UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉTUDE DE SOURCES DE BRUIT ET DE FACTEURS CONFONDANTS SUR LA MESURE DE SPECTRES RAMAN DE TISSUS BIOLOGIQUES

JEAN-PHILIPPE TREMBLAY

DÉPARTEMENT DE GÉNIE ÉLECTRIQUE

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION

DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES

(GÉNIE ÉLECTRIQUE)

MAI 2018

© Jean-Philippe Tremblay, 2018.

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé :

ÉTUDE DE SOURCES DE BRUIT ET DE FACTEURS CONFONDANTS SUR LA MESURE DE SPECTRES RAMAN DE TISSUS BIOLOGIQUES

présenté par : TREMBLAY Jean-Philippe

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

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

M. NERGUIZIAN Chahé, Ph. D, président

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

Mme SANTATO Clara, Ph. D, membre

DÉDICACE

À mes parents qui m'ont toujours encouragé et soutenu dans la poursuite de mes études,

À mes sœurs qui commencent aussi leur vie professionnelle,

À Judith et à nos projets communs.

REMERCIEMENTS

J'aimerais d'abord remercier mon directeur de recherche Frédéric Lesage pour m'avoir soutenu tout au long de ma maîtrise. Un grand merci pour sa rigueur, son point de vue éclairé, ses conseils judicieux, ses commentaires pertinents, sa motivation et son efficacité sans pareil. Que ce soit pour des questions d'ordre techniques, philosophiques ou d'orientation professionnelle, il m'a toujours écouté et offert d'excellents conseils. J'aurais aimé avoir eu la chance de le connaître plus tôt dans mon parcours académique.

J'aimerais ensuite remercier le partenaire industriel ODS Médical, plus spécifiquement Rajeev Yadav et Christopher Kent, pour m'avoir confié ce projet et pour m'avoir fait confiance à tellement de reprises. Un grand merci pour avoir mis toutes les ressources nécessaires à ma disposition, pour m'avoir expliqué les fins détails de leur technologie et pour m'avoir initié à de nombreux aspects concernant le milieu des startups. Finalement, un grand merci pour l'opportunité professionnelle offerte pour joindre leur équipe au terme de ma graduation.

Je remercie aussi Frédéric Leblond et tous les étudiants du Laboratoire de Radiologie Optique, mais plus particulièrement Michael Pinto, Kelly Aubertin, Joannie Desroches, Karl St-Arnaud et François Daoust. Un grand merci pour leur expertise dans le domaine de la spectroscopie Raman de tissu biologique. Ceux-ci m'ont toujours offert de précieux conseils, des idées, du temps, des algorithmes, des articles à lire et des occasions en or pour me joindre à eux pour faire des mesures sur des animaux.

Sans leur travail, je n'aurais pu terminer cette maîtrise. C'est pourquoi je remercie chacun des membres du jury d'avoir étudié ce mémoire, d'avoir assisté à ma présentation et de recommander ma candidature à la graduation.

Finalement, j'aimerais remercier Mitacs, la fondation Pierre-Arbour et l'Association des Diplômés de Polytechnique pour l'aide financière qu'ils m'ont donnée tout au long de ce projet.

RÉSUMÉ

Le plan de traitement habituel du cancer du cerveau implique d'effectuer une craniectomie afin d'accéder aux tissus cancéreux pour en faire la résection. L'enjeu principal de cette chirurgie consiste en retirer un maximum de tissus cancéreux tout en retirant un minimum de tissu sain. Les outils conventionnels utilisés en neurochirurgie afin de guider la procédure sont l'Imagerie par Résonnance Magnétique (IRM) couplée à un système de neuronavigation. Toutefois, ces outils ne suffisent pas à déterminer s'il reste des tissus cancéreux au terme de la chirurgie, lesquels entraîneront une récurrence locale de la maladie le cas échéant. Or, le partenaire industriel ODS Médical travaille présentement à mettre au point un prototype de système de spectroscopie Raman permettant au chirurgien d'interroger des tissus cérébraux en temps réel afin de déceler des traces de tissus cancéreux résiduels au terme de la chirurgie. Son utilisation permettrait ainsi de minimiser le volume de tissus cancéreux résiduels. Cela réduirait donc la récurrence locale du cancer et augmenterait l'espérance de vie du patient.

Toutefois, le signal Raman qui porte l'information permettant de déterminer si un tissu est cancéreux ou non est extrêmement faible ce qui le rend très difficile à mesurer, particulièrement lorsque diverses sources de bruit et facteurs confondants contaminent la mesure. Les plus importantes sont le bruit de la caméra, de l'Auto-Fluorescence (AF) des tissus et des sources de lumière ambiante présentes en salle d'opération. Ce projet étudie donc comment ces sources de bruit et facteurs confondants affectent la mesure afin de proposer des stratégies pour améliorer la qualité du signal Raman. Pour chacun, un modèle de la mesure est établi ce qui permet de formuler un indicateur de la qualité du signal Raman, le SNR Raman moyen.

Dans un premier temps, le bruit de la caméra est étudié en fonction des paramètres d'acquisition. Il est montré que le détecteur est limité par le bruit de grenaille et que ce dernier est relié à l'intensité du signal détecté par un coefficient de proportionnalité de 0.1. Ensuite, l'utilisation du phénomène de photo-blanchiment des tissus est évaluée afin de « fatiguer » le signal d'AF préalablement à la mesure du signal Raman. Il est montré qu'après 3 secondes de préexposition au laser d'excitation le SNR Raman de tissu de cerveau de porc augmente d'environ 10%. Tout porte à croire qu'un gain plus important serait observé sur des tissus présentant un signal d'AF plus intense. Finalement, la Détection Cohérente (DC) est implémentée sur le prototype du partenaire industriel afin de pouvoir détecter le signal Raman malgré la contamination de la mesure par la lumière ambiante. Il

est montré que la DC fonctionne tel qu'escompté, mais que le bruit de grenaille induit par la lumière ambiante sur la mesure demeure. Le spectre optique ainsi que la modulation temporelle de l'intensité des principales sources de lumière ambiante utilisées dans les salles d'opération du Montreal Neurosurgical Institute (MNI) et du Centre de recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CrCHUM) sont mesurés. Des solutions spécifiques pour minimiser l'effet de ces sources de lumière sont finalement proposées.

Pouvoir mesurer un signal Raman de meilleure qualité permettra au prototype du partenaire industriel de détecter les tissus cancéreux avec une plus grande précision, ce qui augmentera l'espérance de vie postopératoire du patient. Aussi, son intégration plus transparente dans le contexte clinique malgré la présence de sources de lumière ambiante facilitera sa commercialisation, ce qui permettra à plus de patients de bénéficier de cette technologie.

ABSTRACT

The usual treatment for gliomas, or diffusively invasive brain cancer, is microsurgical resection of affected tissues. While most of it must be removed to ensure minimal local recurrence, unnecessary removal of brain tissues can severely impair the individual. However, state-of-the-art neurosurgical imaging tools such as Magnetic Resonance Imaging (MRI) coupled with neuronavigation are not capable of detecting cancerous tissues with the required precision during the surgery. Therefore, ODS Medical Inc. aims to commercialize a Raman-spectroscopy-based tissue classification system to be used intraoperatively. The surgeon would use it to point-by-point interrogate tissues in the cavity and guide the tissue resection, leading to fewer cancerous tissues left in the patient postoperatively. In turn, that would lead to fewer local recurrence and increase individual's life expectation.

However, the Raman signal of biological tissues is notoriously weak and difficult to measure because of various noise sources and cofounding factors contaminating the measurement, namely the camera noise, the Auto-Fluorescence (AF) of biological tissues and the operating room ambient light sources. This project proposes an in-depth study of these noise sources and cofounding factors and formulate strategies alleviate their effect. The measurement of Raman signal in those conditions is modelized and a quality indicator is formulated, the mean Raman SNR.

Firstly, the camera noise is studied considering various acquisition parameters. It is shown that the detector is shot-noise limited and that it's magnitude is strictly dependent on detected signal's intensity. Secondly, the strategy of using photo-bleaching phenomenon in order to reduce AF signal prior to the measurement is studied. It is show that mean Raman SNR is increased by about 10% when tissues are exposed 3 seconds to the excitation laser prior to the measurement. It is believed that the mean Raman SNR gain is more important when the tissue present higher AF signal. Finally, Coherent Detection (CD) is implemented in ODS Medical's prototype, allowing Raman signal detection despite measurement contamination from ambient light sources. It is shown that CD works as intended but that the shot-noise induced by contaminating light remains on the demodulated Raman signal. Also, the optical spectrum and temporal intensity modulation of various light sources used at Montreal Neurosurgical Institute (MNI) and Centre de recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CrCHUM) operating room are measured. Specific solutions alleviating the effect of these light sources are proposed.

As better Raman signal quality leads to higher tissue classification accuracy, it leads to higher patient postoperative life expectancies. Furthermore, a more transparent integration of ODS Medical technology in the clinical context despite the presence of contaminating ambient light sources will ease the product commercialisation, allowing more and more patients to beneficiate from the technology.

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE III

REMERCIEMENTS IV

RÉSUMÉ V

ABSTRACT VII

TABLE DES MATIÈRES IX

LISTE DES TABLEAUX XII

LISTE DES FIGURES XIII

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS XVI

CHAPITRE 1 INTRODUCTION 1

1.1 Mise en contexte 1

1.2 Objectifs du projet 4

1.3 Organisation du mémoire 4

CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE 5

2.1 Spectroscopie Raman de tissus biologiques 5

2.1.1 Diffusion Raman : théorie et définitions 5

2.1.2 Utilisation de la spectroscopie Raman en oncologie 8

2.1.3 Système de détection de tissus cancéreux en temps réel du partenaire industriel pour utilisation in-vivo 9

2.2 Sources de bruit et de facteurs confondants en spectroscopie Raman 10

2.2.1 Modélisation du bruit et définitions 10

2.2.2 Bruit de mesure de la caméra CCD 12

2.2.3 Auto-Fluorescence des tissus biologiques 16

2.2.4 Sources de lumière ambiante 18

2.3 Restauration de signaux 19

2.3.1 Estimation du signal d'Auto-Fluorescence 19

2.3.2 Détection Cohérente 20

CHAPITRE 3 SNR DE LA CAMÉRA CCD EN FONCTION DES PARAMÈTRES D'ACQUISITION 22

3.1 Paramètres d'acquisition de la caméra CCD 22

3.2 Estimation de la moyenne et de la variance des bruits de la caméra en fonction des paramètres d'acquisition 24

3.2.1 Bruit Thermique 25

3.2.2 Bruit de Lecture 28

3.2.3 Bruit de Grenaille 31

3.3 SNR de la caméra 35

CHAPITRE 4 AMÉLIORATION DU SNR RAMAN EN PRÉSENCE DE L'AUTO-FLUORESCENCE DES TISSUS 37

4.1 SNR Raman de tissu biologique 38

4.1.1 Modélisation de la mesure du spectre d'une combinaison de signaux optiques 38

4.1.2 Définition du SNR Raman 41

4.1.3 Mesure expérimentale du SNR Raman moyen de tissu biologique 43

4.2 Amélioration du SNR Raman par photo-blanchiment des tissus biologiques 45

4.2.1 Modifications apportées au système du partenaire industriel 45

4.2.2 Caractérisation temporelle du signal d'AF de tissu biologique 50

4.2.3 SNR Raman en fonction du temps 54

4.2.4 Mesure expérimentale du SNR Raman moyen de tissu biologique en fonction du temps 56

CHAPITRE 5 DÉTECTION DU SIGNAL RAMAN EN PRÉSENCE DE SOURCES DE LUMIÈRE AMBIANTE 58

5.1 Implémentation de la détection cohérente 58

5.1.1 Modifications apportées au système du partenaire industriel 58

5.1.2 Preuve de concept en laboratoire 61

5.2 SNR Raman de tissus biologiques dans le contexte de la DC 65

5.2.1 Modélisation de la mesure du spectre d'une combinaison de signaux optiques dans le contexte de la DC 65

5.2.2 Définition du SNR Raman dans le contexte de la DC 67

5.3 Mesure du spectre optique et de la modulation temporelle des sources de lumière ambiante en salles d'opération 68

5.4 Discussion sur les limites de la DC et sur des solutions spécifiques 72

CHAPITRE 6 CONCLUSION ET RECOMMENDATIONS 76

RÉFÉRENCES 79

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 3.1 : Valeurs des paramètres d'acquisition utilisées par le partenaire industriel 24

Tableau 3.2 : Moyenne et variance estimée du BL en fonction de la VDV.....30

Tableau 3.3 : Moyenne et variance estimée du BL en fonction de la VDH.....30

Tableau 3.4 : Moyenne et variance estimée du BL en fonction du paramètre *BC* du gain *G* 30

Tableau 5.1 : Résumé des solutions spécifiques proposées pour les sources de lumière ambiantes présentées à la section 5.3 75

LISTE DES FIGURES

Figure 2.1 : Diagrammes de Jablonski de la diffusion Rayleigh et de la diffusion Raman de type Stokes et anti-Stokes pour un photon incident d'énergie $\hbar\omega$ 7

Figure 2.2 : Spectre Raman de l'acétaminophène 8

Figure 2.3 : Schéma sommaire du prototype de système de détection de tissus cancéreux du partenaire industriel ODS Medical Inc. 10

Figure 2.4 : Étapes de lecture d'un détecteur CCD de dimension 2x2 15

Figure 2.5 : Diagramme de Jablonski de la fluorescence pour un photon incident d'énergie $\hbar\omega$. 17

Figure 2.6 : Détection cohérente du signal d'intérêt Vs en présence d'une source de bruit VBt ayant une composante modulée dans le temps superposée à une composante continue 20

Figure 3.1: Schématisation de la notation utilisée pour distinguer les mesures individuelles effectuées pour *n* acquisitions pour un détecteur de dimension 2x2, pour deux différents ML 25

Figure 3.2 : Paramètres de la distribution de $\varepsilon(j)$estimés, $\mu(j)$ et $\sigma 2(j)$, en fonction de T 26

Figure 3.3 : Paramètres de la distribution de $\varepsilon(j)$estimés, $\mu(j)$ et $\sigma 2(j)$, en fonction du temps d'exposition τ lorsque la température du détecteur $T = -10$°C 27

Figure 3.4 : Paramètres de la distribution de $\varepsilon(j)$estimés, $\mu(j)$ et $\sigma 2(j)$, en fonction du temps d'exposition τ lorsque la température du détecteur $T = -80$°C 27

Figure 3.5 : Superposition de $n = 10$ acquisitions de spectres optiques d'une DEL infrarouge obtenues avec les paramètres d'acquisition du Tableau 3.1 32

Figure 3.6 : Graphique de type nuage de point pour chacune des *j* paires $x(j)$ et $\sigma BG2j$ estimées. La ligne rouge pointillée est la régression linéaire entre les deux variables 33

Figure 3.7 : Coefficient de proportionnalité *a* entre la variance du BG et l'intensité du signal détecté en fonction du temps d'exposition τ de la caméra 34

Figure 4.1 : Réponse du système estimée $R(j)$ 40

Figure 4.2 : Moyenne des 50 spectres Raman de matière grise provenant d'un cerveau de porc ex-vivo. Les $k = 100$ indices ayant la plus grande amplitude sont identifiées par les bandes grises 44

Figure 4.3 : SNR Raman calculé avec l'équation (4.11) et les k indices J présentés à la Figure 4.2 pour les 50 mesures de matière grise de cerveau de porc 44

Figure 4.4 : État du laser d'excitation ainsi que des ports *External Trigger* et *Fire Pin* de la caméra en fonction du temps lors d'une série d'acquisitions, pour $n = 4$, $\tau 0 = 5$ms et $\tau = 25$ms..47

Figure 4.5 : Schéma du système de spectroscopie d'ODS Médical modifié afin d'effectuer de la spectroscopie résolue dans le temps.....48

Figure 4.6 : Circuit de connecteurs, assemblé sur une plaque à trou verte, installé sur le microcontrôleur à la manière d'un *Shield* 48

Figure 4.7 : Oscillogrammes des états du laser d'excitation et du port *Fire* Pin de la caméra CCD tel que $t = 0$ correspond à l'instant où l'acquisition commence 49

Figure 4.8 : Oscillogrammes des états du laser d'excitation et du port *Fire* Pin de la caméra CCD tel que $t = 0$ correspond à l'instant où l'acquisition se termine.....50

Figure 4.9 : Profil de stabilisation du laser d'excitation tel qu'observé par la caméra CCD étant donné les paramètres d'acquisition utilisés pour l'étude du phénomène de photo-blanchiment 51

Figure 4.10 : Estimation de la somme du spectre Raman et du spectre d'AF pour les 100 acquisitions lors de la mesure sur l'échantillon de matière grise de cerveau de porc.....52

Figure 4.11 : Spectre d'AF estimé pour les 100 acquisitions effectuées lors de la mesure sur l'échantillon de matière grise de cerveau de porc 53

Figure 4.12 : Intensité du spectre d'AF estimé à la plage de longueur d'onde $j = 154$ en fonction du logarithme du temps d'exposition au laser d'excitation.....54

Figure 4.13 : Comportement du SNR Raman en fonction du temps (équation (4.19)) 55

Figure 4.14 : Comportement de l'amélioration relative du SNR Raman en fonction du temps pour trois différentes valeurs arbitraires pour $a(j)$ 55

Figure 4.15 : SNR Raman moyen en fonction du temps d'exposition au laser d'excitation pour des échantillons de matière grise de cerveau de porc 56

Figure 5.1 : État du laser d'excitation ainsi que des ports *External Trigger* et *Fire Pin* de la caméra en fonction du temps lors d'une mesure avec DC, pour $n = 4$, $\tau 0 = 5$ms et $\tau = 25$ms 60

Figure 5.2 : Spectre Raman et d'AF étalon du Polystyrène 62

Figure 5.3 : Oscillogramme de l'intensité de la DEL infrarouge en fonction du temps 63

Figure 5.4 : Spectre Raman et d'AF du Polystyrène mesuré en présence d'une source de lumière, une DEL infrarouge de centrée à 850nm 63

Figure 5.5 : Spectre Raman et d'AF du Polystyrène mesuré en présence d'une source de lumière et reconstruit à l'aide de la DC en utilisant une fréquence de modulation $fR = 700$Hz 64

Figure 5.6 : Spectre optique et modulation temporelle de l'intensité des tubes fluorescents servant à éclairer la pièce d'une des salles d'opération du MNI 69

Figure 5.7 : Spectre optique et modulation temporelle de l'intensité de la lampe chirurgicale Mach 500 fabriquée par Dr. Mach et utilisée au MNI 70

Figure 5.8 : Spectre optique et modulation temporelle de l'intensité de la lampe chirurgicale Mach 2SC fabriquée par Dr. Mach et utilisée au CrCHUM 70

Figure 5.9 : Spectre optique et modulation temporelle de l'intensité de la lampe chirurgicale Mach 120F fabriquée par Dr. Mach et utilisée au CrCHUM 71

Figure 5.10 : Spectre optique et modulation temporelle de l'intensité de la lampe du microscope chirurgical Pentero 900 fabriqué par Zeiss et utilisé au MNI 71

Figure 5.11 : Spectre optique et modulation temporelle de l'intensité de l'émission infrarouge du système de neuronavigation StealthStation S8 fabriqué par Medtronics et utilisé au MNI ... 72

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

AF	Auto-Fluorescence
ARPA	Algorithme de Régression Polynomiale Automatique
BG	Bruit de Grenailles
BL	Bruit de Lecture
BT	Bruit Thermique
CAD	Convertisseur Analogique vers Digital
CrCHUM	Centre de recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal
DC	Détection Cohérente
DEL	Diode Électroluminescente
ET	Erreur Type
FPB	Filtre Passe-Bas
FVB	*Full Vertical Binning*
IRM	Imagerie par Résonnance Magnétique
LRO	Laboratoire de Radiologie Optique
MA	Mode d'Acquisition
MD	Mode de Déclenchement
ML	Mode de Lecture
MOS	Métal/Oxyde/Semi-conducteur
PCA	*Principal Component Analysis*
SERDS	*Shifted Excitation Raman Difference Spectroscopy*
SNR	*Signal-to-Noise Ratio*
VDV	Vitesse de Décalage Verticale des charges
VDH	Vitesse de Décalage Horizontale des charges

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

1.1 Mise en contexte

Lorsqu'un patient reçoit un diagnostic de cancer, une étape critique du plan de traitement consiste à accéder à la tumeur afin de la retirer du corps. Toutefois, les cellules cancéreuses ne sont pas circonscrites dans un volume bien défini, mais forment plutôt un gradient décroissant, du centre de la tumeur jusque dans les tissus sains. Comme il est impossible de déterminer à l'œil nu si un tissu est affecté ou non, il est souvent difficile pour le chirurgien de déterminer à quel endroit se situe la marge délimitant la tumeur, et donc jusqu'où il doit retirer des tissus [2, 9].

Or, il a été démontré que la probabilité de récurrence locale postopératoire du cancer chez un patient est liée à la quantité de tissus cancéreux laissés dans le corps après la chirurgie [1, 3, 5, 9]. Ainsi, lorsque le cancer est localisé dans des organes moins vitaux, le chirurgien peut pratiquer une excision plus agressive si les conséquences sur la santé du patient sont jugées moins graves qu'une potentielle reprise de la maladie. Lorsqu'au contraire le cancer est localisé dans le cerveau, toute résection de tissus peut s'accompagner de lourdes conséquences pour le patient. Le jugement du neurochirurgien doit alors être éclairé afin d'éviter de retirer inutilement des tissus cérébraux sains tout en minimisant la quantité de tissus affectés résiduels [4, 8, 9].

Plusieurs technologies d'imagerie conventionnelles, telles que l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM), la tomographie par émission de positrons, l'imagerie nucléaire et l'imagerie par ultrasons permettent de détecter la présence de masses tumorales dans le corps de façon non invasive [2, 9]. Il est donc possible de déterminer approximativement la position et le volume de la tumeur à retirer. Bien que ces outils puissent être d'une grande aide, ils ne sont généralement pas utilisés pendant l'intervention chirurgicale étant donné que le patient doit y être immergé, ce qui compliquerait le déroulement de l'opération. Ces méthodes d'imagerie sont donc plutôt employées de façon préopératoire et les images obtenues permettent de mieux préparer et effectuer la chirurgie.

En complément à ces outils, l'utilisation d'un système de neuronavigation lors d'interventions neurochirurgicales est devenue chose courante depuis plusieurs années. Celui-ci permet d'exploiter au maximum les images d'IRM en les superposant avec celle d'un microscope chirurgical, ce qui facilite considérablement la localisation de la marge de la tumeur. Cette localisation n'est toutefois

pas parfaite en raison de quelques limitations. D'abord, il est courant d'observer une altération de la morphologie du cerveau pendant l'opération, ce qui réduit la validité de la correspondance entre l'image d'IRM et celle du microscope de chirurgie. C'est ce que l'on appelle en anglais le *brain shift*. Une des principales causes de cette altération est la réexpansion du cerveau comprimé par la tumeur au fur et à mesure que les tissus affectés, sont graduellement retirés. Des écarts de correspondance de plusieurs millimètres ont été constatés [7, 6]. Cette situation est particulièrement problématique, car elle peut induire en erreur le chirurgien lors de l'opération. Ensuite, l'IRM permet de détecter les masses tumorales grâce au fait que les tissus de cette région sont plus denses. Son seuil de détection n'est toutefois pas suffisamment sensible pour détecter les tissus cancéreux infiltrés dans les tissus sains qui peuvent parfois s'étendre bien au-delà de la région des tissus denses [2]. Ces deux limitations font en sorte que le système de neuronavigation à lui seul n'est pas suffisant pour assurer une résection maximale des tissus cancéreux tout en minimisant la quantité de tissus sains prélevés inutilement. Le domaine de la neurochirurgie, mais aussi celui de la chirurgie de façon générale, a donc un besoin important pour une nouvelle technologie permettant de mieux distinguer les tissus cancéreux des tissus sains pendant l'opération.

Depuis quelques années, des approches basées sur la spectroscopie optique, telles que la réflectance diffuse, la spectroscopie de fluorescence et la Spectroscopie Raman, semblent prometteuses. Ces approches ont en commun qu'elles tentent de distinguer différents types de tissus en observant l'effet qu'ont leurs compositions moléculaires sur leurs propriétés optiques. Étant donné que les tissus cancéreux ont une composition moléculaire quelque peu différente des tissus sains, il est possible d'utiliser la spectroscopie optique afin de les distinguer [9]. La réflectance diffuse consiste en éclairer un échantillon de tissus à analyser avec une lumière blanche et à observer le spectre de la lumière qu'il réfléchit de façon diffuse. Certaines longueurs d'onde seront plus ou moins réfléchies dépendamment du contenu moléculaire et de la structure physique de l'échantillon, permettant ainsi de discriminer les tissus cancéreux des tissus sains [9, 18]. Une autre approche est celle de la spectroscopie de fluorescence qui consiste en éclairer le tissu avec une source laser afin d'exciter des molécules fluorescentes, ou fluorophores, préalablement administrées. En se désexcitant, ces molécules émettront de la lumière ayant une longueur d'onde particulière à celles-ci. Ainsi, le spectre de fluorescence des tissus renseigne sur la nature et la concentration de fluorophores qui s'y trouve [9, 19]. Finalement, la spectroscopie Raman consiste en exciter les modes vibrationnels des molécules à l'aide d'une source laser. En retournant au mode fondamental,

les molécules émettent de la lumière ayant une longueur d'onde qui leur ait spécifique. Ainsi, le spectre Raman des tissus renseigne sur la nature et la concentration des molécules présentes dans l'échantillon [2, 9, 13].

L'utilisation de la spectroscopie optique dans le contexte clinique offrirait deux avantages majeurs comparativement aux techniques d'imagerie conventionnelles. Elle permettrait d'abord de détecter les tissus cancéreux avec une plus grande sensibilité, ce qui permettrait une meilleure localisation de la marge de la tumeur ainsi qu'une résection plus complète des tissus cancéreux infiltrés [9, 34]. Ensuite, la spectroscopie optique pourrait être utilisée de façon intraopératoire étant donné la rapidité de la mesure et le faible volume occupé par l'équipement requis pour la mettre en œuvre. Ainsi, moins de tissus cancéreux seraient laissés dans le corps du patient ce qui diminuerait la récurrence locale et augmenterait l'espérance de vie de ce dernier [2, 9].

En 2015, des percées majeures dans l'utilisation de la spectroscopie Raman pour discriminer les tissus cérébraux cancéreux des tissus cérébraux sains ont été rapportées par le groupe de recherche de Pr Frédéric Leblond de l'École Polytechnique de Montréal [2, 10]. À l'aide de leur prototype de spectromètre Raman, le groupe a montré qu'il est possible de distinguer ces tissus avec une sensibilité de 93% et une spécificité de 91% [2]. Suite à ces développements probants, la compagnie ODS Médical inc. a été fondée afin d'effectuer la translation clinique de cette technologie. L'objectif est d'offrir aux chirurgiens une solution innovatrice utilisant la spectroscopie Raman afin de leur permettre de détecter la présence de tissus cancéreux pendant l'opération, et ce pour une variété de différents types de cancer [11].

Un problème technique fondamental menace toutefois de limiter les performances du produit sur le terrain : le processus de génération du signal Raman est très peu efficace. Étant donné qu'il n'est pas possible d'irradier les tissus biologiques avec une forte puissance laser, l'intensité du signal Raman est très faible et cela rend sa détection difficile. Il est donc nécessaire d'utiliser un détecteur très sensible, ayant un niveau de bruit très faible. Ensuite, il faut composer avec le signal de fluorescence émis par les fluorophores, présents intrinsèquement dans les tissus biologiques, qui sont excités par la source laser utilisée pour générer le signal Raman. Ce signal de fluorescence est généralement supérieur d'un ou deux ordres de grandeur au signal Raman. Finalement, il faut s'assurer de minimiser la contamination de la mesure Raman par la lumière ambiante qui constitue une source de facteur confondant dans la mesure [10, 12].

