting for the instrument spectral response function of the system using a measurement made on a Raman standard (SRM2241, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, United-States), (3) removal of the intrinsic tissue fluorescence background with an iterative polynomial fit[151], (4) normalization with standard normal variate and (5) smoothing with a Gaussian filter[152]. Principal component analysis was used on the calf brain dataset to quantitatively assess the differences between spectra acquired under different light conditions[153]. The Pearson correlation coefficient was evaluated between spectra acquired with operating microscope lights turned off and every light condition was determined to evaluate quantitatively the correlation between them. The correlation coefficient was also calculated between spectra acquired with no light before and after the sets of measurements to be used as a reference correlation coefficient for two signals acquired in similar conditions.

5.4 Results

5.4.1 *Ex vivo* experiments on calf brain

The average spectra of white and gray matter (“No lights” in Table 5.1) show the principal bands associated with cholesterol, sphingomyelin, saturated lipids and proteins (Figure 5.2)[154].

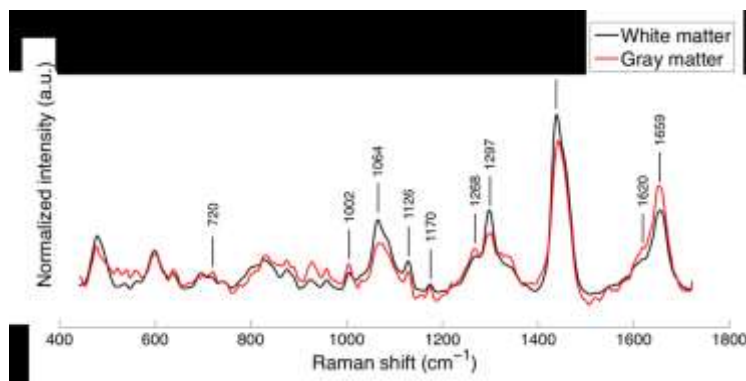


Figure 5.2: Average spectra for white and gray matter acquired with the operating microscope lights turned off. Sample spectral bands are identified corresponding to important brain tissue peaks associated with amino acids, lipids and proteins.

Compared with gray matter, the average white matter spectrum shows increased intensities of bands at 1064, 1297, 1439 cm^{-1} , which is a direct consequence of the differences in lipid content. The spectrum of gray matter shows, in agreement with previous findings[154]–[158], an increased phenyl alanine peak at 1002 cm^{-1} as well as increased intensities of bands at 1602, 1620, 1640 and 1659 cm^{-1} that can be attributed to a higher protein content.

The spectral profile of the operating microscope white light source can be seen in Figure 5.3A, showing sample ambient light measurements (5 mW/cm^2 at 800 nm) corresponding to spectra acquired with the laser source turned off, with (blue curve) and without (red curve) the filter adapter inserted in the excitation light path. The spectra are amplitude-normalized so they can be visualized on the same graph. The filter adapter attenuates by as much as 50 times the intensity associated with the principal arc lamp peaks, most noticeably those seen at 608 cm^{-1} (824 nm), 674.5 cm^{-1} (829 nm), 1579 cm^{-1} (896 nm) and 1694 cm^{-1} (905 nm) cm^{-1} .

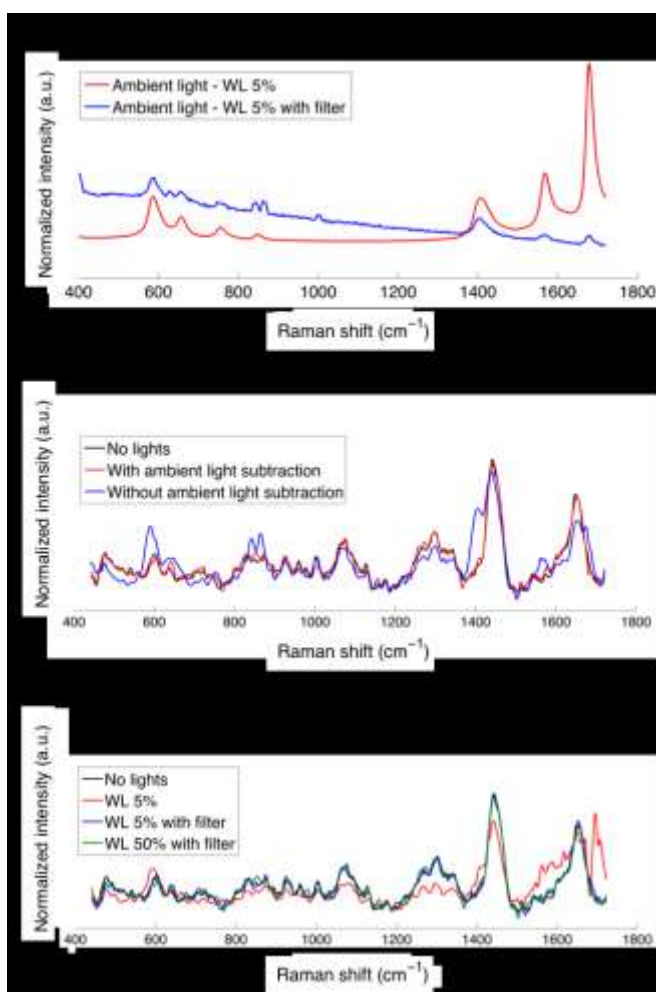


Figure 5.3: Average gray matter Raman spectra of a calf brain for different processing and light conditions. (A) Normalized ambient light measurements taken with and without the filters on the microscope, showing the peaks of the microscope arc lamp still present in the ambient light measurement under filtered white light (B) Spectra of gray matter acquired with the filter, with and without subtraction of the ambient light measurement, compared with a measurement with no lights (C) Normalized and ambient light subtracted Raman spectra of gray matter measured under 5% white light with and without the filter adapter, 50% white light with the filter adapter and under no lights. Average spectra acquired under 50% white light without the filter adapter is not shown since the detector was saturated.

However, Figure 5.3A shows that the main arc lamp peaks are still present in the ambient light measurement despite the presence of the filter adapter. Figure 5.3B shows the corresponding Raman spectra (with the filter adapter and with the laser activated) acquired under white light illumination with and without ambient light subtraction. This figure demonstrates that the residual lamp peaks have a measurable impact on the calf brain Raman spectra (blue curve) when background subtraction is not performed. However, when subtraction of the ambient light measurement is performed, Figure 5.3B shows that the Raman spectrum (black curve) acquired

under pitch dark conditions overlaps that associated with the spectrum where ambient light was subtracted (red curve). As a result, the combination of the filter adapter and the ambient light subtraction appears to efficiently remove the contributions from the operating microscope white light. Figure 5.3C shows gray matter spectra acquired with and without the filter adapter with the white light at 5% intensity, with ambient light subtraction. This figure demonstrate that the microscope unfiltered white light, even at low intensities (red curve), will cause artefacts on the Raman spectra, especially in the spectral region associated with proteins (1558 to 1659 cm^{-1}) (Figure 5.3C) [92]. Higher operating microscope light intensities ($>5 \text{ mW/cm}^2$ at 800 nm)) have a similar impact on the spectra and all subsequent analysis will be presented based on data that has been processed with ambient light subtraction.

In order to further the ex vivo analysis, the effect of operating microscope white light on classification – white matter vs. gray matter – was evaluated. Using the “No lights” measurements as training dataset and the measurements under filtered or unfiltered microscope light as the testing sets, the SVM classification algorithm correctly identified 100% of the samples acquired under filtered light while the accuracy for the dataset with unfiltered light was 83.3%, with a sensitivity of 100% and a specificity of 66.7% (Table 5.2).

Table 5.2: Difference in accuracy achieved when classifying white and gray matter measurements with SVM algorithm, when using filtered and unfiltered white light, using the spectra acquired under the condition no lights as a training dataset

Testing dataset	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Accuracy (%)
White light	100	66.7	83.3
White light with filter	100	100	100

A principal component analysis was then performed on the calf brain gray and white matter datasets, in order to analyze the correlation between the spectra acquired under different light conditions. For conciseness, only the gray matter results are presented here since identical conclusions are reached based on white matter spectra. The scores of the first principal component, which captures 86.3% of the spectral variance in the data, is shown in Figure 5.4A for the datasets associated with “No light”, “Unfiltered white light” and “Filtered white light”. The PCA plot for

the first principal component shows that the spectra acquired under no lights and filtered white light are grouped in a cluster, whereas the ones from spectra acquired under unfiltered white light are separated, which suggests that the operating microscope light have a significant impact on the spectra. In order to substantiate this observation, Figure 5.4B shows the correlation coefficient between spectra acquired under no lights and the other lights conditions including: 5%, 25% and 50% of maximum intensity, with and without the optical adapter. The dotted line in the figure is a measure of the system noise measured as the mean correlation coefficient associated with the two “No lights” measurements made before and after each acquisition sequence. The histogram data demonstrates that the correlation coefficients associated with filtered light are – in all cases – within the system noise implying that potential residual effects of the operating microscope lights are smaller than system noise. This is however not the case for data acquired under unfiltered lights, where the correlation coefficient is typically lower than the threshold. This effect is more pronounced for gray matter than for white matter.

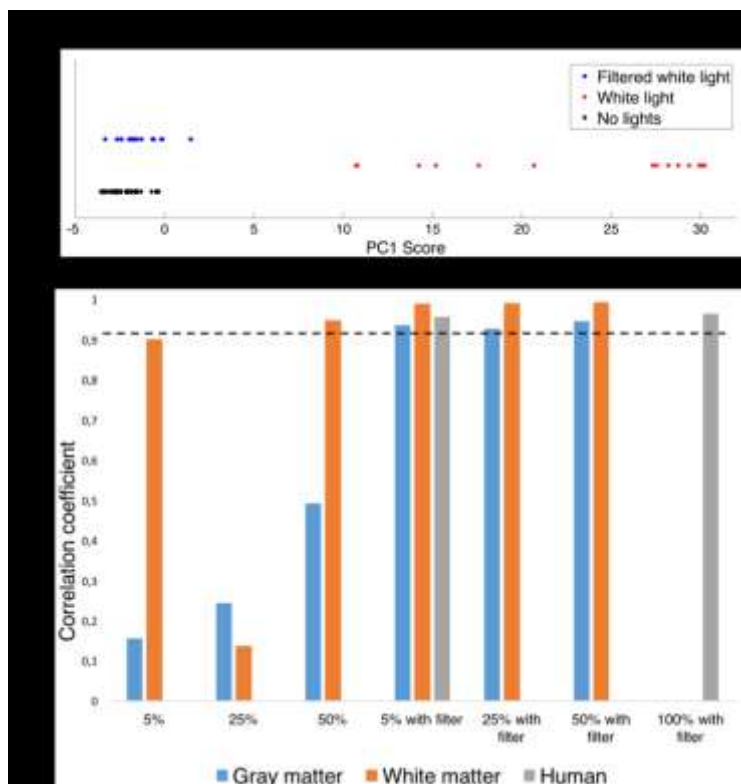


Figure 5.4: (A) Score of the first principal component of the Raman spectra acquired under filtered and unfiltered white light and no lights (B) Cross correlation coefficient between spectra acquired under “no lights” condition, filtered and unfiltered white light for calf brain (white and gray matter) and human. Dotted lines represent the average correlation coefficient between measurements under no lights.

5.4.2 Intraoperative *in vivo* measurements

The hand-held probe was used during brain tumor resection to measure spectra under different light conditions. Figure 5.5 shows the Raman spectra (averaged over 3 different cortex locations) under filtered white light at two intensities (5% and 100% of maximum intensity), as well as with the operating microscope lights turned off. The residuals between the average Raman spectra with lights at two intensities and the spectrum with no lights are also shown. Qualitatively it appears that the residuals are within the system noise which suggest the filter adapter (combined with background subtraction) efficiently negates the impact of the operating microscope light source.

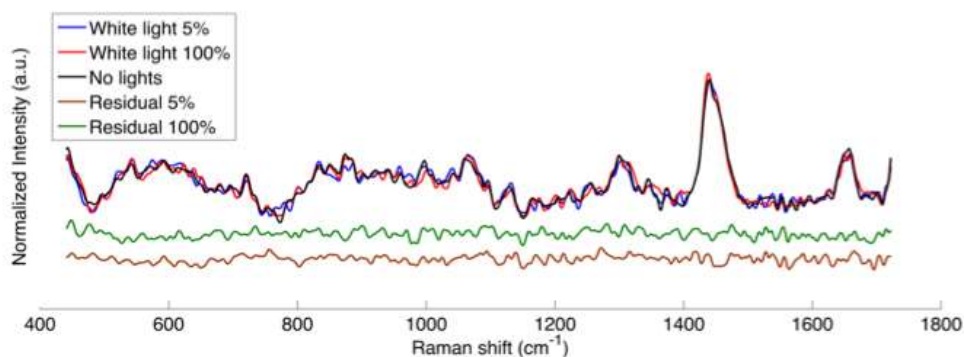


Figure 5.5: Average In-human normalized Raman spectra measured under the filtered microscope light at two intensities, and average residuals between the Raman spectra under filtered light - at 5% and 100% intensity - and under no lights. An offset has been added to the Raman spectra and residuals for clarity.

As was done for calf brain measurements, the correlation coefficients were calculated for the human data between spectra acquired under no lights and spectra acquired with filtered white light (Figure 5.5). Similarly to ex vivo white and gray matter measurements in calf brain, the correlation coefficients for human data are always above the system noise threshold.

5.5 Discussion

Clinical translation of Raman spectroscopy in microsurgery applications can be facilitated by the development of methodologies insuring minimal disruption of the surgical workflow. For example, signal corruption from operating room light sources can prevent accurate tissue classification since information can be lost for characteristic spectral tissue bands associated with molecular constituents essential for distinguishing different tissue types (e.g. normal vs. cancer tissue). Here the development and validation of a technique where a custom optical filter adaptor is seamlessly integrated onto a surgical microscope was presented, allowing intraoperative Raman spectroscopy to be achieved under the white light source of an operating microscope.

In vivo Raman spectroscopy usually implies dealing with low signal to noise ratio (SNR) spectra due to restrictive constraints on laser exposure (time and power density) to comply with safe margins for both patients and the operating room staff. One way to correct for ambient light artefacts in the Raman spectra consists in acquiring an ambient light measurement and subtracting

it from the desired signal. This is efficient for removing broad, weak and repeatable peaks but it is insufficient for lights as strong as a conventional surgical microscope. Notably, the light from the microscope at full intensity is enough to saturate a detector sensitive enough for *in vivo* Raman spectroscopy and will introduce significant shot noise, drowning the weak spontaneous Raman signal of interest. Shot noise is the dominant noise source in Raman spectroscopy and is proportional to the amount of photons reaching the CCD detector. As such, the introduction of ambient/microscope light to the detector significantly increases the shot noise and brings the SNR to unusable levels. The addition of filters to the surgical microscope suppresses light in the spectral region of interest making it possible to acquire Raman spectra with the operating light on without significantly impacting shot noise on the detector or risking saturation. One of the advantages of this filtering technique is that it is easy to implement, it can be used with existing Raman spectroscopy systems without the need for complex system implementations such as for wavelength-modulated Raman spectroscopy or shifted excitation Raman difference spectroscopy [60], [159].

Specifically, it was demonstrated that near infrared Raman spectroscopy can be achieved under white light illumination during microsurgical procedures based on *ex vivo* and *in vivo* tissue measurement in calf and human brain, respectively. The use of interference filters attached to the head of a surgical microscope can sufficiently attenuate the near infrared peaks of arc lamps to allow the acquisition of tissue-specific Raman spectra. This was determined by computing a similarity figure of merit (Figure 5.4) comparing pure tissue spectra acquired under pitch dark conditions (no corruption from light sources other than the excitation laser) with spectra acquired with the microscope lights turned on. It was quantitatively demonstrated that the new filter adapter technique insures that the differences between tissue Raman spectra with microscope lights on or off are within the noise characteristics of the system.

These findings are important because slight differences in molecular composition of sampled areas lead to characteristic Raman spectra showing spectral information that can be used to distinguish different tissue structures. For example, in the case of white vs. gray matter in calf brain, the measurements with the microscope light turned off (Figure 5.2) show peaks associated with lipid and protein bands consistent with literature. Using a machine learning technique, it was demonstrated that classification between white and gray matter can be achieved with 100%

accuracy with the operating microscope lights on when the microscope is fitted with the filter adapter. However, when using measurements done with the operating microscope light turned on without the filter adapter, the residual light artefacts (Figure 5.3) in the Raman signals lead to a 33% drop in specificity.

An important observation stemming from the *ex vivo* measurements is that the intrinsic tissue optical properties (absorption, elastic scattering) can significantly impact the relative contribution of the Raman signal when compared with the artefacts associated with the microscope white lights. For example, the correlation coefficients without the filter adapter in Figure 6.4 are much lower for gray matter than for white matter. This can be attributed to the larger near infrared penetration depth of gray matter when compared with white matter. This is a direct consequence of the larger absorption and reduced scattering coefficients of gray matter in the near infrared[160]. The reduced biomolecule concentration in gray matter, due to the higher water content, could intuitively lead to a decrease in penetration depth. However, the optical properties of tissue depend on many parameters, and overall measured optical properties show that penetration depth is greater in gray matter. As a result, the near infrared components associated with the white light source penetrate the tissue and diffuses into the detection cone of the probe. Since diffusion is less important for white matter, a smaller fraction of the near infrared light impinging on tissue reaches the probe.

Spectral differences between acquisitions on normal and cancerous tissue are far subtler than those between white and grey matter. Classification is therefore more sensitive to the introduction of artefacts and the presence of unfiltered microscope light would make sensitivity specificity and accuracy drop to unusable levels. This brings to light the importance of reducing noise and external artefacts in *in vivo* clinical settings. Our preliminary results on *in vivo* human data acquired during brain tumor resection show next to no impact on measurements made under filtered microscope light as compared to measurements made under “no lights”. However, a future larger scale clinical study is warranted in order to assess the impact of ambient light on tissue classification.

Acknowledgements

This work is supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), Canadian Institute of Health Research (CIHR), Canadian Foundation for Innovation (CFI) and Groupe de Recherche en Sciences et Technologies Biomédicales (GRSTB).

Competing Financial Interests

K.P. and F.L. are co-founders of ODS Medical Inc, a medical device company that seeks to commercialize the Raman spectroscopy system for real-time detection of tissue abnormalities.

CHAPITRE 6 ARTICLE 3: A NEW METHOD USING RAMAN SPECTROSCOPY FOR *IN VIVO* TARGETED BRAIN CANCER TISSUE BIOPSY

**Joannie Desroches, Michael Jermyn, Michael Pinto, Fabien Picot, Marie-Andrée Tremblay,
Sami Obaid, Eric Marple, Kirk Urmeay, Dominique Trudel, Gilles Soulez, Marie-Christine
Guiot, Brian C. Wilson, Kevin Petrecca, Frédéric Leblond**

SCIENTIFIC REPORTS

6.1 Abstract

Modern cancer diagnosis requires histological, molecular, and genomic tumor analyses. Tumor sampling is often achieved using a targeted needle biopsy approach. Targeting errors and cancer heterogeneity causing inaccurate sampling are important limitations of this blind technique leading to non-diagnostic or poor quality samples, and the need for repeated biopsies pose elevated patient risk. An optical technology that can analyze the molecular nature of the tissue prior to harvesting could improve cancer targeting and mitigate patient risk. Here we report on the design, development, and validation of an in situ intraoperative, label-free, cancer detection system based on high wavenumber Raman spectroscopy. This optical detection device was engineered into a commercially available biopsy system allowing tumor analysis prior to tissue harvesting without disrupting workflow. Using a dual validation approach we show that high wavenumber Raman spectroscopy can detect human dense cancer with > 60% cancer cells in situ during surgery with a sensitivity and specificity of 80% and 90%, respectively. We also demonstrate for the first time the use of this system in a swine brain biopsy model. These studies set the stage for the clinical translation of this optical molecular imaging method for high yield and safe targeted biopsy.

6.2 Introduction

Most solid cancers are discovered by conventional imaging techniques such as computed tomography (CT), magnetic resonance imaging (MRI), positron emission tomography (PET), and ultrasound (US). While these images characterize the location(s) and anatomical relationships of the cancer, most of them have limitations in terms of tumor grading and molecular characterization.

Consequently, direct sampling for histological, molecular, and genomic characterization is required for diagnosis and treatment planning. The quality of the tissue obtained for analysis is thus of vital importance to guide the clinical trajectory. Furthermore, as targeted therapies are known to cause imaging changes that appear to represent cancer progression, but are in fact only imaging changes caused by the treatments, oncology teams require high quality tumor sampling during and post-treatment in order to make correct treatment decisions[161]. As the use of these new therapies becomes more common the need for new and more informed tissue sampling approaches are needed.

To aid tumor targeting, biopsies are performed using approaches guided by conventional imaging such as US, CT, and MRI. Since these imaging techniques do not provide the user information regarding the nature of the tissue prior to harvesting, and the precision of lesion targeting may be compromised by tissue shifts between the time of the imaging session and procedure or during the procedure, poor quality sampling often occurs. For example, the prostate cancer detection rate is only 40-45% at initial biopsy[162]–[164]. Similarly, the diagnostic yield of lung cancer biopsies varies from 42 to 100%. Importantly, non-diagnostic samples in brain cancer biopsies leading to repeat procedure occurs in up to 24% of cases[8], [10], [11], and diagnostic errors still occur in 10–30% of cases[4]. For each pass of a biopsy needle there is an associated risk of hemorrhage and infection that can negatively affect patient outcomes[10], [165]–[168].