1.2 Objectifs du projet

Ce projet, effectué en collaboration avec le partenaire industriel ODS Médical inc., consiste en l'étude de facteurs confondants et de sources de bruits liées à l'acquisition de spectre Raman dans le contexte intraopératoire avec le prototype de spectromètre du partenaire. L'objectif général est d'améliorer la qualité du signal Raman mesuré afin d'améliorer la performance du prototype.

Plus spécifiquement, l'attention est portée sur trois types de sources de bruit et de facteurs confondants. D'abord, une étude approfondie du bruit de la caméra est effectuée afin d'optimiser les paramètres d'acquisition. Ensuite, l'impact de l'Auto-Fluorescence (AF) des tissus biologiques en tant que source de bruit est évalué et une stratégie d'acquisition, à savoir l'utilisation du photo-blanchiment pour réduire l'intensité de l'AF avant la mesure, est proposée afin de minimiser son effet. Finalement, l'impact des sources de lumière ambiante en tant que facteur confondant est évalué et une stratégie d'acquisition, la détection cohérente, est proposée afin de minimiser son effet. Des solutions spécifiques pour chaque types de sources de lumière sont finalement proposées. Tout au long de ce mémoire, la mesure du spectre Raman est modélisée et un indicateur objectif de la qualité de la mesure est formulé.

1.3 Organisation du mémoire

Le mémoire se divise en 6 chapitres, incluant cette introduction. Une revue de littérature vise d'abord à dresser un portrait des connaissances sur lesquelles le projet s'appuie. Des aspects théoriques tels que l'origine physique du signal Raman et des différentes sources de bruit y sont présentés, suivis d'aspects plus concrets tels que certaines techniques de traitement de signaux déjà utilisés par le partenaire. Viennent ensuite trois chapitres présentant le travail accompli pendant la maîtrise au sujet de l'effet des trois éléments décrits précédemment sur la qualité du signal Raman mesuré, soit le bruit de la caméra, l'AF des tissus biologiques et les sources de lumière ambiantes. Pour chacun de ces trois chapitres, la mesure du spectre Raman est d'abord modélisée et un indicateur objectif de la qualité de la mesure est formulé. Différentes stratégies sont ensuite proposées et implémentées afin de maximiser la qualité du signal Raman. Des résultats d'expérience démontrant la pertinence mais aussi les limites de ces stratégies sont ensuite présentés. Finalement, en conclusion, les résultats importants du mémoire sont récapitulés et de nouvelles avenues non explorées dans le cadre de ce projet sont présentées.

CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE

Ce chapitre est composé de trois sections qui dressent un portrait des connaissances sur lesquelles se base ce projet. La première section porte sur la spectroscopie Raman de tissus biologiques. La physique de la diffusion Raman, son utilisation en oncologie et le prototype de spectromètre du partenaire industriel y sont décrits. La deuxième section porte sur les différentes sources de bruits et facteurs confondants généralement rapportés dans la littérature dans le contexte de la spectroscopie Raman, à savoir les bruits de lecture de la caméra, l'Auto-Fluorescence (AF) des tissus biologiques et la lumière ambiante. Un rappel de notions théoriques telles que la modélisation probabiliste du bruit et le rapport signal-sur-bruit y sont d'abord présentés. Finalement, la troisième section porte sur différentes stratégies de restauration de signaux, à savoir l'estimation du signal d'AF des tissus et la détection cohérente.

2.1 Spectroscopie Raman de tissus biologiques

2.1.1 Diffusion Raman : théorie et définitions

La spectroscopie Raman permet d'obtenir de l'information sur la nature d'un échantillon en détectant les énergies vibrationnelles des liens moléculaires des molécules qui le composent. Cela permet d'identifier ou de distinguer des substances, qu'elles soient sous forme solide, liquide ou gazeuse. Cette technique repose sur la diffusion inélastique de la lumière, phénomène d'abord postulé par Smekal en 1923 puis observé expérimentalement par Raman et Krishnan en 1928 [13, 14]. Depuis, ce phénomène porte le nom de « diffusion Raman ».

Lorsqu'un photon atteint un échantillon, il peut interagir avec celui-ci soit en étant absorbé, soit en étant diffusé. Supposons que sa longueur d'onde est de l'ordre de 10^{-6}m, ce qui correspond à la région du visible au proche infrarouge dans le spectre électromagnétique. Dans ce cas, l'absorption survient si l'énergie du photon correspond à celle de la bande interdite séparant l'état vibrationnel fondamental d'un lien moléculaire présent dans l'échantillon d'un état excité. Cela ouvre la porte à différentes techniques d'analyse moléculaire basées sur le spectre d'absorption de l'échantillon. En contraste, la diffusion ne requiert pas cette correspondance. Comme la longueur d'onde du photon incident est beaucoup plus grande que la longueur de la liaison moléculaire, celui-ci agit comme un dipôle oscillant à l'échelle de la liaison. Il est alors possible que le photon polarise les charges d'une liaison moléculaire, créant pendant un très court instant un état vibrationnel virtuel.

La liaison est instable dans cet état et un nouveau photon est émis lors du retour à un état propre. Si le photon émis a la même énergie que le photon incident, la diffusion est dite élastique, c'est la diffusion Rayleigh. Dans le cas inverse, c'est la diffusion Raman. Celle-ci se divise en deux types; lorsque le photon émis est de plus faible énergie que le photon incident, il s'agit du décalage Stokes. Dans le cas inverse, il s'agit du décalage anti-Stokes.

Il est aisé d'expliquer ces nuances à l'aide de diagrammes de Jablonski, représentant des états électroniques et des transitions entre ces états. La Figure 2.1 présente trois diagrammes de Jablonski, un pour chaque type de diffusion présenté jusqu'ici. Deux états électroniques vibrationnels y sont représentés, l'état fondamental *m* d'énergie E_m et l'état excité *n* d'énergie E_n, ainsi que les états électroniques virtuels d'énergie $E_m + \hbar\omega$ et $E_n + \hbar\omega$. Supposons qu'un photon incident d'énergie $\hbar\omega$ polarise les charges d'une liaison moléculaire initialement à l'état fondamental *m*, la liaison se retrouve alors dans l'état virtuel $E_m + \hbar\omega$. La diffusion Rayleigh survient lorsque la liaison retourne à l'état fondamental, le photon émis est donc de même énergie que le photon incident. La diffusion Raman avec décalage Stokes, quant à elle, survient lorsque la liaison retourne plutôt vers l'état excité *n*, le photon émis est donc de plus faible énergie que le photon incident et la différence correspond à l'énergie d'excitation vibrationnelle caractéristique à la liaison moléculaire :

$$\hbar\omega_1 = \hbar\omega - (E_n - E_m) \tag{2.1}$$

Il a été supposé jusqu'à maintenant que la liaison se trouve initialement à l'état fondamental *m*. Toutefois, la statistique de Maxwell-Boltzmann montre que la probabilité qu'elle se trouve plutôt à l'état excité *n*, à 300K, est non nulle et augmente exponentiellement avec la température. Ainsi, la diffusion Raman avec décalage anti-Stokes survient lorsqu'un photon incident d'énergie $\hbar\omega$ polarise les charges d'une liaison moléculaire initialement à l'état excité *n*, puis que celle-ci se désexcite de l'état virtuel $E_n + \hbar\omega$ vers l'état fondamental *m*. Le photon émis est donc de plus grande énergie que le photon incident et la différence correspond à l'énergie d'excitation vibrationnelle spécifique à la liaison moléculaire :

$$\hbar\omega_2 = \hbar\omega + (E_n - E_m) \tag{2.2}$$

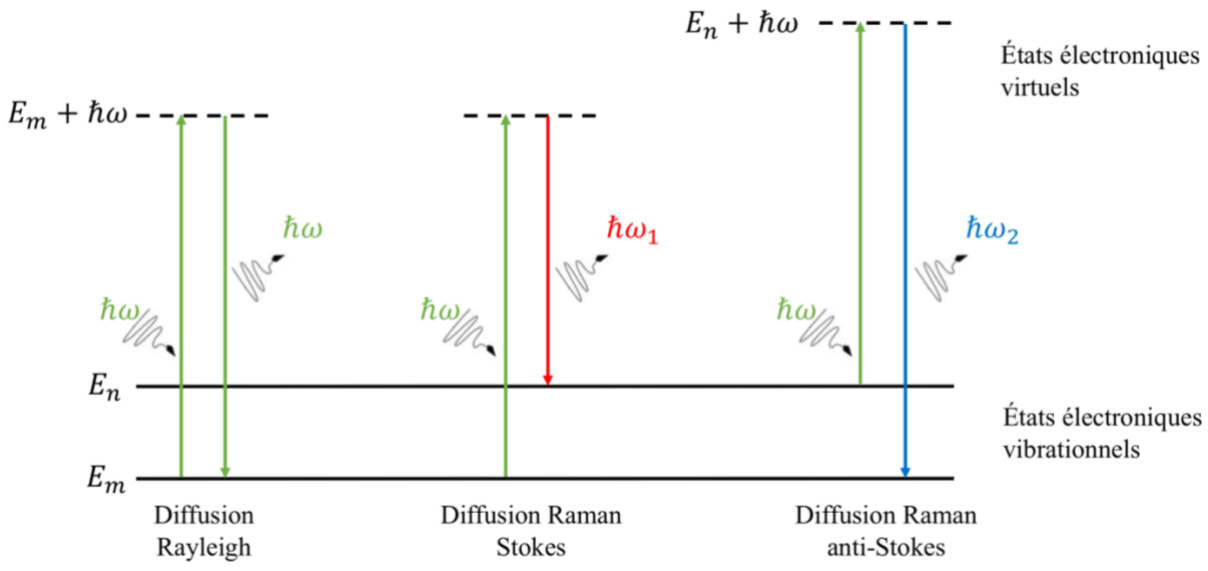

Figure 2.1 : Diagrammes de Jablonski de la diffusion Rayleigh et de la diffusion Raman de type Stokes et anti-Stokes pour un photon incident d'énergie $\hbar\omega$

La diffusion Raman est toutefois un processus moins probable que la diffusion Rayleigh malgré que ce soit elle qui fournit de l'information sur l'énergie d'excitation vibrationnelle du lien moléculaire. Globalement, seul un pour 10^7 photons incidents est diffusé via ce phénomène. De plus, il s'agira dans la plupart des cas d'un décalage Stokes; l'état excité *n* est significativement moins peuplé que l'état fondamental *m* à température ambiante, rendant la diffusion Raman avec décalage anti-Stokes encore moins probable [13]. Ainsi, ce type de diffusion ne sera pas abordé davantage dans ce mémoire. Toute référence subséquente à la diffusion Raman référera à celle avec un décalage Stokes.

La stratégie expérimentale générale afin de mesurer un spectre de diffusion Raman avec décalage Stokes consiste en irradier un échantillon avec un laser de longueur d'onde connue λ_0 et de mesurer le spectre de lumière diffusée à de plus grandes longueurs d'onde λ. Ce spectre est ensuite représenté sur une échelle en *Shift Raman*, soit le nombre d'onde ω en cm^{-1} correspondant à la différence d'énergie entre les photons du laser et les photons diffusés. L'équation (2.3) permet de faire cette conversion d'échelle à partir de longueurs d'onde en nanomètres.

$$\omega\ [\mathrm{cm}^{-1}] = 10^7 \left(\frac{1}{\lambda_0[\mathrm{nm}]} - \frac{1}{\lambda\ [\mathrm{nm}]} \right) \tag{2.3}$$

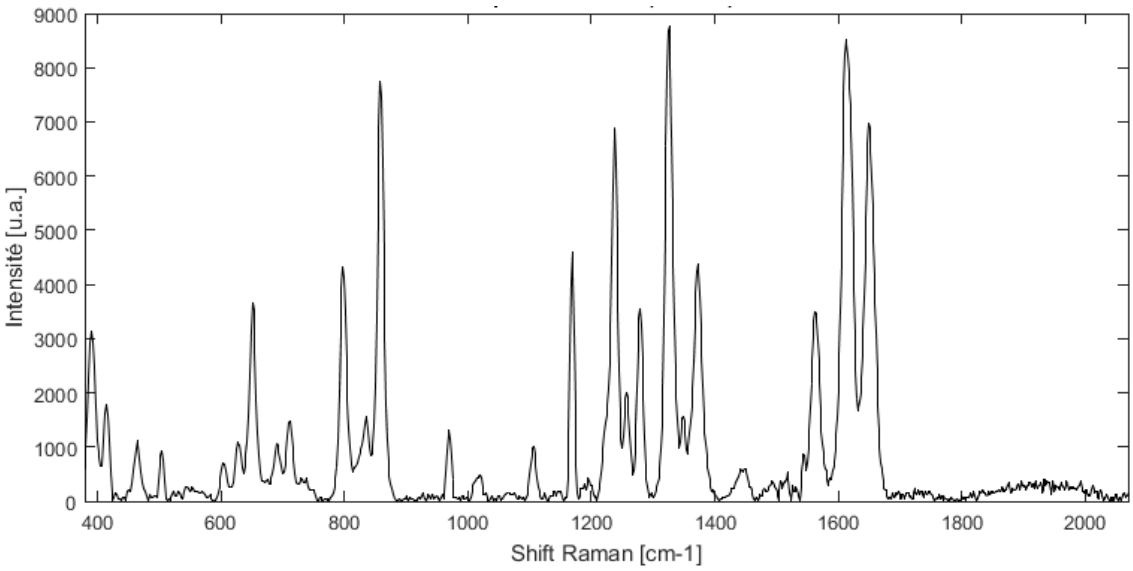

Figure 2.2 : Spectre Raman de l'acétaminophène

Un spectre Raman typique est présenté à la Figure 2.2, celui de l'acétaminophène. Le *shift Raman* de chaque pic correspond à l'énergie perdue par le photon de longueur d'onde λ_0 lors de la diffusion Raman, en d'autres mots il s'agit de l'énergie vibrationnelle moléculaire spécifique à une liaison moléculaire. Ainsi, plusieurs pics sont visibles étant donné que la molécule d'acétaminophène comporte plusieurs types de liaison. Finalement, l'intensité relative de ces pics, donnée en unités arbitraires (u.a), indique l'occurrence des types de liaison.

2.1.2 Utilisation de la spectroscopie Raman en oncologie

Les tissus biologiques contiennent une très grande variété de molécules telles que des protéines, des lipides et des acides nucléiques. Or, le métabolisme atypique des cellules cancéreuses entraîne un changement de concentration de certaines molécules dans les tissus affectés. Une stratégie de détection du cancer dans les tissus consiste donc en l'analyse de la concentration de plusieurs molécules identifiées comme biomarqueurs de la maladie [17]. Or, certains de ces biomarqueurs sont des molécules susceptibles à la diffusion Raman [16]. Il est donc théoriquement possible d'analyser la concentration individuelle de chacun de ces biomarqueurs avec la spectroscopie Raman afin de pouvoir détecter la présence de cellules cancéreuses dans un échantillon de tissus biologique, et ce de façon non invasive et sans administration de marqueurs tels que des fluorophores [2].

La réalité n'est toutefois pas aussi simple; le fait que les tissus contiennent une large variété de molécules, donc de liens et de groupes de liens moléculaires, rend l'analyse fine du spectre Raman difficile tant son contenu est chargé. Ainsi, la stratégie sera de rendre implicite l'observation de la concentration de biomarqueurs individuels en observant plutôt une combinaison de changements d'intensité relative de certaines bandes du spectre Raman. Différentes méthodes de réduction de dimensionnalité et d'apprentissage machine sont ensuite utilisées afin d'établir un modèle permettant d'interpréter ces changements d'intensité et de poser un diagnostic [2, 10, 15, 16].

2.1.3 Système de détection de tissus cancéreux en temps réel du partenaire industriel pour utilisation in-vivo

Le partenaire industriel ODS Médical inc. vise à commercialiser un système de détection de tissus cancéreux pour utilisation in-vivo exploitant la diffusion Raman. Le prototype consiste en une version optimisée et commercialement viable de celui utilisé pour les travaux de recherche du groupe de Pr Leblond de l'École Polytechnique [2, 10]. Il est composé de trois éléments matériels, soit le laser d'excitation, la sonde Raman et le spectromètre, ainsi que de deux éléments logiciels, soit la banque d'algorithmes de traitement du signal et le classificateur. Ces cinq éléments sont contrôlés et interreliés par un logiciel propriétaire développé en C++ qui met à disposition une interface utilisateur, tel que schématisé à la Figure 2.3. Le laser d'excitation a une longueur d'onde de 785nm et est produit par Innovative Photonic Solutions (NJ, USA), alors que la sonde Raman et le spectromètre sont produits par EmVision LLC (FL, USA). Finalement, la caméra CCD utilisée pour le spectromètre est produite par Andor Technology (Belfast, UK) [10].

L'obtention du résultat de classification s'effectue en quatre étapes. L'utilisateur commande une mesure via l'interface utilisateur alors qu'il appuie l'extrémité de la sonde Raman sur le tissu à analyser. (1) Le logiciel commande au laser de s'allumer et au spectromètre de débuter une acquisition. Le faisceau laser est guidé par une fibre optique jusqu'au bout de la sonde et est déposé sur le tissu à analyser. Les phénomènes de diffusion Rayleigh et Raman prennent alors place et la lumière de fréquence plus basse que celle du laser d'excitation est captée à la surface du tissu par d'autres fibres optiques au bout de la sonde [10]. Cette lumière est acheminée au spectromètre où le spectre de la lumière à la surface du tissu est mesuré. (2) Une fois la mesure terminée, le spectromètre envoie les données au logiciel. Il s'agit d'un vecteur de valeurs d'intensité optiques mesurées en fonction de la longueur d'onde. (3) Bien que la lumière à la surface du tissu contienne

le spectre Raman, elle contient aussi différentes sources de contamination lumineuses [10]. Le logiciel transmet les valeurs d'intensité obtenues du spectromètre à une série d'algorithmes de traitement du signal. Ceux-ci visent à discriminer le spectre Raman des sources de contamination, corriger les déformations causées par la réponse du système et réduire le bruit aléatoire. Le module retourne au logiciel le spectre Raman restauré autant que possible. (4) Finalement, le logiciel transmet le spectre Raman à un classificateur qui lui retourne une prédiction sur la classe du tissu analysé, à savoir s'il contient des cellules cancéreuses ou non. L'information sur la classe est affichée sur l'interface utilisateur.

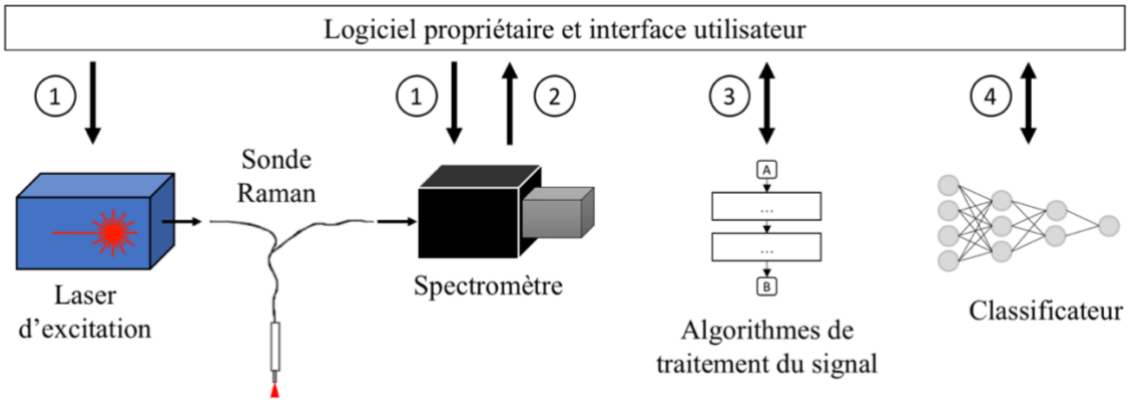

Figure 2.3 : Schéma sommaire du prototype de système de détection de tissus cancéreux du partenaire industriel ODS Medical Inc.

2.2 Sources de bruit et de facteurs confondants en spectroscopie Raman

2.2.1 Modélisation du bruit et définitions

Soit y la mesure d'une quantité physique invariante dans le temps, x, affectée par une certaine quantité de bruit ε, tel que modélisé par l'équation (2.4).

$$y = x + \varepsilon \tag{2.4}$$

Ainsi, n mesures de la même quantité physique mène à n résultats différents en raison de la présence du bruit. Il est commun de poser comme approximation que le bruit a une distribution gaussienne de moyenne μ et de variance $\sigma^2 > 0$, tel que représenté à l'équation (2.5) [20].

$$\varepsilon \sim N(\mu, \sigma^2) \tag{2.5}$$

En raison de l'équation (2.4), cette distribution est affectée à *y*. Ainsi, du point de vue de l'expérimentateur, la mesure a une distribution gaussienne de moyenne $x + \mu$ et de variance σ^2, tel que représenté à l'équation (2.6).

$$y \sim N(x + \mu, \sigma^2) \tag{2.6}$$

Si ε est indépendant de *x*, il est possible d'estimer les paramètres de la distribution μ et σ^2 du bruit d'un instrument de mesure en forçant x à être nul, de façon à ne mesurer que le bruit. En répétant *n* fois la mesure afin de disposer de *n* observations indépendantes du bruit $\boldsymbol{y}_{x=0} = [y_1, y_2, \dots, y_n]_{x=0}$, les estimateurs $\hat{\mu}$ et $\hat{\sigma}^2$ sont obtenus en calculant la moyenne et la variance des valeurs mesurées [20] :

$$\hat{\mu} = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n} y_{i_{x=0}} \tag{2.7}$$

$$\hat{\sigma}^2 = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n} \left(y_{i_{x=0}} - \hat{\mu}\right)^2 \tag{2.8}$$

Ainsi, étant donné une série de *n* mesures indépendantes $\boldsymbol{y} = [y_1, y_2, \dots, y_n]$, l'estimateur de *x* est la différence entre la moyenne des mesures et l'estimateur de la moyenne du bruit :

$$\hat{x} = \left[\frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n} y_i\right] - \hat{\mu} \tag{2.9}$$

Il est toutefois possible que la variance de certains types de bruits soit dépendante de *x*, l'équation (2.6) devient alors

$$y \sim N(x + \mu, \sigma^2(x)) \tag{2.10}$$

Dans ce cas il faut d'abord estimer *x* et μ avec la méthode décrite précédemment, puis utiliser une série de *n* mesures indépendantes $\boldsymbol{y} = [y_1, y_2, \dots, y_n]$ pour estimer la variance en fonction de *x* :

$$\hat{\sigma}^2(x) = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n}((y_i - \hat{\mu}) - \hat{x})^2 \tag{2.11}$$

Il est ainsi possible d'estimer les paramètres de la distribution du bruit μ et σ^2 ainsi que la quantité physique à mesurer. Il ne s'agit toutefois que d'estimations, ce qui implique qu'il y a une erreur entre la valeur estimée et la vraie valeur. En effet, si *m* séries de *n* observations sont mesurées et que $\hat{x}$ est calculé sur chacune, les *m* valeurs estimées ne seront pas égales. Elles seront toutefois plus rapprochées si la variance du bruit est plus faible, car c'est la présence du bruit qui cause l'erreur d'estimation. De plus, la moyenne de ces *m* valeurs sera un meilleur estimé de *x* que chaque valeur individuelle, car elle met à contribution *m* fois plus d'observations. En statistique, ces idées sont formalisées par l'Erreur Type (ET) qui donne l'erreur d'estimation moyenne en fonction de l'écart-type estimé $\hat{\sigma}$ du bruit sur chaque observation et du nombre d'observations n utilisées pour faire l'estimation [21] :

$$\mathrm{ET}(\hat{x}) = \sqrt{\frac{\hat{\sigma}^2(x)}{n}} = \frac{\hat{\sigma}(x)}{\sqrt{n}} \tag{2.12}$$

Or, il est courant de définir comme indicateur de la qualité d'une mesure le rapport de la valeur estimée $\hat{x}$ sur son ET; il s'agit du Rapport Signal-sur-Bruit (SNR) présenté à l'équation (2.13). Ainsi, plus l'ET est grande par rapport à la valeur estimée, plus faible est la qualité de la mesure. Autrement dit, la qualité de la mesure s'améliore si un plus grand nombre d'observations est collecté ou si l'écart-type du bruit diminue.

$$\mathrm{SNR} = \frac{\hat{x}}{\mathrm{ET}(\hat{x})} = \frac{\sqrt{n}\,\hat{x}}{\hat{\sigma}(x)} \tag{2.13}$$

2.2.2 Bruit de mesure de la caméra CCD

Le spectromètre sert à mesurer le spectre de la lumière collectée à la surface des tissus. Il est composé d'une mince fente verticale placée devant un système optique créant une image bidimensionnelle sur le détecteur d'une caméra CCD. L'axe vertical de cette image correspond à l'axe de la fente alors que l'axe horizontal correspond aux longueurs d'onde de la lumière passant

par la fente. La caméra CCD mesure cette image et envoie l'information à un ordinateur [2, 10, 22].

Le détecteur de la caméra CCD remplit trois fonctions, à savoir la collection des charges, leur transfert et leur conversion en une tension mesurable. La collection est effectuée à l'aide d'une matrice de conteneurs de charges photosensible qui consiste en une jonction Métal/Oxyde/Semi-conducteur (MOS). Des photons incidents à la matrice de jonctions y génèrent des charges qui y restent stockées. Après un temps d'exposition τ, il est possible de transférer ces charges dans la matrice en manipulant les tensions aux bornes des jonctions afin d'acheminer celles-ci jusqu'à un dispositif de lecture unique, composé d'un amplificateur de transimpédance et d'un Convertisseur Analogique vers Digital (CAD), qui permet d'en mesurer le nombre [22]. Ainsi, la lecture complète de la matrice de jonction MOS de dimension i par j consiste en $i * j$ mesures pouvant être modélisées par l'équation (2.4), où x est le vrai nombre de charges photo-générées en moyenne pendant τ dans la jonction mesurée et ε est le bruit de la caméra.

Trois différents types de bruit indépendants de distribution gaussienne affectent simultanément une mesure et forment ensemble le bruit de la caméra. D'abord, le Bruit Thermique (BT), $\varepsilon_{BT} \sim N(\mu_{BT}, \sigma_{BT}^2)$, qui provient de la génération thermique de charges dans la jonction MOS. Ensuite, le Bruit de Lecture (BL), $\varepsilon_{BL} \sim N(\mu_{BL}, \sigma_{BL}^2)$, qui englobe tous les bruits entourant la mesure du nombre de charges dans la jonction. Finalement, le Bruit de Grenaille (BG), $\varepsilon_{BG} \sim N(\mu_{BG}, \sigma_{BG}^2)$, qui provient de la nature discrète et aléatoire du nombre de charges photo-générées pendant le temps d'exposition τ [22, 23, 24]. Le bruit de la caméra ε est donc également de distribution gaussienne et ses paramètres correspondent à la somme de ceux de ces trois types de bruits :

$$\varepsilon \sim N(\mu_{BT} + \mu_{BL} + \mu_{BG},\ \sigma_{BT}^2 + \sigma_{BL}^2 + \sigma_{BG}^2) \tag{2.14}$$

Dépendamment des paramètres d'acquisition et de l'intensité du signal, une source de bruit peut être dominante. On dit alors que le détecteur est limité par cette source de bruit.