Current approaches to reduce the risk of poor quality sampling include intraoperative sample analysis based on histological processing such as tissue smears and frozen tissue sections, or harvesting multiple samples to increase the likelihood of a diagnostic sample. These approaches are resource intensive as they require 20-30 minutes for each sample to be processed and analysed thereby lengthening the duration of the procedure. Moreover, this analysis does not provide molecular information. The addition of real time molecular tissue characterization capabilities to guide biopsy needle insertion and tissue collection can enhance the information provided to surgeons and interventionalists prior to sampling thereby improving the rate of high quality diagnostic yields. Informed tissue sampling also reduces patient risk by limiting the number of samples collected and reducing the rate of repeat procedures.

A strategy for real time informed cancer needle biopsy is to interrogate the tissue using optical techniques *in situ* prior to collection. This interrogation can provide the user with online feedback regarding the molecular nature of the tissue to confirm the targeting site, characterise the presence of cancer, avoid injury to major blood vessels, and avoid sampling necrotic tissue or tumor regions that do not represent the pathology. Optical techniques have been developed for this purpose, including the use of the metabolic fluorescent biomarker protoporphyrin (Pp) IX that is endogenously synthesized in tumor cells following administration of 5-aminolevulinic acid. The red PpIX fluorescence could then be used to guide the insertion of a needle biopsy, as demonstrated clinically in brain on *ex vivo* biopsy tissue and *in vivo* in mouse models[104]–[106]. However, the technique requires the use of a contrast agent, which presents issues in terms of clinical practicality and tumor sensitivity. Optical coherence tomography is also investigated for the guidance of needle biopsies, for applications in breast, prostate and lung cancer[107]–[111]. Recently, a RS probe that fits inside the bore of a hypodermic needle was developed for lymph-node biopsy guidance[112], [113]. Although these are impressive advances, OCT has yet to show its ability to detect cancer *in vivo*.

In the past our group has developed Raman spectroscopy instruments for surgical guidance, demonstrating *in vivo* fingerprint (FP) Raman Spectroscopy (RS) can distinguish between normal brain, tumor tissue and necrosis with accuracies upwards of 90% in patients for grade 2-4 gliomas or metastasis associated with lung, colon and skin cancer cells[86], [90], [92], [101], [149], [169]. The majority of biomedical RS studies have used near-infrared illumination and spectral detection in the 500-2000 cm^{-1} range[143], [145], [146], [170], [171], commonly referred to as the fingerprint (FP) region, since it is rich in biochemical information associated with vibrational bonds of proteins, lipids, nucleic acids and amino acids. The high wavenumber (HWN) region, from about 2000 to 4000 cm^{-1} , contains information relating to e.g. CH-, OH- and NH- stretching modes. High wavenumber shifts have been found to discriminate different types of brain tissue *ex vivo*, including cortex and white matter[88], [100]. Stimulated Raman scattering (SRS) microscopy in the HWN regime has been used to differentiate tumors from normal brain *in vivo* in mice bearing intracranial glioblastoma xenografts[101].

Here, we are presenting the development and preliminary validation of a new integrated biopsy system that provides *in situ* cancer characterization using spontaneous Raman spectroscopy. The

device is in the form of an integrated Raman probe, engineered into a commercial biopsy system, with minimal disruption to the surgical workflow. First, a small-scale animal study is presented demonstrating that the novel optical needle can measure deep brain Raman spectra and collect tissue samples at the same location. Secondly, an *in vivo* human validation study is presented to demonstrate -during brain cancer resection surgeries- that a HWN RS intraoperative probe can accurately detect cancer tissue in situ. This sets the stage for the clinical translation of this optical molecular imaging method for high quality and safe targeted cancer biopsy.

6.3 Results

6.3.1 Core needle biopsy system for interstitial vibrational spectroscopy

We have developed an instrument that can provide, rapidly and with minimal impact on the flow of the clinical procedure, interstitial (in situ) label-free vibrational spectroscopy of tissue to ensure biopsy samples are collected in a location containing densities of cancer cells sufficiently high for reliable diagnosis. Despite the richer molecular information content associated with FP region, the HWN region was chosen since it allowed the use of a practical fiberoptic configuration that satisfies the stringent miniaturization constraints required for direct integration with a commercial brain biopsy needle. In particular, fiberoptic FP probes typically require interference filters to be positioned close to the distal end of the fibers to minimize detection of the background due to elastic (Rayleigh) light scattering in the tissue and the contribution of Raman-active molecules from the optical fibers[172]. This is crucial for intraoperative applications because of the rarity of inelastic scattering events such that real time (<1 s) detection can only be achieved in situations where the contribution of non tissue-specific backgrounds is minimal. However, the filter constraint is relaxed in the HWN region because of the low silica Raman activity in the fibers and the large shift between the excitation and the detection spectral bands that markedly reduces the elastic scattering contribution to the detected signal.

A core needle biopsy consists of an outer cannula and an inner cannula, both with rectangular windows through which a tissue sample can be aspirated and cut following rapid relative rotation of the two cannulas. Optical measurement capability was integrated into a commercial brain needle biopsy (Medtronic, Inc) by attaching optical fibers around the periphery of the outer

cannula (Figure 6.1). The distal tips of these fibers were polished at an angle for side illumination and positioned to ensure that measurements are made in the middle (along the main axis) of the biopsy window. The collected tissue spectra correspond spatially to the physical tissue biopsy volume once the operator rotates the needle by 180° prior to sample collection. A biocompatible polymer cover with low Raman signal (no carbon-hydrogen bonds) protected the optical fibers. For initial proof-of-principle *in vivo* measurements, one of the optical fibers was connected to a 671 nm diode laser for excitation and the reemitted light was detected through the same fiber by a spectrometer (ANDOR Technologies, Inc). Instrument control and data acquisition were achieved using a custom LabView software (National Instruments, Inc), allowing the Raman spectra to be visualized in real time as they are collected. Each spectrum covered the range $2600\text{-}3800\text{ cm}^{-1}$ at a spectral resolution $\sim 1.8\text{ cm}^{-1}$. More details relating to the design and fabrication of the interstitial optical system are provided in the Methods section.

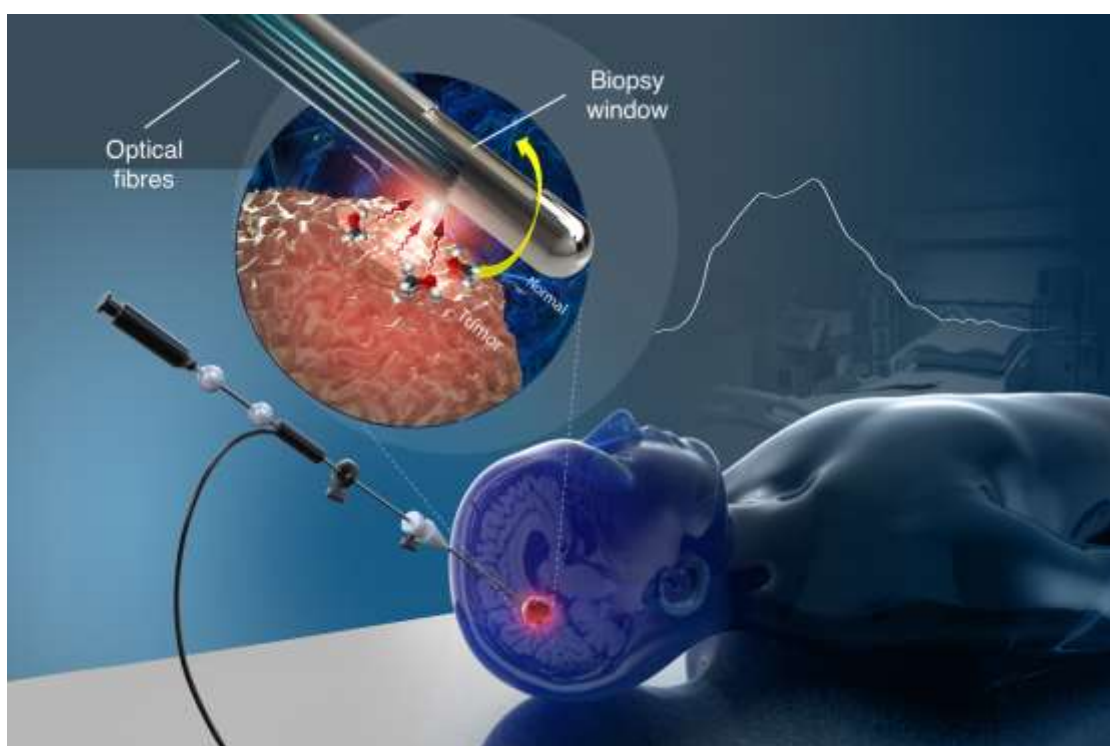


Figure 6.1: Schematic representation of the optical core needle biopsy, with a magnified view of the tip showing the biopsy window and the beveled optical fibers used for illumination and detection. The fibers are located opposite to the biopsy window and the needle is rotated by exactly 180° to collect a tissue sample spatially co-localized with a spectral measurement. Figure produced by Dariush Bagheri.

6.3.2 Interstitial Raman spectroscopy measurements

Measurements were made to ensure that the optical needle biopsy system can retrieve reliable HWN Raman spectra in brain tissue. Initially, *ex vivo* spectra were acquired on a calf brain to evaluate the ability of the system to distinguish between white and gray matter. The tip of the excitation/detection fiber was placed in contact with either white or gray matter at 20 different locations and the mean spectra were computed for each tissue type (Figure 6.2b). Compared with gray matter (blue spectrum), the white matter spectrum (in red) demonstrates larger contributions from lipids (2845 cm^{-1}) and a lower contribution from proteins and nucleic acids (2930 cm^{-1}), in agreement with the literature[88], [90].

An experiment was then conducted in two pig brains *in situ* to demonstrate technical feasibility of deep brain spectroscopy. Computed tomography angiography (CTA) of the animal head was done before the procedure to determine a safe trajectory for the needle in order to avoid major blood vessels, and a frameless system (Medtronic, Inc.) was used to secure the needle on the cranium and to ensure a straight trajectory into the brain is followed (Figure 6.2a). After intracranial insertion of the needle through a burr hole, Raman measurements were made at several locations (21 in total) along its trajectory. After each measurement, the needle was rotated by 180° and a tissue sample was collected for histopathology analysis. Of the 21 brain samples, 9 were heterogeneous (containing both white matter and cortex), 8 contained only cortex, 1 contained only white matter and 3 contained other brain structures such as blood vessels. The mean spectrum associated with samples containing cortex and/or white matter ($n=18$) was computed (Figure 6.2b). The resulting *in situ* brain spectrum is consistent with the *ex vivo* data, showing characteristic spectral features of cerebral tissue, mostly from proteins (2930 cm^{-1}) and lipids (2845 to 2885 cm^{-1}). This experiment confirmed that the device can be easily and safely inserted into the brain and generate Raman spectra with low acquisition time (Table S6.2) and minimal disruption of a standard biopsy procedure.

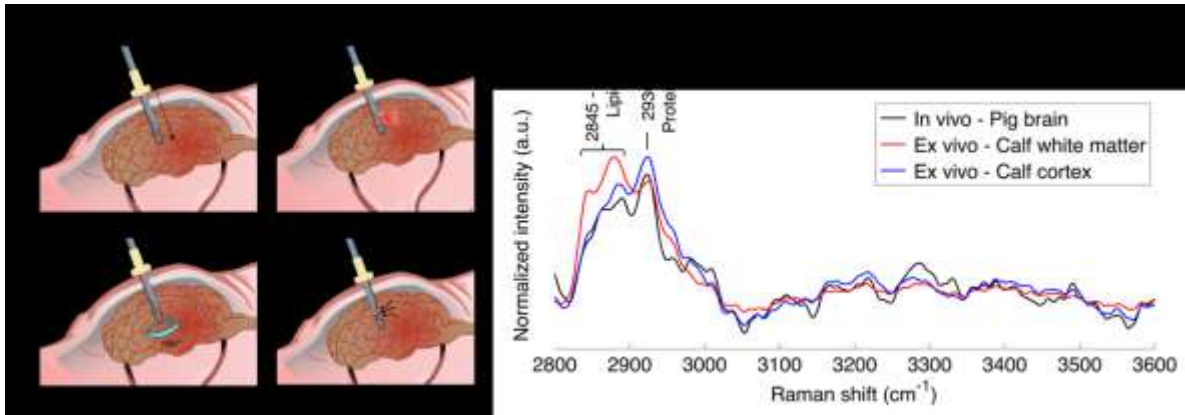
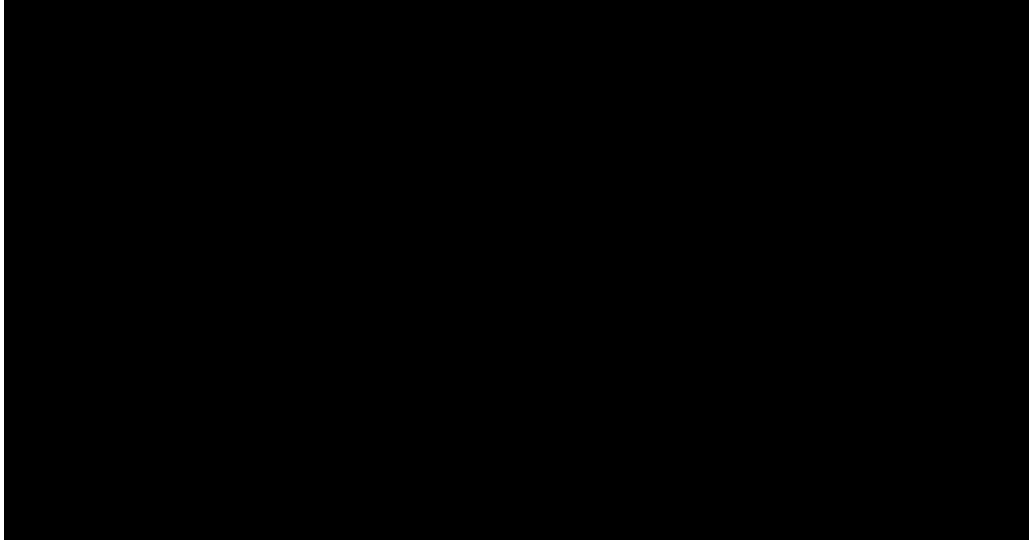


Figure 6.2: RS measurements in normal brain. (a) Schematic of the *in vivo* acquisition steps: 1) needle insertion along the planned trajectory, 2) RS collection, 3) 180° rotation of the needle, and 4) tissue collection. (b) In vivo Raman spectra averaged over all measurements (n=11) and compared with ex vivo spectra for white matter and cortex.

6.3.3 Intraoperative Raman spectroscopy measurements during human glioma surgery

A clinical study was conducted in 19 grade 2-4 glioma patients to determine whether or not HWN RS can differentiate normal brain from tissue containing cancer cells. The system setup and clinical validation details can be found in the Methods section, together with further details relating to the intraoperative use of the hand-held contact probe that we have reported previously in which the FP rather than the HWN region was used[92]. Ten to fifteen sites were interrogated in each patient for a total of 280 measurements (Figure 6.3a). Tissue was sampled at each site for blinded histopathological analysis to estimate the percentage of cancer cells within the interrogated region based on Hematoxylin & Eosin (H&E) staining (see Methods for details). Information relating to sample size and patient histological diagnosis information is given in Table 6.1.

Table 6.1: Patient histological diagnosis, indicating tumor grade and type as well as sample size information.



In total, 105 measurements were made on normal brain (no cancer cells present), 51 in infiltrated brain ($\leq 60\%$ cancer cells present), and 124 in dense cancer ($>60\%$ cancer cells present). In the case of infiltrated brain tissue, the percentage of cancer cells in the samples ranged from only a few infiltrative cells ($<5\%$) to 60%. The mean spectra for normal brain, infiltrated brain and dense cancer for all patients were computed (Figure 6.3c). Sample histopathology images for the three groups are provided showing H&E images of dense cancer, infiltrated brain and normal brain (Figure 6.3c). The *in vivo* spectra for normal brain tissue acquired with the hand-held HWN RS probe are consistent with the spectra acquired in calf and swine brain using the optical biopsy needle.

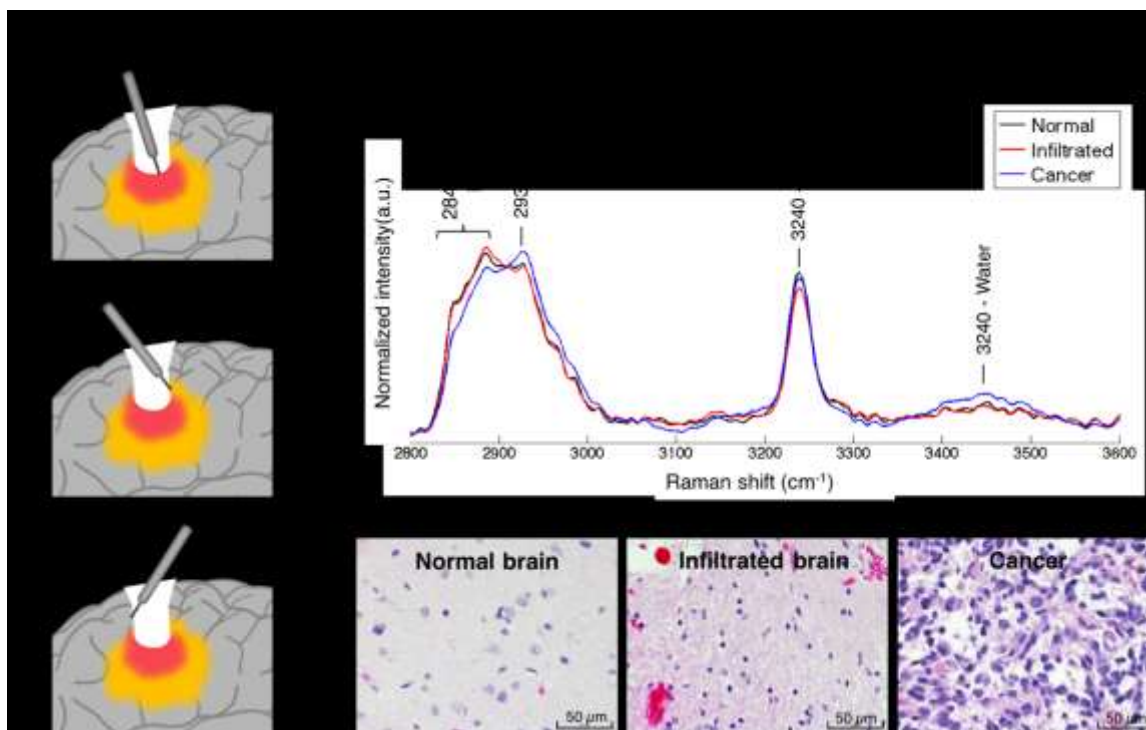


Figure 6.3: (a) Schematic depiction of *in vivo* RS measurements taken in the surgical cavity during glioma resection using the handheld contact probe in dense cancer (red), infiltrated brain (yellow) and surrounding normal brain. (b) *In vivo* high wavenumber Raman spectra of dense cancer, infiltrated brain and normal brain, averaged over all samples. (c) Representative H&E-stained micrographs for each tissue type.

6.3.4 Vibrational molecular spectroscopy can differentiate cancer from normal brain

Identified prominent peaks (Figure 6.3b) are associated mainly with CH₂ symmetric and asymmetric stretches of lipids and proteins (2845-2885 cm⁻¹), symmetric CH₃ stretch due primarily to proteins (2930 cm⁻¹) and the OH stretching from water molecules (at 3450 cm⁻¹). The peak at 3240 cm⁻¹ comes from the sapphire of the tip lens in the hand-held contact probe. It was not observed in the spectra acquired with the optical biopsy needle since no lens was used in the design of that instrument. The most significant biochemical differences between *dense cancer* and *normal brain* were assessed based on a two-sided *t*-test of the individual RS peaks. Tissue bands associated with some biomolecules are dominant either in *normal brain* or *dense cancer* (Table S6.1). Particularly, peaks associated mostly with the presence of proteins (2930 cm⁻¹) were found to be higher for *dense cancer* tissue. Figure 6.4a shows box plots of the ratio of inelastic scattering

intensity at 2930 and 2845 cm^{-1} , a metric used to quantify the relative fraction of proteins and lipids. These data demonstrate an increase in the protein/lipid ratio for *dense cancer* compared to *normal brain* samples, consistent with findings by Ji *et al.* in *ex vivo* brain samples using stimulated RS[101]. However, when compared with that of normal brain, the protein/lipid ratio in *infiltrated* samples does not show significant differences.

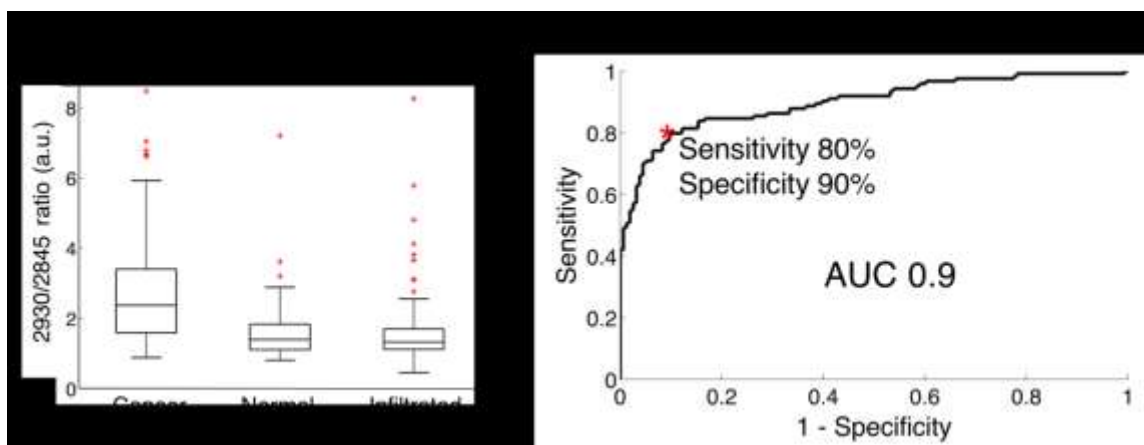


Figure 6.4: (a) Boxplots of the ratio of the lipid and protein bands ($2930\text{ cm}^{-1}/2845\text{ cm}^{-1}$) for normal brain, infiltrated brain and dense cancer tissue in glioma patients. (b) Receiver operating characteristic (ROC) curve computed using the SVM algorithm and leave-one-out cross-validation. The indicated point at the minimal distance from the upper-left corner of the ROC curve was chosen for calculating the sensitivity and specificity values.

While individual measures such as peak ratios can provide valuable biochemical information for tissue differentiation, only multivariate approaches are able to fully utilize the spectrally distributed HWN RS information. Classification of the data was therefore performed using a support vector machine (SVM) algorithm and its performance was preliminarily evaluated using a leave-one-out cross-validation (LOOCV) approach, with the histopathological assessment as ground truth. The most important clinical goal here is to follow needle trajectory planning using conventional imaging methods by a confirmation that the needle has reached a location associated with a brain area containing cancer cells in proportions relative to normal brain than enable reliable diagnosis. Here, the tumor cells density that was deemed sufficient was set at 60% based on neuropathologist experience (more details in the Methods section). Therefore, the unmet clinical need to reduce non-diagnostic biopsies can be addressed if the proposed technique can detect – and thus target for collection – cancer tissue associated with a large enough density of cancer cells. For classification purposes the 280 samples were divided into two categories. The so-called non-

diagnostic category contains samples that should not have been collected because they are either associated with normal brain or with infiltrated tissue containing less than 60% of cancer cells. The second category, labeled dense cancer is associated with samples with >60% cancer cells and that should have been collected for diagnostic purposes. Based on multivariate classification, dense cancer samples could be distinguished from non-diagnostic samples with an accuracy of 84%, a sensitivity of 80%, a specificity of 90% and a receiver-operating-characteristic ROC curve with an area-under-the-curve (AUC) of 0.9 (Figure 6.4b).

6.4 Discussion

There is a critical need in modern medicine for new molecular targeting techniques that can be seamlessly integrated with standard biopsy procedures to increase diagnostic yield and insure optimal treatment planning. Here, using brain cancer as a model, we developed a real time interstitial tissue characterization technique acquiring molecular vibrational spectroscopy measurements at the distal end of a commercial biopsy needle to ensure co-location with biopsy sample collection. A detailed proof of principle was presented, initially demonstrating the new optical biopsy needle can detect subtle molecular differences between white matter and cortex *ex vivo* in calf brain, followed by a technical feasibility of *in vivo* spectroscopy and tissue sampling deep into the brain in a swine model. Then, using a different instrument (an intraoperative handheld probe) during 19 human neurosurgical resection procedures, we provided evidence that the same molecular contrast detected by the new system could be used to locate cancer tissue *in vivo* (sensitivity and specificity >80%) to target biopsy location. Because the optical fibres are integrated with a commercial biopsy needle with measurements taking <2 s, the new optical biopsy needle could be used as a synergistic complement to standard of care brain biopsy procedures with minimal disruption of the clinical workflow. Less constraining strategies, in which placement of miniaturized optical probes within the outer cannula of the needle alternates with placement of the inner cannula for tissue collection, were not considered because of the potential to add significant time to the clinical workflow and so limit the number of measurements that can be made. Clinical translation of the proposed technique could eliminate the need for inserting a separate optical probe and collecting multiple samples as well as reduce repeat brain needle biopsy procedures by insuring only one biopsy sample is harvested that contains a sufficient density of cancer cells for diagnosis.

Incidentally this could allow optimal treatment planning as well as lead to a reduction of the risks to patient health caused by haemorrhages and infections during needle insertion and tissue collection.

A crucial component of future in-human clinical studies with the new system will be the development of robust statistical models insuring cancer cells detection with supervised multivariate techniques can be achieved *in vivo* during a procedure[173]. However, this requires the acquisition of large patient datasets, which could be challenging in terms of achieving statistical significance and capturing the full heterogeneity associated with tumors and normal brain, given only a few biopsy samples are normally collected per biopsy procedure[173]. An indirect but nevertheless valid approach is to train the statistical model on vibrational spectroscopy data acquired *in vivo* during surgical resection, since multiple measurements/samples can then be acquired for each patient. This is precisely what was done here using the intraoperative handheld probe[92], [149] during open-cranium surgery. A critical factor insuring the validity of this approach will be to consider any differences in the instrument spectral-response function to allow the algorithm trained with the intraoperative handheld probe to be directly applied to data acquired with the optical biopsy needle. In the present study the observed differences between brain spectra acquired with the optical needle (Figure 6.2) and the intraoperative probe (Figure 6.3) are attributable to differences in the noise level, and the contribution from the Raman-active molecules in the contact probe lens. The photonic noise is larger in the optical needle spectra, since it uses only a single optical fibre with a smaller diameter, whereas the contact probe uses 7 collection fibres of larger core diameter (Table S6.2). Additionally, the effective excitation power is lower by a factor of ~ 5 in the optical needle. These signal discrepancies will be offset by using all 12 needle fibers simultaneously at comparable excitation powers and signal integration times, and applying separately-measured corrections for the different spectral-response functions. Importantly, the statistical models will be made using data where the spectral region around the Raman peak associated with the lens material is truncated to ensure exact correspondence between data acquired with the different probes. In this proof-of-concept study, a single fiber (out of 12 that were available) was used for excitation and detection. However, several fibers could have been use in spatial offset mode[174]–[176] to increase detection volume and penetration depth. In the case of cancer cells detection, considering that the signal of interest is very weak, there is a compromise between detection volume and signal to noise ratio. Decreasing detection volume might produce a

better sensitivity for detection, but only if the signal to noise ratio remains unchanged. This translates to a higher laser power or acquisition time, so less clinical practical. An interesting study would be to determine the optimal combination of detection volume, laser power and integration time to lead the best sensitivity for a specific application.

The results of the present experiments set the stage for a clinical study using the optical biopsy needle to provide live tissue classification during brain needle biopsy procedures. However, brain tissue sampling is among the most accurate biopsy procedures, in large part due to the use of stereotactic approaches and advanced image-guided techniques. Online molecular characterization would be even more important for diagnostic of disease in other organ systems where conventional imaging techniques are less specific and guidance techniques used less accurate[177]. Oncology applications with high levels of misdiagnosis at biopsy include prostate and lung, but also other organ sites such as breast and colon[162], [166]–[168], [178]–[181]. Because of all the tissue processing steps needed before microscopic histopathological analyses, the presence of cancer in the biopsy cores is only confirmed after a few days, and up to several weeks if a molecular analysis is required. In cases of uncertain diagnosis repeat biopsies are required, adding significant delay before diagnosis can be obtained and a treatment chosen, and increasing risk for the patient. The new technique also shows great potential in interventional medicine applications beyond biopsies to optimize targeted treatment methods such as in laser-induced thermotherapy (LIIT)[182], brachytherapy[183], [184] or therapeutics injection of viruses into tumors.

Although clinical translation of the new technique for organ systems other than brain has the potential to significantly reduce instances of misdiagnosis, it will require significant efforts to insure the optical technology is integrated into clinical practice in a manner that is minimally disruptive to the standard workflow. This will not only include developing the vibrational spectroscopy technique to fit with instrumentation used as the standard of care (*e.g.*, bronchoscope, laparoscope) but will also require the development of statistical models for each pathology of interest. Here, we have presented a proof of principle demonstrating clinical integration of high wavenumber Raman spectroscopy in brain needle biopsy procedures. Although more challenging from an engineering perspective, developing optical biopsy needles detecting in the fingerprint would lend even more molecular information, with incidental increases in sensitivity and specificity for cancer detection[92], [149], [169] and thus a potential for even more precise targeting for biopsy sample collection.

6.5 Methods

6.5.1 Core needle biopsy system design and fabrication

The biopsy needle probe comprises 12 low-hydroxyl fibers of 105 μm core diameter, 150 μm outer diameter and 0.22 NA (numerical aperture) for excitation and collection, distributed around the needle to provide 200° azimuthal angular coverage. Since total internal reflection is used to create a side viewing fiber, an air interface is required at the angle polished end of the fiber. The fiber tips were polished at a 37° angle to ensure total internal reflection. 12 thin polymer tubes (170 μm inner diameter, 355 μm outer diameter) were heat fused together, and each of their distal ends were heat fused close to ensure no liquid infiltration. The 12 tubes were placed around the external cannula of the needle, on the 200° not covered by the biopsy window. The fibers were inserted in each tube one at a time so that the angled end is aligned to the center of the needle biopsy window, and rotated to the proper orientation to ensure the fiber emission and collection cone was normal (outward) to the BNB needle. This is repeated for all 12 fibers. The tubes around the fibers create the air interface at the angled ends, required for total internal reflection. Epoxy was used to close the proximal tube ends to prevent any liquid infiltration. A thin wall heat shrink was placed over both ends of the tubes/fibers to hold them in place on the needle. The heat shrink was not placed over the angled portion of the fibers so no Raman signature of the heat shrink would be collected. The fibers at the proximal end of the needle were placed in a 1m long nylon protective tube (1.55mm inner diameter, 1.8mm outer diameter) to a breakout section which each fiber is protected individually by a 0.75m long nylon protective tube (1.55mm inner diameter, 1.8mm outer diameter). The fibers were terminated individually with FC/PC connectors.

6.5.2 Ex vivo tissue measurements

For the current proof-of-principle experiments, a single fiber of the needle probe was used. A 785 nm dichroic beam splitter (Semrock, Inc) is used to separate the illumination and detection light and the light collection used a laser-line band-pass filter ($R_{\text{avg}} > 97\%$ from 705 – 900 nm, Semrock, Inc) and a long-pass filter ($T_{\text{avg}} > 93\%$ from 812.9 – 1200 nm, Semrock, Inc), together with collimating lenses (Thorlabs, Inc). A 750 mW, 671 nm spectrum stabilized near-infrared laser

(Laser Quantum, Inc) with adjustable power is used for Raman excitation. The collection path is connected to a spectrograph comprising a diffraction grating coupled to a high-resolution charge-coupled-device (CCD) camera (ANDOR Technology, Inc.). A fresh normal calf brain was used for the *ex vivo* proof-of-concept study, since this has a Raman signature and background similar to that of human brain tissue[185]. Contact Raman spectral measurements were made on different locations, and tissues were labeled white matter or gray matter by visual assessment. An imaging sequence comprises a background acquisition (laser turned off) and acquisition of 3 Raman spectra at the same location, with integration times of 0.5-2 s for each measurement. A fixed laser power of 10 mW was used to avoid damaging the polymer tubing from blood heating around the fiber tips. All ambient sources of light were turned off during acquisitions.

6.5.3 *In vivo* measurements in swine brain

The *in vivo* animal study was approved by the institutional Ethics Review Board (CHUM Research Center, Montreal, Canada), and all methods were performed in accordance with the relevant guidelines and regulations. Two adult 20-30 kg pigs were anaesthetised using a standard injection and gas inhalation procedure. Raman measurements were acquired using two different procedures in each animal: through a burr hole and following craniotomy) to access the brain with the RS biopsy needle. In both cases an X-ray contrast agent (Visipaque 370, 15 ml) was first injected via a catheter placed in the carotid artery, and CT difference angiography was performed to highlight intracranial blood vessels. For the first animal, the burr hole location was selected and a trajectory for the needle was chosen to achieve maximum depth and avoid intercepting major blood vessels during needle insertion through the dura. The Navigus frameless system (Medtronic, Inc.) was installed on the skull and the biopsy needle was aligned to its calculated trajectory. The needle was inserted until it reached the target location using navigational software (iGuide, Siemens Healthcare, Inc.). Data acquisition consisted of a 0.5 s background measurement (laser off) and 3 Raman spectra measurements at 0.5 s acquisition time at the target location. The probe was then rotated 180° and a tissue sample (typically 1 cm long and ~1-2 mm wide) was extracted by opening the biopsy window, aspirating tissue into the inner cannula and cutting the sample by rotating the inner cannula. These acquisition steps were repeated at different insertion depths (n=8) while pulling out the needle along its trajectory. The samples were fixed in formalin for subsequent

histopathologic assessment to distinguish gray and white matter. In the second pig, a craniotomy was performed to provide direct access to the brain. Since finding locations of white and gray matter is difficult based on a single trajectory of the needle, this approach was used on the second animal to access different areas of the brain more easily. The needle was inserted manually into the brain, and the RS and biopsy sequence was repeated for various locations and depths ($n=13$). The total time for optical measurements and tissue sample collection was ~15-20 min for each animal. The measured spectra were processed as follows: 1) averaging of the 3 spectra at each location and background subtraction (measurement with the laser off), 2) correction for the instrument response using measurements of a calibrated halogen white light (National Institute of Standards and Technology, Maryland, USA), 3) removal of intrinsic tissue fluorescence using an iterative polynomial fit[61] and 4) standard normal variate (SNV) normalization. Spectra from samples found on pathology to include other tissues such as blood vessel and choroid plexus were excluded from the analysis, so that 18 spectra were kept for the analysis and their average was computed.

6.5.4 High wavenumber Raman spectroscopy with intraoperative probe

In vivo validation was performed with a contact intraoperative probe that was previously used to demonstrate that fingerprint RS is able to distinguish normal brain tissue from tissue containing cancer cells[92], [149]. In order to use the same spectrometer (same spectral range in nanometers), a 671 nm laser was employed with this probe to measure higher frequency shifts. Slight modifications were also made to the design of the intraoperative probe previously used to make it capable of both fingerprint and high wavenumber RS. This modified probe has a 2.1 mm outer diameter containing 7 low-hydroxyl, 300 μm core fibers for light collection distributed around a central 272 μm core source fiber. The reemitted signal passes through a ring-shaped notch filter to remove elastically backscattered light and light scattered from the lens surface. The band-pass filter used in front of the excitation fiber was replaced with an in-line short-pass filter to allow the 671 nm excitation. A custom sapphire 2-component lens was used at the tip of the probe to overlap the excitation and detection volumes. The illumination and detection instruments are the same as for the animal study, previously described in detail. The 7 collection fibers were connected to the spectrometer through a single custom-built SMA connector. The laser spot size of the probe (tissue excitation area) of the handheld probe had a diameter of 0.5 mm and a field of view associated with

a single point of that same diameter. Further, light transport simulations in tissue using a Monte Carlo technique demonstrated that the sampling depth is ~ 1 mm [186]. Similar results are expected both for the handheld probe and the optical biopsy needle since tissue excitation and detection are spatially co-located.

6.5.5 Validation during brain tumor resection

This study investigated high-wavenumber RS using the modified handheld contact probe in 19 adult patients undergoing open cranium surgery for grade 2-4 glioma at the Montreal Neurological Institute and Hospital, under institutional Ethics Board approval and with informed consent. All methods were performed in accordance with the relevant guidelines and regulations. Preoperative neurological examination was performed, as well as standard clinical imaging by magnetic resonance (MRI). For the intraoperative measurements the system was placed on a surgical cart, brought in the operating room and connected to the previously sterilized probe. Purpose-built acquisition software was operated by a member of the instrument-development group, while the neurosurgeon handled the probe within the surgical sterile area. The surgeon first put the probe in contact with brain tissue in the surgical cavity followed by Raman spectroscopy acquisition. The RS sequence comprised a series of single-point spectral acquisitions with step-wise automatic laser power adjustment to find a power that optimized the use of the detector's dynamic range without saturation, a background acquisition with the laser turned off, and then collection of 3 Raman spectra. Each spectral measurement required that the neurosurgical microscope light be turned off temporarily to minimize ambient-light artefacts [149]. Following spectral acquisition, the neurosurgeon collected a small biopsy sample (~ 1.5 mm) at the interrogated site, located by the visible indentation of the tissue surface from the probe contact. Biopsy samples were fixed in formalin, embedded in paraffin, H&E stained and evaluated using a standard blinded protocol by an expert neuropathologist. Using standard clinical practice, atypical cells were identified based on their morphological features, including nuclear atypia and nuclear polymorphism and mitotic figures. Each sample was classified as either: *normal brain* (no cancer cells present), *infiltrated* (presence of cancer cells within non tumoral brain parenchyma), or *dense cancer*. For each infiltrated sample, the pathologist estimated the percentage of cancer cells in the sample (number of cancer cells divided by the total number of cells). Samples were rejected if optical artifacts were

observed in the Raman signal (4 samples), if the CCD saturated during acquisition (3 samples) or if the biopsy sample was partitioned, i.e. containing focal area(s) of different tissue types (10 samples).

6.5.6 Data analysis and tissue classification

Processing for RS involves background subtraction, correction for the instrument response, the removal of intrinsic tissue fluorescence[61] and normalization. Regarding classification, classes were chosen based on the clinical application and limitations of brain needle biopsy. The density of cancer cells in the sample plays an essential role in obtaining all the components for the integrated diagnosis of gliomas, as recommended by the WHO classification of tumors of the central nervous system[187]. Analysis of samples containing a minimum number of tumor cells is required for the identification of biomarkers essential for accurate diagnosis, ensuring optimal treatment planning and prognosis for the patient. For example, standard of care for the management of patients with glioma includes the detection of the IDH1 R132H point mutation as well as the status of the promoter of the MGMT gene for which, as is also the case for DNA sequencing, a minimum percentage of tumoral cells is necessary to get reliable and reproducible results[188], [189]. Thus, a threshold of 60% of cancer cells or higher was set since it is sufficient to achieve a precise diagnosis, based on neuropathologist experience (MCG). A Support Vector Machine (SVM) technique was used for RS tissue classification using 141 features of the spectra, chosen based on the p -values computed for the correlation between a particular spectral feature and the tissue type. Therefore, the spectral features used were those most correlated with the difference between cancer and normal tissue. The number of features was optimized to find the best outcome. Leave-one-out cross-validation (LOOCV) was used to determine the classification accuracy, sensitivity and specificity, treating all spectra except one as the training data for the classifier, with the other spectra as the testing data and repeating this for each spectrum. The sample size (number of patients and measurements per patient) was selected with the goal of achieving two-sided 95% normal-based confidence intervals of less than $\pm 5\%$ for all reported classification results, based on cross-validation.

Data availability

The datasets generated during and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Acknowledgements

This work was supported by the New Researchers and Discovery Grant programs of the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and the Collaborative Health Research Program (Canadian Institutes of Health Research/NSERC). JD is supported by a Mitacs Accelerate PhD Fellowship with Medtronic.

Author contributions

J.D, M.J. and M.P. developed software. J.D., E.M., K.U. and F.L. designed the biopsy needle probe and the intraoperative probe. E.M and K.U. fabricated the biopsy needle probe and the intraoperative probe. J.D, M.J., and F.L. analyzed optical spectroscopy data. K.P. and S.O. performed surgeries and optical data acquisitions. J.D., M.P., M.J. and F.P. assisted in optical data acquisitions. G.S. performed the imaging acquisition and needle trajectory planning for the animal experiment. M.-C.G. performed all neuropathology analysis. J.D. designed the illumination & detection system. K.P., B.W., D.T. and F.L. conceptualized the study and supervised the project. J.D., D.T., B.W., K.P. and F.L. wrote the manuscript.

Competing financial interests

K.P., F.L., E.M, and K.U. are co-founders of ODS Medical Inc, a medical device company that seeks to commercialize the Raman spectroscopy system for real time detection of tissue abnormalities.

Materials & correspondence

All correspondence and requests for materials should be sent to F.L.

6.6 SUPPLEMENTAL

Table S6.1: Prominent Raman peaks. For each peak, a bootstrapping student t-test was applied for two categories (normal vs. cancer), and the corresponding p-value is provided.