2.2.2.1 Bruit Thermique (BT)

Le BT provient de la génération thermique de charges dans la jonction MOS, principalement à l'intérieur de la zone de déplétion. Ces charges thermo-générées s'ajoutent à celles photo-générées et sont mesurées comme tel lors de la lecture de la matrice de jonctions [25]. Ce type de bruit est

fonction du temps d'exposition τ et de la température de la jonction T, car les charges thermo-générées s'accumulent au fil du temps avec un taux de génération λ augmentant exponentiellement avec la température [22]. L'équation (2.15) montre cette dépendance, avec E_g l'énergie de la bande interdite du semi-conducteur, k_B la constante de Boltzmann et T la température de la jonction.

$$\lambda \propto e^{\frac{-E_g}{2k_B T}} \tag{2.15}$$

D'autre part, le temps t séparant deux évènements de génération thermique de charges suit une loi exponentielle de paramètre λ, tel que présenté à l'équation (2.16). En effet, plus T est grand, plus λ l'est aussi et donc plus la probabilité que t soit petit est grande.

$$p(t|\lambda) = \lambda e^{-\lambda t} \tag{2.16}$$

En conséquence, le nombre de charges thermo-générées k pendant un intervalle de temps τ suit une distribution de Poisson de paramètre $\lambda\tau$, le nombre moyen de charges thermo-générées pendant cet intervalle [24] :

$$p(k|\lambda) = e^{-(\lambda\tau)} \frac{(\lambda\tau)^k}{k!} \tag{2.17}$$

Or, lorsque $\lambda\tau$ devient grand, la distribution de poisson peut être approximée par une distribution gaussienne de moyenne et de variance égale à $\lambda\tau$ [26]. Ainsi, lorsque le détecteur est limité par le bruit thermique, la moyenne et la variance du signal sont égales, augmentent linéairement avec le temps d'exposition et diminuent exponentiellement avec la température :

$$\mu_{BT} = \sigma_{BT}^2 \propto \tau e^{-1/T} \tag{2.18}$$

Afin de maximiser la sensibilité des détecteurs, il est courant d'équiper ceux-ci d'un refroidisseur électronique à effet Peltier afin d'abaisser T sous 200 degrés Kelvin [23]. Le BT devient alors négligeable pour des temps d'exposition de l'ordre de la seconde et le détecteur est limité par les autres types de bruits [22, 23]. Dans ces conditions, l'équation (2.14) se réécrit

$$\varepsilon \sim N(\mu_{BL} + \mu_{BG}, \sigma_{BL}^2 + \sigma_{BG}^2) \tag{2.19}$$

2.2.2.2 Bruit de Lecture (BL)

Après un temps d'exposition τ, les charges photo-générées contenues dans chaque jonction MOS sont acheminées à un dispositif de lecture unique. Un amplificateur de transimpédance convertit d'abord celles-ci en une tension puis un CAD en fait la mesure [22]. La Figure 2.4 présente les étapes de lecture d'un détecteur CCD de dimension 2x2 plus en détail. Les tuiles grises représentent les jonctions MOS exposées au signal optique, les tuiles bleues représentent les jonctions MOS non exposées, appelées registres de lecture, et la tuile verte représente le dispositif de lecture des charges. D'abord, les jonctions MOS sont exposées au signal optique pendant τ secondes ce qui cause l'accumulation de charges photo-générées et le registre de lecture est initialement vide. Ensuite, le potentiel aux bornes des jonctions MOS est modifié de façon à déplacer les charges verticalement d'une ligne. Le registre de lecture contient maintenant les charges de la deuxième ligne. Finalement, le potentiel aux bornes des jonctions du registre de lecture est modifié de façon à déplacer les charges horizontalement d'une colonne et le nombre de charges situées dans la dernière colonne est mesuré [23].

Le temps nécessaire pour lire l'entièreté du détecteur CCD dépend de la Vitesse de Décalage Horizontale et Verticale des charges (VDH et VDV), qui sont deux paramètres de lecture définis par l'utilisateur.

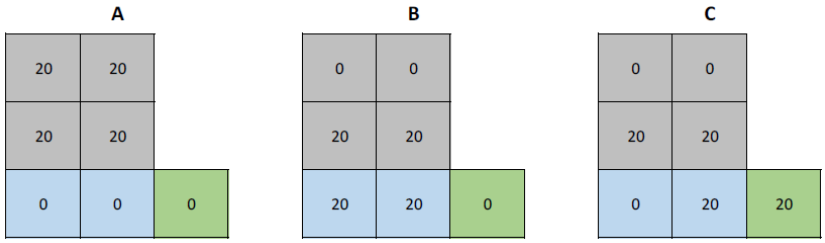

Figure 2.4 : Étapes de lecture d'un détecteur CCD de dimension 2x2

Le BL est une propriété inhérente du détecteur CCD et constitue généralement sa limite de sensibilité [23]. Il correspond à la combinaison de toutes les sources de bruit associées à l'acheminement et la mesure des charges et dépend principalement de la VDH et de la VDV; le BL augmente pour de plus grandes vitesses de décalage [22, 23, 27]. Étant donné qu'il correspond à une combinaison de sources de bruit diverses non spécifiées, il sera pris pour acquis que le BL est de distribution gaussienne en vertu du théorème de limite centrale. Finalement, étant donné que le

dispositif de lecture est unique pour un détecteur, il est considéré que la distribution du BL sur la lecture de chaque jonction MOS est identique et possède donc les même paramètres μ_{BL}et σ_{BL}^2.

2.2.2.3 Bruit de Grenaille (BG)

Le BG provient de la nature discrète des photons et consiste en une fluctuation du nombre de charges photo-générées pendant un temps d'exposition τ. Un flux de photons incidents à une jonction MOS cause la photo-génération de charges à un taux moyen λ. Ainsi, $\lambda\tau$ est le nombre *moyen* de charges photo-générés pendant τ. Or, k, le nombre *observé* de charges photo-générées pendant τ, suit une distribution de Poisson de paramètre $\lambda\tau$ [22, 23, 25, 27]. Cette distribution est présentée à l'équation (2.20).

$$p(k|\lambda) = e^{-(\lambda\tau)} \frac{(\lambda\tau)^k}{k!} \tag{2.20}$$

Toutefois, lorsque $\lambda\tau$ devient grand, la distribution de Poisson peut être approximée par une distribution gaussienne de moyenne et de variance égale à $\lambda\tau$ [26]. Étant donné que la grandeur physique à mesurer x est $\lambda\tau$ et que le BG est la fluctuation sur cette mesure, celui-ci est de moyenne nulle et de variance $\lambda\tau$. La variance du BG est donc proportionnelle à x. Ainsi, l'équation (2.19) se réécrit

$$\varepsilon \sim N(\mu_{BL}, \sigma_{BL}^2 + \sigma_{BG}^2(x)) \tag{2.21}$$

Lorsque le flux de photons incident est faible ou lorsque le temps d'exposition est court, le nombre de charges photo-générées est faible et le bruit de la caméra est une combinaison du BL et du BG. Autrement, le détecteur est limité par le BG.

2.2.3 Auto-Fluorescence des tissus biologiques

La fluorescence est un type d'interaction lumière-matière pouvant être observé dans les tissus biologiques au même titre que la diffusion Rayleigh et Raman discutés à la section 2.1.1. Elle consiste en l'absorption d'un photon incident suivie d'une émission spontanée d'un photon de plus faible énergie. Les molécules susceptibles à ce type d'interaction sont appelées fluorophores [28, 29].

Soit un lien moléculaire possédant des états électroniques S_0 à S_2, eux-mêmes subdivisés en états vibroniques V_0 à V_4. Le diagramme de Jablonski des états propres du lien est présenté à la Figure 2.5. Un photon incident d'énergie $\hbar\omega$ peut être absorbé si son énergie correspond à celle d'une transition électronique possible. Supposons que le lien moléculaire est initialement à l'état fondamental et que l'énergie du photon absorbé est telle que l'électron est promu au premier état électronique excité et au troisième état vibrationnel excité, tel que représenté par la flèche verte à la Figure 2.5. Cet état vibrationnel est instable et l'électron se désexcite rapidement de façon non radiative à l'état vibrationnel fondamental, tel que représenté par la flèche noire ondulée à la Figure 2.5. Ce mécanisme est la relaxation vibrationnelle. La liaison demeure toutefois dans l'état électronique excité, qui est lui aussi instable. Après un temps généralement de l'ordre de la nanoseconde, l'électron se désexcitera de façon radiative vers l'état électronique fondamental, tel que représenté par la flèche rouge à la Figure 2.5. Ce mécanisme est l'émission spontanée. Le photon émis possède une énergie $\hbar\omega_1$ qui correspond à l'énergie de la transition électronique. Ainsi, l'énergie du photon fluorescent est toujours inférieure à celle du photon incident étant donné que la relaxation vibrationnelle est un processus beaucoup plus probable que l'émission spontanée, causant ainsi une perte d'énergie avant l'émission du photon. De plus, le grand nombre d'états propres pouvant être couplés par des transitions radiatives et non radiatives fait en sorte que le spectre d'émission de la fluorescence est étendu et lisse malgré l'utilisation d'une source laser, contrairement au spectre Raman qui est étendu, mais constitué de pics [30, 31].

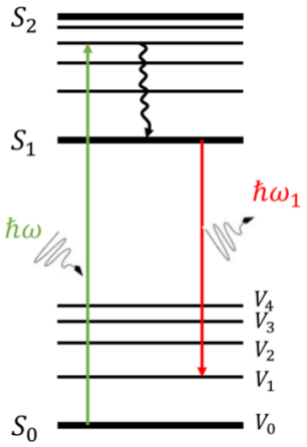

Figure 2.5 : Diagramme de Jablonski de la fluorescence pour un photon incident d'énergie $\hbar\omega$

Or, les tissus biologiques contiennent naturellement des fluorophores. Ceux-ci sont principalement intracellulaires, tels que le tryptophane, la pyrimidine et la flavine. D'autres proviennent de la

matrice extracellulaire, tels que l'élastine et le collagène [28]. Ainsi, sous l'excitation laser utilisée dans le cadre de la spectroscopie Raman, les tissus biologiques émettent intrinsèquement un spectre de fluorescence, appelé spectre d'Auto-Fluorescence (AF), qui fait compétition au spectre Raman de façon importante. En effet, l'intensité du spectre d'AF peut être jusqu'à 10 ordres de grandeur supérieure à celui-ci [32]. Toutefois, les fluorophores ont une courbe d'efficacité quantique d'excitation qui est généralement maximale dans les régions de l'ultra-violet et du visible et qui diminue drastiquement pour de plus grandes longueurs d'ondes [28]. Ainsi, la stratégie habituelle afin de minimiser l'émission d'AF lors de la mesure du spectre Raman de tissus biologiques est de choisir une longueur d'onde d'excitation laser dans le proche infrarouge. Cela n'est toutefois pas suffisant pour complètement l'atténuer et la mise en place de stratégies supplémentaires est nécessaire [32, 33].

Une propriété particulière des fluorophores est l'affaiblissement de leur signal de fluorescence lors d'une exposition prolongée à la source d'excitation. Ce phénomène est appelé photo-blanchiment. Lorsque la molécule se trouve à l'état excité, il y a une probabilité non nulle qu'elle se dénature et perde sa propriété de fluorescence. Le nombre de cycles d'excitation/désexcitation d'un fluorophores est donc fini, ce qui cause un affaiblissement exponentiel du signal d'AF dans le temps [45, 46].

2.2.4 Sources de lumière ambiante

Un des problèmes associés à l'utilisation de la spectroscopie Raman dans le contexte clinique est la contamination du signal par des sources de lumière ambiante situées à proximité et souvent nécessaires au déroulement de la chirurgie. Il peut s'agir de sources de lumière visible dont le spectre s'étend dans le proche infrarouge telles que les lampes de chirurgie, les tubes fluorescents qui constituent l'éclairage de la pièce, les écrans LCD, la lumière d'un microscope chirurgical ou la lumière du jour. Il peut aussi s'agir de sources de lumière infrarouge telles que le système de neuronavigation [10, 49]. La lumière émise par ces sources peut se retrouver à proximité de l'échantillon et pénétrer dans la sonde Raman lors de la mesure. Si cette lumière possède un contenu spectral dans la même plage de longueurs d'onde que le spectre Raman, ceux-ci vont se superposer et le spectre de la lumière ambiante devient un facteur confondant pouvant mener à des erreurs de classification. Il est ainsi généralement nécessaire d'effectuer la mesure Raman dans l'obscurité afin d'éviter la contamination par des sources de lumière ambiante [10, 49].

2.3 Restauration de signaux

2.3.1 Estimation du signal d'Auto-Fluorescence

Tel que discuté à la section 2.2.3, le signal d'AF des tissus biologiques fait compétition au signal Raman de façon importante, car son intensité peut y être supérieure de quelques ordres de grandeur malgré l'utilisation d'un laser d'excitation dans le proche infrarouge. Les stratégies proposées dans la littérature afin de minimiser l'impact du signal d'AF sur la mesure du signal Raman se divisent en deux groupes [35]. Le premier rassemble les stratégies impliquant des modifications matérielles au système. Par exemple, la *Shifted Excitation Raman Difference Spectroscopy* (SERDS) consiste en exciter subséquemment l'échantillon avec plusieurs longueurs d'onde différentes, mais semblables, de façon à obtenir des mesures dont les pics Raman sont légèrement décalés, mais ayant sensiblement le même signal d'AF. Le spectre Raman est ensuite reconstruit à partir de ces mesures [36, 37, 38]. Aussi, la *Time Gated Raman Spectroscopy* consiste en l'exploitation du fait que la diffusion Raman est un processus beaucoup plus rapide que la fluorescence en excitant l'échantillon avec une impulsion laser de quelques picosecondes puis en utilisant un dispositif à effet Kerr permettant de bloquer le signal d'AF émit quelques dizaines de picosecondes plus tard [39, 40]. Le deuxième groupe rassemble les stratégies plutôt basées sur l'estimation a posteriori du signal d'AF. Tel que mentionné précédemment, le signal d'AF est lisse contrairement au signal Raman qui est plutôt composé de pics. Ainsi, des méthodes numériques utilisant la *Principal Component Analysis* (PCA) [41], la régression des moindres carrés [42, 43], la décomposition en ondelettes [44] ou la régression polynomiale [35, 43] visent à estimer le signal d'AF pour ensuite le soustraire au spectre mesuré. Ces stratégies sont moins coûteuses à implémenter que celles du premier groupe, car elles ne requièrent pas l'utilisation de matériel additionnel, plus performant ou plus sophistiqué. Ainsi, l'utilisation d'un Algorithme de Régression Polynomiale Automatique (ARPA) est la solution la plus populaire pour les applications biomédicales en raison de sa simplicité et de sa commodité [35]. Toutefois, son intérêt est moindre si l'amplitude du BG généré par le signal d'AF cause une détérioration importante du signal Raman [37]. Il a ainsi été proposé d'exploiter le phénomène de photo-blanchiment afin de réduire le signal d'AF préalablement à la mesure [47, 48, 54].

2.3.2 Détection Cohérente

D'une part, l'intensité d'une source de lumière ambiante, contrairement à celle du signal d'AF, n'est pas corrélée avec celle du signal Raman. Elle dépend de son circuit d'alimentation et possède généralement une composante modulée dans le temps, superposée à une composante continue. D'autre part, la détection cohérente (DC) est une technique permettant de mesurer des signaux faibles en présence de bruit à condition que l'intensité de ceux-ci ne soit pas corrélée [50, 51]. Elle consiste en moduler l'amplitude du signal d'intérêt, le signal émis par les tissus suivant l'excitation laser en l'occurrence, suivi de la démodulation du signal afin d'éliminer la contribution du bruit, soit le signal émis par les sources de lumière ambiante. La Figure 2.6 schématise l'implémentation de la DC pour la mesure du signal d'intérêt V_S en présence du bruit $V_B(t)$ [50, 51].

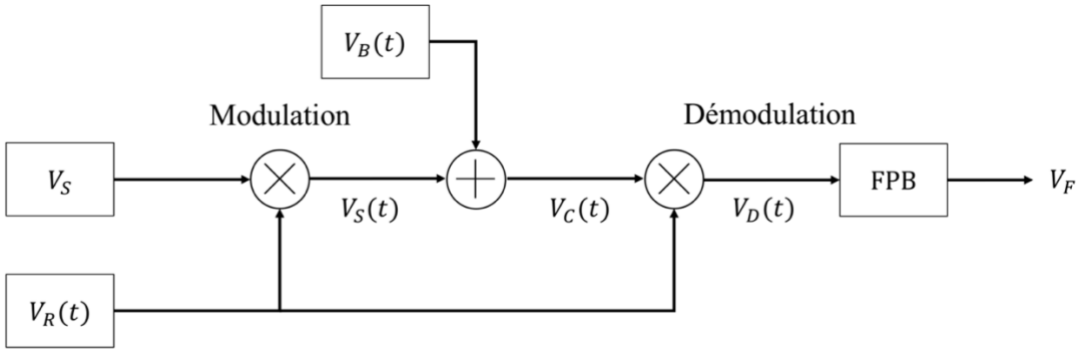

Figure 2.6 : Détection cohérente du signal d'intérêt V_s en présence d'une source de bruit $V_B(t)$ ayant une composante modulée dans le temps superposée à une composante continue

Soit un signal de référence $V_R(t)$ périodique de fréquence radiale ω_R, de phase ϕ_R et d'amplitude V_R :

$$V_R(t) = V_R \sin(\omega_R t + \phi_R) \tag{2.22}$$

La modulation du signal d'intérêt V_S est réalisée en multipliant celui-ci avec le signal de référence :

$$V_S(t) = V_S V_R(t) = V_S V_R \sin(\omega_R t + \phi_R) \tag{2.23}$$

Soit une source de bruit qui émet un signal $V_B(t)$ ayant une composante modulée dans le temps de fréquence radiale $\omega_B < \omega_R$, de phase ϕ_B et d'amplitude V_{B1} superposée à une composante continue d'amplitude V_{B2} :

$$V_B(t) = V_{B1}\sin(\omega_B t + \phi_B) + V_{B2} \tag{2.24}$$

Le signal de la source de bruit s'additionne à $V_S(t)$, ce qui forme le signal contaminé $V_C(t)$:

$$V_C(t) = V_S V_R \sin(\omega_R t + \phi_R) + V_{B1}\sin(\omega_B t + \phi_B) + V_{B2} \tag{2.25}$$

La démodulation de V_S est alors effectuée en deux étapes. D'abord, le signal contaminé est modulé en amplitude par le signal de référence, ce qui est réalisé par la multiplication des deux signaux. L'utilisation d'identités trigonométriques permet d'écrire :

$$\begin{aligned} V_D(t) = {} & \frac{V_S V_R^2}{2}[1 - \cos(2\omega_R t + 2\phi_R)] \\ & + \frac{V_{B1}V_R}{2}[\cos((\omega_R - \omega_B)t + \phi_R - \phi_B) - \cos((\omega_R + \omega_B)t + \phi_R + \phi_B)] \\ & + V_{B2}V_R \sin(\omega_R t + \phi_R) \end{aligned} \tag{2.26}$$

Ensuite, un Filtre Passe-Bas (FPB) de fréquence radiale de coupure $\omega_C < (\omega_R - \omega_B)$ est appliqué au signal contaminé modulé, ce qui a pour effet d'annuler toutes les composantes périodiques du signal. Le signal à la sortie du filtre est donc la composante continue de l'équation (2.26) dont l'intensité est proportionnelle à celle du signal d'intérêt, mais pas à celle du signal de la source de bruit, tel que présenté à l'équation (2.27) [50, 51]. La détection cohérente permet donc de restaurer le signal d'intérêt malgré la présence de sources de bruit.

$$V_F = \underset{\omega_C}{\mathrm{FPB}}\{V_D(t)\} = \frac{V_S V_R^2}{2} \tag{2.27}$$

CHAPITRE 3 SNR DE LA CAMÉRA CCD EN FONCTION DES PARAMÈTRES D'ACQUISITION

La caméra CCD utilisée dans le système de spectroscopie Raman du partenaire industriel est fabriquée par la compagnie Andor, il s'agit du modèle Newton 920/BR-DD. Ce chapitre présente d'abord les paramètres d'acquisitions de la caméra CCD pouvant être modifiés par l'utilisateur ainsi que les valeurs déjà utilisées par le partenaire industriel. Ensuite, les paramètres μ et σ^2 de la distribution des trois types de bruits présentés à la section 2.2.2 sont estimés en fonction des paramètres d'acquisition afin de déterminer lesquels minimisent le bruit de la caméra. Finalement, l'expression empirique du SNR de la caméra en fonction de l'intensité du signal pour les paramètres d'acquisition optimaux est établie.

3.1 Paramètres d'acquisition de la caméra CCD

Les mesures présentées dans ce chapitre ont été effectuées avec le logiciel Solis, développé et distribué par Andor, le fabricant de la caméra. Celui-ci offre une interface utilisateur permettant de contrôler un certain nombre de paramètres d'acquisition de la Newton 920. Ceux ayant un impact potentiel sur le bruit de la caméra sont présentés dans cette section [52].

- Température du détecteur (T) : Tel que mentionné à la section 2.2.2.1, le BT peut être réduit en réduisant la température du détecteur. Un refroidisseur à effet Peltier installé sur le détecteur permet d'abaisser sa température. La valeur cible est définie par T et peut prendre des valeurs entières jusqu'à -80 degrés Celsius;
- Temps d'exposition (τ) : Définis la durée pendant laquelle le détecteur est exposé au signal optique à mesurer. La valeur peut varier de quelques millisecondes à plusieurs minutes;
- Vitesse de Décalage Vertical (VDV) : Définis la vitesse à laquelle les charges contenues dans chaque rangée de jonctions MOS du détecteur sont décalées verticalement vers le registre de lecture. Ce paramètre peut prendre 9 valeurs différentes, soit 1, 1.8, 3.4, 6.6, 13, 25.8, 51.4, 102.6 et 153.8 microsecondes;
- Vitesse de Décalage Horizontal (VDH) : Définis la vitesse à laquelle les charges contenues dans chaque jonction MOS du registre de lecture sont décalées horizontalement vers le CAD. Ce paramètre peut prendre 2 différentes valeurs, soit 1MHz et 2.5MHz;

- Gain de l'amplificateur de transimpédance (G) : La mesure du nombre de charges contenues dans une jonction MOS par le CAD est indirecte. En effet, les charges photo-générées forment un courant qui est converti en tension par un amplificateur de transimpédance. Cette tension est mesurée par le CAD qui représente celle-ci sous la forme d'un entier non signé de 16 bits. La plage dynamique de tensions mesurables par le CAD est donc constituée de $2^{16} = 65536$ valeurs discrètes, ce qui donne une certaine résolution sur la mesure d'intensité. Lorsque les signaux sont faibles, cette résolution peut ne pas être suffisante et un gain sur l'amplificateur de transimpédance peut être ajusté pour augmenter la tension lue par le CAD. Le gain peut prendre trois valeurs, soit 1x, 2x et 4x;
- Mode de Lecture (ML) : Le détecteur de la caméra peut être lu de différentes façons. Celle présentée à la section 2.2.2.2 permet de mesurer la charge contenue dans chaque jonction MOS du détecteur. La caméra retourne donc une image. Ce ML est donc *image*. Toutefois, il pourrait être désirable de décaler verticalement toutes les charges dans les registres de lecture, où elles s'accumuleront avant d'en faire la mesure. La caméra retourne plutôt un vecteur d'intensité. Ce ML est, en anglais, *Full Vertical Binning* (*FVB*). Tous les cas intermédiaires sont possibles avec le ML *Random-Track* qui permet de définir les lignes et colonnes pour lesquelles les charges sont accumulées avant d'être lues;
- Mode d'Acquisition (MA) : Une acquisition consiste en l'exposition du détecteur au signal optique pendant τ secondes puis en sa lecture selon le ML défini. Cela correspond au MA *Single Scan*. Toutefois, l'utilisateur peut vouloir effectuer plusieurs acquisitions les unes après les autres. Le MA *Kinetic Series* permet d'effectuer une séquence de n acquisitions et de définir le délai entre chacune. La caméra retourne alors les valeurs pour les n mesures;
- *Baseline Clamp* (*BC*) : Le CAD ne pouvant mesurer de tensions négatives, une faible tension continue est superposée à la tension à la sortie de l'amplificateur de transimpédance. Cela contribue largement au fait que bruit de lecture soit de moyenne non nulle. Or, un registre de lecture témoin ne contenant aucune charge est utilisé afin de déterminer la moyenne du bruit de lecture pour ensuite le soustraire à toutes les valeurs mesurées à l'intérieur de la même acquisition. Ce paramètre permet de tenir ou compte ou non de ce registre de lecture témoin;

Le partenaire industriel a toutefois déjà quelque peu exploré l'espace des paramètres d'acquisition afin de pouvoir obtenir des spectres Raman de qualité raisonnable. Les valeurs des paramètres qu'il utilise sont présentées au Tableau 3.1. Celles-ci constituent le point de départ des expériences présentées dans ce chapitre.

Tableau 3.1 : Valeurs des paramètres d'acquisition utilisées par le partenaire industriel

Paramètre	**Valeur**
T	-80 °C
τ	75 ms
VDV	1.8 μs
VDH	2.5 MHz
G	1x
ML	*FVB*
MA	*Kinetic Series*
BC	Oui

3.2 Estimation de la moyenne et de la variance des bruits de la caméra en fonction des paramètres d'acquisition

La stratégie expérimentale de cette section repose sur la modélisation du bruit présentée à la section 2.2.1. La quantité physique à mesurer, x, est l'intensité de la lumière incidente tel que mesuré par une jonction MOS du détecteur de la caméra CCD. Le bruit gaussien ε, de moyenne μ et de variance σ^2, qui s'additionne à x est le bruit de la caméra. Ensemble, x et ε forment y, la mesure par le CAD de la charge accumulée dans la jonction. Or, la caméra Newton 920 de Andor possède un détecteur bidimensionnel composé de 1024 colonnes et 256 lignes de jonctions MOS. Une lecture du détecteur, une acquisition, requiert donc 262,144 mesures individuelles pour le ML *image* ou 1024 pour le ML *FVB*. Cela nécessite l'emploi d'une notation plus élaborée, car il faut pouvoir distinguer les mesures individuelles effectuées à l'intérieur de différentes acquisitions. Ainsi, les mesures individuelles effectuées lors de la n^{e} acquisition sont indexées par j et sont notées $y_n^{(j)}$. Cette notation est schématisée à la Figure 3.1 pour les deux types de ML déjà présentés et pour un détecteur composé de 2 colonnes et de 2 lignes. En conséquence, l'équation (2.4) se réécrit tel que présenté à l'équation (3.1), où $\varepsilon_n^{(j)} \sim N(\mu^{(j)}, \sigma^{2(j)})$.

$$y_n^{(j)} = x^{(j)} + \varepsilon_n^{(j)} \tag{3.1}$$

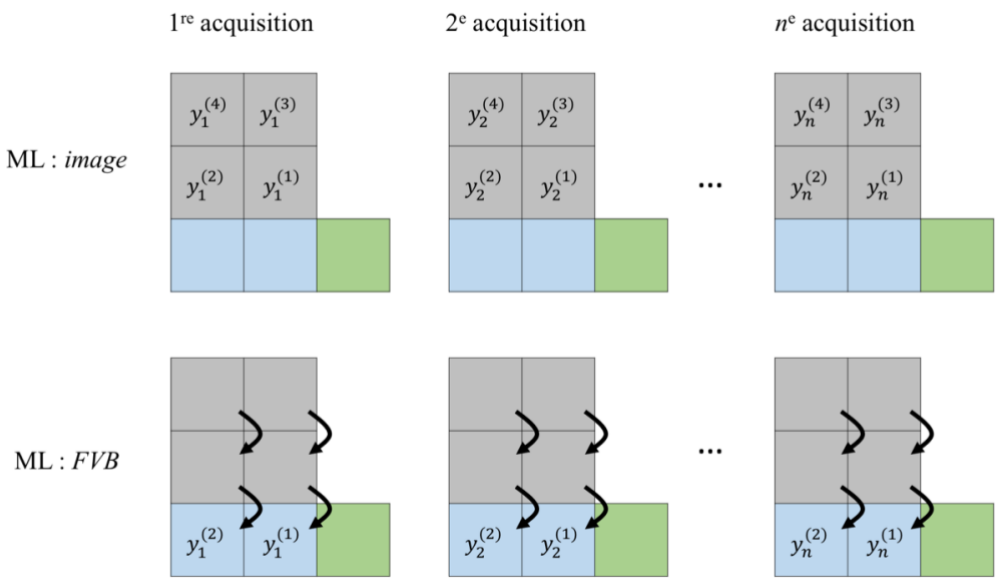

Figure 3.1: Schématisation de la notation utilisée pour distinguer les mesures individuelles effectuées pour *n* acquisitions pour un détecteur de dimension 2x2, pour deux différents ML

3.2.1 Bruit Thermique

Afin d'estimer les paramètres μ_{BT} et σ_{BT}^2 de la distribution du BT, il faut pouvoir mesurer celui-ci indépendamment du signal optique, du BL et du BG. Or, tel que mentionné à la section 2.2.2.1, le BT est indépendant de l'intensité du signal optique. Ainsi, en obstruant la fente d'entrée du spectromètre, il est possible d'éviter toute contribution du signal optique et du BG à la mesure. L'équation (3.1) se réécrit donc tel que présenté à l'équation (3.2), où $\varepsilon_n^{(j)}$ est seulement composé du BT et du BL.

$$y_n^{(j)} = \varepsilon_n^{(j)} \tag{3.2}$$

En effectuant $n = 100$ acquisitions, les équations (2.7) et (2.8) permettent d'estimer la moyenne $\mu^{(j)}$ et la variance $\sigma^{2^{(j)}}$ de $\varepsilon^{(j)}$, et ce pour tout j. Il faut toutefois pouvoir distinguer les deux types de bruit. Or, le BT, contrairement au BL, est exponentiellement dépendant de *T*, la température du détecteur, et linéairement dépendant de τ, le temps d'exposition. La Figure 3.2 présente les paramètres estimés $\hat{\mu}^{(j)}$ et $\hat{\sigma}^{2^{(j)}}$ de $\varepsilon^{(j)}$, $\forall\, j$, obtenus avec les équations (2.7) et (2.8), en fonction de *T*. Les unités des paramètres estimés sont ceux de à la mesure de la caméra, c'est-à-dire l'intensité du signal optique en unité arbitraire (u.a.). Les paramètres d'acquisition utilisés sont

ceux présentées au Tableau 3.1. La courbe continue noire représente la valeur moyenne des *j* paramètres estimés en fonction de *T* et la région grise représente son écart-type.

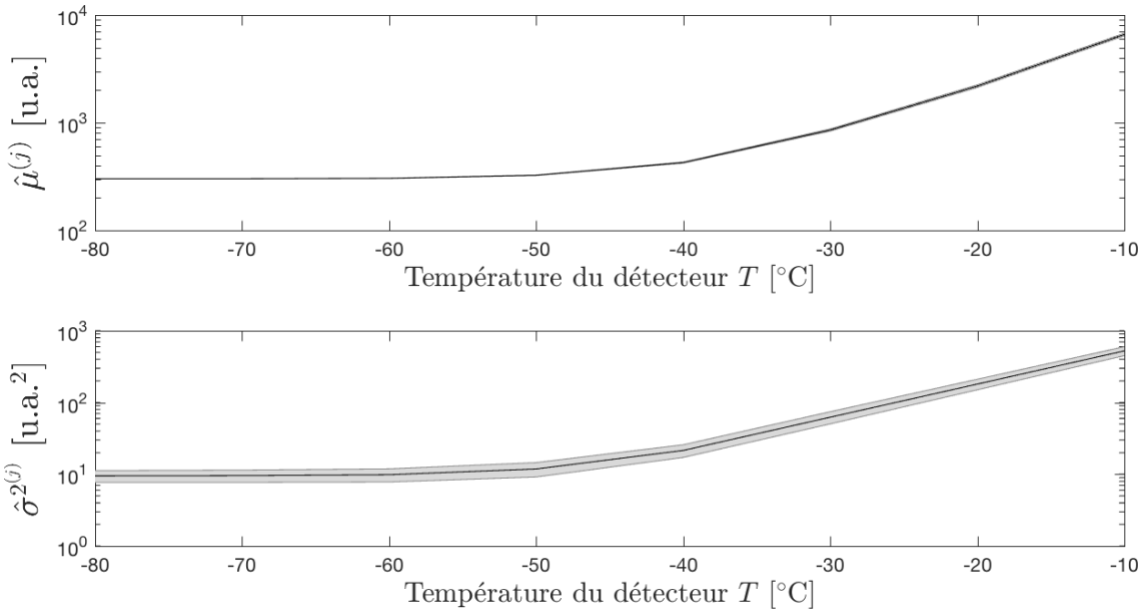

Figure 3.2 : Paramètres de la distribution de $\varepsilon^{(j)}$estimés, $\hat{\mu}^{(j)}$ et $\hat{\sigma}^{2^{(j)}}$, en fonction de T

Il est possible de constater à la Figure 3.2 que pour des températures supérieures à -30°C, les paramètres estimés sont exponentiellement dépendants de *T*, alors qu'ils en sont indépendants pour des températures inférieures à -60°C. Deux régimes sont ainsi représentés, séparés par une zone de transition. Le premier est celui où le détecteur est limité par le BT, c'est-à-dire que $\mu_{BT} \gg \mu_{BL}$ et $\sigma_{BT}^2 \gg \sigma_{BL}^2$, et qui survient lorsque $T > -30$°C. Le deuxième est celui où le détecteur est limité par le BL, c'est-à-dire que $\mu_{BT} \ll \mu_{BL}$ et $\sigma_{BT}^2 \ll \sigma_{BL}^2$, et qui survient lorsque $T < -60$°C. Autrement, lorsque $-60°\mathrm{C} < T < -30°\mathrm{C}$, les contributions des deux types de bruits sont du même ordre de grandeur, donc $\mu^{(j)} = \mu_{BT}^{(j)} + \mu_{BL}^{(j)}$ et $\sigma^{2^{(j)}} = \sigma_{BT}^{2\ (j)} + \sigma_{BL}^{2\ (j)}$. Afin de corroborer cette affirmation, la Figure 3.3 et la Figure 3.4 présentent les mêmes paramètres estimés $\hat{\mu}^{(j)}$ et $\hat{\sigma}^{2^{(j)}}$ mais cette fois en fonction du temps d'exposition τ et pour deux températures *T*, chacune associée à un des deux régimes. Dans la première, $T = -10$°C, il s'agit donc du régime limité par le BT et les paramètres estimés sont linéairement dépendants de τ, ce qui correspond bien au comportement attendu pour ce régime. Dans la deuxième, $T = -80$°C, il s'agit donc du régime limité par le BL et les paramètres estimés sont indépendants de τ, ce qui correspond aussi au comportement attendu pour un ce régime. Il est ainsi possible de rendre la contribution du BT complètement négligeable

pour des temps d'exposition allant au moins jusqu'à quelques centaines de millisecondes en fixant $T = -80°\text{C}$. Ce type de bruit ne sera dorénavant plus considéré.

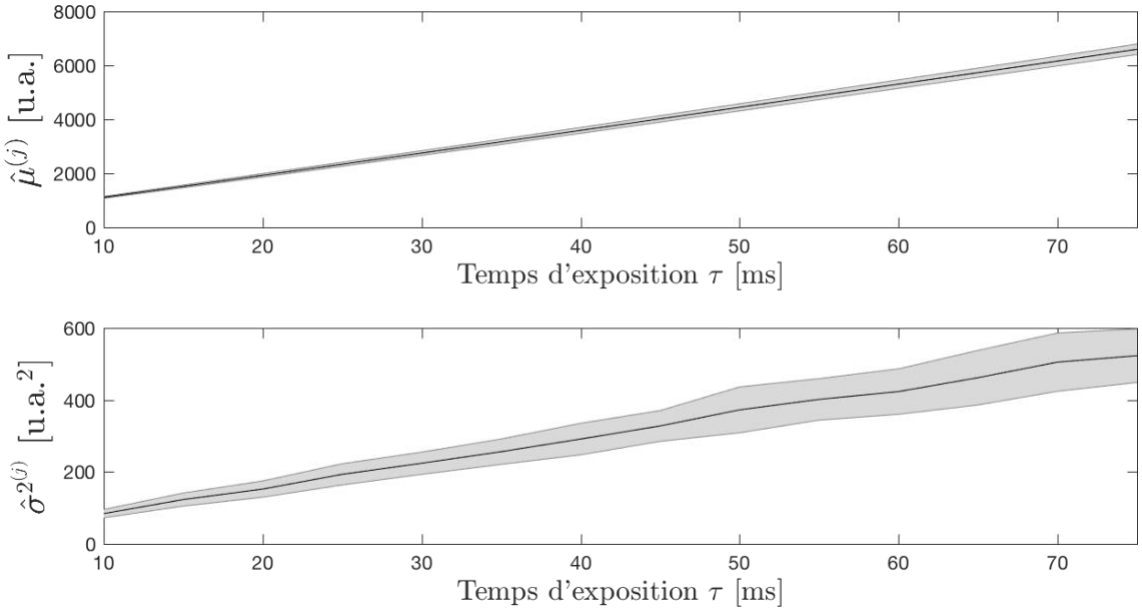

Figure 3.3 : Paramètres de la distribution de $\varepsilon^{(j)}$estimés, $\hat{\mu}^{(j)}$ et $\hat{\sigma}^{2(j)}$, en fonction du temps d'exposition τ lorsque la température du détecteur $T = -10°\text{C}$

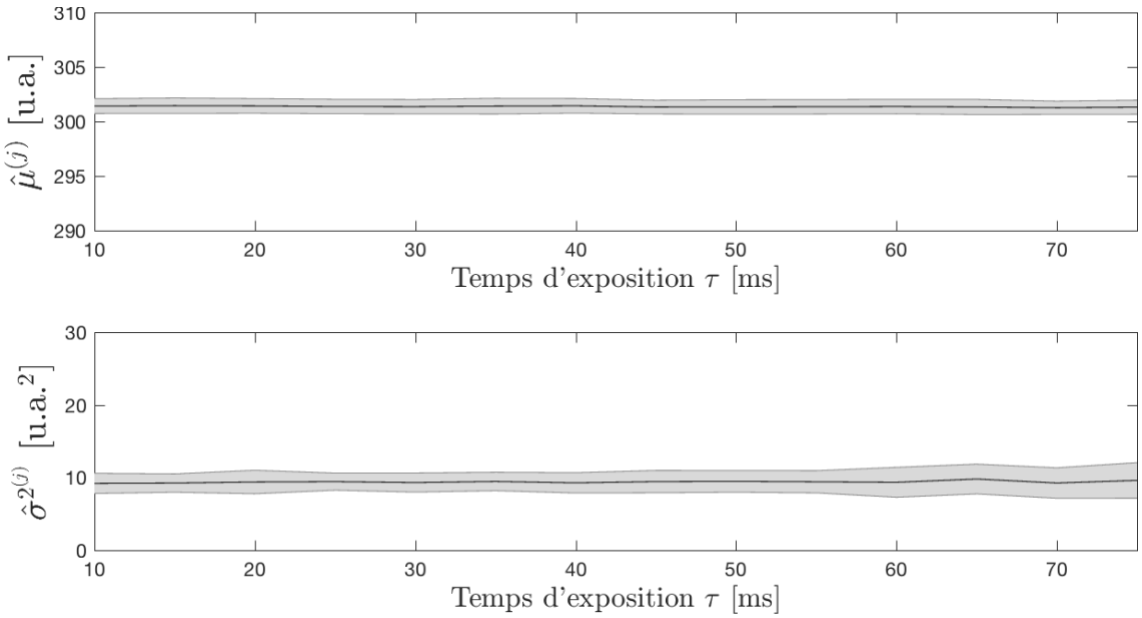

Figure 3.4 : Paramètres de la distribution de $\varepsilon^{(j)}$estimés, $\hat{\mu}^{(j)}$ et $\hat{\sigma}^{2(j)}$, en fonction du temps d'exposition τ lorsque la température du détecteur $T = -80°\text{C}$

3.2.2 Bruit de Lecture

À la section précédente, il a été montré que le BT est négligeable lorsque la température du détecteur est fixée à $-80°\text{C}$, pour tous les temps d'exposition jusqu'à au moins une centaine de millisecondes. Dans ces conditions, obstruer la fente d'entrée du spectromètre fait en sorte que toute mesure $y_n^{(j)}$ est uniquement composée du BL. En effectuant $n = 100$ acquisitions, les équations (2.7) et (2.8) permettent d'estimer les paramètres $\mu_{BL}^{(j)}$ et $\sigma_{BL}^{2\ (j)}$ de la distribution du BL, et ce pour tout j. Or, le bruit de lecture est identiquement distribué pour chacune des j mesures d'une acquisition étant donné que la caméra n'est équipée que d'un seul dispositif de mesure de charges. Il est donc raisonnable de poser l'approximation

$$\begin{aligned} \mu_{BL} &= \mu_{BL}^{(j)}\ \forall\, j \\ \sigma_{BL}^2 &= \sigma_{BL}^{2\ (j)}\ \forall\, j \end{aligned} \tag{3.3}$$

Étant donné les paramètres d'acquisition du Tableau 3.1, il est possible d'estimer et d'obtenir un intervalle de confiance sur les paramètres de la distribution du BL étant donné que lorsque le ML est *FVB*, $j = 1 \ldots 1024$. Ainsi, la valeur des paramètres estimés retenue est la moyenne calculée sur les j mesures et l'intervalle de confiance est deux fois l'écart-type. Les valeurs numériques peuvent être obtenues directement de la Figure 3.4, pour $\tau = 75\text{ms}$, et sont présentées à l'équation (3.4).

$$\begin{aligned} \hat{\mu}_{BL} &= 301.3 \pm 1.0 \\ \hat{\sigma}_{BL}^2 &= 9.5 \pm 2.7 \end{aligned} \tag{3.4}$$

L'objectif est maintenant d'explorer l'espace des paramètres d'acquisition afin de tenter de réduire la moyenne et la variance du BL. Ceux-ci ne valent toutefois pas tous la peine d'être explorés. D'abord, il a été établi que la température du détecteur T devrait rester sous $-60°\text{C}$, idéalement $-80°\text{C}$, afin que celui-ci demeure limité par le BL. Il a aussi été établi que, dans ce régime, les paramètres de la distribution du bruit sont indépendants du temps d'exposition τ. Finalement, le MA ne risque pas d'affecter les paramètres de la distribution du BL, car il ne sert qu'à définir les paramètres d'une séquence d'acquisitions, tels que le nombre et le délai entre chacune d'elle.

Par ailleurs, bien que celui-ci n'affecte pas la moyenne et la variance du BL sur chaque mesure $y_n^{(j)}$, le ML est le paramètre d'acquisition ayant le plus grand impact sur le BL effectif. En effet, au-delà d'effectuer une acquisition, l'objectif est d'obtenir un spectre, c'est-à-dire un vecteur représentant l'intensité mesurée en fonction de la longueur d'onde. Tel que décrit à la section 2.2.2, l'image formée par le système optique du spectromètre sur le détecteur est bidimensionnelle (2D). Son axe vertical est spatial et correspond à l'axe de la fente par laquelle la lumière entre, alors que l'axe horizontal est spectral et correspond aux longueurs d'onde de la lumière. Or, seule l'information spectrale est requise pour obtenir le spectre. Lorsque le ML *image* est utilisé, le spectre peut être obtenu en additionnant les valeurs des 256 mesures contenues dans chaque colonne de l'image, ce qui forme un vecteur de 1024 valeurs. Or, le BL affecte chacune de ces 256 mesures et s'additionne donc du même coup, faisant en sorte que la moyenne et la variance du BL effectif du i^e élément du spectre correspondent à 256 fois ceux du BL. Autrement, lorsque le ML *FVB* est utilisé, la caméra accumule les charges photo-générées dans les registres de lecture avant d'en faire la lecture. Ainsi, la moyenne et la variance du BL effectif du i^e élément du spectre sont ceux du BL. Il est donc primordial d'utiliser le ML *FVB* afin de minimiser le BL effectif sur le spectre mesuré.

Les paramètres restant à explorer sont la VDV, la VDH, le gain *G* et le *BC*. Pour chacun, 100 acquisitions sont effectuées pour chaque valeur disponible alors que les autres paramètres d'acquisition utilisés sont ceux du Tableau 3.1. Les paramètres de la distribution du BL sont ensuite estimés de la même façon que pour ceux présentés à l'équation (3.4). D'abord, le Tableau 3.2 présente la moyenne et la variance estimée du BL en fonction de la VDV. Il est possible de constater que ce paramètre n'a presque pas d'influence sur les paramètres de la distribution du BL, mais que de plus faibles valeurs de VDV diminuent légèrement la moyenne du bruit. La valeur de ce paramètre proposée au Tableau 3.1 est donc convenable. Ensuite, le Tableau 3.3 présente la moyenne et la variance du BL en fonction de la VDH. Il est possible de constater que le fait d'utiliser la valeur 1MHz réduit d'environ 15% la variance du BL. Toutefois, cela implique un temps de lecture du registre de lecture 2.5 fois plus long ce qui ne vaut pas la peine, surtout en présence de BG. Encore une fois, la valeur de ce paramètre proposée au Tableau 3.1 est convenable. Finalement, le Tableau 3.4 présente la moyenne et la variance estimée du BL en fonction du paramètre *BC* et du gain *G*. Alors que son effet sur la variance du BL n'est pas clair, il est possible de constater que le paramètre *BC* affecte considérablement la moyenne du bruit en la diminuant

significativement et en la rendant presque indépendante de *G*. Il donc préférable d'activer la fonction *BC*, tel que déjà proposé au Tableau 3.1. Aussi, il est possible de constater au Tableau 3.4 que *G* affecte significativement la variance du BL et multiplie approximativement celle-ci par la valeur du gain utilisé. De plus faibles valeurs de gain sont donc préférables. Ainsi, les paramètres d'acquisition présentés au Tableau 3.1 sont déjà ceux qui minimisent le BL et les valeurs estimées de la moyenne et de la variance du BL associées à ces paramètres d'acquisition sont celles présentées à l'équation (3.4).

Tableau 3.2 : Moyenne et variance estimée du BL en fonction de la VDV

VDV [μs]	$\hat{\mu}_{BL}$ **[u.a.]**	$\hat{\sigma}^2_{BL}$ **[u.a.^{2}]**
1	301.2 ± 1.0	9.5 ± 2.7
1.8	301.3 ± 1.0	9.5 ± 2.7
3.4	301.2 ± 0.9	9.5 ± 2.6
6.6	301.4 ± 0.9	9.6 ± 2.8
13	305.6 ± 1.9	9.5 ± 2.7
25.8	305.5 ± 1.9	9.7 ± 2.8
51.4	305.6 ± 1.9	9.5 ± 2.7
102.6	305.2 ± 1.6	9.6 ± 2.6
153.8	304.9 ± 1.4	9.7 ± 2.7

Tableau 3.3 : Moyenne et variance estimée du BL en fonction de la VDH

VDH [MHz]	$\hat{\mu}_{BL}$ **[u.a.]**	$\hat{\sigma}^2_{BL}$ **[u.a.^{2}]**
1	300.0 ± 0.6	7.9 ± 2.2
2.5	301.3 ± 1.0	9.5 ± 2.7

Tableau 3.4 : Moyenne et variance estimée du BL en fonction du paramètre *BC* du gain *G*

BC	***G***	$\hat{\mu}_{BL}$ **[u.a.]**	$\hat{\sigma}^2_{BL}$ **[u.a.^{2}]**
Oui	1x	301.3 ± 1.0	9.5 ± 2.7
Oui	2x	302.4 ± 2.0	20.0 ± 5.6
Oui	4x	304.4 ± 4.1	58.4 ± 17
Non	1x	717.4 ± 1.1	12.8 ± 3.5
Non	2x	1400.6 ± 2.9	20.0 ± 5.7
Non	4x	1681.4 ± 6.3	54.7 ± 15.3

3.2.3 Bruit de Grenaille

Jusqu'à maintenant, les bruits étudiés n'étaient pas liés au signal optique et étaient donc indépendants de son intensité. L'estimation des paramètres de leurs distributions pouvait donc être réalisée en effectuant des acquisitions dans l'obscurité. Toutefois, tel que mentionné à la section 2.2.2.3, le BG est proportionnel à l'intensité du signal optique, car il provient de la nature discrète des photons et consiste en une fluctuation du nombre de charges photo-générées pendant le temps d'exposition τ. En d'autres mots, soient n acquisitions composées de j mesures $y_n^{(j)}$ effectuées alors que le signal optique à détecter est maintenu constant. La j^e mesure de la n^e acquisition correspond au nombre de charges photo-générées dans la jonction MOS pendant τ, lors de cette acquisition en particulier. Or, la nature discrète des photons fait en sorte que ce nombre varie aléatoirement d'une acquisition à l'autre; le nombre de photons observés à chaque observation est une variable aléatoire ayant une distribution de Poisson. Ce type de distribution peut être approximé par une gaussienne de moyenne et variance égales. Si la quantité d'intérêt x est la moyenne de cette distribution, c'est-à-dire le nombre moyen de charges photo-générées dans la jonction pendant τ, sa variance agit comme du bruit et constitue le BG. Ainsi, par définition, le BG est de moyenne nulle et sa variance est proportionnelle au nombre moyen de charges photo-générées dans la jonction pendant τ, donc à l'intensité du signal optique x.

La stratégie expérimentale afin d'estimer la variance du BG en fonction de x, l'intensité du signal optique mesuré par une jonction MOS, consiste d'abord en effectuer n acquisitions du spectre optique d'une Diode Électroluminescente (DEL) infrarouge. Celui étant de forme gaussienne, il permet de mesurer plusieurs niveaux d'intensité optique lors d'une même acquisition et il est aisé de trouver une source d'alimentation électrique continue afin de maintenir son intensité constante. La Figure 3.5 présente la superposition de $n = 10$ acquisitions du spectre optique d'une DEL infrarouge obtenues avec les paramètres d'acquisition du Tableau 3.1. Il est possible de constater que ces 10 acquisitions sont pratiquement indistinguables les unes des autres, car l'intensité du spectre optique de la DEL est constante. Aussi, le spectre est de forme gaussienne et couvre de façon continue les intensités de 310 à 13,000 u.a. d'intensité.

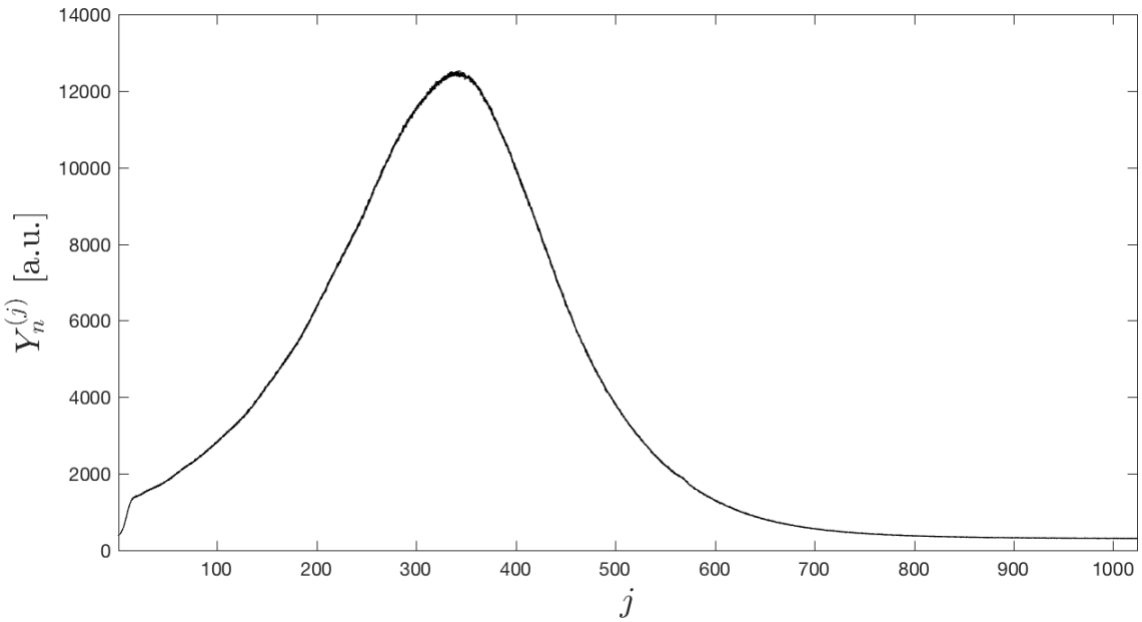

Figure 3.5 : Superposition de $n = 10$ acquisitions de spectres optiques d'une DEL infrarouge obtenues avec les paramètres d'acquisition du Tableau 3.1

Tel que modélisé à l'équation (3.1), les valeurs d'intensités $y_n^{(j)}$ présentées à la Figure 3.5 correspondent à la somme de l'intensité du signal optique mesuré par une jonction MOS, $x^{(j)}$, et du bruit de la caméra $\varepsilon_n^{(j)}$. Ce dernier est composé du BL et du BG et sa distribution est celle présentée à l'équation (2.21). Ainsi, il est possible d'estimer $x^{(j)}$ en calculant la moyenne des mesures $y_n^{(j)}$ sur les n acquisitions et en soustrayant la moyenne du BL estimée pour les mêmes paramètres d'acquisition :

$$\hat{x}^{(j)} = \left(\frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n} y_i^{(j)}\right) - \hat{\mu}_{BL} \tag{3.5}$$

De façon similaire, il est possible d'estimer ${\sigma_{BG}^2}^{(j)}$ en calculant la variance sur les n mesures $y_n^{(j)}$, de laquelle est soustraite la moyenne du BL, puis en soustrayant la variance du BL estimée pour ces paramètres d'acquisition, tel que présenté à l'équation (3.6).

$${\hat{\sigma}_{BG}^2}^{(j)} = \left(\frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n}\left(\left(y_i^{(j)} - \hat{\mu}_{BL}\right) - \hat{x}_i^{(j)}\right)^2\right) - \hat{\sigma}_{BL}^2 \tag{3.6}$$