Band (cm ⁻¹)	Dominant	Molecular Species	Details	p-value
2845	Normal	Lipids and proteins	CH ₂ symmetric stretch of lipids & CH ₂ asymmetric stretch of lipids and proteins	< 0.0001
2884	Normal	Lipids and proteins	CH ₂ symmetric stretch of lipids & CH ₂ asymmetric stretch of lipids and proteins	< 0.0001
2930	Cancer	Proteins and lipids	Symmetric CH ₃ stretch due primarily to protein	< 0.0001
3450	Cancer	Water	OH stretching	0.7968

Table S6.2: Comparison of the geometry of probes and acquisition parameters used in all experiments

	Power at tip (mW)	Acquisition time (s)	Fiber diameter (μm) Illumination/ Collection	n collection fibers	n spectra/measurement
Intraoperative probe <i>In vivo</i> in humans	40-65	0.05	272/300	7	3
Biopsy needle probe <i>Ex vivo</i> calf brain	10	0.5 - 2	100/100	1	3
Biopsy needle probe <i>In vivo</i> pig brain	10	0.5	100/100	1	3

CHAPITRE 7 RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES

7.1 Limitations du premier prototype

Tel que présenté dans le troisième article de cette thèse, un premier prototype d'aiguille de biopsie avec système Raman intégré a été développé et validé *ex vivo* et *in vivo* sur des cerveaux d'animaux. Ce premier prototype, utilisant la spectroscopie Raman HWN, présente certaines limitations importantes. Premièrement, la fabrication de celui-ci a été difficile, particulièrement dû à l'alignement des 12 fibres optiques polies à angle. En effet, les fibres polies ont dû être insérées dans des petits tubes autour de la canule externe de l'aiguille de biopsie, et ensuite alignées de sorte que leur extrémité se retrouve au milieu de la fenêtre de biopsie, et que l'orientation de la sortie de la lumière soit perpendiculaire à l'axe de l'aiguille. La facilité et la reproductibilité du processus de fabrication d'un instrument médical est un enjeu majeur pour son intégration clinique, car le coût de fabrication de l'instrument est un facteur important à considérer lors de la commercialisation[18]. De plus, ce premier prototype a été fabriqué dans le but de faire une preuve de concept sur fantômes optiques et cerveaux animaux et n'est pas stérilisable. Un deuxième prototype devait donc être conçu pour l'utilisation *in vivo* chez les humains. Aussi, une limitation importante du prototype est la nécessité d'effectuer une rotation de l'aiguille de 180 degrés entre la mesure optique et la prise d'échantillon. Ceci nécessite le design d'une pièce complémentaire permettant d'effectuer une rotation précisément à 180 degrés, et complique les tâches du chirurgien. De plus, bien que la région spectrale HWN est assez spécifique pour distinguer les tissus cancéreux des tissus normaux, nos études précédentes montrent que la région FP présente de meilleurs résultats de classification de tissus. L'utilisation de ces deux régions spectrales était donc attrayante pour le guidage d'une aiguille de biopsie. Ces raisons ont donc conduit à la conception d'un deuxième prototype.

7.2 Deuxième prototype : micro-sonde dans la canule interne

Le deuxième prototype a été conçu dans l'objectif d'augmenter la précision de classification de tissus, de diminuer l'impact sur le flux de travail chirurgical pour poursuivre le projet de recherche avec une étude clinique chez les humains. Le design choisi consiste en une micro-sonde Raman de 900 μm de diamètre s'insérant dans la canule interne d'une aiguille de biopsie commerciale (Figure

7.1). La sonde est assez petite pour permettre l'aspiration d'air dans la canule interne, donc nul besoin de la retirer pour collecter un échantillon. Elle est composée d'une fibre centrale d'illumination de 100 μm de cœur, entourée de 12 fibres de collection de 100 μm de cœur. Un filtre passe-bande (transmission moyenne de 93% dans la bande spectrale 625 nm – 792 nm) à l'extrémité distale de la fibre d'illumination permet de rejeter la contribution du signal Raman provenant de la fibre elle-même, et un filtre circulaire passe-haut (transmission moyenne de 93%, longueur d'onde de coupure à 805 nm) à l'extrémité distale des fibres de collection permet d'éliminer la contribution des photons diffusés élastiquement par l'échantillon interrogé. Un prisme cylindrique poli à angle permet d'interroger le tissu à travers la fenêtre de biopsie, de façon normale à l'axe de l'aiguille (« *side-viewing* »). Finalement, un tube thermorétractable est ajouté afin de protéger les composants optiques et sceller le tout pour la stérilisation par le processus standard STERRAD (stérilisation chimique).

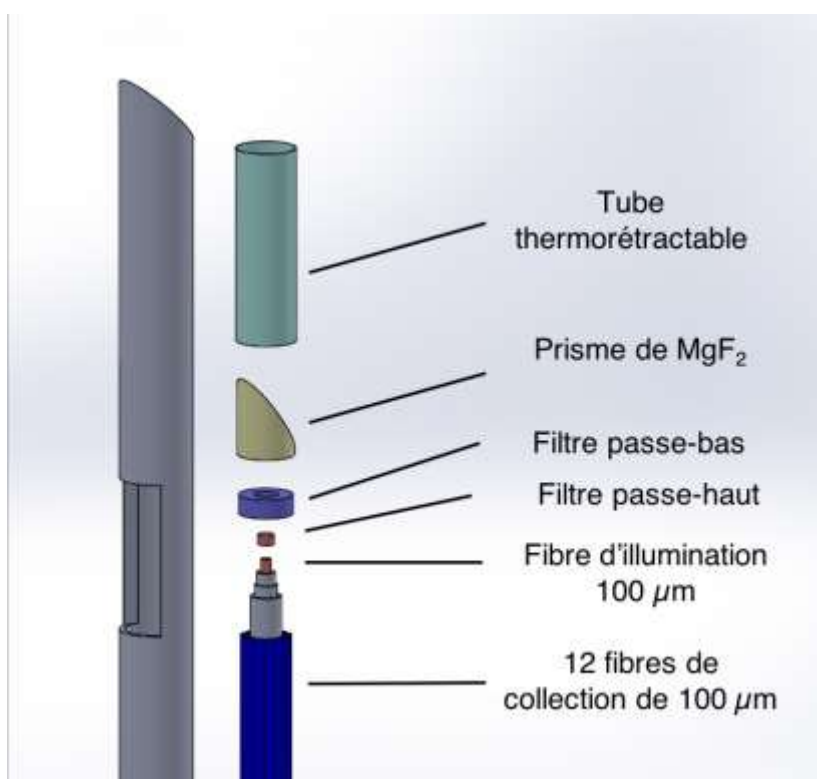


Figure 7.1: Vue explosée de la micro-sonde Raman s'insérant dans la canule interne de l'aiguille de biopsie commerciale.

Cette sonde permet l'illumination avec deux sources laser – une à 671 nm et une à 785 nm - afin de mesurer les spectres Raman dans les plages spectrales FP et HWN séquentiellement. Le

système optique utilisé pour l'acquisition est illustré à la Figure 7.2. Les détails des instruments optiques d'illumination et de détection sont présentés dans les chapitres 4 à 6. Une lame dichroïque permet l'injection de chacun des lasers séquentiellement dans l'unique fibre d'illumination de la sonde. Les 12 fibres de collection sont regroupées et alignées dans un connecteur optique de type « *mechanical transfer push-on* » (MTP) qui est connecté au spectromètre composé d'un réseau de diffraction et d'une caméra CCD.

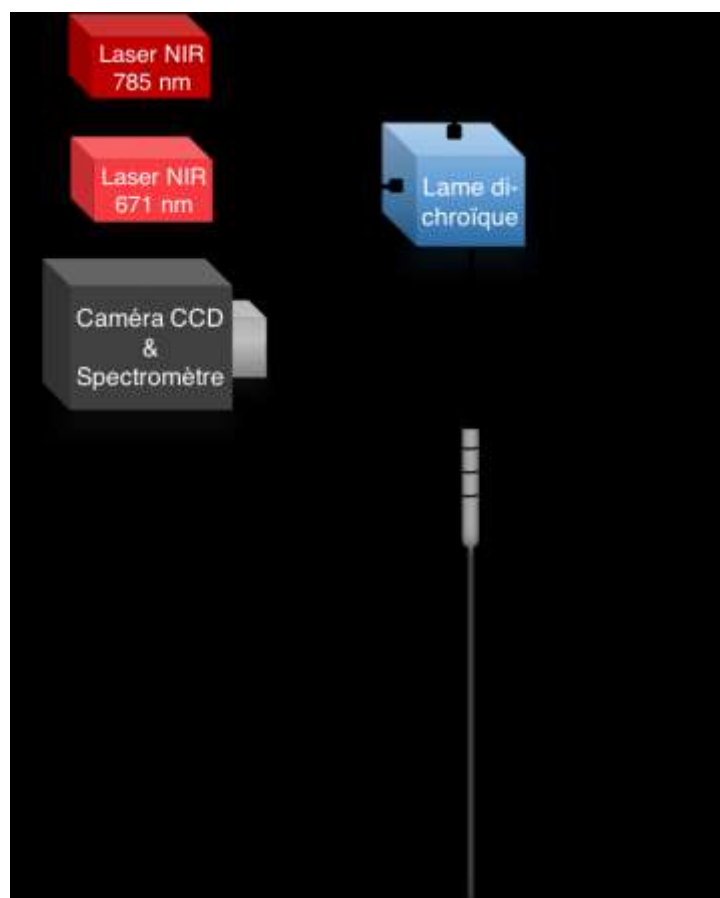


Figure 7.2: Système optique menant à l'acquisition de spectres Raman avec le deuxième prototype.

Le positionnement de la sonde dans la canule interne s'effectue du début de la chirurgie (Figure 7.3A). Dans une procédure de biopsie standard, une seringue est fixée à l'extrémité distale de l'aiguille de biopsie pour l'aspiration du tissu. Lorsque la micro-sonde (Figure 7.3B) Raman est utilisée, un adaptateur en forme de « y » (Figure 7.3C) est positionné à l'extrémité proximale de l'aiguille afin de permettre l'aspiration du tissu sans devoir retirer la sonde (Figure 7.3D). Cet adaptateur est aussi utilisé comme repère pour aligner le bout de la sonde avec la fenêtre de biopsie.

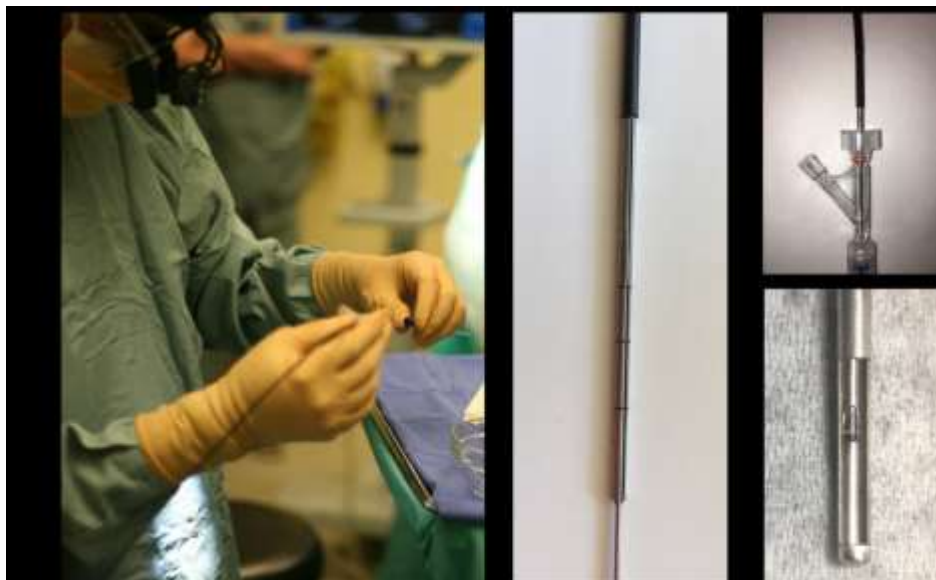


Figure 7.3: (A) La micro-sonde Raman s'insère dans l'aiguille de biopsie au début de la procédure (B) Photo de la sonde de 900 microns de diamètre. Des lignes circulaires sont présentes sur la sonde afin de faciliter l'alignement par rapport à l'aiguille de biopsie (C) Adaptateur permettant l'aspiration du tissu en présence de la sonde (D) Vue rapprochée de la fenêtre de biopsie ouverte montrant l'extrémité de la sonde optique

7.3 Protocole de l'étude clinique

Cette étude est menée pour évaluer la sécurité, la faisabilité technique et l'utilité potentielle de la technologie optique intégrée par rapport aux procédures standard de biopsie au cerveau. Puisque la sonde s'insère à l'intérieur de la canule interne de l'aiguille, une aiguille de biopsie commerciale standard est utilisée. Le flux de travail menant à l'acquisition des mesures optiques et l'échantillonnage de tissu (prise d'échantillons de biopsie) colocalisé est décrite ci-dessous.

La trajectoire de l'aiguille est d'abord calculée à l'aide du système de neuronavigation par le chirurgien. Un trou est percé dans le crâne du patient et un cadre crânien passif y est ensuite installé afin d'aligner la trajectoire de l'aiguille avec la trajectoire calculée. L'assemblage de l'aiguille, de la micro-sonde Raman et de l'adaptateur est ensuite effectué par le chirurgien dans la zone stérile de la salle d'opération et les fibres optiques sont connectées aux sources laser et au spectromètre. L'aiguille est ensuite insérée dans le cerveau avec la fenêtre de biopsie fermée (Figure 7.4).



Figure 7.4: Photographie montrant le cadre crânien passif et l'aiguille de biopsie insérée dans le cerveau du patient.

Lorsqu'il est décidé qu'une mesure optique soit effectuée, la position de l'aiguille est d'abord enregistrée sur l'image IRM à l'aide du système de neuronavigation, et la fenêtre de biopsie est ouverte afin de permettre la mesure de spectroscopie. Une telle mesure consiste en un spectre de « background » (sans source laser) ainsi que de 10 spectres consécutifs par région spectrale (FP et HWN), avec un temps d'acquisition variable (0.05 à 0.3 secondes par spectre) afin de maximiser l'utilisation de la plage dynamique du spectromètre. La puissance au bout de la sonde est de 20 mW pour les deux lasers. Lorsque l'acquisition est terminée, la sonde est retirée de 1 cm afin de laisser de l'espace pour l'aspiration du tissu à l'intérieur de la fenêtre de biopsie. Le tissu est ensuite aspiré, le chirurgien effectue une rotation de la canule interne par rapport à la canule externe pour l'excision, et la canule interne est retirée avec l'échantillon de tissu. L'échantillon est ensuite congelé et envoyé en laboratoire d'analyse pathologique pour le diagnostic de référence basé sur des analyses histopathologiques standards.

Tableau 7.1: Répartition des échantillons et mesures optiques acquises dans le cadre de l'étude clinique

Pathologie (n patients)	Type de tissu	n spectra
Lymphome (n=2)	Normal	2
	Cancer	7
		9
Gliome grade IV (n=1)	Normal	0
	Cancer	4
		4
Total		13

7.4 Résultats

Pour chaque patient, plusieurs mesures optiques ont été prises le long de la trajectoire de l'aiguille de biopsie : dans le tissu cérébral normal, à l'interface entre la tumeur et le parenchyme, et dans la tumeur. Au total, 14 mesures (avec échantillons e biopsie) ont été acquises dans 3 patients atteints ou bien de lymphomes ($n=2$) ou d'un gliome ($n=1$) (Tableau 7.1). Dans la tumeur, des mesures ont été prises dans différents cadrans du cerveau pour le premier et le deuxième patient (lymphomes): latéral, médial et supérieur. Un exemple de positionnement de l'aiguille pour une acquisition de spectres Raman FP et HWN est illustré à la Figure 7.5.

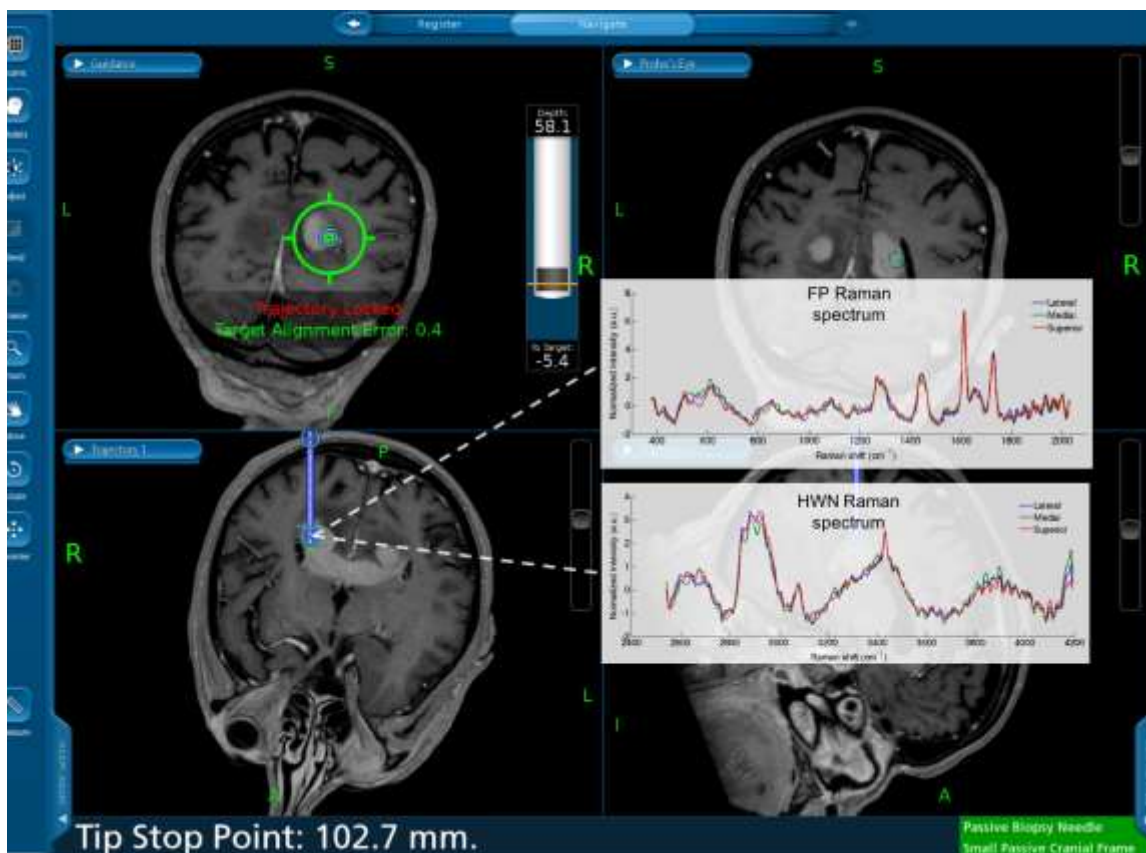


Figure 7.5: Exemple d'acquisition Raman, et positionnement de l'aiguille dans l'image RM préparatoire

La Figure 7.6 et la Figure 7.7 montrent une analyse de spectres à chaque étape du traitement des données, (1 spectre de tissu normal et 1 spectre de tissu cancéreux) *in vivo* associés à l'étude. Tel qu'il peut être observé sur le spectre Raman de tissu normal (Figure 7.6f), des oscillations sont présentes au début de la plage spectrale qui ne sont pas associées à des vibrations moléculaires de tissus biologiques. En effet, le polynôme itératif calculé (Figure 7.6c) ne correspond pas exactement à l'arrière-plan ('background') de fluorescence en début de spectre, causant un résiduel dans le spectre Raman après soustraction. Dans l'exemple donné, cet artéfact est plus important sur le spectre de tissu normal que sur celui de tissu cancéreux (Figure 7.7). Ceci peut être dû au fait que la forme du spectre de la fluorescence des tissus est différente, et/ou que la fluorescence intrinsèque du tissu normal est plus importante.

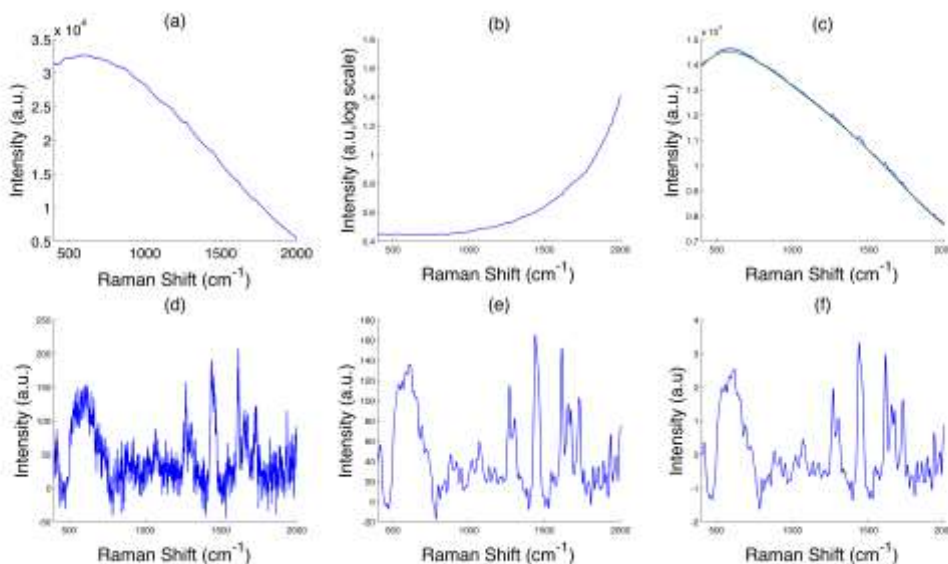


Figure 7.6 : Étapes de traitement pour un spectre Raman fingerprint in vivo de tissu normal (a) Spectre brut moyenné avec soustraction du background (b) Courbe de correction de la réponse spectrale du système, obtenue avec le standard NIST (c) Spectre brut multiplié par la courbe de correction (courbe bleue) et fit polynomial calculé pour correspondre aux contributions de fluorescence (courbe verte) (d) Soustraction de l'arrière-plan calculé en (c) (e) Spectre filtré avec un filtre gaussien pour éliminer le bruit (f) Spectre normalisé avec SNV

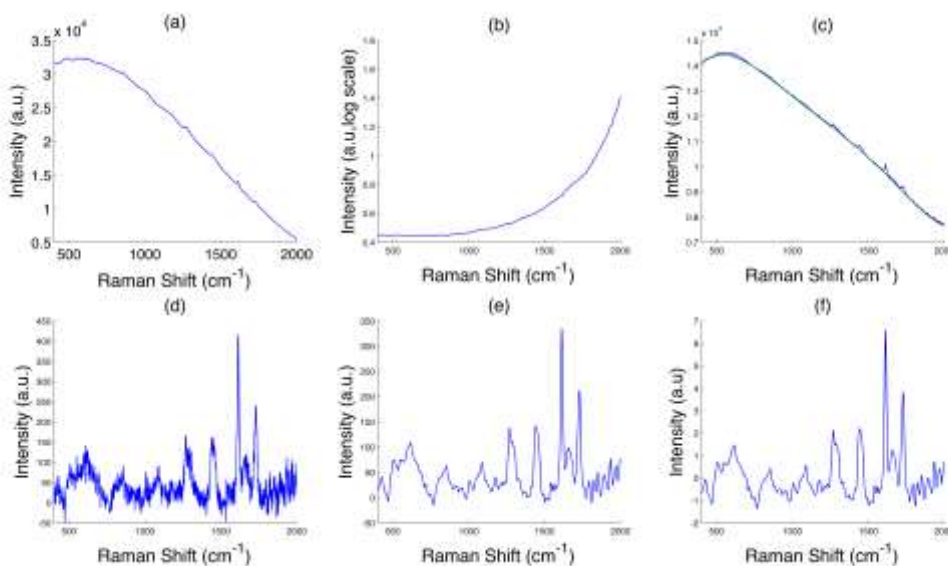


Figure 7.7: Étapes de traitement pour un spectre Raman fingerprint in vivo de tissus cancéreux (a) Spectre brut moyenné avec soustraction du background (b) Courbe de correction de la réponse spectrale du système, obtenue avec le standard NIST (c) Spectre brut multiplié par la courbe de correction (courbe bleue) et fit polynomial calculé pour correspondre aux contributions de fluorescence (courbe verte) (d) Soustraction de l'arrière-plan calculé en (c) (e) Spectre filtré avec un filtre gaussien pour éliminer le bruit (f) Spectre normalisé avec SNV

Lorsque l'on considère l'ensemble des spectres associés à l'étude clinique préliminaire, une variance importante (autour des spectres moyens) est observée en début de spectre dû à l'inconsistance de la soustraction de la fluorescence. Par contre, ceci n'aura aucun impact sur une classification éventuelle (méthodes d'apprentissage machine) entre les types de tissus puisque cette région (400 cm^{-1} - 800 cm^{-1}) ne sera pas sélectionnée afin d'extraire les caractéristiques spectrales significativement différentes entre différents types de tissus (par exemple, cancer vs. normal).

Les mesures de tissus normaux et cancéreux montrent les caractéristiques spectrales typiques des tissus cérébraux provenant majoritairement des lipides, protéines et acides aminés (Figure 7.8). Par exemple, le pic de phénylalanine à 1005 cm^{-1} est visible sur les spectres, ce qui est un bon indicateur de la qualité spectrale. Bien que ces données ne proviennent que de seulement trois patients, certaines différences sont déjà notables entre le spectre de tissu normal et les spectres de tissus cancéreux. Par exemple, au niveau des pics des lipides et protéines sur les spectres HWN ($2845\text{-}2930\text{ cm}^{-1}$), on peut observer une contribution plus grande des lipides pour le tissu normal que pour la tumeur.

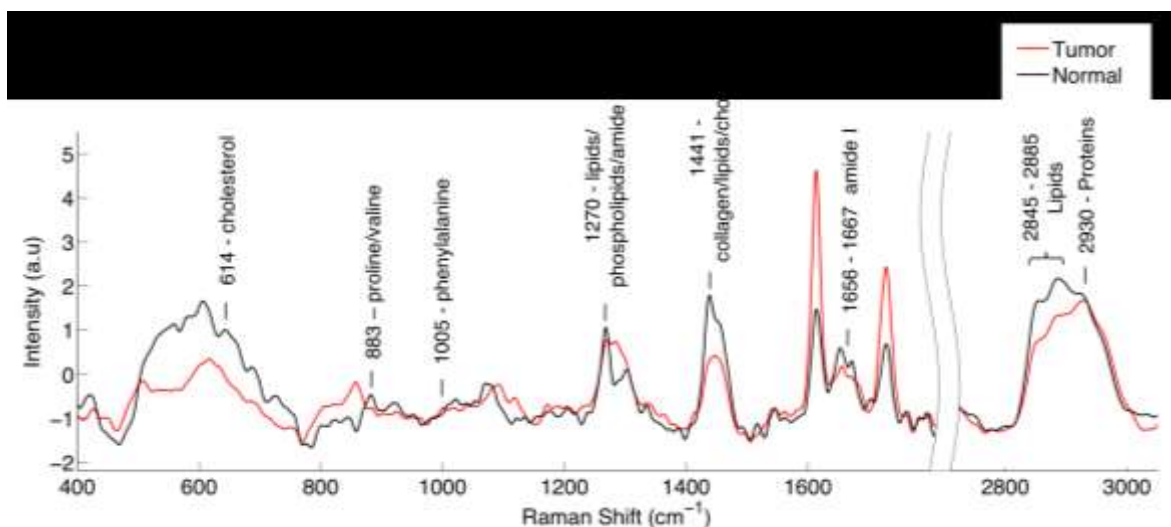


Figure 7.8: Spectres Raman FP et HWN du tissu normal (n=2 spectres) et de la tumeur (n=11 spectres) moyennés sur les trois patients. Les lignes verticales indiquent les principales caractéristiques spectrales présentes dans les spectres.

Pendant la procédure, la présence de sang au bout de la sonde est un facteur qui pourrait influencer les spectres. En effet, la présence de sang dû à une hémorragie locale (rupture de

vaisseaux sanguins lors de l'insertion de l'aiguille) peut affecter le spectre en ajoutant une contribution non spécifique au tissu d'intérêt. Afin d'évaluer qualitativement cette influence, un spectre a été acquis dans un échantillon de sang du patient, à la fin d'une procédure. L'analyse visuelle du spectre du sang et des spectres de tumeur du patient atteint d'un gliome permettent de faire l'hypothèse que la troisième mesure ('*Tumor #3*') dans la tumeur a été contaminée par du sang (courbe verte dans la Figure 7.9).

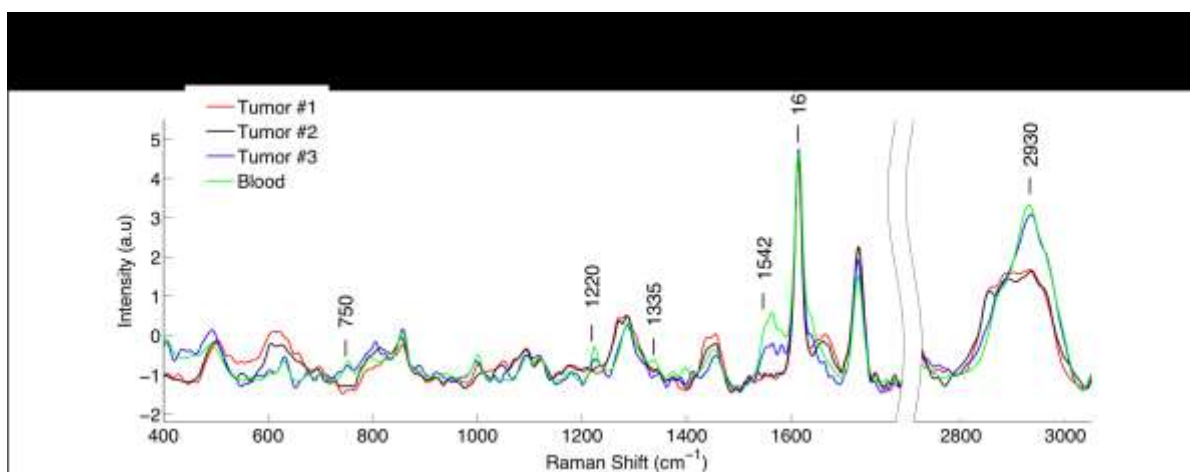


Figure 7.9: Trois des spectres Raman de tissus tumoraux et d'un échantillon de sang provenant du patient #3

Certains des pics du spectre du sang correspondent à des pics caractéristiques de spectres de sang provenant de la littérature (750, 1220, 1335, 1542, 1614 et 2930 cm^{-1}) [190]. Même si ceci est un résultat préliminaire, la différence est plus notable dans le spectre HWN (pic provenant des contributions en protéines à 2930 cm^{-1}) que dans le spectre FP, donc celui-ci pourrait être un indicateur de la quantité de sang présente au bout de l'aiguille. Ce sera certainement un élément à considérer pour l'applicabilité clinique de la technique de guidage *in vivo* de biopsie, et il sera discuté dans le chapitre suivant.

CHAPITRE 8 DISCUSSION GÉNÉRALE

8.1 Buts de l'étude

Avec l'évolution rapide de la médecine moderne, il existe un besoin critique pour de nouvelles techniques de caractérisation moléculaire des tissus qui peuvent être intégrées pratiquement aux procédures de biopsie standard pour améliorer le diagnostic et assurer une planification optimale du traitement. Un des plus grand défis de développement de ces techniques est l'intégration harmonieuse dans l'environnement clinique. La spectroscopie Raman utilise les différences de composition moléculaires pour distinguer les tissus normaux des tissus pathologiques. C'est une technique extrêmement prometteuse pour les interventions chirurgicales en oncologie par rapport à d'autres techniques d'imagerie, dû notamment à l'utilisation d'un contraste intrinsèque (nul besoin d'agents de contraste), facilitant ainsi l'intégration dans le flux de travail clinique et réduisant les barrières réglementaires. Malgré ces avantages, plusieurs défis ont limité l'adoption clinique de la spectroscopie Raman au cours des dernières décennies et ce un des buts de ce projet de recherche était de démontrer que l'utilisation en salle d'opération est possible et avantageuse. Cette étude porte particulièrement sur les biopsies du cerveau, et l'objectif principal était de démontrer qu'il serait possible d'améliorer la sécurité et l'efficacité diagnostique de cette procédure en y intégrant des mesures de spectroscopie optique. Dans le cadre de ce projet de recherche, nous avons développé un système de caractérisation des tissus *in vivo* en temps réel avec l'acquisition de mesures de spectroscopie Raman à l'extrémité distale d'une aiguille de biopsie commerciale.

8.2 Spectroscopie Raman validée *in vivo* en salle d'opération

Le premier objectif du projet était le développement et la validation de différentes approches menant à la caractérisation de tissus à l'aide de mesures de spectroscopie Raman. Tel que mentionné dans le chapitre 3, la détection du signal Raman reste l'un des principaux défis auxquels est confrontée l'utilisation de cette technique pour le diagnostic clinique et le guidage d'interventions chirurgicales. La contribution de l'arrière-plan d'auto-fluorescence intrinsèque dans les tissus domine souvent le signal Raman relativement faible, et d'autres facteurs tels que le bruit (e.g., bruit de grenaille, bruit de lecture, etc), la réponse spectrale des instruments et la lumière

ambiante compliquent davantage le problème. Le premier article publié dans le cadre de ce projet de recherche a traité des principaux aspects à considérer et à optimiser pour la détection de signaux Raman dans les patients humains, dans la salle d'opération. Cette étude a permis d'émettre des recommandations pour l'utilisation de la sonde Raman en salle d'opération, en prenant compte des sources de lumière présentes. À noter que la lumière ambiante n'impacte pas les mesures dans le cas de l'aiguille de biopsie Raman, puisque les mesures sont prises profondément dans le cerveau du patient. Un système de sonde de spectroscopie Raman a été optimisé pour l'utilisation *in vivo*, afin de valider que la technique permet de distinguer différents types de tissus biologiques. Dans le même article, des spectres Raman *in vivo* de cerveau normal, de cancer et de tissu nécrotique ont été mesurés chez 10 patients lors de procédures menant à la résection de tumeurs, démontrant que les mesures Raman permettent de différencier les tissus nécrotiques des tissus vitaux (tumeur et tissu cérébral normal) avec une précision de 87% et une spécificité de 89%. Cette preuve de concept est très utile pour l'application à l'aiguille de biopsie, car la nécrose est à éviter lors de l'échantillonnage de tissus cérébraux. Cet article présente aussi une évaluation de l'impact sur les mesures spectroscopiques des sources de lumière ambiante dans la salle d'opération et des recommandations ont été faites afin d'assurer des conditions de fonctionnement optimales.

Dans le souci d'optimiser les mesures dans la salle d'opération, un système de filtres pour le microscope chirurgical a été conçu et est présenté dans le deuxième article. Ce système permet d'effectuer des mesures Raman sous la lumière blanche d'un microscope neurochirurgical, et les résultats démontrent qu'il n'y a pas de différence significative entre les mesures sous la lumière blanche du microscope et sous la lumière blanche filtrée. Cette étude est importante pour l'intégration des mesures spectroscopiques au flux de travail du chirurgien, et permet donc de réduire le temps requis par acquisition. C'est aussi une avancée importante pour l'utilisation clinique de la sonde Raman pour aider la résection de tumeur, car ce système de filtres permettrait de réduire le temps total de l'intervention chirurgicale.

8.3 Développement de deux prototypes d'aiguilles Raman

Suite à l'optimisation de l'acquisition avec un système connu et validé, la phase d'intégration à l'aiguille de biopsie a été amorcée. Deux prototypes ont été conçus au cours de ce projet de recherche. Dans le cas du premier prototype, la plage spectrale HWN a été choisie pour la

conception de l'aiguille de biopsie Raman car la difficulté technique est moindre pour l'intégration dans un instrument de cette taille. Puisque cette plage spectrale n'avait pas été utilisée dans la littérature pour distinguer les tissus cérébraux normaux des tissus cancéreux, une preuve de concept a été effectuée avec un instrument différent (sonde peropératoire) et fait l'objet du troisième article de cette thèse. Pour ce faire, le système de sonde Raman déjà validé a été adapté et utilisé lors de résection de tumeurs au cerveau pour mesurer des spectres HWN de tissus sains et cancéreux. Les résultats démontrent que la spectroscopie Raman HWN peut détecter les tissus cancéreux denses (contenant plus de 60% de cellules cancéreuses) *in situ* pendant la chirurgie avec une sensibilité et une spécificité de 80% et 90%, respectivement. Ces résultats *in vivo* chez les humains démontrent que la technique est appropriée pour l'utilisation pour le guidage chirurgical d'une aiguille de biopsie. Le premier prototype d'aiguille a donc été conçu en intégrant des fibres optiques sur la canule externe d'une aiguille de biopsie commerciale, afin de mesurer des spectres Raman HWN à son extrémité distale. Une première preuve de concept a été effectuée dans un modèle de biopsie cérébrale porcine, démontrant pour la première fois dans le domaine de l'optique biomédicale des spectres Raman *in vivo* acquis au bout d'une aiguille de biopsie.

Finalement, le deuxième prototype de l'aiguille a été présenté au dernier chapitre de cette thèse, intégrant cette fois les régions spectrales FP et HWN dans la même micro-sonde. Cette dernière s'insère dans la canule interne d'une aiguille de biopsie commerciale au lieu d'être constituée de fibres directement intégrées sur la canule externe d'une aiguille commerciale. La preuve de concept a été effectuée sur 3 patients à l'institut de Neurologie de Montréal (voir Chapitre 7), et son utilisation est prévue dans le cadre d'une étude clinique multicentrique au cours des deux prochaines années, afin de démontrer l'efficacité et le potentiel de la technique pour l'amélioration des procédures de biopsies cérébrales. Les spectres acquis provenant des 3 patients contiennent des caractéristiques importantes des tissus cérébraux, ce qui est déjà un résultat très prometteur. En effet, il s'agit des premiers spectres Raman acquis *in vivo*, dans des cerveaux humains, profondément dans le cerveau. L'avantage principal de l'utilisation de l'instrument (en comparaison avec la technique développée pour le premier prototype d'aiguille de biopsie optique) est lié à des aspects pratiques en lien avec l'utilisation en clinique. Premièrement, le diamètre de l'aiguille est inchangé par rapport à l'aiguille de biopsie couramment utilisée puisque la sonde se positionne à l'intérieur de la canule interne. Ceci permet donc d'utiliser la même procédure et les mêmes instruments de positionnement de l'aiguille sur le crâne du patient et dans la salle

d'opération. L'instrument s'intègre aussi de façon naturelle avec le système de neuronavigation, ce qui permet d'utiliser la complémentarité de l'information fournie par les deux méthodes. Aussi, la sonde intégrée à l'aiguille permet la mesure optique rapide colocalisée avec l'échantillon, donc avec un impact minime sur le flux de travail chirurgical.

CHAPITRE 9 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

L'un des principaux défis liés à l'utilisation de la spectroscopie Raman pour le diagnostic clinique est le compromis entre la qualité des signaux moléculaires et le temps nécessaire pour l'acquisition. En effet, tel que démontré au chapitre 3, l'intensité du signal Raman est proportionnelle au temps d'acquisition et à la puissance laser. Dans le cadre de ce doctorat et en collaboration avec Guillaume Sheehy, un système d'ajustement automatique du temps d'intégration a été implémenté dans le logiciel d'acquisition et sera utilisé lors de l'étude multicentrique. Par contre, puisque l'exposition laser est limitée afin d'éviter les dommages aux tissus, la qualité des spectres n'est pas garantie. Dans plusieurs cas, l'ajout de fibres optiques à la sonde Raman permet l'acquisition de spectres avec un meilleur rapport signal sur bruit. Cependant, dans le cas de l'intégration dans une aiguille de biopsie, la taille de la sonde était critique puisqu'elle devait s'intégrer dans la canule interne. Les défis techniques pour le développement d'un système Raman proviennent donc des contraintes physiques liées à la nature des applications cliniques.

L'un des obstacles au transfert des techniques Raman vers des applications cliniques est la corrélation spatiale entre les mesures Raman *in vivo* et l'histopathologie *ex vivo* comme référence pour des études de validation. En effet, il est souvent difficile de s'assurer que l'échantillon de tissu est colocalisé exactement avec celui de la mesure Raman. Plusieurs facteurs sont confondants : la taille et la géométrie de la sonde Raman, l'absorption tissulaire et la diffusion élastique qui déterminent la profondeur et le volume échantillonné et la manipulation, la préservation et l'orientation de la biopsie pour la coupe histopathologique. De plus, même si l'échantillon de tissu et le volume d'échantillonnage Raman effectif sont colocalisés dans l'espace, il y a souvent une hétérogénéité marquée dans l'échantillon de tissu. Par exemple, ce dernier peut contenir à la fois des tissus cancéreux et normaux ou plusieurs grades de la tumeur. En général, pour la pathologie clinique, le grade le plus élevé est le plus important pour déterminer le traitement optimal et même le seul qui est rapporté, même s'il n'est représentatif que d'une fraction limitée de la tumeur. Dans ce cas, le résultat donné par le système Raman pourrait être considéré comme un faux négatif par rapport à l'histopathologie puisque ce tissu de plus haut grade ne contribue qu'à une petite fraction du signal Raman. Une façon de remédier en partie ce problème serait de déterminer l'étendue approximative du cancer dans l'échantillon de biopsie afin d'améliorer la précision de la corrélation. Aussi, une étude exhaustive du volume échantillonné par la sonde Raman, en utilisant une plage

de propriétés optiques réaliste pour le cerveau doit être effectuée pour déterminer la précision de la colocalisation.

Il sera important de valider que les mesures acquises soient spécifiques aux tissus interrogés pour l'intégration complète de la technique en clinique. En effet, l'influence potentielle du sang sur les mesures devra être rigoureusement caractérisée. Une des mesures de l'étude clinique utilisant le deuxième prototype *in vivo* présentait la signature spectrale du sang. Dans un contexte clinique cette mesure pourrait être rejetée automatiquement. Une autre avenue pourrait être l'utilisation de cette signature spectrale pour éviter les vaisseaux sanguins lors de la prise d'échantillon. Pour ce faire, il devra être possible de différencier spectralement du sang « stagnant » au bout de la sonde de la présence d'un vaisseau sanguin en proximité. Ceci pourrait potentiellement être effectué en intégrant des mesures de réflectance diffuse à l'aiguille de biopsie.

Une autre des limitations de l'utilisation de la spectroscopie Raman en clinique est la difficulté d'obtenir suffisamment de mesures pour l'obtention d'un modèle statistique robuste. En effet, l'utilisation d'algorithmes d'apprentissage machine pour la classification nécessite une base de données d'entraînement considérable. Malheureusement, des données de seulement trois patients sont disponibles à ce moment et présentées dans cette thèse, mais l'étude multicentrique devrait permettre d'accumuler suffisamment de données. Un des objectifs de l'intégration de cette technique optique dans une aiguille de biopsie pourrait aussi d'être en mesure de détecter les différents grades de la tumeur *in vivo*, ce qui permettrait de guider l'aiguille vers la zone à plus haut grade. Ceci nécessite encore plus de données, car plusieurs classes doivent être utilisées dans l'apprentissage de l'algorithme de classification. Une des façons d'approcher le problème serait d'utiliser la sonde pour l'interrogation de tissus lors de résections de tumeurs, pendant lesquels il est plus facile d'avoir accès à différents types de tissus. Il serait bien sur nécessaire de prendre en compte les différences entre les systèmes en développant une méthode de correction spectrale robuste pour la réponse spectrale des systèmes.