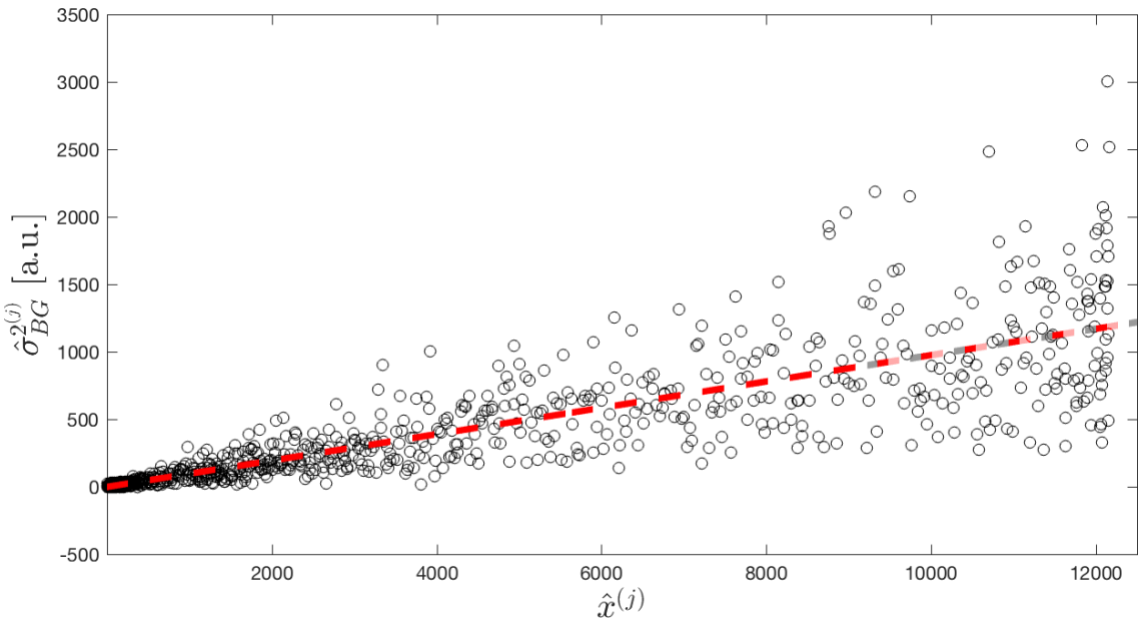

Figure 3.6 : Graphique de type nuage de point pour chacune des j paires $\hat{x}^{(j)}$ et $\hat{\sigma}_{BG}^{2}{}^{(j)}$ estimées. La ligne rouge pointillée est la régression linéaire entre les deux variables

Finalement, $\hat{x}^{(j)}$ et $\hat{\sigma}_{BG}^{2}{}^{(j)}$ sont estimés pour tous les j et chaque paire est rapportée dans un graphique de type nuage de point, présenté à la Figure 3.6. Il est possible de constater qu'il y a une forte corrélation entre les variables, tel qu'attendu. Il est donc possible d'utiliser la régression linéaire afin d'obtenir la relation entre celles-ci. La ligne rouge pointillée est le résultat de cette régression linéaire de pente $a = 0.1$ et d'origine b nulle, tel présentée à l'équation (3.7). Le paramètre a est donc le coefficient de proportionnalité entre la variance du BG et l'intensité du signal. Ainsi, la variance du BG est égale à 10% de l'intensité du signal optique.

$$\hat{\sigma}_{BG}^{2}{}^{(j)} = a\hat{x}^{(j)} + b = 0.1\hat{x}^{(j)} \tag{3.7}$$

Étant donné l'équation (3.1), où $\varepsilon_n^{(j)}$ est composé du BL et du BG et dont la distribution est présentée à l'équation (2.21), $x^{(j)}$ correspond à $y^{(j)}$ moins la moyenne du BL. L'équation (3.7) se réécrit donc

$$\hat{\sigma}_{BG}^{2}{}^{(j)} = 0.1\left(y^{(j)} - \hat{\mu}_{BL}\right) \tag{3.8}$$

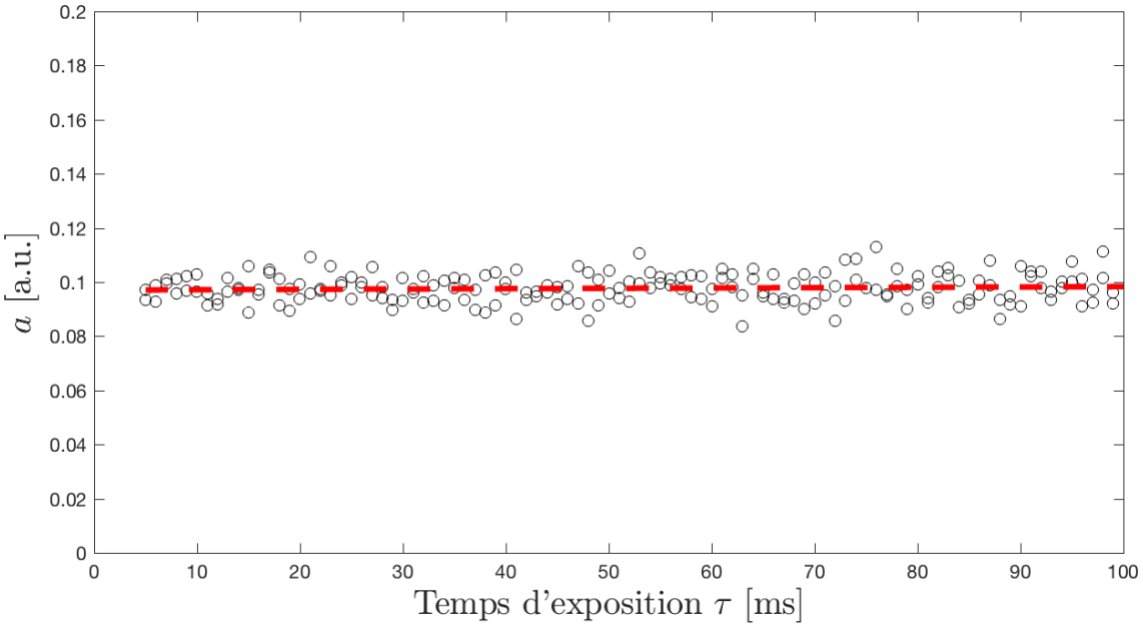

Figure 3.7 : Coefficient de proportionnalité *a* entre la variance du BG et l'intensité du signal détecté en fonction du temps d'exposition τ de la caméra

Par ailleurs, la nature du BG fait en sorte que l'ajustement d'aucun paramètre d'acquisition ne permet de diminuer *a*, le coefficient de proportionnalité entre la variance du BG et l'intensité du signal. D'abord, la température du détecteur *T*, le paramètre *BC*, la VDV, la VDH, le ML et le MA n'ont rien à voir avec le nombre de photons détectés et donc avec la variance du BG. À l'inverse, le temps d'exposition τ est fondamentalement relié à l'intensité du signal détecté; tel que mentionné à la section 2.2.2.3, le taux moyen de charges photo-générées est constant donc l'intensité du signal détecté est proportionnelle à τ. Il pourrait donc sembler intuitif que ce paramètre puisse avoir un impact sur la distribution du BG et donc sur *a*. Néanmoins, tel que montré à la Figure 3.7, le coefficient de proportionnalité entre la variance du BG et l'intensité du signal détecté est indépendant du temps d'exposition; la pente de la régression linéaire, représentée par la ligne pointillée rouge, est nulle. Finalement, le gain *G* agit en multipliant l'intensité du signal détecté par une constante 1, 2 ou 4. Or, la variance du signal se trouve affectée quadratiquement par cette même constante. La constante de proportionnalité *a* est donc multipliée par *G*.

3.3 SNR de la caméra

Tel que mentionné à la section 2.2.1, le SNR est un indicateur de la qualité du signal. Il correspond au rapport entre la valeur mesurée de la quantité physique en question et la variance de la mesure. En considérant le gain de la caméra G et en utilisant la modélisation de la mesure présentée à l'équation (3.1) ainsi que la distribution du bruit de l'équation (2.21), il est possible de réécrire l'équation du SNR de l'équation (2.13) comme

$$\mathrm{SNR}^{(j)} = \frac{\sqrt{n}\, G x^{(j)}}{\sqrt{\hat{\sigma}_{BL}^2 + \hat{\sigma}_{BG}^2{}^{(j)}}} \tag{3.9}$$

De plus, l'équation (3.7) montre que la variance du BG et l'intensité du signal optique $x^{(j)}$ sont reliés par une constante de proportionnalité égale à 0.1. En considérant l'effet de G sur ces derniers, l'équation (3.9) se réécrit donc :

$$\mathrm{SNR}^{(j)} = \frac{\sqrt{n}\, G x^{(j)}}{\sqrt{\hat{\sigma}_{BL}^2 + (0.1G)(Gx^{(j)})}} \tag{3.10}$$

Tel que mentionné à la section précédente, $x^{(j)}$ correspond à $y^{(j)}$ moins la moyenne du BL. L'équation (3.10) se réécrit donc

$$\mathrm{SNR}^{(j)} = \frac{\sqrt{n} G\left(y^{(j)} - \hat{\mu}_{BL}\right)}{\sqrt{\hat{\sigma}_{BL}^2 + 0.1G^2(y^{(j)} - \hat{\mu}_{BL})}} \tag{3.11}$$

Or, il a été déterminé à la section 3.2.2 que l'ordre de grandeur de la variance du BL est de l'ordre d'une dizaine d'u.a. au carré, dépendamment des paramètres d'acquisition. En comparaison, le terme $\left(y^{(j)} - \hat{\mu}_{BL}\right)$ peut prendre des valeurs entre 0 et un peu plus de 60,000 u.a. d'intensité. Le BG peut donc largement dominer le BL, dépendamment de l'intensité du signal mesuré. Supposons que la condition nécessaire pour que le BG domine le BL soit $\hat{\sigma}_{BG}^2 > 10\hat{\sigma}_{BL}^2$, alors le détecteur est limité par le BG lorsque $\left(y^{(j)} - \hat{\mu}_{BL}\right) > 1000$ u.a. Dans cette situation, l'équation (3.11) se simplifie significativement et devient

$$\mathrm{SNR}^{(j)} = 3.16\sqrt{n(y^{(j)} - \hat{\mu}_{BL})} \tag{3.12}$$

Il est intéressant de constater que le terme de gain disparait de l'équation du SNR de la caméra lorsque cette dernière est limitée par le BG. De plus, l'équation (3.12) montre qu'il est possible de déterminer la qualité de la mesure à partir de la valeur de la mesure elle-même. En d'autres mots, il est possible de calculer le SNR d'une mesure d'intensité optique simplement à partir de la valeur mesurée. Aussi, cette équation met en évidence qu'augmenter le nombre de mesures n et augmenter l'intensité du signal optique sont deux façons équivalentes d'améliorer le SNR. Ce dernier augmentera toutefois proportionnellement à la racine carrée de ces quantités.

Maintenant que les paramètres d'acquisitions de la caméra optimaux sont connus, que la mesure de l'intensité optique par la caméra est modélisée, que les paramètres de la distribution du BL et du BG sont estimés et que l'équation du SNR de la caméra est établie, la prochaine étape est de s'intéresser à l'effet du signal d'Auto-Fluorescence (AF) sur la mesure du spectre Raman.

CHAPITRE 4 AMÉLIORATION DU SNR RAMAN EN PRÉSENCE DE L'AUTO-FLUORESCENCE DES TISSUS

L'expression empirique du SNR de la caméra établie au Chapitre 3 est un indicateur de la qualité de chacune des *j* mesures effectuées par la caméra CCD, c'est-à-dire l'intensité du signal optique mesuré par chacune des *j* colonnes de jonctions MOS, étant donné le BL et le BG. Tel que mentionné au Chapitre 2, le signal optique dans le contexte de ce projet est le spectre de la lumière collectée à la surface d'un échantillon de tissu biologique qui, sous l'effet d'une source d'excitation laser, émet un signal Raman et un signal d'Auto-Fluorescence (AF). Si l'échantillon est isolé de toute source de lumière ambiante, le signal optique collecté est seulement composé du spectre de ces deux signaux. Or, seul le signal Raman contient l'information sur les biomarqueurs du cancer, et il faut pouvoir le discriminer du signal d'AF. Parmi les différentes méthodes présentées à la section 2.2.3, le partenaire industriel a choisi d'implémenter un Algorithme de Régression Polynomiale Automatisée (ARPA) permettant d'estimer le signal d'AF afin de le soustraire au signal mesuré, ne laissant que le signal Raman. Le signal d'AF induit toutefois du BG sur la mesure qui ne peut pas être retiré par la suite. Dans ce chapitre, un modèle plus étoffé de la mesure du signal Raman est d'abord établi, puis un indicateur de qualité de la mesure de ce dernier, le SNR Raman, est formulé à partir de l'expression du SNR de la caméra établie au chapitre précédent. Cet indicateur est alors utilisé pour quantifier la qualité du signal Raman de matière grise de cerveau de porc ex-vivo. Ensuite, une stratégie permettant d'augmenter le SNR Raman est mise en place et évaluée; il s'agit d'exploiter l'effet de photo-blanchiment décrit à la section 2.2.3 afin de diminuer l'intensité du signal d'AF préalablement à la mesure. Les modifications apportées au système du partenaire industriel sont présentées et une étude du comportement temporel du signal d'AF est effectuée. Finalement, l'amélioration du SNR Raman en fonction du temps de photo-blanchiment est mesuré pour la matière grise de cerveau de porc ex-vivo.

4.1 SNR Raman de tissu biologique

4.1.1 Modélisation de la mesure du spectre d'une combinaison de signaux optiques

L'équation (3.1) du chapitre précédent modélise la mesure $y_n^{(j)}$ par la somme de l'intensité du signal optique mesuré $x^{(j)}$ et du bruit $\varepsilon_n^{(j)}$ dont la distribution est présentée à l'équation (2.21). Cette modélisation n'est toutefois pas suffisante dans le contexte de la mesure d'un spectre optique. D'abord, parce qu'elle prend en considération que toutes les longueurs d'onde collectées à la surface de l'échantillon de tissu biologique sont mesurées de façon équivalente par le système, ce qui n'est pas le cas. En effet, l'efficacité quantique E_Q des jonctions MOS varie en fonction de la longueur d'onde et le système optique acheminant les photons captés à la surface des tissus jusqu'au détecteur de la caméra CCD possède une fonction de transfert caractéristique H, elle aussi fonction de la longueur d'onde. Ensuite, cette modélisation ne tient pas en compte que plusieurs types de signaux optiques, dont le signal Raman, peuvent être collectés en même temps à la surface du tissu et que le spectre mesuré correspond à la somme des spectres de chacun des signaux pondérés par leur intensité relative. Finalement, cette modélisation ne tient pas en compte le temps d'intégration τ, le paramètre de gain G de la caméra ainsi que l'intensité du laser d'excitation I, qui sont trois paramètres importants de la mesure. Une modélisation de la mesure plus étoffée est proposée dans le cadre de ce projet afin de tenir compte de tous ces éléments.

Lors de l'exposition au laser d'excitation d'intensité I, l'échantillon de tissu biologique émet des photons issus de la diffusion Raman et des photons issus de l'AF. Les flux de photons Raman et d'AF collectés par la sonde, respectivement ϕ_R et ϕ_{AF}, sont proportionnels à I via des coefficients de proportionnalité r et a qui représentent la probabilité de chacun des phénomènes et l'efficacité de collection de la sonde. Ainsi,

$$\begin{aligned} \phi_R &= rI \\ \phi_{AF} &= aI \end{aligned} \tag{4.1}$$

Si l'échantillon est isolé de toute source de lumière ambiante, le flux total de photons collecté ϕ correspond à la somme de ϕ_R et ϕ_{AF}. Ces photons sont ensuite acheminés jusqu'au réseau de

diffraction qui fait en sorte que le chemin optique soit fonction de leur longueur d'onde, puis parviennent au détecteur de la caméra CCD. Or, tous les éléments optiques rencontrés de la collection jusqu'au détecteur occasionnent des pertes plus ou moins grandes en fonction de la longueur d'onde, caractérisées par la fonction de transfert H. Ainsi, la j^e colonne de jonctions MOS du détecteur reçoit un flux total

$$\phi^{(j)} = H^{(j)}\left[r^{(j)}I + a^{(j)}I\right] \tag{4.2}$$

Ce flux de photons entraîne la photo-génération de charges dans les jonctions MOS, et ce avec une efficacité quantique E_Q qui est fonction de la longueur d'onde. Ainsi, pendant un temps d'exposition τ, le nombre de charges photo-générées au total dans la j^e colonne de jonctions MOS est

$$\tau E_Q^{(j)}\phi^{(j)} = \tau E_Q^{(j)}H^{(j)}\left[r^{(j)}I + a^{(j)}I\right] \tag{4.3}$$

Étant donné que leur effet sur la mesure est similaire, E_Q et H sont regroupés pour former la réponse du système R qu'il est ensuite possible d'estimer. En tenant compte du terme de gain G qui multiplie le signal lors de la lecture, le nombre de charges photo-générées *mesurées* pendant le temps d'exposition τ est donc

$$x^{(j)} = G\tau IR^{(j)}\left[r^{(j)} + a^{(j)}\right] \tag{4.4}$$

Ainsi, la modélisation de la mesure s'écrit maintenant tel qu'à l'équation (4.5), où le terme de bruit $\varepsilon_n^{(j)} \sim N(0, \sigma_{BL}^2 + \sigma_{BG}^{2\,(j)})$

$$y_n^{(j)} = G\tau IR^{(j)}\left[r^{(j)} + a^{(j)}\right] + \mu_{BL} + \varepsilon_n^{(j)} \tag{4.5}$$

Or, il est possible d'estimer la réponse du système en effectuant la mesure d'un échantillon étalon. Le partenaire industriel l'a d'ailleurs déjà estimé pour son prototype de spectromètre Raman en utilisant la norme intitulée *Standard Guide for Relative Intensity Correction of Raman Spectrometers*, publiée par *l'American Section of the international association for Testing Material* (ASTM), ainsi que l'échantillon du matériau SRM 2241 prévu à cette fin [53]. La réponse estimée du système $\hat{R}^{(j)}$ est donc fournie sous la forme d'un vecteur de coefficients normalisés, tel que

présenté à la Figure 4.1. Ces coefficients ont pour objectif de réduire ou d'augmenter l'amplitude de certaines régions du spectre mesuré afin de le corriger pour les variations d'efficacité quantique de la caméra CCD et pour la fonction de transfert du système optique. En effet, il est possible de constater à la Figure 4.1 de fortes oscillations pour $j < 400$, caractéristiques des filtres optiques placés dans la sonde Raman. Aussi, la forte décroissance de la réponse pour $j > 400$ est caractéristique de la plus faible efficacité quantique du détecteur CCD pour des photons ayant des longueurs d'ondes plus grandes.

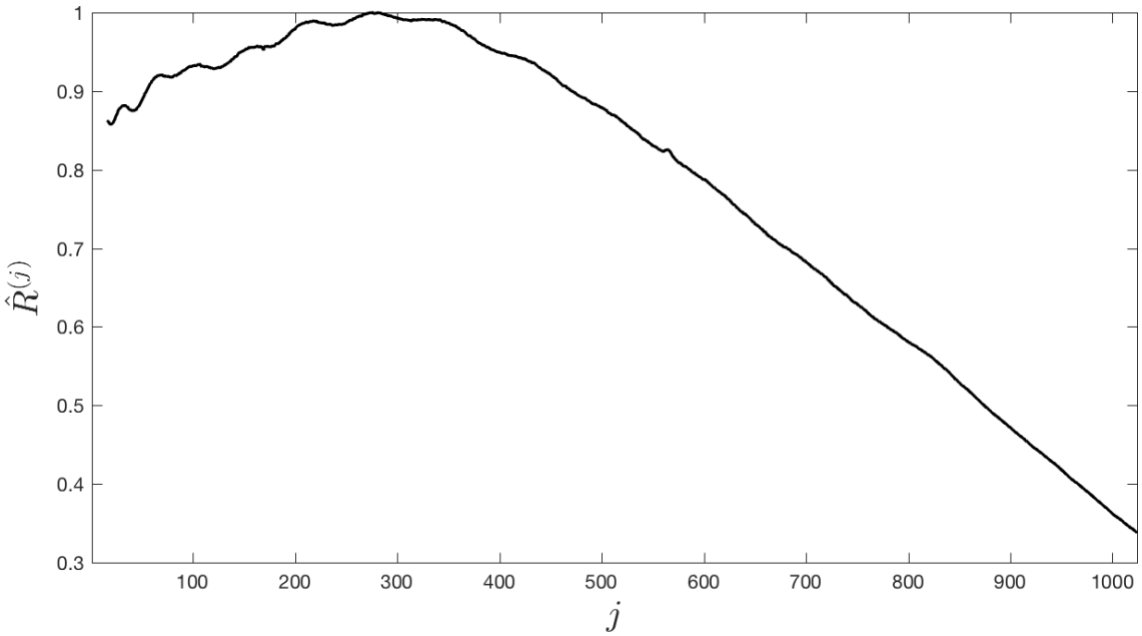

Figure 4.1 : Réponse du système estimée $\hat{R}^{(j)}$

La réponse du système permet ensuite d'obtenir $y'^{(j)}_n$ la mesure corrigée par la réponse du système, présentée à l'équation (4.6). Il est à noter que, dans l'expression de la mesure corrigée, la variance de la distribution du terme de bruit est affectée quadratiquement par la réponse du système et devient $\left[\sigma_{BL}^2 + \sigma_{BG}^{2\,(j)}\right] / \hat{R}^{(j)^2}$. Il s'agit de la modélisation de la mesure proposée dans le cadre de ce projet.

$$y'^{(j)}_n = \frac{y_n^{(j)} - \hat{\mu}_{BL}}{\hat{R}^{(j)}} = G\tau I\left[r^{(j)} + a^{(j)}\right] + \varepsilon'^{(j)}_n \tag{4.6}$$

4.1.2 Définition du SNR Raman

De façon générale, le SNR est un indicateur de la qualité de la mesure d'un signal d'intérêt en présence de bruit et correspond au rapport entre l'amplitude de ce signal et le bruit, tel qu'établi à la section 3.3. En reprenant l'équation (3.9) et en considérant la modélisation de la mesure proposée à l'équation (4.6), l'expression du SNR Raman est

$$\mathrm{SNR}_{\mathrm{Raman}}^{(j)} = \frac{\sqrt{n}\, G\tau I r^{(j)}}{\sqrt{\left[\sigma_{BL}^2 + \sigma_{BG}^{2\ (j)}\right] / \hat{R}^{(j)2}}} \tag{4.7}$$

Or, tel qu'établi au Chapitre 3, la variance du BG et l'intensité du signal optique $x^{(j)}$ sont reliés par une constante de proportionnalité égale à $0.1G$. L'équation (4.7) se réécrit donc

$$\mathrm{SNR}_{\mathrm{Raman}}^{(j)} = \frac{\hat{R}^{(j)}\sqrt{n}\, G\tau I r^{(j)}}{\sqrt{\sigma_{BL}^2 + (0.1G)\left(G\tau I \hat{R}^{(j)}[r^{(j)} + a^{(j)}]\right)}} \tag{4.8}$$

Dans le contexte de la mesure d'un spectre Raman de tissu biologique, l'intensité du signal d'AF est toujours au moins un ordre de grandeur supérieur à celle du signal Raman. Il est ainsi raisonnable de supposer que l'intensité du signal détecté est suffisamment élevée pour qu'à toute fin pratique le détecteur soit toujours limité par le BG, c'est-à-dire que $\sigma_{BG}^{2\ (j)} \gg \sigma_{BL}^2$ pour tout j. Ainsi, l'équation (4.8) se réécrit :

$$\mathrm{SNR}_{\mathrm{Raman}}^{(j)} = \frac{3.16\sqrt{n\tau I \hat{R}^{(j)}}\, r^{(j)}}{\sqrt{r^{(j)} + a^{(j)}}} \tag{4.9}$$

L'équation (4.9) est une des contributions originales de ce projet et elle permet d'établir comment maximiser le SNR Raman :

- Il faut viser à maximiser l'amplitude du signal détecté afin que celui-ci occupe autant que possible toute la plage dynamique de la caméra;
- Augmenter le temps d'exposition τ de la caméra et l'intensité I du laser sont des façons équivalentes d'améliorer le SNR Raman;

- Si et seulement si le détecteur est limité par le BG, le nombre d'acquisitions *n* est une autre façon équivalente d'augmenter le SNR Raman;
- Le gain de la caméra n'affecte pas SNR Raman;
- La réponse du système devrait être aussi constante que possible sur toute la plage de longueurs d'onde;
- L'intensité du signal d'AF devrait être minimale.

Cette définition du SNR Raman n'est toutefois pas tout à fait adéquate, car elle est spécifique à chaque plage de longueur d'onde *j* alors qu'il serait préférable d'avoir un seul indicateur pour un spectre au complet. Une première approche est de calculer la moyenne du SNR Raman sur tous les *j* afin d'obtenir le SNR Raman moyen pour un spectre :

$$\overline{\mathrm{SNR}}_{\mathrm{Raman}} = \frac{1}{1024}\sum_{j=1}^{1024} \mathrm{SNR}_{\mathrm{Raman}}^{(j)} \tag{4.10}$$

Toutefois, de par sa nature, le signal Raman est nul pour certaines plages de longueurs d'onde, comme c'est le cas pour le spectre Raman de l'acétaminophène présenté à la Figure 2.2. En conséquence le SNR Raman est aussi nul à ces plages de longueur d'onde, car le signal ne contient pas d'information et seulement du bruit. Cela fait en sorte de diminuer la valeur du SNR Raman moyen calculé en utilisant cette première approche. Ainsi, au lieu de faire la moyenne sur tous les *j*, ce projet propose d'identifier au préalable les *k* plages de longueur d'onde $J \in j$ qui contiennent l'information sur le spectre Raman. L'équation (4.10) se réécrit alors :

$$\overline{\mathrm{SNR}}_{\mathrm{Raman}} = \frac{1}{k}\sum_{J \in j} \mathrm{SNR}_{\mathrm{Raman}}^{(J)} \tag{4.11}$$

Finalement, il existe plusieurs façons de définir les plages de longueur d'onde J à retenir pour le calcul du SNR Raman moyen. Dans le cadre de ce projet, plusieurs spectres Raman sont d'abord mesurés sur les échantillons du tissu biologique à l'étude et la moyenne de ces spectres est calculée. Ensuite, le 10% des plages de longueur d'onde ayant la plus grande amplitude est retenu pour former J, donc $k = 0.1 * 1024 \approx 100$.

4.1.3 Mesure expérimentale du SNR Raman moyen de tissu biologique

Étant donné que la première application du système de spectroscopie Raman du partenaire industriel vise à effectuer la classification d'échantillons de tissu cérébral humains afin d'identifier lesquels sont affectés par le cancer, le tissu biologique étudié dans cette section est choisi de façon à être aussi similaire que possible à celui-ci. Il s'agit de la matière grise d'un cerveau de porc ex-vivo frais, mesuré moins d'une heure après la mort de l'animal. Ainsi, 50 mesures sont effectuées sur ce cerveau en utilisant un temps d'exposition $\tau = 150$ms, une intensité laser $I = 100$mW, un gain $G = 4$ et $n = 1$ acquisition est effectuée à chaque fois. Tous les autres paramètres d'acquisition de la caméra sont ceux définis au Tableau 3.1. La mesure a été réalisée en collaboration avec le Laboratoire de Radiologie Optique (LRO) et l'animalerie du Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CrCHUM).

Tel que mentionné à la section précédente, la première étape est de déterminer les k plages de longueur d'ondes $J \in j$ qui contiennent l'information sur le spectre Raman afin de pouvoir calculer le SNR Raman moyen avec l'équation (4.11). D'abord, les spectres Raman des 50 acquisitions sont obtenues. En estimant le terme $r^{(j)} + a^{(j)}$ à partir de l'équation (4.6) :

$$\widehat{r^{(J)} + a^{(J)}} = \frac{y_n^{(j)} - \hat{\mu}_{BL}}{\hat{R}^{(j)} G\tau I} \tag{4.12}$$

Il est ensuite possible d'estimer $r^{(j)}$ en utilisant un ARPA sur le terme $\widehat{r^{(J)} + a^{(J)}}$ afin d'estimer $a^{(j)}$, puis soustraire $\hat{a}^{(j)}$ à $\widehat{r^{(J)} + a^{(J)}}$:

$$\hat{r}^{(j)} = \widehat{r^{(J)} + a^{(J)}} - \hat{a}^{(j)} = \widehat{r^{(J)} + a^{(J)}} - \mathrm{ARPA}\left[\widehat{r^{(J)} + a^{(J)}}\right] \tag{4.13}$$

La moyenne des 50 spectres Raman ainsi estimés est ensuite calculée et les $k = 100$ indices ayant la plus grande amplitude sont identifiés, tel que présenté à la Figure 4.2. Ce sont ces indices qui constituent J.