L'originalité du projet provient à la fois des composantes individuelles et du projet entier en lui-même. En effet, la caractérisation de tissus cérébraux à l'aide de la spectroscopie Raman était déjà un projet original. Les tissus cérébraux nécrotiques, cancéreux et normaux n'avaient jamais été classifiés *in vivo* chez les humains à l'aide d'un système de spectroscopie Raman. De

plus, l'utilisation de la plage spectrale « *high wavenumber* » avait seulement été utilisée sur des tissus cérébraux *ex vivo*. Le développement de cet instrument optique a le potentiel de permettre aux chirurgiens d'avoir accès à de nouvelles informations en temps réel durant les biopsies du cerveau, afin de minimiser les erreurs de diagnostic dans le but d'éviter une deuxième procédure et donc de diminuer les risques pour le patient. Ces améliorations par rapport à la pratique actuelle représentent un impact clinique considérable. De plus, la technologie, en augmentant l'efficacité d'une prise de biopsies, ainsi diminuant le nombre de procédures nécessaires et de coupes congelées jusqu'à l'obtention d'un échantillon utilisable pour l'établissement du diagnostic, qui sont coûteuses et prennent du temps, devrait contribuer à diminuer les coûts effectifs liés aux procédures de biopsies du cerveau. Cette thèse a démontré l'intégration de la spectroscopie Raman dans une aiguille de biopsie commerciale et son utilisation pour des mesures de tumeurs cérébrales, *in vivo*, pour la première fois. Bien que ceci implique des défis technologiques de taille pour l'intégration clinique, les résultats de cette thèse montre la faisabilité de la technique et ouvre la voie à la translation de techniques similaires dans de nombreuses autres procédures chirurgicales, telles que les biopsies de la prostate, du poumon, sein, et l'injection ciblée de médicaments.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Y. Lu, C. Yeung, A. Radmanesh, R. Wiemann, P. M. Black, and A. J. Golby, “Comparative Effectiveness of Frame-Based, Frameless, and Intraoperative Magnetic Resonance Imaging–Guided Brain Biopsy Techniques,” *World Neurosurg.*, vol. 83, no. 3, pp. 261–268, Mar. 2015.
- [2] G. F. Woodworth, M. J. McGirt, A. Samdani, I. Garonzik, A. Olivi, and J. D. Weingart, “Frameless image-guided stereotactic brain biopsy procedure: diagnostic yield, surgical morbidity, and comparison with the frame-based technique,” *J. Neurosurg.*, vol. 104, no. 2, pp. 233–237, Feb. 2006.
- [3] J. Gralla, C. Nimsky, M. Buchfelder, R. Fahlbusch, and O. Ganslandt, “Frameless stereotactic brain biopsy procedures using the Stealth Station: indications, accuracy and results,” *Zentralbl. Neurochir.*, vol. 64, no. 4, pp. 166–170, 2003.
- [4] R. Dammers, I. K. Haitzma, J. W. Schouten, J. M. Kros, C. J. J. Avezaat, and A. J. P. E. Vincent, “Safety and efficacy of frameless and frame-based intracranial biopsy techniques,” *Acta Neurochir. (Wien)*, vol. 150, no. 1, pp. 23–29, Jan. 2008.
- [5] M. L. Goodenberger and R. B. Jenkins, “Genetics of adult glioma,” *Cancer Genet.*, vol. 205, no. 12, pp. 613–621, Dec. 2012.
- [6] D. N. Louis *et al.*, “The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System,” *Acta Neuropathol. (Berl.)*, vol. 114, no. 2, pp. 97–109, Jul. 2007.
- [7] R. Henriksson, T. Ask Lund, and H. S. Poulsen, “Impact of therapy on quality of life, neurocognitive function and their correlates in glioblastoma multiforme: a review,” *J. Neurooncol.*, vol. 104, no. 3, pp. 639–646, Apr. 2011.
- [8] R. Dammers, J. W. Schouten, I. K. Haitzma, A. J. P. E. Vincent, J. M. Kros, and C. M. F. Dirven, “Towards improving the safety and diagnostic yield of stereotactic biopsy in a single centre,” *Acta Neurochir. (Wien)*, vol. 152, no. 11, pp. 1915–1921, Aug. 2010.
- [9] N. L. Dorward, T. S. Paleologos, O. Alberti, and D. G. T. Thomas, “The advantages of frameless stereotactic biopsy over frame-based biopsy,” *Br. J. Neurosurg.*, vol. 16, no. 2, pp. 110–118, Jan. 2002.

- [10] W. A. Hall, “The safety and efficacy of stereotactic biopsy for intracranial lesions,” *Cancer*, vol. 82, no. 9, pp. 1749–1755, May 1998.
- [11] G. K. Zoeller, R. J. Benveniste, H. Landy, J. J. Morcos, and J. Jagid, “Outcomes and Management Strategies after Nondiagnostic Stereotactic Biopsies of Brain Lesions,” *Stereotact. Funct. Neurosurg.*, vol. 87, no. 3, pp. 174–181, 2009.
- [12] F. V. Aker, T. Hakan, S. Karadereler, and M. Erkan, “Accuracy and diagnostic yield of stereotactic biopsy in the diagnosis of brain masses: Comparison of results of biopsy and resected surgical specimens,” *Neuropathology*, vol. 25, no. 3, pp. 207–213, Sep. 2005.
- [13] L. D. Lunsford, A. Niranjana, A. A. Khan, and D. Kondziolka, “Establishing a Benchmark for Complications Using Frame-Based Stereotactic Surgery,” *Stereotact. Funct. Neurosurg.*, vol. 86, no. 5, pp. 278–287, 2008.
- [14] R. J. Jackson *et al.*, “Limitations of stereotactic biopsy in the initial management of gliomas,” *Neuro-Oncol.*, vol. 3, no. 3, pp. 193–200, Jan. 2001.
- [15] C. V. Raman and K. S. Krishnan, “A New Type of Secondary Radiation,” *Nature*, vol. 121, no. 3048, pp. 501–502, Mar. 1928.
- [16] C. V. Raman, “A Change of Wave-length in Light Scattering,” *Nature*, vol. 121, no. 3051, p. 619, Apr. 1928.
- [17] R. C. Lord and N. Yu, “Laser-excited Raman spectroscopy of biomolecules: I. Native lysozyme and its constituent amino acids,” *J. Mol. Biol.*, vol. 50, no. 2, pp. 509–524, Jun. 1970.
- [18] B. C. Wilson, M. Jermyn, and F. Leblond, “Challenges and opportunities in clinical translation of biomedical optical spectroscopy and imaging,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 23, no. 3, p. 030901, Mar. 2018.
- [19] L. A. Austin, S. Osseiran, and C. L. Evans, “Raman technologies in cancer diagnostics,” *Analyst*, vol. 141, no. 2, pp. 476–503, Jan. 2016.
- [20] E. Smith and G. Dent, *Modern Raman Spectroscopy: A Practical Approach*. John Wiley & Sons, 2013.

- [21] R. Salzer and H. W. Siesler, *Infrared and Raman Spectroscopic Imaging*. John Wiley & Sons, 2014.
- [22] F. A. South, E. J. Chaney, M. Marjanovic, S. G. Adie, and S. A. Boppart, “Differentiation of ex vivo human breast tissue using polarization-sensitive optical coherence tomography,” *Biomed. Opt. Express*, vol. 5, no. 10, pp. 3417–3426, Oct. 2014.
- [23] M. Thill, “MarginProbe®: intraoperative margin assessment during breast conserving surgery by using radiofrequency spectroscopy,” *Expert Rev. Med. Devices*, vol. 10, no. 3, pp. 301–315, May 2013.
- [24] T. Bhattacharjee, P. Kumar, G. Maru, A. Ingle, and C. M. Krishna, “Swiss bare mice: a suitable model for transcutaneous in vivo Raman spectroscopic studies of breast cancer,” *Lasers Med. Sci.*, vol. 29, no. 1, pp. 325–333, Jan. 2014.
- [25] A. S. Haka *et al.*, “Diagnosing breast cancer using Raman spectroscopy: prospective analysis,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 14, no. 5, p. 054023, Sep. 2009.
- [26] A. S. Haka *et al.*, “In vivo Margin Assessment during Partial Mastectomy Breast Surgery Using Raman Spectroscopy,” *Cancer Res.*, vol. 66, no. 6, pp. 3317–3322, Mar. 2006.
- [27] J. Zhao, H. Lui, D. I. McLean, and H. Zeng, “Real-time raman spectroscopy for non-invasive skin cancer detection - preliminary results,” in *2008 30th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, 2008, pp. 3107–3109.
- [28] M. Gniadecka *et al.*, “Melanoma Diagnosis by Raman Spectroscopy and Neural Networks: Structure Alterations in Proteins and Lipids in Intact Cancer Tissue,” *J. Invest. Dermatol.*, vol. 122, no. 2, pp. 443–449, Feb. 2004.
- [29] S. Sigurdsson, P. A. Philipsen, L. K. Hansen, J. Larsen, M. Gniadecka, and H.-C. Wulf, “Detection of skin cancer by classification of Raman spectra,” *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. 51, no. 10, pp. 1784–1793, 2004.
- [30] P. A. Philipsen, L. Knudsen, M. Gniadecka, M. H. Ravnbak, and H. C. Wulf, “Diagnosis of malignant melanoma and basal cell carcinoma by in vivo NIR-FT Raman spectroscopy is independent of skin pigmentation,” *Photochem. Photobiol. Sci.*, vol. 12, no. 5, pp. 770–776, Apr. 2013.

- [31] J. Schleusener *et al.*, “In vivo study for the discrimination of cancerous and normal skin using fibre probe-based Raman spectroscopy,” *Exp. Dermatol.*, vol. 24, no. 10, pp. 767–772.
- [32] A. Mizuno, H. Kitajima, K. Kawauchi, S. Muraishi, and Y. Ozaki, “Near-infrared Fourier transform Raman spectroscopic study of human brain tissues and tumours,” *J. Raman Spectrosc.*, vol. 25, no. 1, pp. 25–29.
- [33] S. Koljenović, L.-P. Choo-Smith, T. C. Bakker Schut, J. M. Kros, H. J. van den Berge, and G. J. Puppels, “Discriminating Vital Tumor from Necrotic Tissue in Human Glioblastoma Tissue Samples by Raman Spectroscopy,” *Lab. Invest.*, vol. 82, no. 10, pp. 1265–1277, Jan. 2002.
- [34] S. Koljenovic’ *et al.*, “Tissue characterization using high wave number Raman spectroscopy,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 10, no. 3, pp. 031116–03111611, 2005.
- [35] C. Krafft, S. B. Sobottka, G. Schackert, and R. Salzer, “Raman and infrared spectroscopic mapping of human primary intracranial tumors: a comparative study,” *J. Raman Spectrosc.*, vol. 37, no. 1–3, pp. 367–375.
- [36] A. Beljebbar, S. Dukic, N. Amharref, and M. Manfait, “Ex vivo and in vivo diagnosis of C6 glioblastoma development by Raman spectroscopy coupled to a microprobe,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 398, no. 1, pp. 477–487, Sep. 2010.
- [37] M. Kirsch, G. Schackert, R. Salzer, and C. Krafft, “Raman spectroscopic imaging for in vivo detection of cerebral brain metastases,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 398, no. 4, pp. 1707–1713, Oct. 2010.
- [38] S. N. Kalkanis *et al.*, “Raman spectroscopy to distinguish grey matter, necrosis, and glioblastoma multiforme in frozen tissue sections,” *J. Neurooncol.*, vol. 116, no. 3, pp. 477–485, Feb. 2014.
- [39] M. Ji *et al.*, “Rapid, Label-Free Detection of Brain Tumors with Stimulated Raman Scattering Microscopy,” *Sci. Transl. Med.*, vol. 5, no. 201, pp. 201ra119–201ra119, Sep. 2013.
- [40] M. S. Bergholt *et al.*, “Fiber-optic Raman spectroscopy probes gastric carcinogenesis in vivo at endoscopy,” *J. Biophotonics*, vol. 6, no. 1, pp. 49–59.

- [41] M. S. Bergholt *et al.*, “Raman endoscopy for *in vivo* differentiation between benign and malignant ulcers in the stomach,” *Analyst*, vol. 135, no. 12, pp. 3162–3168, Nov. 2010.
- [42] M. S. Bergholt, W. Zheng, K. Y. Ho, K. G. Yeoh, and Z. Huang, “Raman endoscopy for objective diagnosis of early cancer in the gastrointestinal system,” *J Gastroint Dig Syst S*, vol. 1, p. 008, 2013.
- [43] M. G. Shim, L.-M. W. K. Song, N. E. Marcon, and B. C. Wilson, “*In vivo* Near-infrared Raman Spectroscopy: Demonstration of Feasibility During Clinical Gastrointestinal Endoscopy ¶,” *Photochem. Photobiol.*, vol. 72, no. 1, pp. 146–150.
- [44] A. Molckovsky, L.-M. W. K. Song, M. G. Shim, N. E. Marcon, and B. C. Wilson, “Diagnostic potential of near-infrared Raman spectroscopy in the colon: Differentiating adenomatous from hyperplastic polyps,” *Gastrointest. Endosc.*, vol. 57, no. 3, pp. 396–402, Mar. 2003.
- [45] B. C. Wilson, “Detection and treatment of dysplasia in Barrett’s esophagus: a pivotal challenge in translating biophotonics from bench to bedside,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 12, no. 5, p. 051401, Sep. 2007.
- [46] J. Wang *et al.*, “Simultaneous fingerprint and high-wavenumber fiber-optic Raman spectroscopy improves *in vivo* diagnosis of esophageal squamous cell carcinoma at endoscopy,” *Sci. Rep.*, vol. 5, p. 12957, Aug. 2015.
- [47] H. C. McGregor *et al.*, “Real-time endoscopic Raman spectroscopy for *in vivo* early lung cancer detection,” *J. Biophotonics*, p. n/a-n/a, Jan. 2016.
- [48] C. M. Krishna *et al.*, “FTIR and Raman microspectroscopy of normal, benign, and malignant formalin-fixed ovarian tissues,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 387, no. 5, pp. 1649–1656, Mar. 2007.
- [49] K. Maheedhar *et al.*, “Diagnosis of Ovarian Cancer by Raman Spectroscopy: A Pilot Study,” *Photomed. Laser Surg.*, vol. 26, no. 2, pp. 83–90, Mar. 2008.
- [50] J. V. Jokerst, A. J. Cole, D. Van de Sompel, and S. S. Gambhir, “Gold Nanorods for Ovarian Cancer Detection with Photoacoustic Imaging and Resection Guidance via Raman Imaging in Living Mice,” *ACS Nano*, vol. 6, no. 11, pp. 10366–10377, Nov. 2012.

- [51] S. Boca-Farcau, M. Potara, T. Simon, A. Juhem, P. Baldeck, and S. Astilean, “Folic Acid-Conjugated, SERS-Labeled Silver Nanotriangles for Multimodal Detection and Targeted Photothermal Treatment on Human Ovarian Cancer Cells,” *Mol. Pharm.*, vol. 11, no. 2, pp. 391–399, Feb. 2014.
- [52] I. I. Patel *et al.*, “High contrast images of uterine tissue derived using Raman microspectroscopy with the empty modelling approach of multivariate curve resolution-alternating least squares,” *Analyst*, vol. 136, no. 23, pp. 4950–4959, Nov. 2011.
- [53] S. Borel *et al.*, “Discrimination of normal and malignant mouse ovarian surface epithelial cells in vitro using Raman microspectroscopy,” *Anal. Methods*, vol. 7, no. 22, pp. 9520–9528, Nov. 2015.
- [54] S. Feng *et al.*, “Surface-enhanced Raman spectroscopy of saliva proteins for the noninvasive differentiation of benign and malignant breast tumors,” *Int. J. Nanomedicine*, vol. 10, pp. 537–547, Jan. 2015.
- [55] S. Li *et al.*, “Noninvasive prostate cancer screening based on serum surface-enhanced Raman spectroscopy and support vector machine,” *Appl. Phys. Lett.*, vol. 105, no. 9, p. 091104, Sep. 2014.
- [56] B. Elumalai, A. Prakasarao, B. Ganesan, K. Dornadula, and S. Ganesan, “Raman spectroscopic characterization of urine of normal and oral cancer subjects,” *J. Raman Spectrosc.*, vol. 46, no. 1, pp. 84–93.
- [57] Z. Huang, A. McWilliams, H. Lui, D. I. McLean, S. Lam, and H. Zeng, “Near-infrared Raman spectroscopy for optical diagnosis of lung cancer,” *Int. J. Cancer*, vol. 107, no. 6, pp. 1047–1052.
- [58] C. W. Freudiger *et al.*, “Multicolored stain-free histopathology with coherent Raman imaging,” *Lab. Invest.*, vol. 92, no. 10, pp. 1492–1502, Oct. 2012.
- [59] “Raman Spectroscopy of Biological Tissues: Applied Spectroscopy Reviews: Vol 50, No 1.” [Online]. Available: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/05704928.2014.923902>. [Accessed: 26-Jul-2018].

- [60] S. Dochow *et al.*, “Etaloning, fluorescence and ambient light suppression by modulated wavelength Raman spectroscopy,” *Biomed. Spectrosc. Imaging*, vol. 1, no. 4, pp. 383–389, 2012.
- [61] J. Zhao, H. Lui, D. I. McLean, and H. Zeng, “Automated Autofluorescence Background Subtraction Algorithm for Biomedical Raman Spectroscopy,” *Appl. Spectrosc.*, vol. 61, no. 11, pp. 1225–1232, Nov. 2007.
- [62] M. Jermyn *et al.*, “A review of Raman spectroscopy advances with an emphasis on clinical translation challenges in oncology,” *Phys. Med. Biol.*, vol. 61, no. 23, p. R370, 2016.
- [63] J. F. Kelly, T. A. Blake, B. E. Bernacki, and T. J. Johnson, “Design Considerations for a Portable Raman Probe Spectrometer for Field Forensics,” *International Journal of Spectroscopy*, 2012. [Online]. Available: <https://www.hindawi.com/journals/ijs/2012/938407/abs/>. [Accessed: 23-May-2018].
- [64] J. A. Dieringer *et al.*, “Introductory Lecture,” *Faraday Discuss.*, vol. 132, no. 0, pp. 9–26, Apr. 2006.
- [65] S. Schlücker, “Surface-Enhanced Raman Spectroscopy: Concepts and Chemical Applications,” *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 53, no. 19, pp. 4756–4795.
- [66] M. Schütz, C. I. Müller, M. Salehi, C. Lambert, and S. Schlücker, “Design and synthesis of Raman reporter molecules for tissue imaging by immuno-SERS microscopy,” *J. Biophotonics*, vol. 4, no. 6, pp. 453–463.
- [67] C. L. Zavaleta *et al.*, “Multiplexed imaging of surface enhanced Raman scattering nanotags in living mice using noninvasive Raman spectroscopy,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 106, no. 32, pp. 13511–13516, Aug. 2009.
- [68] U. S. Dinish, G. Balasundaram, Y.-T. Chang, and M. Olivo, “Actively Targeted *In Vivo* Multiplex Detection of Intrinsic Cancer Biomarkers Using Biocompatible SERS Nanotags,” *Sci. Rep.*, vol. 4, p. 4075, Feb. 2014.
- [69] P. McVeigh, R. J. Mallia, I. Veilleux, and B. C. Wilson, “Widefield quantitative multiplex surface enhanced Raman scattering imaging *in vivo*,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 18, no. 4, p. 046011, Apr. 2013.

- [70] S. Feng, W. Wang, I. T. Tai, G. Chen, R. Chen, and H. Zeng, "Label-free surface-enhanced Raman spectroscopy for detection of colorectal cancer and precursor lesions using blood plasma," *Biomed. Opt. Express*, vol. 6, no. 9, pp. 3494–3502, Sep. 2015.
- [71] S. Feng *et al.*, "Nasopharyngeal cancer detection based on blood plasma surface-enhanced Raman spectroscopy and multivariate analysis," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 25, no. 11, pp. 2414–2419, Jul. 2010.
- [72] C. L. Evans, E. O. Potma, M. Puoris'haag, D. Côté, C. P. Lin, and X. S. Xie, "Chemical imaging of tissue in vivo with video-rate coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 102, no. 46, pp. 16807–16812, Nov. 2005.
- [73] F. Légaré, C. L. Evans, F. Ganikhanov, and X. S. Xie, "Towards CARS Endoscopy," *Opt. Express*, vol. 14, no. 10, pp. 4427–4432, May 2006.
- [74] B. G. Saar, R. S. Johnston, C. W. Freudiger, X. S. Xie, and E. J. Seibel, "Coherent Raman scanning fiber endoscopy," *Opt. Lett.*, vol. 36, no. 13, pp. 2396–2398, Jul. 2011.
- [75] M. Balu, G. Liu, Z. Chen, B. J. Tromberg, and E. O. Potma, "Fiber delivered probe for efficient CARS imaging of tissues," *Opt. Express*, vol. 18, no. 3, pp. 2380–2388, Feb. 2010.
- [76] J. Zheng *et al.*, "Vibrational phase imaging in wide-field CARS for nonresonant background suppression," *Opt. Express*, vol. 23, no. 8, pp. 10756–10763, Apr. 2015.
- [77] A. Alfonso-Garcia, R. Mittal, E. S. Lee, and E. O. Potma, "Biological imaging with coherent Raman scattering microscopy: a tutorial," *J. Biomed. Opt.*, vol. 19, no. 7, p. 071407, Mar. 2014.
- [78] B. G. Saar, C. W. Freudiger, J. Reichman, C. M. Stanley, G. R. Holtom, and X. S. Xie, "Video-Rate Molecular Imaging in Vivo with Stimulated Raman Scattering," *Science*, vol. 330, no. 6009, pp. 1368–1370, Dec. 2010.
- [79] C. W. Freudiger, W. Yang, G. R. Holtom, N. Peyghambarian, X. S. Xie, and K. Q. Kieu, "Stimulated Raman scattering microscopy with a robust fibre laser source," *Nat. Photonics*, vol. 8, no. 2, pp. 153–159, Feb. 2014.
- [80] D. Fu *et al.*, "Quantitative Chemical Imaging with Multiplex Stimulated Raman Scattering Microscopy," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 134, no. 8, pp. 3623–3626, Feb. 2012.

- [81] C.-S. Liao *et al.*, “Spectrometer-free vibrational imaging by retrieving stimulated Raman signal from highly scattered photons,” *Sci. Adv.*, vol. 1, no. 9, p. e1500738, Oct. 2015.
- [82] P. Berto, E. R. Andresen, and H. Rigneault, “Background-Free Stimulated Raman Spectroscopy and Microscopy,” *Phys. Rev. Lett.*, vol. 112, no. 5, p. 053905, Feb. 2014.
- [83] I. Latka, S. Dochow, C. Krafft, B. Dietzek, and J. Popp, “Fiber optic probes for linear and nonlinear Raman applications – Current trends and future development,” *Laser Photonics Rev.*, vol. 7, no. 5, pp. 698–731.
- [84] S. Koljenović, L.-P. Choo-Smith, T. C. Bakker Schut, J. M. Kros, H. J. van den Berge, and G. J. Puppels, “Discriminating Vital Tumor from Necrotic Tissue in Human Glioblastoma Tissue Samples by Raman Spectroscopy,” *Lab. Invest.*, vol. 82, no. 10, pp. 1265–1277, Jan. 2002.
- [85] A. Beljebbar, S. Dukic, N. Amharref, and M. Manfait, “Ex vivo and in vivo diagnosis of C6 glioblastoma development by Raman spectroscopy coupled to a microprobe,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 398, no. 1, pp. 477–487, Jun. 2010.
- [86] A. Mizuno, H. Kitajima, K. Kawauchi, S. Muraishi, and Y. Ozaki, “Near-infrared Fourier transform Raman spectroscopic study of human brain tissues and tumours,” *J. Raman Spectrosc.*, vol. 25, no. 1, pp. 25–29, Jan. 1994.
- [87] A. Mizuno, T. Hayashi, K. Tashibu, S. Muraishi, K. Kawauchi, and Y. Ozaki, “Near-infrared FT-Raman spectra of the rat brain tissues,” *Neurosci. Lett.*, vol. 141, no. 1, pp. 47–52, Jul. 1992.
- [88] S. Koljenović *et al.*, “Raman Spectroscopic Characterization of Porcine Brain Tissue Using a Single Fiber-Optic Probe,” *Anal. Chem.*, vol. 79, no. 2, pp. 557–564, Jan. 2007.
- [89] M. Kirsch, G. Schackert, R. Salzer, and C. Krafft, “Raman spectroscopic imaging for in vivo detection of cerebral brain metastases,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 398, no. 4, pp. 1707–1713, Aug. 2010.
- [90] S. N. Kalkanis *et al.*, “Raman spectroscopy to distinguish grey matter, necrosis, and glioblastoma multiforme in frozen tissue sections,” *J. Neurooncol.*, vol. 116, no. 3, pp. 477–485, Jan. 2014.

- [91] C. Krafft *et al.*, “Advances in optical biopsy – correlation of malignancy and cell density of primary brain tumors using Raman microspectroscopic imaging,” *Analyst*, vol. 137, no. 23, pp. 5533–5537, Oct. 2012.
- [92] M. Jermyn *et al.*, “Intraoperative brain cancer detection with Raman spectroscopy in humans,” *Sci. Transl. Med.*, vol. 7, no. 274, pp. 274ra19-274ra19, Feb. 2015.
- [93] M. Jermyn *et al.*, “Raman spectroscopy detects distant invasive brain cancer cells centimeters beyond MRI capability in humans,” *Biomed. Opt. Express*, vol. 7, no. 12, pp. 5129–5137, Dec. 2016.
- [94] M. Jermyn *et al.*, “Neural networks improve brain cancer detection with Raman spectroscopy in the presence of operating room light artifacts,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 21, no. 9, p. 094002, Sep. 2016.
- [95] M. Jermyn *et al.*, “Highly Accurate Detection of Cancer In Situ with Intraoperative, Label-Free, Multimodal Optical Spectroscopy,” *Cancer Res.*, vol. 77, no. 14, pp. 3942–3950, Jul. 2017.
- [96] C. Krafft, L. Neudert, T. Simat, and R. Salzer, “Near infrared Raman spectra of human brain lipids,” *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 61, no. 7, pp. 1529–1535, May 2005.
- [97] C. Krafft, S. B. Sobottka, G. Schackert, and R. Salzer, “Raman and infrared spectroscopic mapping of human primary intracranial tumors: a comparative study,” *J. Raman Spectrosc.*, vol. 37, no. 1–3, pp. 367–375, Jan. 2006.
- [98] N. Bergner, C. Krafft, K. D. Geiger, M. Kirsch, G. Schackert, and J. Popp, “Unsupervised unmixing of Raman microspectroscopic images for morphochemical analysis of non-dried brain tumor specimens,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 403, no. 3, pp. 719–725, May 2012.
- [99] C. Beleites, K. Geiger, M. Kirsch, S. B. Sobottka, G. Schackert, and R. Salzer, “Raman spectroscopic grading of astrocytoma tissues: using soft reference information,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 400, no. 9, p. 2801, Jul. 2011.
- [100] L. F. Santos, R. Wolthuis, S. Koljenović, R. M. Almeida, and G. J. Puppels, “Fiber-Optic Probes for in Vivo Raman Spectroscopy in the High-Wavenumber Region,” *Anal. Chem.*, vol. 77, no. 20, pp. 6747–6752, Oct. 2005.

- [101] M. Ji *et al.*, “Rapid, Label-Free Detection of Brain Tumors with Stimulated Raman Scattering Microscopy,” *Sci. Transl. Med.*, vol. 5, no. 201, pp. 201ra119-201ra119, Sep. 2013.
- [102] M. S. Bergholt *et al.*, “Simultaneous fingerprint and high-wavenumber fiber-optic Raman spectroscopy enhances real-time in vivo diagnosis of adenomatous polyps during colonoscopy,” *J. Biophotonics*, vol. 9, no. 4, pp. 333–342, Apr. 2016.
- [103] S. Duraipandian, W. Zheng, J. Ng, J. J. H. Low, A. Ilancheran, and Z. Huang, “Simultaneous Fingerprint and High-Wavenumber Confocal Raman Spectroscopy Enhances Early Detection of Cervical Precancer In Vivo,” *Anal. Chem.*, vol. 84, no. 14, pp. 5913–5919, Jul. 2012.
- [104] G. von Campe, M. Moschopoulos, and M. Hefti, “5-Aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX fluorescence as immediate intraoperative indicator to improve the safety of malignant or high-grade brain tumor diagnosis in frameless stereotactic biopsies,” *Acta Neurochir. (Wien)*, vol. 154, no. 4, pp. 585–588, Apr. 2012.
- [105] V. Pavlov *et al.*, “Intraoperative Probe-Based Confocal Laser Endomicroscopy in... : Neurosurgery,” *Neurosurgery*, vol. 79, no. 4, pp. 604–612, 2016.
- [106] W. Göbel *et al.*, “Optical needle endoscope for safe and precise stereotactically guided biopsy sampling in neurosurgery,” *Opt. Express*, vol. 20, no. 24, pp. 26117–26126, Nov. 2012.
- [107] X. Li, C. Chudoba, T. Ko, C. Pitris, and J. G. Fujimoto, “Imaging needle for optical coherence tomography,” *Opt. Lett.*, vol. 25, no. 20, pp. 1520–1522, Oct. 2000.
- [108] D. Lorensen *et al.*, “Dual-modality needle probe for combined fluorescence imaging and three-dimensional optical coherence tomography,” *Opt. Lett.*, vol. 38, no. 3, pp. 266–268, Feb. 2013.
- [109] A. Curatolo *et al.*, “Ultrasound-Guided Optical Coherence Tomography Needle Probe for the Assessment of Breast Cancer Tumor Margins,” *Am. J. Roentgenol.*, vol. 199, no. 4, pp. W520–W522, Oct. 2012.
- [110] M. Villiger *et al.*, “Deep tissue volume imaging of birefringence through fibre-optic needle probes for the delineation of breast tumour,” *Sci. Rep.*, vol. 6, Jul. 2016.

- [111] B. G. Muller *et al.*, “Prostate cancer diagnosis by optical coherence tomography: First results from a needle based optical platform for tissue sampling,” *J. Biophotonics*, vol. 9, no. 5, pp. 490–498, May 2016.
- [112] I. E. I. Petterson, J. C. C. Day, L. M. Fullwood, B. Gardner, and N. Stone, “Characterisation of a fibre optic Raman probe within a hypodermic needle,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 407, no. 27, pp. 8311–8320, Nov. 2015.
- [113] L. M. Fullwood *et al.*, “Evaluation of a multi-fibre needle Raman probe for tissue analysis,” 2016, vol. 9704, pp. 97040G-97040G–8.
- [114] R. Henriksson, T. Asklund, and H. S. Poulsen, “Impact of therapy on quality of life, neurocognitive function and their correlates in glioblastoma multiforme: a review,” *J. Neurooncol.*, vol. 104, no. 3, pp. 639–646, Sep. 2011.
- [115] W. Stummer *et al.*, “Prospective cohort study of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide chemotherapy for glioblastoma patients with no or minimal residual enhancing tumor load after surgery,” *J. Neurooncol.*, vol. 108, no. 1, pp. 89–97, May 2012.
- [116] J. S. Smith *et al.*, “Role of Extent of Resection in the Long-Term Outcome of Low-Grade Hemispheric Gliomas,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 26, no. 8, pp. 1338–1345, Mar. 2008.
- [117] L. Capelle *et al.*, “Spontaneous and therapeutic prognostic factors in adult hemispheric World Health Organization Grade II gliomas: a series of 1097 cases,” *J. Neurosurg.*, vol. 118, no. 6, pp. 1157–1168, Mar. 2013.
- [118] W. Stummer *et al.*, “Counterbalancing risks and gains from extended resections in malignant glioma surgery: a supplemental analysis from the randomized 5-aminolevulinic acid glioma resection study. Clinical article,” *J. Neurosurg.*, vol. 114, no. 3, pp. 613–623, Mar. 2011.
- [119] I.-F. Talos *et al.*, “Supratentorial low-grade glioma resectability: statistical predictive analysis based on anatomic MR features and tumor characteristics,” *Radiology*, vol. 239, no. 2, pp. 506–513, May 2006.
- [120] Z. Movasaghi, S. Rehman, and I. U. Rehman, “Raman Spectroscopy of Biological Tissues,” *Appl. Spectrosc. Rev.*, vol. 42, no. 5, pp. 493–541, 2007.

- [121] Michael Jermyn *et al.*, “Intraoperative brain cancer detection with Raman spectroscopy in humans,” *Science Translational Medicine*, 2015.
- [122] P. Kongkham, E. Knifed, M. Tamber, and M. Bernstein, “Complications in 622 Cases of Frame-Based Stereotactic Biopsy, a Decreasing Procedure,” *Can. J. Neurol. Sci.*, vol. 35, no. 1, pp. 79–84, Mar. 2008.
- [123] Y. Muragaki *et al.*, “Low-grade glioma on stereotactic biopsy: how often is the diagnosis accurate?,” *Minim. Invasive Neurosurg. MIN*, vol. 51, no. 5, pp. 275–279, Oct. 2008.
- [124] P. D. Sawin M.D., P. W. Hitchon M.D., P. D. , K. A. Follett M.D., and J. C. Torner Ph.D., “Computed Imaging-Assisted Stereotactic Brain Biopsy: A Risk Analysis of 225 Consecutive Cases,” *Surg. Neurol.*, vol. 49, no. 6, pp. 640–649, Jun. 1998.
- [125] M. J. Glantz *et al.*, “Influence of the type of surgery on the histologic diagnosis in patients with anaplastic gliomas,” *Neurology*, vol. 41, no. 11, pp. 1741–1741, Nov. 1991.
- [126] A. Goyette *et al.*, “Sub-diffuse interstitial optical tomography to improve the safety of brain needle biopsies: a proof-of-concept study,” *Opt. Lett.*, vol. 40, no. 2, pp. 170–173, Jan. 2015.
- [127] J. Zhao, H. Lui, D. I. McLean, and H. Zeng, “Automated Autofluorescence Background Subtraction Algorithm for Biomedical Raman Spectroscopy,” *Appl. Spectrosc.*, vol. 61, no. 11, pp. 1225–1232, Nov. 2007.
- [128] P. Crow *et al.*, “The use of Raman spectroscopy to identify and grade prostatic adenocarcinoma in vitro,” *Br. J. Cancer*, vol. 89, no. 1, pp. 106–108, 2003.
- [129] N. Stone, C. Kendall, J. Smith, P. Crow, and H. Barr, “Raman spectroscopy for identification of epithelial cancers,” *Faraday Discuss.*, vol. 126, no. 0, pp. 141–157, Dec. 2004.
- [130] R. O. P. Draga *et al.*, “In Vivo Bladder Cancer Diagnosis by High-Volume Raman Spectroscopy,” *Anal. Chem.*, vol. 82, no. 14, pp. 5993–5999, Jul. 2010.
- [131] A. Mahadevan-Jansen and R. R. Richards-Kortum, “Raman spectroscopy for the detection of cancers and precancers,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 1, no. 1, pp. 31–70, 1996.
- [132] M. G. Ramírez-Eliás, J. ALDA, and F. J. GONZÁLEZ, “Noise and Artifact Characterization of in Vivo Raman Spectroscopy Skin Measurements,” *Appl. Spectrosc.*, vol. 66, no. 6, pp. 650–655, Jun. 2012.

- [133] D. Van de Sompel, E. Garai, C. Zavaleta, and S. S. Gambhir, "Comparison of Gaussian and Poisson noise models in a hybrid reference spectrum and principal component analysis algorithm for Raman spectroscopy," 2013, vol. 8590, pp. 85900I-85900I-12.
- [134] I. Barman, C.-R. Kong, G. P. Singh, and R. R. Dasari, "Effect of photobleaching on calibration model development in biological Raman spectroscopy," *J. Biomed. Opt.*, vol. 16, no. 1, pp. 011004-011004-10, 2011.
- [135] L. Quintero, C. Matthäus, S. Hunt, and M. Diem, "Denoising of single scan Raman spectroscopy signals," 2010, vol. 7568, pp. 756817-756817-12.
- [136] I. Barman, N. C. Dingari, G. P. Singh, J. S. Soares, R. R. Dasari, and J. M. Smulko, "Investigation of Noise-Induced Instabilities in Quantitative Biological Spectroscopy and Its Implications for Noninvasive Glucose Monitoring," *Anal. Chem.*, vol. 84, no. 19, pp. 8149-8156, Oct. 2012.
- [137] R. L. McCreery, *Raman Spectroscopy for Chemical Analysis*. John Wiley & Sons, 2005.
- [138] J. M. Smulko, N. C. Dingari, J. S. Soares, and I. Barman, "Anatomy of noise in quantitative biological Raman spectroscopy," *Bioanalysis*, vol. 6, no. 3, pp. 411-421, Jan. 2014.
- [139] H. Abdi and L. J. Williams, "Principal component analysis," *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Stat.*, vol. 2, no. 4, pp. 433-459, Jul. 2010.
- [140] D. N. Louis *et al.*, "The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System," *Acta Neuropathol. (Berl.)*, vol. 114, no. 2, pp. 97-109, Aug. 2007.
- [141] M. B. Fenn, P. Xanthopoulos, G. Pyrgiotakis, S. R. Grobmyer, P. M. Pardalos, and L. L. Hench, "Raman spectroscopy for clinical oncology," *Adv. Opt. Technol.*, vol. 2011, 2011.
- [142] K. Kong, C. Kendall, N. Stone, and I. Notingher, "Raman spectroscopy for medical diagnostics - From in-vitro biofluid assays to in-vivo cancer detection.," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, Mar. 2015.
- [143] C. Kallaway *et al.*, "Advances in the clinical application of Raman spectroscopy for cancer diagnostics," *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, vol. 10, no. 3, pp. 207-219, 2013.
- [144] K. A. Antonio and Z. D. Schultz, "Advances in biomedical raman microscopy," *Anal. Chem.*, vol. 86, no. 1, pp. 30-46, 2014.

- [145] H. Abramczyk and B. Brozek-Pluska, "Raman Imaging in Biochemical and Biomedical Applications. Diagnosis and Treatment of Breast Cancer," *Chem. Rev.*, 2013.
- [146] L. A. Austin, S. Osseiran, and C. L. Evans, "Raman Technologies in Cancer Diagnostics," *The Analyst*, 2015.
- [147] A. Rae, R. Stosch, P. Klapetek, A. R. Hight Walker, and D. Roy, "State of the art Raman techniques for biological applications," *Methods San Diego Calif*, vol. 68, no. 2, pp. 338–347, Jul. 2014.
- [148] J. F. Kelly, T. a. Blake, B. E. Bernacki, and T. J. Johnson, "Design Considerations for a Portable Raman Probe Spectrometer for Field Forensics," *Int. J. Spectrosc.*, vol. 2012, pp. 1–15, 2012.
- [149] J. Desroches *et al.*, "Characterization of a Raman spectroscopy probe system for intraoperative brain tissue classification," *Biomed. Opt. Express*, vol. 6, no. 7, p. 2380, Jul. 2015.
- [150] E. Widjaja, W. Zheng, and Z. Huang, "Classification of colonic tissues using near-infrared Raman spectroscopy and support vector machines.," *Int. J. Oncol.*, vol. 32, no. 3, pp. 653–662, 2008.
- [151] J. Zhao, H. Lui, D. I. McLean, and H. Zeng, "Automated Autofluorescence Background Subtraction Algorithm for Biomedical Raman Spectroscopy," *Appl. Spectrosc.*, vol. 61, no. 11, pp. 1225–1232, Nov. 2007.
- [152] M. Jermyn *et al.*, "Neural networks improve brain cancer detection with Raman spectroscopy in the presence of light artifacts," *Journal of Biomedical Optics*, 2016.
- [153] H. Abdi and L. J. Williams, "Principal component analysis," *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Stat.*, vol. 2, no. 4, pp. 433–459, Jul. 2010.
- [154] M. Daković *et al.*, "Profiling differences in chemical composition of brain structures using Raman spectroscopy," *Talanta*, vol. 117, pp. 133–138, Dec. 2013.
- [155] C. Krafft, S. B. Sobottka, G. Schackert, and R. Salzer, "Analysis of human brain tissue, brain tumors and tumor cells by infrared spectroscopic mapping," *Analyst*, vol. 129, no. 10, pp. 921–925, Sep. 2004.

- [156] M. Köhler, S. Machill, R. Salzer, and C. Krafft, “Characterization of lipid extracts from brain tissue and tumors using Raman spectroscopy and mass spectrometry,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 393, no. 5, pp. 1513–1520, Jan. 2009.
- [157] C. Krafft, L. Neudert, T. Simat, and R. Salzer, “Near infrared Raman spectra of human brain lipids,” *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 61, no. 7, pp. 1529–1535, May 2005.
- [158] C. Krafft, S. B. Sobottka, G. Schackert, and R. Salzer, “Near infrared Raman spectroscopic mapping of native brain tissue and intracranial tumors,” *Analyst*, vol. 130, no. 7, pp. 1070–1077, Jun. 2005.
- [159] M. Maiwald, A. Müller, B. Sumpf, G. Erbert, and G. Tränkle, “Capability of shifted excitation Raman difference spectroscopy under ambient daylight,” *Appl. Opt.*, vol. 54, no. 17, p. 5520, Jun. 2015.
- [160] A. N. Yaroslavsky, P. C. Schulze, I. V. Yaroslavsky, R. Schober, F. Ulrich, and H.-J. Schwarzmaier, “Optical properties of selected native and coagulated human brain tissues in vitro in the visible and near infrared spectral range,” *Phys. Med. Biol.*, vol. 47, no. 12, p. 2059, 2002.
- [161] V. L. Chiou and M. Burotto, “Pseudoprogression and Immune-Related Response in Solid Tumors,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 33, no. 31, pp. 3541–3543, Nov. 2015.
- [162] K. Eichler, S. Hempel, J. Wilby, L. Myers, L. M. Bachmann, and J. Kleijnen, “Diagnostic Value of Systematic Biopsy Methods in the Investigation of Prostate Cancer: A Systematic Review,” *J. Urol.*, vol. 175, no. 5, pp. 1605–1612, May 2006.
- [163] A. V. Taira *et al.*, “Performance of transperineal template-guided mapping biopsy in detecting prostate cancer in the initial and repeat biopsy setting,” *Prostate Cancer Prostatic Dis.*, vol. 13, no. 1, pp. 71–77, Mar. 2010.
- [164] J. S. Jones, “Saturation biopsy for detecting and characterizing prostate cancer,” *BJU Int.*, vol. 99, no. 6, pp. 1340–1344, Jun. 2007.
- [165] F. M. E. Wagenlehner, A. Pilatz, P. Waliszewski, W. Weidner, and T. E. B. Johansen, “Reducing infection rates after prostate biopsy,” *Nat. Rev. Urol.*, vol. 11, no. 2, pp. 80–86, Feb. 2014.