Finalement, le SNR Raman tel que défini à l'équation (4.11) est calculé pour chacune des 50 mesures. Les valeurs numériques sont rapportées à la Figure 4.3. Ainsi, pour ce type de tissu biologique, le SNR Raman moyen est d'environ 6.6 unités.

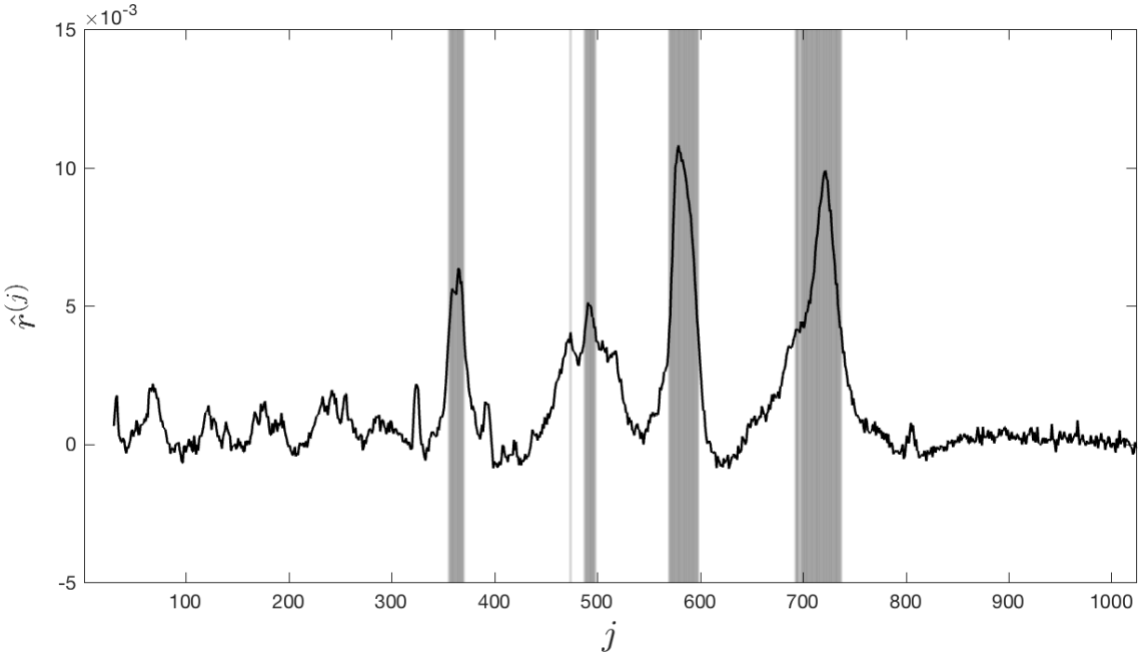

Figure 4.2 : Moyenne des 50 spectres Raman de matière grise provenant d'un cerveau de porc ex-vivo. Les $k = 100$ indices ayant la plus grande amplitude sont identifiées par les bandes grises

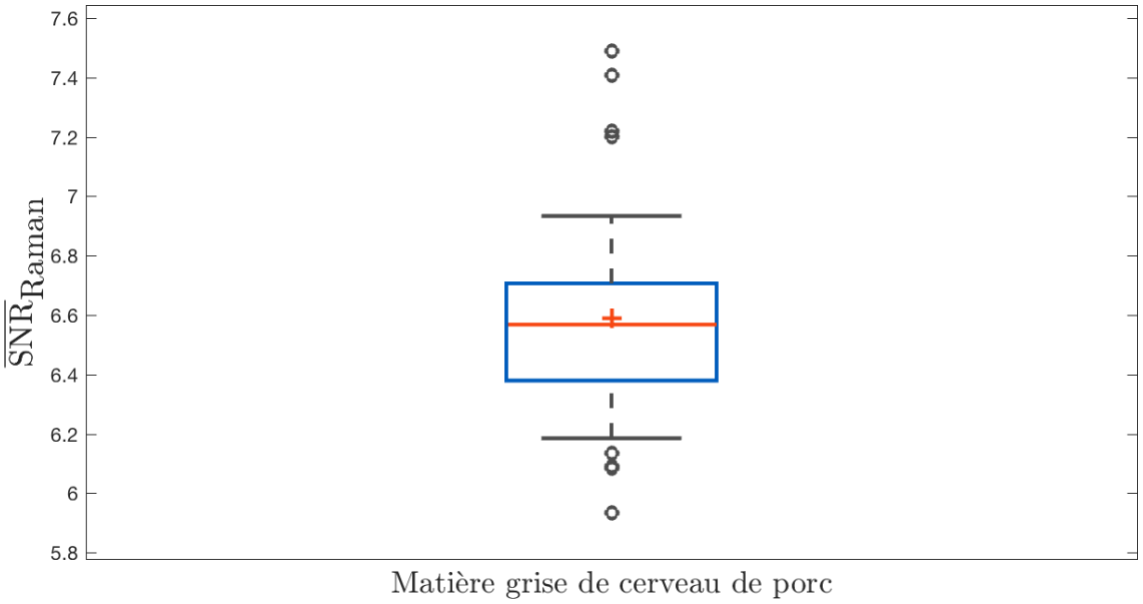

Figure 4.3 : SNR Raman calculé avec l'équation (4.11) et les k indices J présentés à la Figure 4.2 pour les 50 mesures de matière grise de cerveau de porc

4.2 Amélioration du SNR Raman par photo-blanchiment des tissus biologiques

Le photo-blanchiment d'un tissu biologique consiste en un affaiblissement de l'intensité de son signal d'AF sous l'exposition continue du laser d'excitation. Or, tel que mentionné à la section précédente, le SNR Raman est inversement proportionnel à l'intensité du signal d'AF. Il est ainsi possible d'exploiter ce phénomène afin d'améliorer le SNR Raman; en exposant l'échantillon de tissu biologique quelques instants avant la mesure, le signal d'AF est affaibli ce qui a pour effet d'améliorer le SNR Raman. Le photo-blanchiment de tissu biologique est étudié dans ce projet et son effet sur le SNR est mesuré.

4.2.1 Modifications apportées au système du partenaire industriel

Le photo-blanchiment est un phénomène temporel. Afin de l'étudier, il faut pouvoir mesurer l'intensité du spectre du signal d'AF de façon répétée, et ce à une fréquence suffisamment élevée pour pouvoir l'observer. En d'autres mots, il faut pouvoir faire de la spectroscopie résolue dans le temps. Dans le cadre de ce projet, cela est réalisé en apportant certaines modifications au système de spectroscopie Raman du partenaire industriel présenté à la section 2.1.3. Celles-ci visent à améliorer la synchronisation entre le laser et la caméra CCD en exploitant son MA *Kinetic Series* et son Mode de Déclenchement (MD) *External*.

D'une part, le MA *Kinetic Series* de la caméra Andor Newton 920 permet d'effectuer automatiquement une série d'acquisitions paramétrées par n le nombre d'acquisitions à effectuer, τ le temps d'exposition de chaque acquisition et τ_0 le délai entre chaque acquisition. Or, chacune de ces acquisitions mesure l'intégrale dans le temps, pendant τ ms, de l'intensité du spectre du signal optique. Une autre interprétation est qu'il s'agit de l'intensité moyenne du signal optique pendant la période d'acquisition, à la constante τ près. En posant $t = 0$ au début de la première acquisition, la m^e acquisition est centrée au temps $t^{(m)}$ tel que présenté à l'équation (4.14). Étant donné les paramètres d'acquisition du Tableau 3.1, le délai minimal entre chaque acquisition est $\tau_0 = 5$ms.

$$t^{(m)} = \left(m - \frac{1}{2}\right)\tau + (m-1)\tau_0 \quad , \quad m = 1 \dots n \tag{4.14}$$

D'autre part, la caméra est équipée de deux ports permettant d'interagir avec un microcontrôleur. Ce dernier pourra alors agir en tant que maître d'orchestre et synchroniser les acquisitions de la caméra avec d'autres instruments tels qu'un laser ou un obturateur. Le premier, étiqueté *Fire Pin*, est une sortie de niveau logique qui présente l'état 1 pendant que la caméra effectue une acquisition et 0 autrement. La détection d'un flanc montant ou descendant sur ce port permet au microcontrôleur de détecter, respectivement, le début et la fin d'une acquisition. Le deuxième, étiqueté *External Trigger*, est une entrée de niveau logique permettant de déclencher une acquisition lorsqu'un flanc montant ou descendant est généré par le microcontrôleur, à condition que le MD de la caméra soit configuré à *External*.

La stratégie d'acquisition consiste en utiliser un microcontrôleur afin d'agir en maître d'orchestre pour contrôler l'allumage et l'extinction du laser d'excitation ainsi que les acquisitions de la caméra CCD, tout en effectuant un minimum de modifications au système du partenaire industriel présenté à la Figure 2.3. Lorsque l'utilisateur du logiciel commande une série de n acquisitions, celui-ci notifie la caméra et le microcontrôleur que la mesure peut débuter. L'état du laser d'excitation ainsi que des ports de la caméra lors d'une acquisition sont présentés à la Figure 4.4, pour $n = 4$ $\tau_0 = 5\text{ms}$ et $\tau = 25\text{ms}$. Au temps $t = 0$, le microcontrôleur allume le laser d'excitation et déclenche une acquisition de la caméra en générant un flanc montant sur le port *External Trigger*. Dès que cette acquisition débute, le niveau sur le port *Fire Pin* de la caméra est mis au niveau logique 1, puis revient à 0 lorsque celle-ci termine. Ce flanc descendant est détecté par le microcontrôleur qui déclenche une nouvelle acquisition, après avoir attendu un temps τ_0, en générant un flanc descendant sur le port *External Trigger*. Finalement, après avoir détecté la fin de la n^e acquisitions, le microcontrôleur éteint le laser et la caméra envoie au logiciel un vecteur de $n * 1024$ entiers sur 16 bits, ce qui constitue les n spectres mesurés.

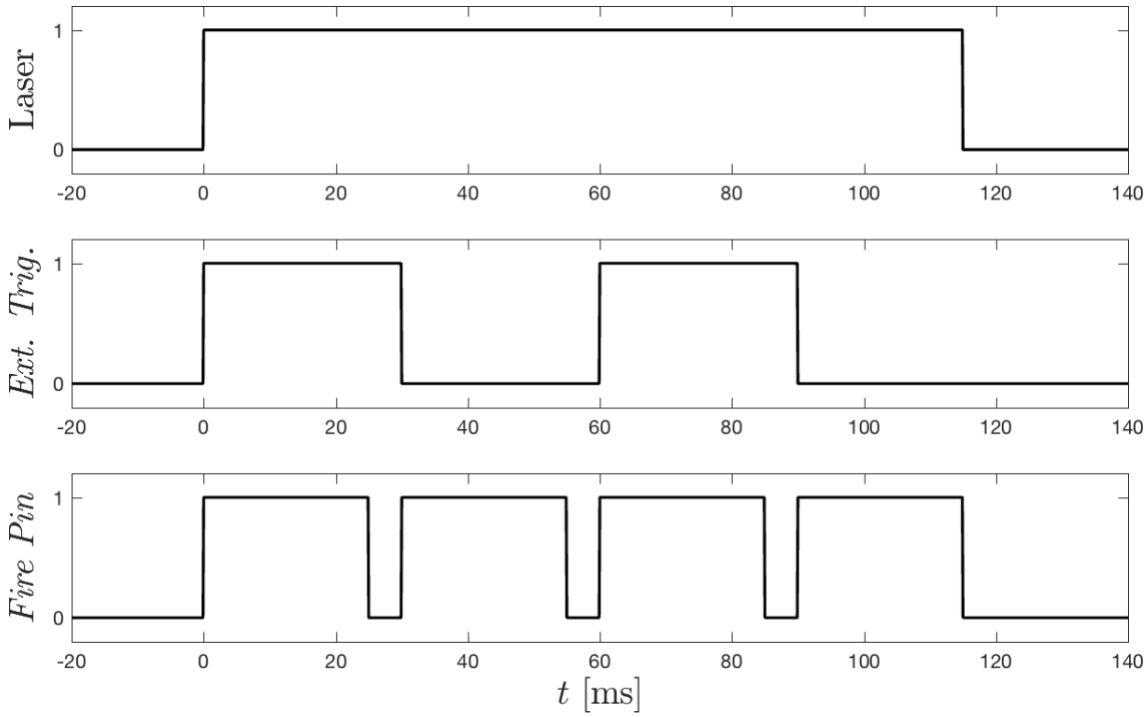

Figure 4.4 : État du laser d'excitation ainsi que des ports *External Trigger* et *Fire Pin* de la caméra en fonction du temps lors d'une série d'acquisitions, pour $n = 4$, $\tau_0 = 5$ms et $\tau = 25$ms

Les modifications apportées au système du partenaire industriel afin de mettre en place cette stratégie d'acquisition se divisent en deux groupes, les modifications matérielles et les modifications logicielles. Les modifications matérielles consistent en relier physiquement les deux ports de la caméra décrits précédemment avec le microcontrôleur déjà utilisé dans le système pour contrôler le laser. En effet, dans le schéma du système présenté à la Figure 2.3, il a été négligé de représenter le microcontrôleur placé entre le logiciel et le laser d'excitation. C'est en fait lui qui permet d'activer le laser lors d'une mesure du spectre Raman sous la commande du logiciel. Les ports de la caméra sont ainsi reliés à ce microcontrôleur avec des câbles coaxiaux; le port *Fire Pin* est connecté sur une de ses entrées digitales avec interruption et le port *External Trigger* est connecté sur une de ses sorties digitales. Le schéma du système modifié pour ce projet est présenté à la Figure 4.5. Afin de rendre plus fiables les connexions, la caméra, le laser et le microcontrôleur, un circuit de connecteurs est assemblé sur une plaque à trou verte et monté sur celui-ci à la manière d'un *Shield*. Le circuit assemblé et installé est présenté à la Figure 4.6.

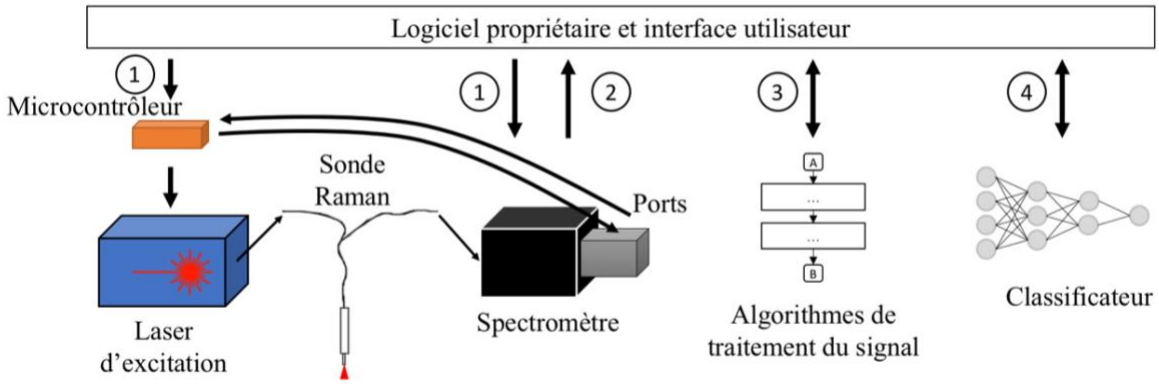

Figure 4.5 : Schéma du système de spectroscopie d'ODS Médical modifié afin d'effectuer de la spectroscopie résolue dans le temps

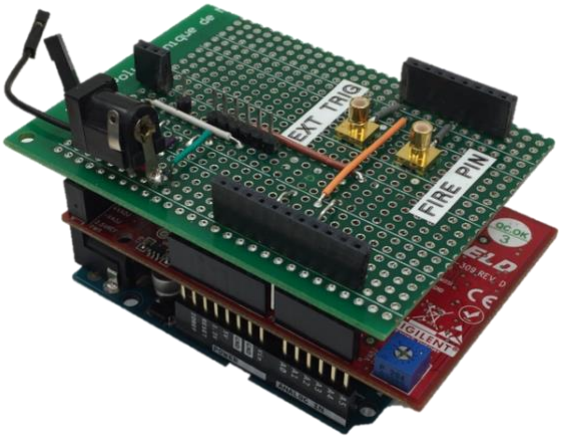

Figure 4.6 : Circuit de connecteurs, assemblé sur une plaque à trou verte, installé sur le microcontrôleur à la manière d'un *Shield*

Pour ce qui est des modifications logicielles, le protocole de communication entre le logiciel et le programme embarqué du microcontrôleur est modifié afin de transmettre à ce dernier le nombre d'acquisitions *n* à effectuer lors de la prochaine série. Ensuite, le programme embarqué du microcontrôleur est modifié afin d'utiliser les interruptions et d'implémenter l'algorithme qui correspond à la mise en œuvre de la stratégie d'acquisition présentée. Finalement, certains paramètres d'initialisations sont modifiés dans le logiciel afin d'utiliser le MA *Kinetic Series* et le MD *External Trigger* de la caméra.

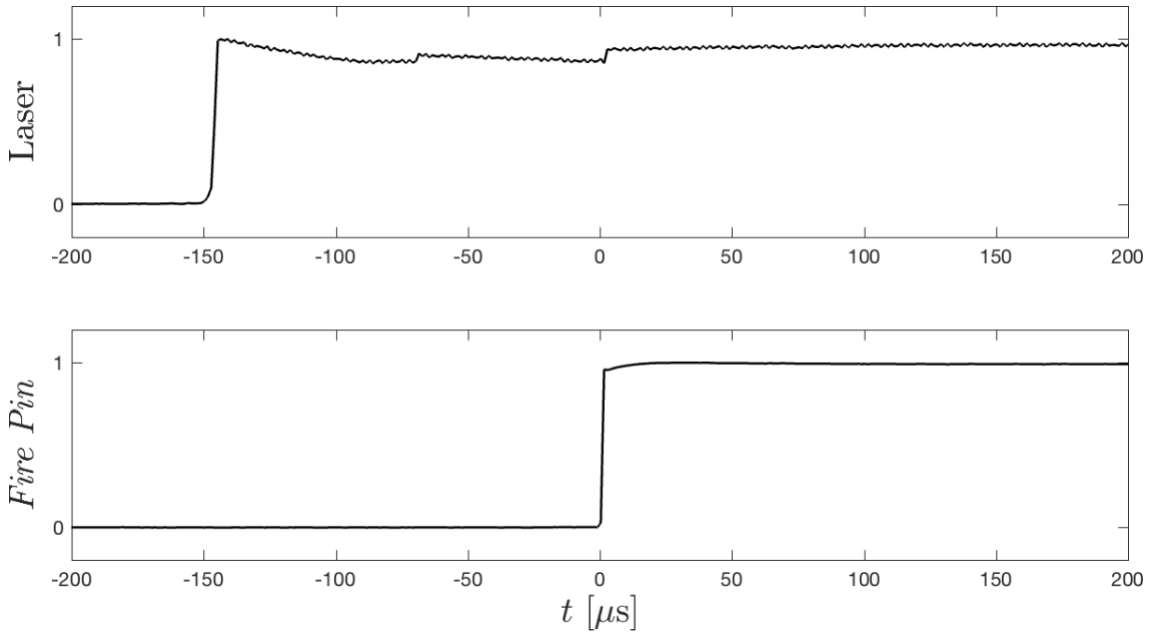

Figure 4.7 : Oscillogrammes des états du laser d'excitation et du port *Fire* Pin de la caméra CCD tel que $t = 0$ correspond à l'instant où l'acquisition commence

Une fois la stratégie d'acquisition mise en place, les délais de synchronisation entre le laser et la caméra sont mesurés à l'aide d'un oscilloscope numérique à deux canaux. Le premier canal mesure la tension sur le port de la caméra *Fire Pin* tandis que le deuxième canal mesure la tension de sortie d'une photodiode sur laquelle pointe la sonde Raman connectée au laser. Une mesure avec $n = 1$ acquisition est alors lancée dans le logiciel. Deux délais doivent être mesurés. Le premier est celui séparant l'allumage du laser et le début de l'acquisition. La mesure est réalisée en configurant le *trigger* de l'oscilloscope de façon à assigner le temps $t = 0$ à l'instant où un flanc montant est détecté sur le port *Fire Pin*, c'est-à-dire lorsque la caméra débute l'acquisition. Le résultat de la mesure est présenté à la Figure 4.7. Il est possible de constater que le laser s'allume environ 150μs avant le début de l'acquisition, ce qui correspond au fonctionnement désiré.

Le deuxième délai est celui séparant la fin de l'acquisition de l'extinction du laser. De façon similaire, la mesure est réalisée en configurant le *trigger* de l'oscilloscope de façon à assigner le temps $t = 0$ à l'instant où un flanc descendant est détecté sur le premier canal, c'est-à-dire lorsque la caméra termine l'acquisition. Le résultat de la mesure est présenté à la Figure 4.8. Il est possible de constater que le laser s'éteint environ 25μs après la fin de l'acquisition, ce qui correspond aussi au fonctionnement désiré.

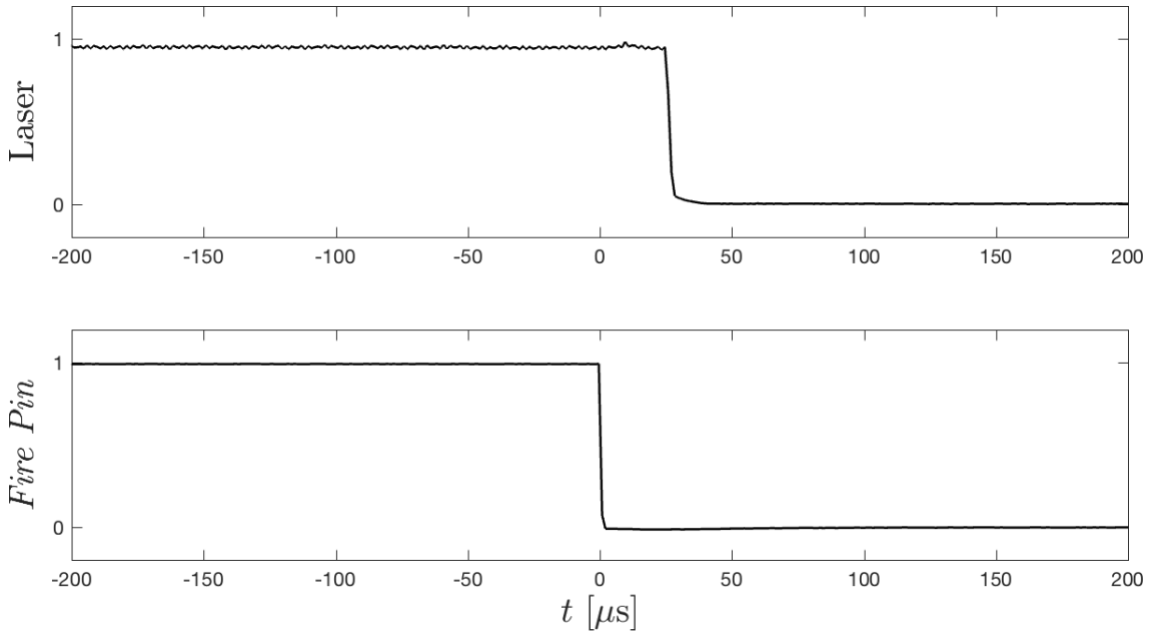

Figure 4.8 : Oscillogrammes des états du laser d'excitation et du port *Fire* Pin de la caméra CCD tel que $t = 0$ correspond à l'instant où l'acquisition se termine

4.2.2 Caractérisation temporelle du signal d'AF de tissu biologique

Afin de pouvoir observer le phénomène de photo-blanchiment avec à la fois une résolution temporelle et un SNR raisonnable, le temps d'acquisition de la caméra est fixé à 25ms et l'intensité du laser d'excitation à 100mW. Aussi, afin d'observer le phénomène sur une certaine période, le nombre d'acquisitions n de la série est fixé à 100. Ainsi, l'échantillon de tissu biologique est exposé au laser d'excitation pendant 3 secondes au total.

Or, l'intensité du laser d'excitation varie quelque peu pendant ces 3 secondes; le passage de 0mW à ImW est caractérisé par un profil de stabilisation $\kappa_I(t)$. Cela affecte l'intensité des signaux Raman et d'AF détectés et devient un facteur confondant pour l'étude du photo-blanchiment. Toutefois, le profil de stabilisation est répétable et propre à l'intensité cible I. Ainsi, l'intensité du laser en fonction du temps lorsque $I = 100mW$ est modélisée comme le produit du profil de stabilisation par l'intensité cible:

$$I_{100}(t) = 100 * \kappa_{100}(t) \tag{4.15}$$

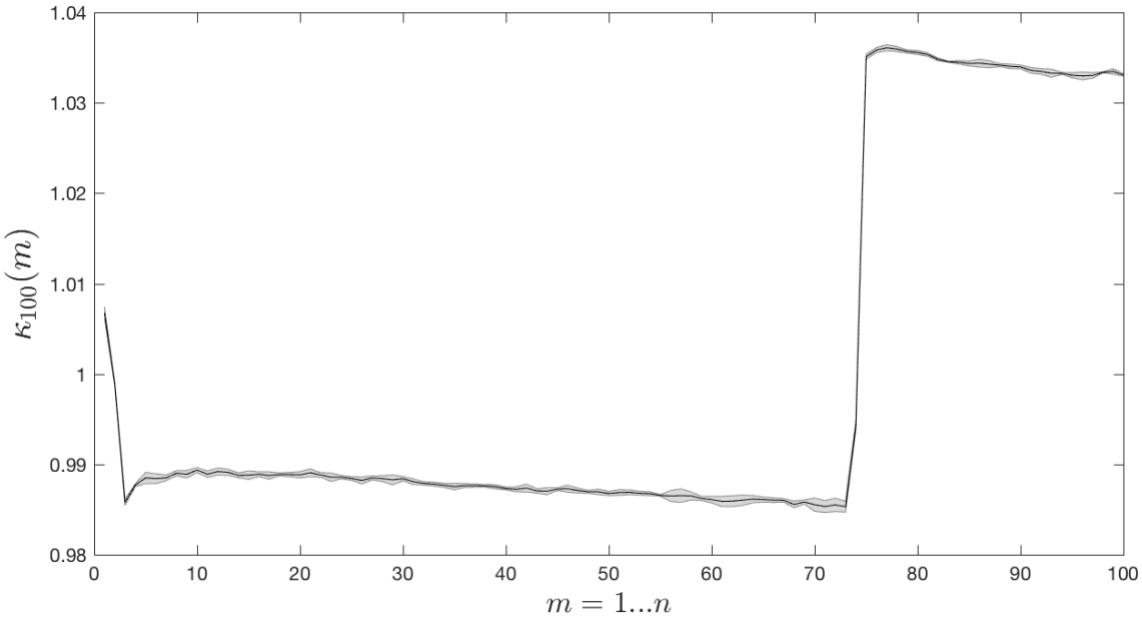

Figure 4.9 : Profil de stabilisation du laser d'excitation tel qu'observé par la caméra CCD étant donné les paramètres d'acquisition utilisés pour l'étude du phénomène de photo-blanchiment

Il est donc nécessaire de caractériser $\kappa_{100}(t)$ au préalable. La façon la plus simple de procéder étant donné le contexte est d'utiliser le système du partenaire afin d'effectuer la mesure du spectre Raman d'un échantillon ne présentant pas de photo-blanchiment, soit l'échantillon SRM 2241 mentionné à la section 4.1.1. Cela est possible étant donné que l'intensité du spectre Raman de cet échantillon est strictement proportionnelle à l'intensité du laser d'excitation. Les paramètres d'acquisition utilisés sont ceux présentés plus haut, soit $\tau = 25$ms, $I = 100$mW et $n = 100$. Ainsi, les variations d'intensité du signal sur les 100 acquisitions correspondent à $\kappa_{100}(m)$, $m = 1 \dots n$, c'est-à-dire le profil de stabilisation du laser tel qu'observé par la caméra CCD. La Figure 4.9 présente celui-ci, obtenu en calculant l'intensité spectrale moyenne des 100 spectres de l'échantillon SRM 2241 et en normalisant par la moyenne sur toutes les acquisitions. La mesure étant répétée 10 fois, le profil de stabilisation moyen est représenté par la ligne continue noire et l'écart-type des mesures par la région grise sur la Figure 4.9. Il est possible de constater que $\kappa_{100}(m)$ est pratiquement le même pour les 10 mesures et qu'il est relativement de faible amplitude.