- [166] S. Loeb *et al.*, “Systematic Review of Complications of Prostate Biopsy,” *Eur. Urol.*, vol. 64, no. 6, pp. 876–892, Dec. 2013.
- [167] R. S. Wiener, L. M. Schwartz, S. Woloshin, and H. G. Welch, “Population-Based Risk for Complications After Transthoracic Needle Lung Biopsy of a Pulmonary Nodule: An Analysis of Discharge Records,” *Ann. Intern. Med.*, vol. 155, no. 3, p. 137, Aug. 2011.
- [168] Q. Han *et al.*, “Diagnostic yield and postoperative mortality associated with surgical lung biopsy for evaluation of interstitial lung diseases: A systematic review and meta-analysis,” *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, vol. 149, no. 5, pp. 1394-1401.e1, May 2015.
- [169] M. Jermyn, “Highly accurate detection of cancer in situ with intraoperative, label-free, multimodal optical spectroscopy.”
- [170] E. B. Hanlon *et al.*, “Prospects for in vivo Raman spectroscopy,” *Phys. Med. Biol.*, vol. 45, no. 2, p. R1, 2000.
- [171] Z. Movasaghi, S. Rehman, and D. I. U. Rehman, “Raman Spectroscopy of Biological Tissues,” *Appl. Spectrosc. Rev.*, vol. 42, no. 5, pp. 493–541, Sep. 2007.
- [172] M. G. Shim, B. C. Wilson, E. Marple, and M. Wach, “Study of Fiber-Optic Probes for in Vivo Medical Raman Spectroscopy,” *Appl. Spectrosc.*, vol. 53, no. 6, pp. 619–627, Jun. 1999.
- [173] C. Beleites, U. Neugebauer, T. Bocklitz, C. Krafft, and J. Popp, “Sample size planning for classification models,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 760, pp. 25–33, Jan. 2013.
- [174] P. Matousek *et al.*, “Numerical Simulations of Subsurface Probing in Diffusely Scattering Media Using Spatially Offset Raman Spectroscopy,” *Appl. Spectrosc.*, vol. 59, no. 12, pp. 1485–1492, Dec. 2005.
- [175] N. Stone, R. Baker, K. Rogers, A. W. Parker, and P. Matousek, “Subsurface probing of calcifications with spatially offset Raman spectroscopy (SORS): future possibilities for the diagnosis of breast cancer,” *Analyst*, vol. 132, no. 9, pp. 899–905, Aug. 2007.
- [176] P. Matousek *et al.*, “Subsurface Probing in Diffusely Scattering Media Using Spatially Offset Raman Spectroscopy,” *Appl. Spectrosc.*, vol. 59, no. 4, pp. 393–400, Apr. 2005.

- [177] H. U. Ahmed *et al.*, “Is it time to consider a role for MRI before prostate biopsy?,” *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, vol. 6, no. 4, pp. 197–206, Apr. 2009.
- [178] J. M. E. Walsh and J. P. Terdiman, “Colorectal Cancer Screening: Scientific Review,” *JAMA*, vol. 289, no. 10, pp. 1288–1296, Mar. 2003.
- [179] F. M. Lomoschitz *et al.*, “Stereotactic 11-gauge Vacuum-assisted Breast Biopsy: Influence of Number of Specimens on Diagnostic Accuracy,” *Radiology*, vol. 232, no. 3, pp. 897–903, Sep. 2004.
- [180] L. Liberman, D. D. Dershaw, P. P. Rosen, A. F. Abramson, B. M. Deutch, and L. E. Hann, “Stereotaxic 14-gauge breast biopsy: how many core biopsy specimens are needed?,” *Radiology*, vol. 192, no. 3, pp. 793–795, Sep. 1994.
- [181] L. E. Hoorntje, P. H. M. Peeters, W. P. T. M. Mali, and I. H. M. Borel Rinkes, “Vacuum-assisted breast biopsy: a critical review,” *Eur. J. Cancer*, vol. 39, no. 12, pp. 1676–1683, Aug. 2003.
- [182] J. Torres-Reveron, H. C. Tomaszewicz, A. Shetty, N. M. Amankulor, and V. L. Chiang, “Stereotactic laser induced thermotherapy (LITT): a novel treatment for brain lesions regrowing after radiosurgery,” *J. Neurooncol.*, vol. 113, no. 3, pp. 495–503, Jul. 2013.
- [183] G. C. Morton, “The emerging role of high-dose-rate brachytherapy for prostate cancer,” *Clin. Oncol.*, vol. 17, no. 4, pp. 219–227, Jun. 2005.
- [184] O. Lauche *et al.*, “Single-fraction high-dose-rate brachytherapy using real-time transrectal ultrasound based planning in combination with external beam radiotherapy for prostate cancer: dosimetrics and early clinical results,” *J. Contemp. Brachytherapy*, vol. 8, no. 2, pp. 104–109, Apr. 2016.
- [185] J. Desroches *et al.*, “Characterization of a Raman spectroscopy probe system for intraoperative brain tissue classification,” *Biomed. Opt. Express*, vol. 6, no. 7, p. 2380, 2015.
- [186] M. Jermyn *et al.*, “Intraoperative brain cancer detection with Raman spectroscopy in humans,” vol. 7, no. 274, pp. 1–10, 2015.

- [187] D. N. Louis *et al.*, “The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary,” *Acta Neuropathol. (Berl.)*, vol. 131, no. 6, pp. 803–820, Jun. 2016.
- [188] T. Siegal, “Clinical impact of molecular biomarkers in gliomas,” *J. Clin. Neurosci.*, vol. 22, no. 3, pp. 437–444, Mar. 2015.
- [189] K. Aldape, G. Zadeh, S. Mansouri, G. Reifenberger, and A. von Deimling, “Glioblastoma: pathology, molecular mechanisms and markers,” *Acta Neuropathol. (Berl.)*, vol. 129, no. 6, pp. 829–848, Jun. 2015.
- [190] N. Huang *et al.*, “Full range characterization of the Raman spectra of organs in a murine model,” *Opt. Express*, vol. 19, no. 23, pp. 22892–22909, Nov. 2011.

ANNEXE 1 MÉTHODE DE CLASSIFICATION

Les résultats de classification présentés dans cette thèse ont été obtenus en utilisant un *toolbox* développé par Michael Jermyn, post-doctorant au laboratoire de radiologie optique. Ce *toolbox*, présenté à la figure suivante, permet de sélectionner les spectres d'entraînement, leur classes respectives, la méthode de classification et ensuite d'évaluer la performance de la méthode choisie sur un ensemble de données.

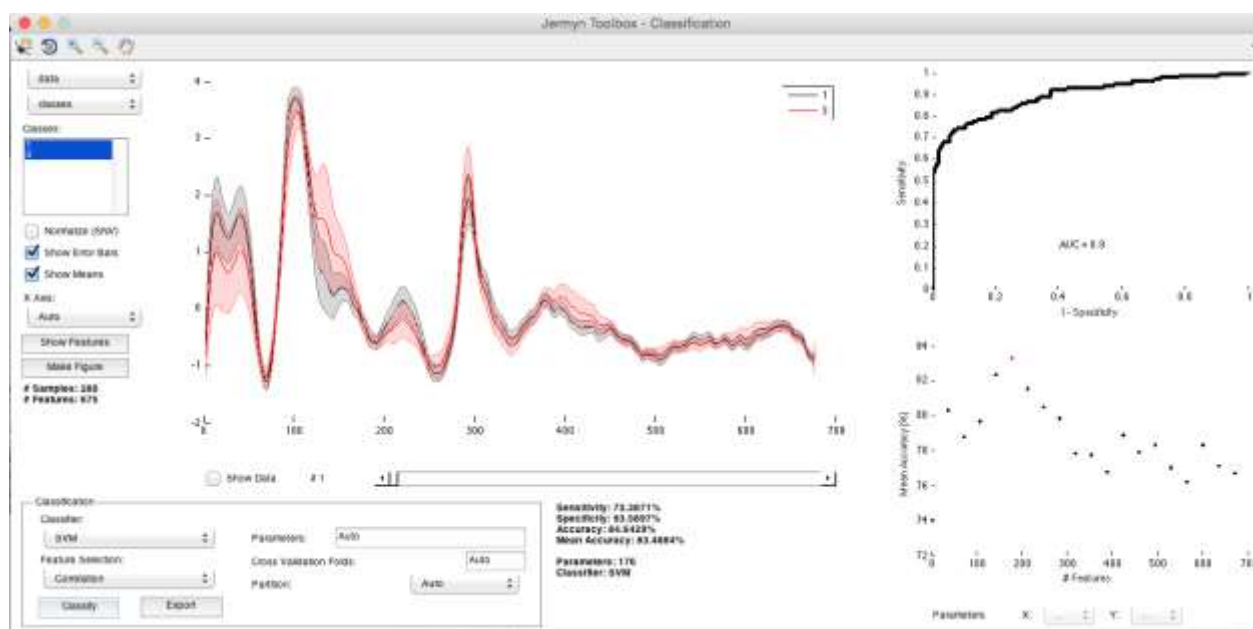


Figure A1 : Toolbox développé par Michael Jermyn utilisé pour la classification de spectres Raman

La première étape est l'entraînement du modèle de classification choisi. Le modèle choisi pour ce projet de recherche est le *support vector machine* (SVM), avec un noyau linéaire, puisque celui-ci est robuste à l'*overfitting* comparé à d'autres classifieurs. La première étape est le calcul des *p-values* pour chacune des bandes pour déterminer lesquelles sont les plus significativement différentes entre les deux classes. Ces *p-values* seront ensuite utilisées pour déterminer l'ordre des *features* utilisées dans le modèle du classifieur. L'évaluation de la performance est effectuée en utilisant la corrélation croisée (leave-one-out-cross-validation), tel qu'illustré à la figure suivante. Pour ce faire, tous les spectres de l'ensemble de données est utilisé pour l'entraînement du classifieur sauf un, et le classifieur est testé sur ce dernier. Le spectre « test » est alterné à travers

toute la base de données, menant à un nombre de faux positifs, vrais positifs, faux négatifs et vrais négatifs.

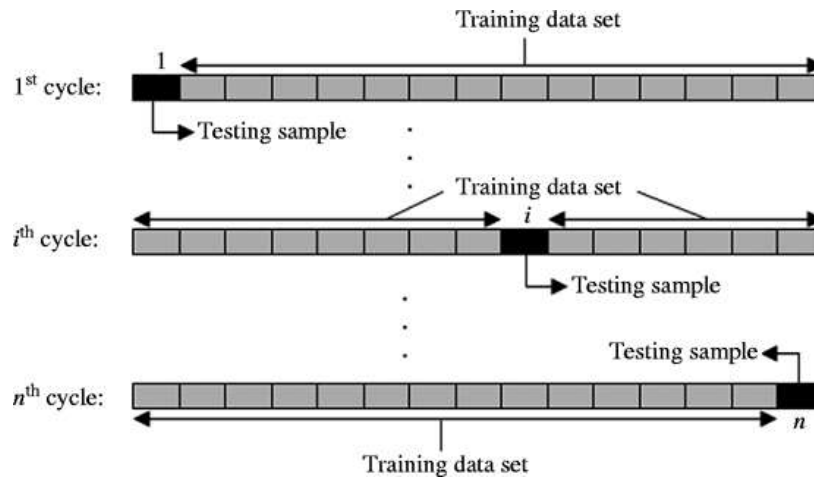


Figure A2 : Schéma illustrant la validation croisée, ou *leave-one-out-cross-validation*

Ces résultats permettent ensuite d'évaluer la sensibilité, spécificité et précision du modèle. Ceci est répété pour plusieurs nombre de *features* utilisés, et ce nombre est finalement déterminé par le *toolbox* en optimisant la précision.

ANNEXE 2 CURRICULUM VITAE

Formation universitaire

- 2015 – **Philosophicae Doctor (obtention prévue 2018)**
Génie Biomédical
Directeur : Frédéric Leblond
École Polytechnique de Montréal
- 2012 - 2014 **Master ès Science appliquées**
Physique Médicale
Directeur : Jan Seunjens
Codirecteur : Frédéric Leblond
Université McGill
- 2006 - 2010 **Baccalauréat en ingénierie**
Génie physique, concentration biomédicale
École Polytechnique de Montréal
- 2008 - 2009 ***Échange étudiant à University of New Mexico (États-Unis)**

Expérience professionnelle et académique

- Automne 2015 École Polytechnique de Montréal
Chargée de travaux dirigés pour le cours PHS1101
- Hiver 2015 École Polytechnique de Montréal
Répétitrice pour le cours PHS1101
- 09/2014 to 01/2015 École Polytechnique de Montréal
Associée de recherche
Directeur : Frédéric Leblond
- 02/2010 to 09/2012 Photon etc

Experte en développement

Assemblage, alignement optique, caractérisation et qualification des instruments standards. Gestion de l'approvisionnement, amélioration continue et assurance qualité. Participation au développement d'instruments scientifiques sur mesure.

Summer 2010

Institut de recherches cliniques de Montréal

Stagiaire

Développement de programmes d'analyse pour les besoins spéciaux des utilisateurs plateau de microscopie

Étés 2008-2009

CHUM, Département de radio oncologie, Hôpital Notre-Dame

Stagiaire en recherche

Développement d'un système de dosimétrie à base de films Gafchromic EBT/EBT2

Prix et bourses

2017	Bourse de la Fondation Pierre Arbour
2017	Bourse d'excellence du CRCHUM
2015	Mitacs Accelerate PhD Bourse de recherche en milieu de pratique, partenariat entreprise/université Entreprise partenaire: Medtronic
2012	Bourse BMP Innovation FQRNT-CRSNG Bourse de recherche en milieu de pratique, partenariat entreprise/université Entreprise partenaire : Photon etc
2008	Bourse Fondation McConnell
2006	Bourse d'entrée du Directeur Fondation de Polytechnique

Publications, conférences et mémoire

En préparation ou en révision:

- Picot, F., **Desroches, J.**, Goyette, A., Pichette, J., Tremblay, M.-A., Obaid, S., Soulez, G., Leblond, F., Diffusive reflectance spectroscopy to enhance safety during brain biopsy procedure, Neurophotonics, En soumission
- Aubertin, K., **Desroches, J.**, Jermyn, J., Trinh, V.Q.H., Saad, F., Trudel, D., Leblond, F., "Combining high wavenumber and fingerprint spontaneous Raman spectroscopy to improve detection of prostate cancer during radical prostatectomy", Journal of Biomedical Optics, En révision

Published or in press manuscripts:

- **Desroches, J.**, Jermyn, M., Pinto, M., Picot, F., Tremblay, M.-A., Obaid, S., Marple, E., Urme, K., Soulez, G., Guiot, M.C., Wilson, B., Petrecca, K. & Leblond, F. A new method using Raman spectroscopy for *in vivo* targeted brain cancer tissue biopsy (2018). Scientific Reports, 8(1), 1792
- K. Aubertin, V.Q.-H Trinh, M. Jermyn, P. Baksic, A.-A. Grosset, **J. Desroches**, K. St-Arnaud, M. Birlea, M.-C. Vladioiu, M. Latour, R. Albadine, F. Saad, F. Leblond & D. Trudel, "Raman spectroscopy for prostate cancer characterization: potential for precision diagnostics and therapeutics" (2018), British Journal of Urology International
- **Desroches, J.**, Laurence, A., Jermyn, M., Pinto, M., Tremblay, M. A., Petrecca, K., & Leblond, F. (2017). Raman spectroscopy in microsurgery: impact of operating microscope illumination sources on data quality and tissue classification. Analyst, 142(8), 1185-1191
- Aubertin, K., Trinh, V., Jermyn, M., **Desroches, J.**, St-Pierre, C., Vladioiu, M. C., ... & Leblond, F. (2017). Raman Spectroscopy for Prostate Cancer Detection and Characterization. Biophysical Journal, 112(3), 584a.
- Jermyn, M., Mercier, J., **Desroches, J.**, Aubertin, K., Umrey, K., Marple, E., Guiot, M. C., Leblond, F. & Petrecca, K., "Highly accurate detection of cancer in situ with intraoperative, label-free, multimodal optical spectroscopy", Cancer Research, 77 (14), 3942-3950 (2017)
- Jermyn, M., **Desroches, J.**, Aubertin, K., St-Arnaud, K., Madore, W. J., De Montigny, E., ... & Leblond, F. (2016). A review of Raman spectroscopy advances with an emphasis on clinical translation challenges in oncology. Physics in Medicine and Biology, 61(23), R370.
- Jermyn, M., **Desroches, J.**, Mercier, J., St-Arnaud, K., Guiot, M. C., Leblond, F., & Petrecca, K. (2016). Raman spectroscopy detects distant invasive brain cancer cells centimeters beyond MRI capability in humans. Biomedical Optics Express, 7(12), 5129-5137.
- Jermyn, M., **Desroches, J.**, Mercier, J., St-Arnaud, K., Guiot, M. C., Petrecca, K., & Leblond, F. (2016, March). Neural networks improve brain cancer detection with Raman spectroscopy in the presence of light artifacts. In SPIE BiOS (pp. 96900B-96900B). International Society for Optics and Photonics.
- Jermyn, M., Mok, K., Mercier, J., **Desroches, J.**, Pichette, J., Saint-Arnaud, K., ... & Leblond, F. (2015). Intraoperative brain cancer detection with Raman spectroscopy in humans. Science translational medicine, 7(274)
- **Desroches, J.**, Jermyn, M., Mok, K., Lemieux-Leduc, C., Mercier, J., St-Arnaud, K., ... & Leblond, F. (2015). Characterization of a Raman spectroscopy probe system for intraoperative brain tissue classification. Biomedical optics express, 6(7), 2380-2397.

- **Desroches, J.**, Bouchard, H., and Lacroix, F. "Technical note: potential errors in optical density measurements due to scanning side in EBT and EBT2 Gafchromic film dosimetry." *Medical physics* 37.4 (2010): 1565-1570.

Présentations orales ou par affiche :

- **Desroches, J. (Présentatrice)**, Jermyn, M., Pinto, M., Picot, F., Tremblay, M-A., Obaid, S., Marple, E., Urmev, K., Soulez, G., Guiot, M.C., Wilson, B., Petrecca, K. & Leblond, F. (2018, January). Multimodal optical biopsy probe to improve the safety and diagnostic yield of brain needle biopsies. Oral presentation at SPIE BiOS, San Francisco
- **Desroches, J. (Présentatrice)**, Jermyn, M., Pinto, M., Picot, F., Tremblay, M. A., Obaid, S., Guiot, M-C., Petrecca, K., Wilson, B. & Leblond, F. (2017, April). High wavenumber Raman spectroscopy to improve diagnostic yield of brain needle biopsies. Présentation orale à OSA, San Diego
- **Desroches, J. (Présentatrice)**, Picot, F., Pichette, J., Goyette, A., Tremblay, M. A., Soulez, G., Jermyn, M., Guiot, M-C., Obaid, S., Petrecca, K., Wilson, B. & Leblond, F. (2017, February). Sonde de biopsie optique multimodale afin d'améliorer la sécurité et la précision de diagnostic des biopsies neurochirurgicales. Présentation par affiche au FFQIS, Montréal *1st prize
- **Desroches, J. (Présentatrice)**, Pichette, J., Goyette, A., Tremblay, M. A., Jermyn, M., Petrecca, K., & Leblond, F. (2016, June). Optical biopsy probe using Raman spectroscopy and diffuse reflectance spectroscopy for brain needle biopsy guidance. Poster presentation at SPEC 2016, Montréal
- **Desroches, J. (Présentatrice)**, Pichette, J., Goyette, A., Tremblay, M. A., Jermyn, M., Petrecca, K., & Leblond, F. (2016, June). Dual modality optical biopsy probe for brain needle biopsy guidance. Oral presentation at IONS, Québec
- **Desroches, J. (Présentatrice)**, Pichette, J., Goyette, A., Tremblay, M. A., Jermyn, M., Petrecca, K., & Leblond, F. (2016, January). Multimodal optical biopsy probe to improve the safety and diagnostic yield of brain needle biopsies. Oral presentation at SPIE BiOS, San Francisco
- **Desroches, J. (Présentatrice)**, Goyette, A., Pichette, J., Jermyn, M., Mok, K., Mercier, J., ... & Leblond, F. (2015, April). Towards the combined use of Raman Spectroscopy and interstitial Optical Tomography to improve the safety and diagnostic accuracy of brain needle biopsies. Oral presentation at Optics and the Brain, Vancouver
- Jermyn, M., Mok, K., **Desroches, J. (Présentatrice)**, Mercier, J., Saint-Arnaud, K., Bernstein, L., ... & Leblond, F. (2014, April). Brain Tumor Resection Guided with Single-Point Raman Spectroscopy: In-Human Results. Oral presentation at Biomedical Optics, Miami

Mémoire de maîtrise :

- **Joannie Desroches**, « Intraoperative use of Raman Spectroscopy for brain tumor resection guidance », mémoire de maîtrise, Medical Physics Department, McGill University