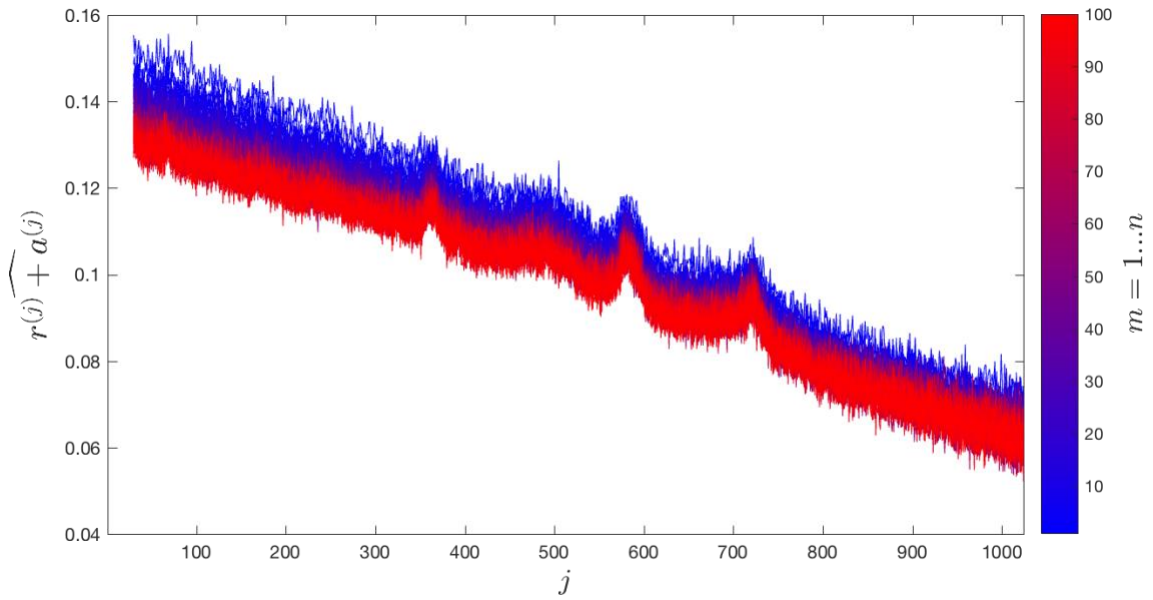

Figure 4.10 : Estimation de la somme du spectre Raman et du spectre d'AF pour les 100 acquisitions lors de la mesure sur l'échantillon de matière grise de cerveau de porc

Une mesure est ensuite effectuée sur un échantillon de matière grise de cerveau de porc, le même que celui utilisé pour les mesures de la section 4.1.3, en utilisant les paramètres d'acquisition mentionnés plus haut. Pour chacune des 100 acquisitions, le terme $r^{(j)} + a^{(j)}$ de l'équation (4.6) est estimé à l'aide de l'équation (4.12) et leur intensité est corrigée par le profil de stabilisation du laser. Ces spectres sont tracés à la Figure 4.10 avec une couleur variant du bleu au rouge en fonction de l'indice m associé. Ainsi, le premier spectre de la série, pour lequel $m = 1$, est tracé en bleu et le dernier, pour lequel $m = 100$, est tracé en rouge.

Un ARPA est ensuite utilisé afin d'estimer le spectre d'AF $\hat{a}^{(j)}$ pour chacun des 100 spectres de la Figure 4.10. Étant donné que celui-ci agit à la manière d'un filtre passe-bas, les spectres résultants sont très peu bruités. Ceux-ci sont présentés à la Figure 4.11. Il est possible de constater que l'intensité du signal d'AF décroît au fil des acquisitions en raison du phénomène de photo-blanchiment, et cela plus rapidement pour les premières acquisitions que pour les dernières. De plus, la décroissance est plus prononcée lorsque l'intensité du signal d'AF est plus grande.

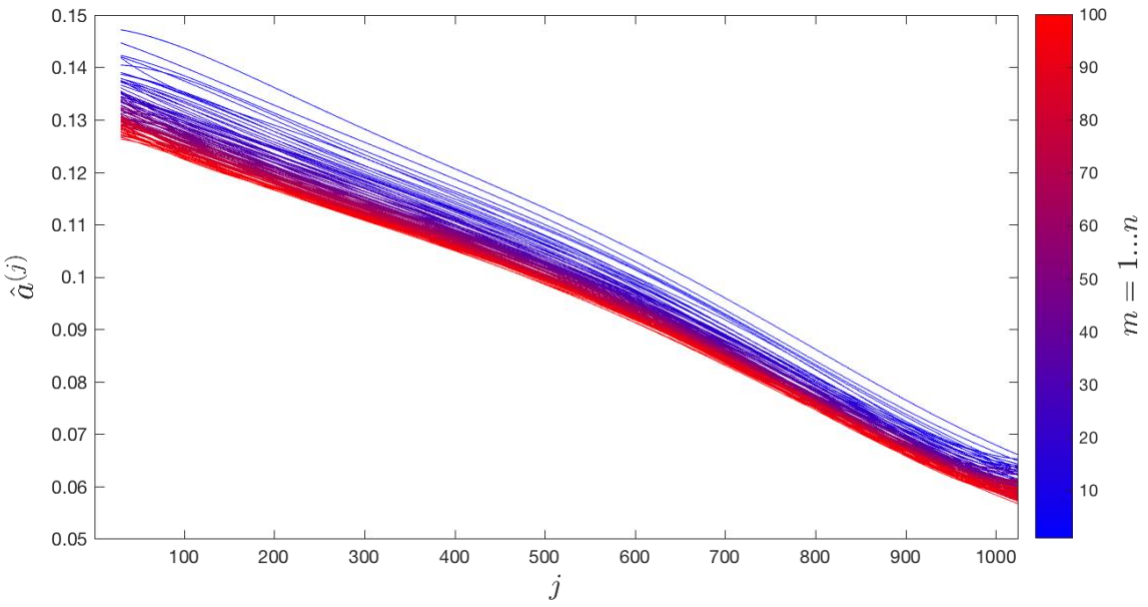

Figure 4.11 : Spectre d'AF estimé pour les 100 acquisitions effectuées lors de la mesure sur l'échantillon de matière grise de cerveau de porc

Ensuite, une plage de longueur d'onde j est arbitrairement choisie et l'intensité du spectre d'AF à cette plage est tracée à la Figure 4.12 en fonction temps d'exposition t au laser d'excitation, obtenu avec l'équation (4.14). Il est à noter que l'abscisse est tracée sur une échelle logarithmique. Il s'avère qu'il est possible d'ajuster un modèle de régression linéaire de façon convaincante aux donné dans cet espace, ce qui signifie que la décroissance du signal d'AF causée par le photo-blanchiment est une fonction logarithmique de t. Ainsi, l'équation (4.16) modélise l'intensité du spectre d'AF pour la j^{e} plage de longueur d'onde en fonction de t, où $p^{(j)}$ est le taux de photo-blanchiment et $b^{(j)}$ est l'intensité initiale du signal.

$$a^{(j)}(t) = -p^{(j)} \ln t + b^{(j)} \tag{4.16}$$

Il est possible de montrer que $p^{(j)}$ et $b^{(j)}$ sont tous deux strictement proportionnels à $a^{(j)}(t = 0)$ via des coefficients de proportionnalité ρ et β, mais la valeur de ceux-ci peut varier considérablement d'un échantillon de tissu à l'autre. Pour cette raison, ils ne seront pas évalués. L'équation (4.16) s'écrit alors :

$$a^{(j)}(t) = a^{(j)}(-\rho \ln t + \beta) \tag{4.17}$$

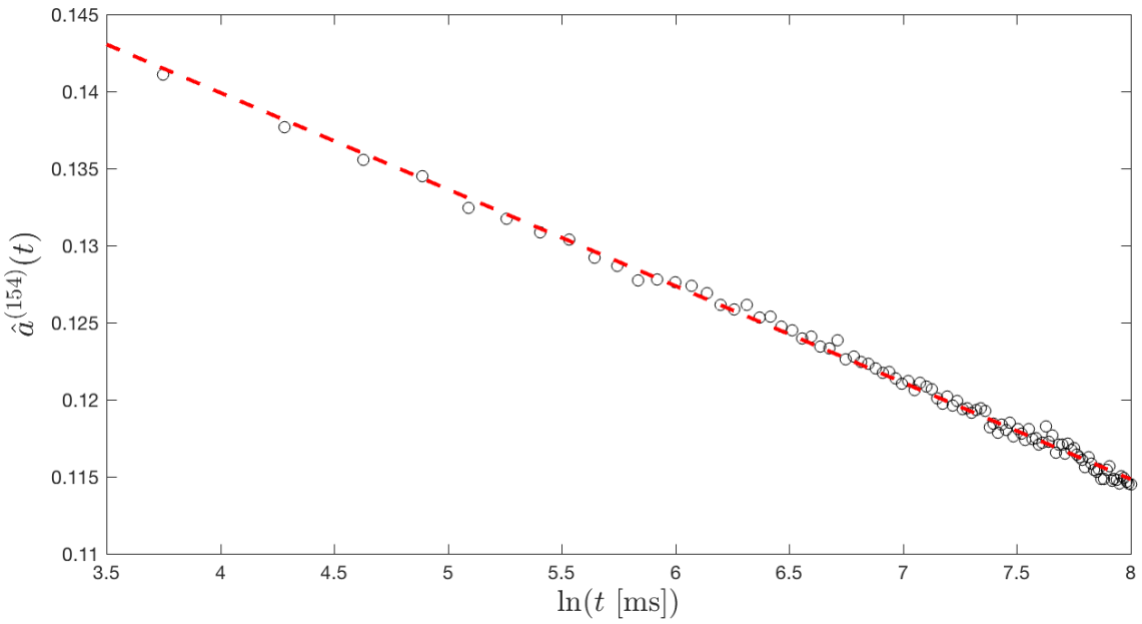

Figure 4.12 : Intensité du spectre d'AF estimé à la plage de longueur d'onde $j = 154$ en fonction du logarithme du temps d'exposition au laser d'excitation

4.2.3 SNR Raman en fonction du temps

En combinant l'équation (4.9) et l'équation (4.17), il est possible d'établir l'expression du SNR Raman pour la j^{e} plage de longueur d'onde en fonction du temps afin de tenir compte du phénomène de photo-blanchiment :

$$\mathrm{SNR}_{\mathrm{Raman}}^{(j)}(t) = \frac{3.16\sqrt{n\tau I\hat{R}^{(j)}}\, r^{(j)}}{\sqrt{r^{(j)} + a^{(j)}(-\rho \ln t + \beta)}} \tag{4.18}$$

Il est toutefois difficile de saisir à première vue le comportement du SNR Raman en fonction du temps en regardant l'équation (4.18). Ainsi, cette dernière est réécrite de façon très simplifiée à l'équation (4.19) et tracée à la Figure 4.13 en utilisant des valeurs arbitraires pour r, a, ρ et β. Il est possible de constater que le SNR Raman augmente rapidement puis converge plus lentement vers une asymptote, à la façon d'une fonction logarithmique.

$$y(t) = \frac{r}{\sqrt{r + a(-\rho \ln t + \beta)}} \tag{4.19}$$

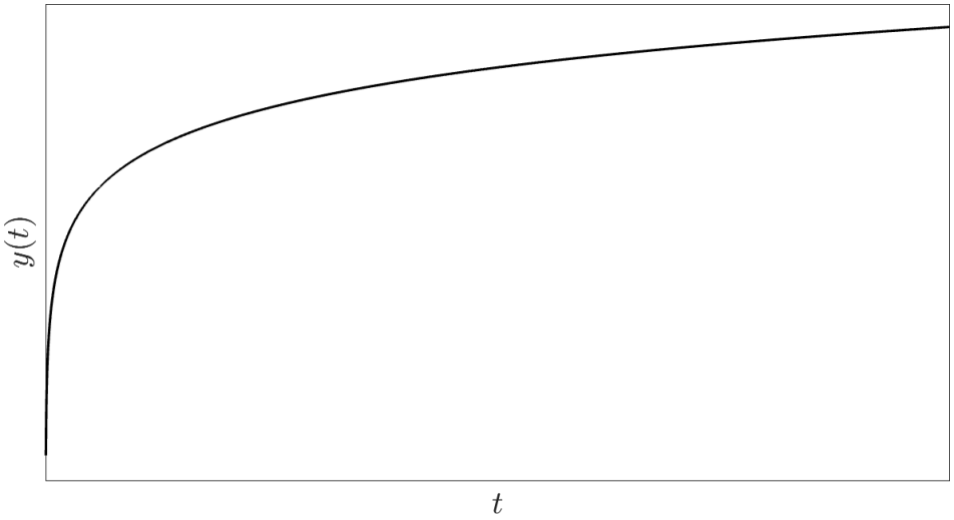

Figure 4.13 : Comportement du SNR Raman en fonction du temps (équation (4.19))

Il est ensuite possible de montrer que l'amélioration relative du SNR Raman en fonction du temps $\zeta^{(j)}(t)$ est plus grande lorsque le signal d'AF est de plus grande intensité. L'expression de $\zeta^{(j)}(t)$ est présentée à l'équation (4.20) et est tracée à la Figure 4.14 en utilisant des valeurs arbitraires fixes pour $r^{(j)}$, ρ et β et trois différentes valeurs arbitraires pour $a^{(j)}$. Ainsi, plus le signal d'AF est intense, plus l'amélioration relative du SNR Raman par photo-blanchiment est grande.

$$\zeta^{(j)}(t) = \frac{\mathrm{SNR}_{\mathrm{Raman}}^{(j)}(t)}{\mathrm{SNR}_{\mathrm{Raman}}^{(j)}} = \frac{\sqrt{r^{(j)} + a^{(j)}}}{\sqrt{r^{(j)} + a^{(j)}(-\rho \ln t + \beta)}} \tag{4.20}$$

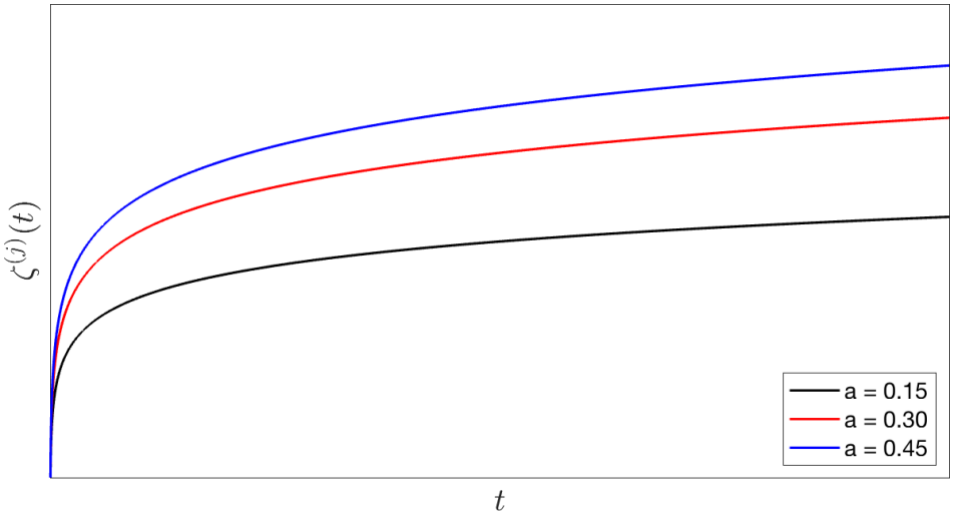

Figure 4.14 : Comportement de l'amélioration relative du SNR Raman en fonction du temps pour trois différentes valeurs arbitraires pour $a^{(j)}$

4.2.4 Mesure expérimentale du SNR Raman moyen de tissu biologique en fonction du temps

La démarche effectuée à la section 4.1.3 est répétée, mais cette fois-ci en préexposant les échantillons de tissu biologique au laser d'excitation. La façon la plus simple de procéder est de commander à la caméra une série de n acquisitions, puis d'analyser le SNR Raman moyen de chacune. Ainsi, les acquisitions effectuées plus tard dans la série ont été préexposées plus longtemps. Les échantillons de tissu biologique sont toujours de la matière grise provenant d'un cerveau de porc ex-vivo frais, mesurés moins d'une heure après la mort de l'animal. 50 mesures sont effectuées sur ce type tissu avec un temps d'exposition $\tau = 150$ms, une intensité laser $I = 100$mW, un gain $G = 4$ et $n = 20$ acquisition sont effectuées à chaque fois, pour un total de 3 secondes. Tous les autres paramètres d'acquisition de la caméra sont ceux définis au Tableau 3.1.

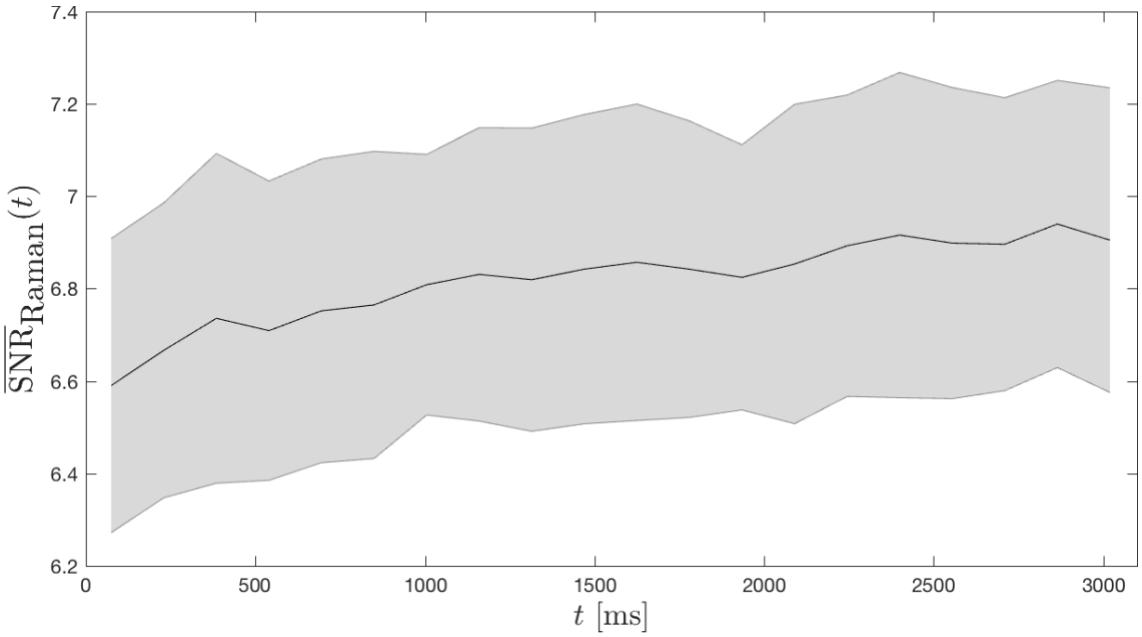

Figure 4.15 : SNR Raman moyen en fonction du temps d'exposition au laser d'excitation pour des échantillons de matière grise de cerveau de porc

La Figure 4.15 présente le SNR Raman moyen tel que défini à l'équation (4.11) en fonction du temps pendant lequel l'échantillon a été préexposé au laser d'excitation. Les mêmes indices J que ceux déterminés à la section 4.1.3 ont été utilisés. Il est possible de constater que le comportement du SNR Raman moyen est semblable à celui montré à la Figure 4.13 et donc que le modèle est valide. Toutefois, l'amélioration relative est tout au plus d'une dizaine de pourcent après 3000ms

de préexposition. Selon l'équation (4.20), elle serait supérieure si les échantillons présentaient un signal d'AF plus intense.

La modélisation de la mesure du signal Raman présentée dans ce chapitre suppose l'absence de contamination par des sources de lumière ambiante. Toutefois, dans le contexte clinique, il n'est pas nécessairement possible d'effectuer la mesure dans l'obscurité. Ainsi, le chapitre suivant propose d'utiliser la détection cohérente afin de permettre la détection du signal Raman malgré cela. La modélisation de la mesure du signal Raman est donc étoffée et l'équation du SNR Raman est reformulée pour ce cas particulier. Or, similairement au signal d'AF, le signal provenant des sources lumière ambiante induit un BG sur la mesure, ce qui pousse la recherche de solutions spécifiques.

CHAPITRE 5 DÉTECTION DU SIGNAL RAMAN EN PRÉSENCE DE SOURCES DE LUMIÈRE AMBIANTE

Il a été supposé jusqu'à maintenant que la mesure du spectre Raman prend place dans un environnement exempt de toute autre source de lumière infrarouge, ce qui est rarement le cas. Ces sources peuvent être diverses, telles que la lumière naturelle du jour, la lumière émise par des équipements d'éclairage ou le rayonnement émis par des équipements présents dans la pièce tel que le système de neuronavigation. Lors de la mesure du spectre Raman en laboratoire, il suffit de simplement fermer ces sources de lumière pour régler le problème. Cela n'est toutefois pas possible dans le contexte clinique, celui pour lequel est destiné le système de spectroscopie du partenaire industriel. En effet, la cavité chirurgicale doit pouvoir être éclairée lors de la mesure et le système de neuronavigation doit pouvoir être utilisé. Le système de spectroscopie doit donc être suffisamment robuste pour pouvoir détecter le signal Raman malgré la présence de sources de lumière ambiante. Or, une technique généralement employée pour faire face à ce genre de situation a été présentée au chapitre 2, il s'agit de la Détection Cohérente (DC). Elle consiste en la modulation du signal d'intérêt à la source pour ensuite le démoduler du signal détecté. Cette technique de détection a été implémentée dans le système du partenaire industriel dans le cadre de ce projet. Ce chapitre présente d'abord les détails d'implémentation ainsi qu'une preuve de concept effectuée en laboratoire. Ensuite, l'expression du SNR Raman de tissu biologique dans le contexte de la DC est établie. Par la suite, les six principales sources de lumière ambiante pouvant contaminer la mesure du spectre Raman sont identifiées dans les salles d'opération du Montreal Neurosurgical Institute (MNI) et du Centre de recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CrCHUM). Leur spectre optique et leur intensité en fonction du temps sont alors mesurés. Finalement, les limites et l'applicabilité de la méthode sont discutées.

5.1 Implémentation de la détection cohérente

5.1.1 Modifications apportées au système du partenaire industriel

La théorie générale de la DC est présentée à la section 2.3.2. Cette technique repose sur le fait que l'intensité de la source de lumière ambiante n'est pas corrélée avec celle du signal d'intérêt, soit la combinaison du signal Raman et du signal d'AF. Son implémentation dans le système de

spectroscopie Raman du partenaire industriel constitue l'une des réalisations importantes de ce projet.

D'abord, l'intensité du signal d'intérêt doit pouvoir être modulée à la source à une fréquence f_R. Cela est aisément réalisé par la modulation de l'intensité I du laser d'excitation. En effet, tel que mentionné au chapitre 4, l'intensité du signal Raman et du signal d'AF sont directement proportionnelles à I. Bien que la théorie présentée à la section 2.3.2 soit développée en considérant une forme d'onde sinusoïdale pour le signal de modulation V_R, il est possible et beaucoup plus simple dans ce contexte d'utiliser une forme d'onde carrée; l'intensité du laser alterne entre la valeur I et 0. De plus, étant donné que les fréquences de modulation visées sont inférieures à 1kHz, le temps de transition du laser entre les états « ouvert » et « fermé » est suffisamment court pour que la modulation de I consiste en l'alternance entre ces états. En effet, il est possible de constater à la Figure 4.7 et à la Figure 4.8 que le temps de transition du laser entre ces états est inférieur à 10μs. Il n'est donc pas nécessaire d'utiliser un modulateur optique afin de moduler l'intensité du laser d'excitation. Ensuite, le signal d'intérêt modulé ainsi que la lumière ambiante sont collectés par la sonde Raman à la surface de l'échantillon de tissu biologique et acheminés jusqu'au détecteur de la caméra CCD. Le signal d'intérêt est alors démodulé à la détection, ce qui permet de le distinguer de la lumière ambiante. Dans la théorie présentée à la section 2.3.2, la démodulation consiste d'abord en la modulation du signal détecté à la même fréquence f_R, puis en l'application d'un Filtre Passe-Bas (FPB). Dans le contexte du projet, où le détecteur est une caméra CCD et où le signal d'intérêt est modulé en onde carrée, la modulation du signal détecté est réalisée effectuant des acquisitions à la fréquence $f_R/2$. Ainsi, un cycle de modulation consiste en une acquisition de type A, lorsque l'état du laser d'excitation est « ouvert » et une autre de type B, lorsque son état est « fermé ». Cela requiert donc une très bonne synchronisation entre les acquisitions et la caméra CCD et les changements d'états du laser d'excitation. Le FPB est réalisé numériquement en calculant la moyenne de la différence entre les spectres de type A et ceux de type B.

Or, il s'avère que la version du système de spectroscopie du partenaire industriel modifiée afin d'effectuer la spectroscopie résolue dans le temps, tel que présenté à la section 4.2.1, implémente déjà presque tous les éléments permettant de réaliser la DC. En effet, le système est déjà optimisé pour effectuer une série d'acquisitions avec une synchronisation fine entre les changements d'états du laser d'excitation et le déclenchement des acquisitions. La seule modification supplémentaire

est au niveau du programme embarqué du microcontrôleur : au lieu d'éteindre le laser seulement lorsque la n^e acquisition termine, il faut l'éteindre et l'ouvrir pour toutes les acquisitions de type A.

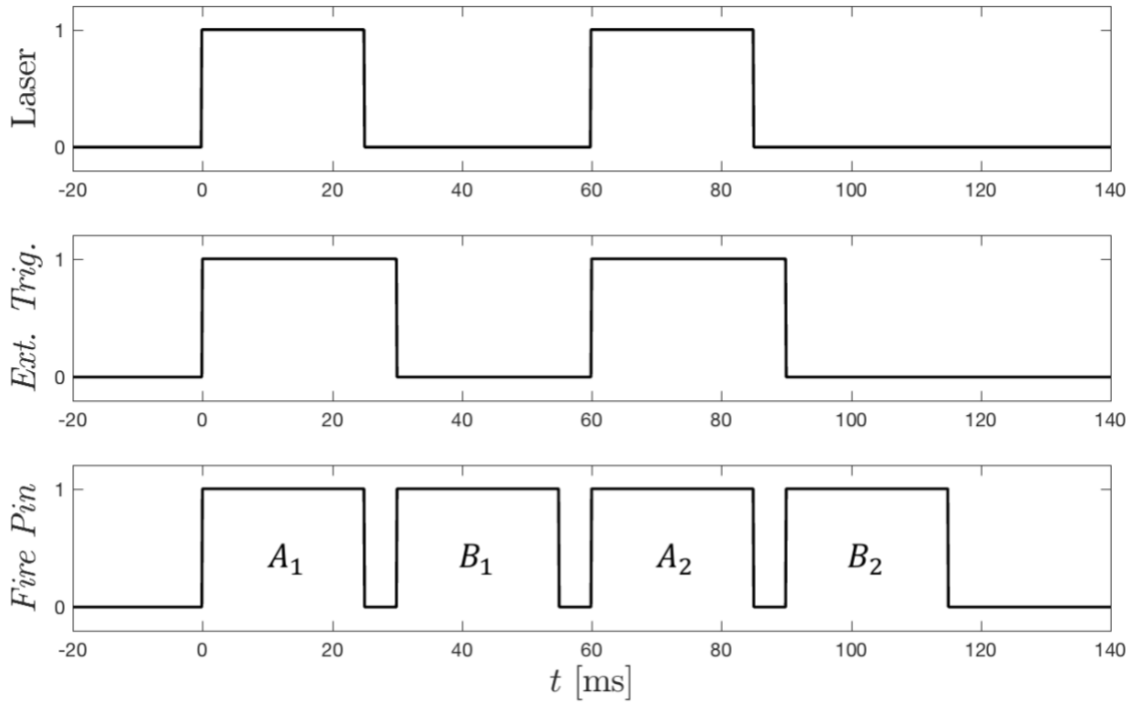

Figure 5.1 : État du laser d'excitation ainsi que des ports *External Trigger* et *Fire Pin* de la caméra en fonction du temps lors d'une mesure avec DC, pour $n = 4$, $\tau_0 = 5$ms et $\tau = 25$ms

L'état du laser d'excitation ainsi que des ports de la caméra lors d'une mesure avec DC sont présentés à la Figure 5.1, pour $n = 4$, $\tau_0 = 5$ms et $\tau = 25$ms. Au temps $t = 0$, le microcontrôleur allume le laser d'excitation et déclenche une acquisition de la caméra en générant un flanc montant sur le port *External Trigger*. Il s'agit de la première acquisition de type A. Dès que celle-ci débute, le niveau sur le port *Fire Pin* de la caméra est mis au niveau logique 1, puis revient à 0 une fois l'acquisition terminée. Ce flanc descendant est détecté par le microcontrôleur qui éteint le laser et déclenche une nouvelle acquisition, après avoir attendu un temps τ_0, en générant un flanc descendant sur le port *External Trigger*. Il s'agit de la première acquisition de type B. Au terme de celle-ci, une période de modulation est complétée. En tout, $n/2$ périodes de modulations sont effectuées afin d'effectuer $n/2$ acquisitions de chaque type. Finalement, la caméra envoie au logiciel un vecteur de $n * 1024$ entiers sur 16 bits, ce qui correspond à tous les spectres mesurés. Le spectre Raman et d'AF démodulé $F^{(j)}$ est obtenu en calculant la moyenne des différences entre

deux types de spectres consécutifs ou, de façon équivalente, en calculant la différence des moyennes des acquisitions de chaque type :

$$F^{(j)} = \frac{1}{n/2}\sum_{m=1}^{n/2}\left(A_m^{(j)} - B_m^{(j)}\right) = \frac{1}{n/2}\sum_{m=1}^{n/2} A_m^{(j)} - \frac{1}{n/2}\sum_{m=1}^{n/2} B_m^{(j)} \tag{5.1}$$

D'autre part, la fréquence de modulation est reliée au temps d'exposition τ et au délai entre deux acquisitions τ_0 :

$$f_R = \frac{1}{2(\tau + \tau_0)} \tag{5.2}$$

En réarrangeant l'équation (5.2), il est possible de déterminer la valeur du temps d'exposition à utiliser afin de moduler le signal à la fréquence f_R étant donné le délai entre deux acquisitions :

$$\tau = \frac{1}{2f_R} - \tau_0 \tag{5.3}$$

Finalement, le temps d'exposition total du signal Raman τ_{Raman} étant donné n est :

$$\tau_{\text{Raman}} = \frac{\tau n}{2} \tag{5.4}$$

En réarrangeant l'équation (5.4) et avec l'équation (5.3), il est possible de déterminer le nombre d'acquisitions à effectuer n étant donné le temps d'exposition total du signal Raman τ_{Raman} requis et la fréquence de modulation f_R :

$$n = \frac{2\tau_{\text{Raman}}}{\tau} = \frac{2\tau_{\text{Raman}}}{\frac{1}{2f_R} - \tau_0} \tag{5.5}$$

5.1.2 Preuve de concept en laboratoire

Afin de vérifier que l'implémentation de la DC présentée à la section précédente permet effectivement de mesurer le spectre d'un échantillon en présence de sources de lumière ambiante, une preuve de concept en laboratoire est effectuée. Dans un premier temps, le spectre d'un

échantillon est mesuré en l'absence de lumière ambiante et sans que la DC soit utilisée. Il s'agit du spectre étalon. Un échantillon de polystyrène est utilisé étant donné que ce matériau présente un signal Raman et un signal d'AF similaire à celui des tissus biologiques. Les paramètres d'acquisition sont $n = 2$, $\tau = 100$ms et ceux du Tableau 3.1 du Chapitre 3.

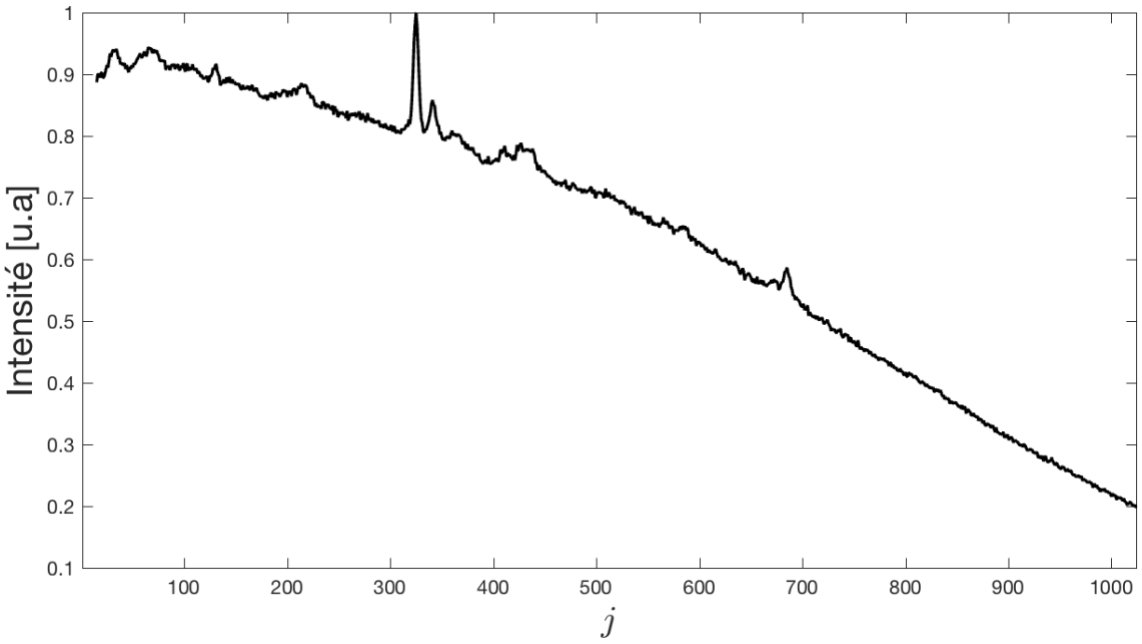

Figure 5.2 : Spectre Raman et d'AF étalon du Polystyrène

Ensuite, la DC est utilisée afin de mesurer des spectres modulés à différentes fréquence f_R en présence d'une source de lumière infrarouge. Cette source est une Diode Électroluminescente (DEL) dont l'intensité est modulée à 120Hz. Son spectre optique est de distribution gaussienne centrée à 850nm, et est présenté à la Figure 3.5 du Chapitre 3. En connectant celle-ci à un générateur de fonction, il est possible de l'alimenter avec une combinaison de tension continue et de tension alternative afin que son intensité soit sinusoïdale et de fréquence égale à 120Hz. En pointant la DEL vers une photodiode dont la tension de sortie est mesurée par un oscilloscope numérique, l'oscillogramme de son intensité en fonction du temps peut être mesuré. Celui-ci est présenté à la Figure 5.3. Il est possible de constater que l'intensité de la DEL varie sinusoïdalement autour d'une valeur moyenne située à 2.5 u.a. d'intensité et que sa période est d'environ 8ms, ce qui correspond bien à une modulation de 120Hz.

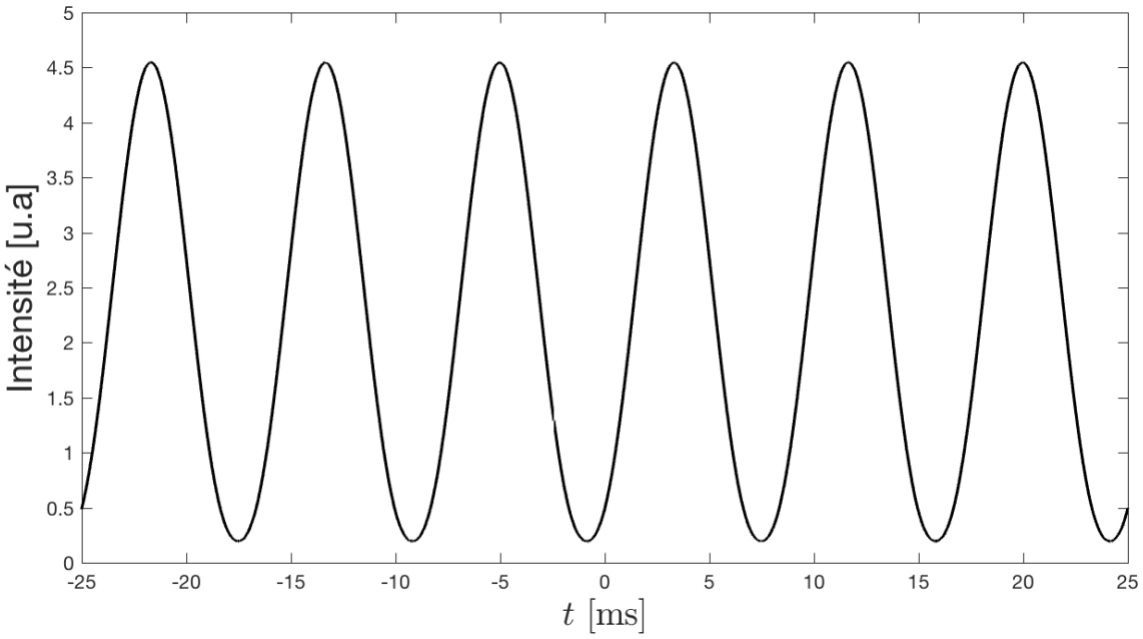

Figure 5.3 : Oscillogramme de l'intensité de la DEL infrarouge en fonction du temps

La mesure de l'échantillon telle qu'effectuée pour la mesure du spectre Raman et d'AF étalon présentée à la Figure 5.2 est répétée en présence de cette source de lumière. Celle-ci est présentée à la Figure 5.4. Il est possible de constater une forte déformation du spectre Raman et d'AF étalon du Polystyrène.

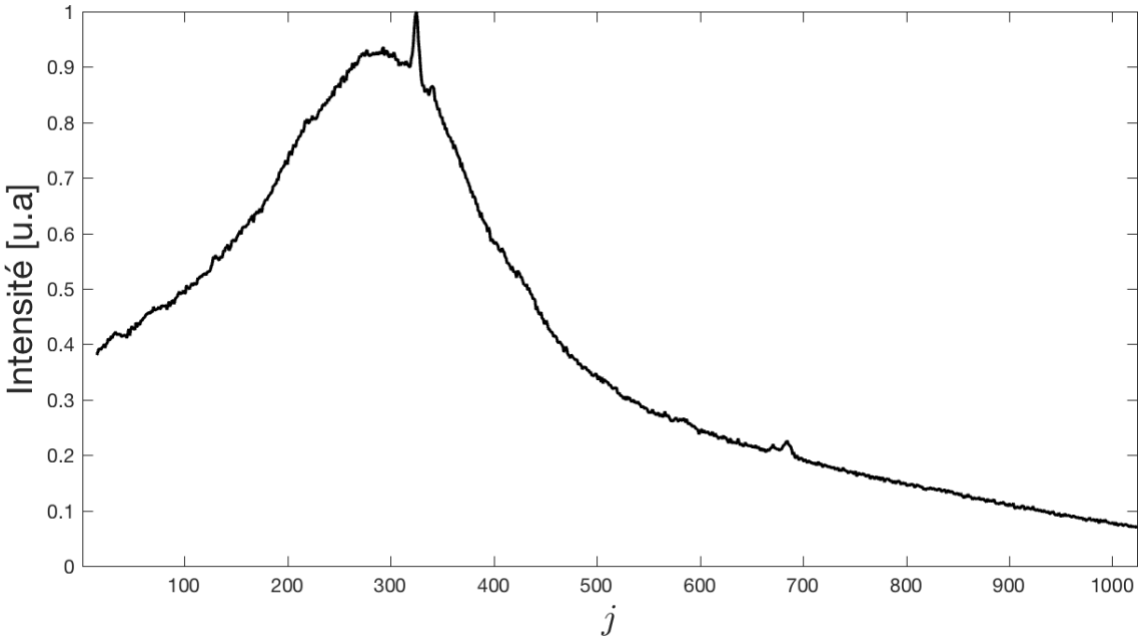

Figure 5.4 : Spectre Raman et d'AF du Polystyrène mesuré en présence d'une source de lumière, une DEL infrarouge de centrée à 850nm

La DC est maintenant utilisée afin de mesurer le spectre Raman et d'AF de l'échantillon malgré la présence de la source de lumière en question. Plusieurs fréquences de modulation variant entre 50Hz et 700Hz sont testées. Pour chacune, le temps d'acquisition τ est calculé à l'aide de l'équation (5.3) et le nombre d'acquisitions n est calculé à l'aide de l'équation (5.5) de façon à maintenir $\tau_{\text{Raman}} = 100\text{ms}$. Il s'avère que c'est lorsque la fréquence de modulation est significativement supérieure ou inférieure au 120Hz de la DEL que le spectre Raman et d'AF obtenu avec la DC est le plus similaire au spectre étalon. Celui obtenu en modulant à la fréquence $f_R = 700\text{Hz}$ est présenté à la Figure 5.5. Il est possible de constater que le spectre reconstruit est très similaire au spectre étalon présenté à la Figure 5.2, mais est plus bruité. Cela s'explique par le fait que, bien que la DC puisse supprimer le spectre de la lumière ambiante sur la mesure, le BG que ce dernier induit demeure et ne peut pas être supprimé.

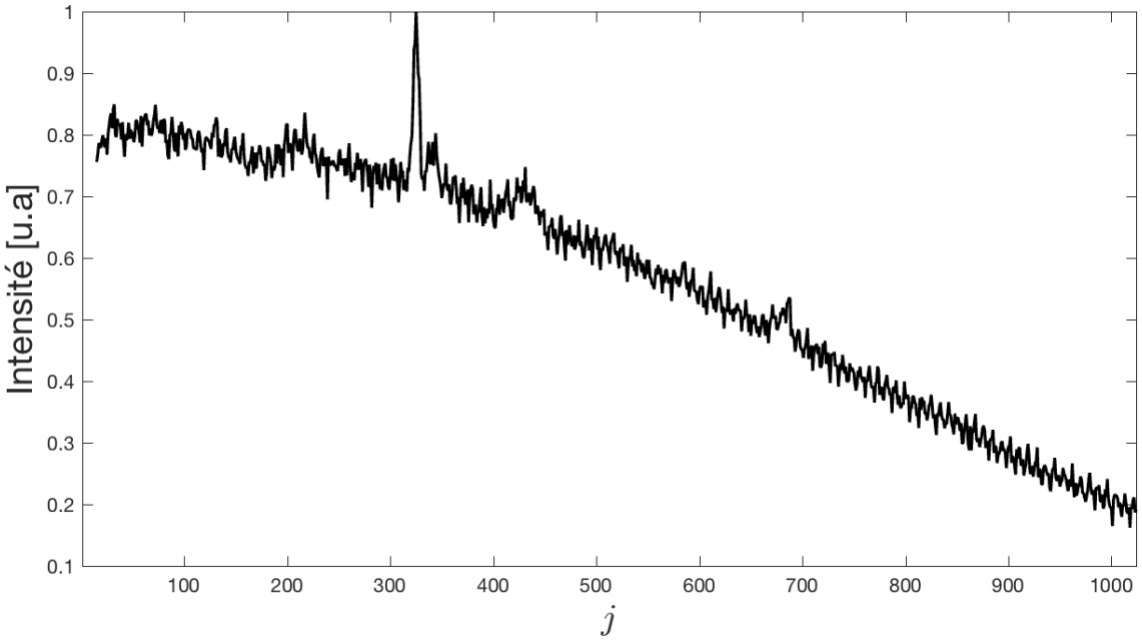

Figure 5.5 : Spectre Raman et d'AF du Polystyrène mesuré en présence d'une source de lumière et reconstruit à l'aide de la DC en utilisant une fréquence de modulation $f_R = 700\text{Hz}$

5.2 SNR Raman de tissus biologiques dans le contexte de la DC

5.2.1 Modélisation de la mesure du spectre d'une combinaison de signaux optiques dans le contexte de la DC

La modélisation de la mesure du spectre d'une combinaison de signaux optiques développée à la section 4.1.1 suppose que l'échantillon est isolé de toute source de lumière ambiante et donc que le flux total de photons collecté ϕ correspond à la somme du flux de photon Raman ϕ_R et du flux de photon d'AF ϕ_{AF}. Afin que ce modèle tienne compte de la lumière ambiante pouvant être collectée par la sonde Raman, il suffit d'ajouter le flux de photon de lumière ambiante $\phi_L = l$ à l'équation (4.2) :

$$\phi^{(j)} = H^{(j)}\left[r^{(j)}I + a^{(j)}I + l^{(j)}\right] \tag{5.6}$$

En conséquence, la modélisation de la mesure présentée à l'équation (4.6) se réécrit tel qu'à l'équation (5.7) où, dans le contexte de la DC, elle modélise la mesure de type A.

$$A'^{(j)}_m = \frac{A^{(j)}_m - \hat{\mu}_{BL}}{\hat{R}^{(j)}} = G\tau\left[I\left(r^{(j)} + a^{(j)}\right) + l^{(j)}_m\right] + \varepsilon'^{(j)}_{A_m}, \quad m = 1 \dots n/2 \tag{5.7}$$

La modélisation de la mesure de type B est obtenue en posant $I = 0$ dans l'équation (5.7) :

$$B'^{(j)}_m = \frac{B^{(j)}_m - \hat{\mu}_{BL}}{\hat{R}^{(j)}} = G\tau l^{(j)}_m + \varepsilon'^{(j)}_{B_m}, \quad m = 1 \dots n/2 \tag{5.8}$$

Il est à noter à l'équation (5.7) que la contribution de la lumière ambiante possède l'indice m, contrairement aux contributions du signal Raman et du signal d'AF. En effet, comme l'intensité du laser d'excitation I est approximativement identique pour les $n/2$ acquisitions de type A, les contributions du signal Raman et du signal d'AF aussi sont identiques. Or, ce n'est pas le cas pour la contribution de la lumière ambiante. Son intensité étant modulée et non-corrélée avec le signal d'intérêt, l'acquisition débute et termine à des états de phase arbitraires causant des contributions $G\tau l^{(j)}_m$ arbitraires sur la mesure, car la caméra effectue l'intégrale du signal optique pendant τ. Ainsi, la contribution de la lumière ambiante sur le signal détecté varie d'une acquisition à l'autre, d'où le maintien de l'indice m.

Cela a des conséquences importantes sur la capacité de la technique à discriminer le signal Raman et d'AF du signal mesuré. D'une part, si le temps d'exposition τ est beaucoup plus grand que la période de modulation de l'intensité de la lumière ambiante, alors le fait que l'acquisition débute et termine à des états de phase arbitraires importe peu, car la période d'intégration couvre plusieurs cycles. Toutes les contributions de la lumière ambiante sont donc approximativement identiques et $l_m^{(j)} \approx l^{(j)}$. Il est alors possible de n'effectuer qu'une acquisition de chaque type et d'obtenir le signal Raman et d'AF à partir de l'équation (5.1) :

$$\begin{aligned} F^{(j)} = A'^{(j)} - B'^{(j)} &= G\tau\left[I\left(r^{(j)} + a^{(j)}\right) + l^{(j)}\right] + \varepsilon'_{A_m}{}^{(j)} - G\tau l^{(j)} - \varepsilon'_{B_m}{}^{(j)} \\ &= G\tau I\left[r^{(j)} + a^{(j)}\right] + \varepsilon_{F_m}{}^{(j)} \end{aligned} \tag{5.9}$$

À la première ligne de l'équation (5.9), $\varepsilon'_{A_m}{}^{(j)}$ est le bruit sur l'acquisition de type A et est de moyenne nulle et de variance $\left[\sigma_{BL}^2 + \sigma_{BG_A}^2{}^{(j)}\right]/\hat{R}^{(j)^2}$, alors que $\varepsilon'_{B_m}{}^{(j)}$ est le bruit sur l'acquisition de type B et est de moyenne nulle et de variance $\left[\sigma_{BL}^2 + \sigma_{BG_B}^2{}^{(j)}\right]/\hat{R}^{(j)^2}$. Lorsque deux variables aléatoires gaussiennes sont additionnées ou soustraites, elles en forment une nouvelle de variance égale à la somme de celles des deux premières. Ainsi, $\varepsilon_{F_m}{}^{(j)}$ est le bruit sur $F^{(j)}$ et est de moyenne nulle et de variance $\left[2\sigma_{BL}^2 + \sigma_{BG_A}^2{}^{(j)} + \sigma_{BG_B}^2{}^{(j)}\right]/\hat{R}^{(j)^2}$.

D'autre part, si le temps d'exposition τ est du même ordre de grandeur ou plus petit que la période de modulation de l'intensité de la lumière ambiante, alors les contributions $l_m^{(j)}$ sont différentes à chaque acquisition et ne peuvent se soustraire complètement tel qu'à l'équation (5.9). Dans ce cas, il faut effectuer plusieurs acquisitions de chaque type afin que la moyenne des contribution $l_m^{(j)}$ sur toutes les acquisitions de type A soit approximativement égale à celle sur toutes les acquisitions de type B et qu'elles puissent se soustraire tel qu'à l'équation (5.9).

Or, le partenaire industriel emploie des temps d'exposition τ de l'ordre de la centaine de millisecondes. Il est invraisemblable que l'intensité d'une source de lumière ambiante présente dans la salle d'opération soit modulée à une fréquence inférieure à 10 Hz, car cela est très lent et serait remarquable à l'œil nu. De plus, l'intensité d'aucune des sources de lumière caractérisée à la section 5.3 n'est modulée à une fréquence inférieure à 120Hz. Ainsi, le deuxième cas de figure ne risque pas de se concrétiser, il donc est supposé que le temps d'exposition τ est toujours beaucoup

plus grand que la période de modulation de l'intensité de la lumière ambiante. En conséquence, seules deux acquisitions sont nécessaires, une de type A et une de type B, et l'équation (5.9) modélise la mesure du spectre d'une combinaison de signaux optiques dans le contexte de la DC.

5.2.2 Définition du SNR Raman dans le contexte de la DC

L'expression du SNR Raman de l'équation (4.7) établie à la section 4.1.2 est reprise et adaptée en considérant que la mesure dans le contexte de la DC est modélisée par l'équation (5.9) et qu'en tout n acquisitions ont été effectuées :

$$\mathrm{SNR}_{\mathrm{Raman_DC}}^{(j)} = \frac{\sqrt{n/2}\, G\tau I r^{(j)}}{\sqrt{\dfrac{2\sigma_{BL}^2 + \sigma_{BG_A}^{2\ (j)} + \sigma_{BG_B}^{2\ (j)}}{\hat{R}^{(j)^2}}}} \tag{5.10}$$

Encore une fois, la variance du BG et l'intensité du signal optique de la mesure associée sont reliés par une constante de proportionnalité égale à 0.1, multipliée par le gain G de la caméra. Pour la mesure de type A, l'intensité du signal optique contient des contributions du signal Raman, d'AF et de la lumière ambiante. Pour la mesure de type B, il n'y a que la lumière ambiante comme contribution. L'équation (5.10) se réécrit donc

$$\mathrm{SNR}_{\mathrm{Raman_DC}}^{(j)} = \frac{\hat{R}^{(j)}\sqrt{n/2}\, G\tau I r^{(j)}}{\sqrt{2\sigma_{BL}^2 + (0.1G)(G\tau R^{(j)}[I(r^{(j)} + a^{(j)}) + 2l^{(j)}])}} \tag{5.11}$$

Encore une fois, il est raisonnable de supposer que l'intensité du signal détecté est suffisamment élevée pour qu'à toute fin pratique le détecteur soit toujours limité par le BG, donc l'équation (4.8) se réécrit :

$$\mathrm{SNR}_{\mathrm{Raman_DC}}^{(j)} = \frac{2.23\sqrt{n\tau\hat{R}^{(j)}I}\, r^{(j)}}{\sqrt{r^{(j)} + a^{(j)} + \dfrac{2l^{(j)}}{I}}} \tag{5.12}$$

L'équation (5.12) est similaire à l'expression du SNR Raman présentée à l'équation (4.9) de la section 4.1.2 à l'exception du terme au dénominateur représentant la contribution de la lumière ambiante. Il est à noter que celui-ci est divisé par l'intensité du laser d'excitation I. Ainsi, dans le

contexte de la DC et contrairement à ce qui est mentionné au Chapitre 4, le SNR Raman augmente plus rapidement lorsque l'intensité du laser d'excitation I est augmentée que lorsque le temps d'exposition τ est augmenté. En d'autres mots, ces paramètres d'acquisition n'affectent plus de façon équivalente le SNR Raman.

Finalement, après avoir déterminé les k indices J qui contiennent l'information sur le spectre Raman, l'expression du SNR Raman moyen dans le contexte de la DC est :

$$\overline{\mathrm{SNR}}_{\mathrm{Raman_DC}} = \frac{1}{k}\sum_{J \in j} \mathrm{SNR}^{(J)}_{\mathrm{Raman_DC}} \tag{5.13}$$

5.3 Mesure du spectre optique et de la modulation temporelle des sources de lumière ambiante en salles d'opération

Les principales sources de lumière ambiante pouvant contaminer la mesure du spectre Raman sont identifiées dans les salles d'opération du MNI et du CrCHUM. Il s'agit des tubes fluorescents servant à éclairer la pièce, trois différents modèles de lampe d'opération, le microscope chirurgical et l'appareil de neuronavigation. Le spectre optique et la modulation temporelle de l'intensité de chacun sont mesurés. Le spectre optique est d'abord mesuré avec le système de spectroscopie Raman du partenaire industriel. Pour ce faire, la sonde Raman est pointée vers la source et les paramètres d'acquisition de la caméra CCD sont ajustés de façon à ce que le signal optique ne sature pas. Le spectre est alors corrigé par la réponse du système et rapporté sur une abscisse en nanomètres, tous deux obtenus du partenaire industriel. La région du spectre électromagnétique observée est le proche infrarouge. La modulation temporelle de l'intensité est ensuite obtenue à l'aide d'une photodiode dont la tension de sortie est mesurée par un oscilloscope numérique. Celui-ci est ajusté de façon à visualiser correctement la forme d'onde de l'intensité de chaque source en fonction du temps.

Premièrement, les tubes fluorescents servant à éclairer la pièce d'une des salles d'opération du MNI présentent un spectre optique composé de six pics de faible étendue spectrale. Leur intensité est modulée sinusoïdalement à une fréquence de 120Hz et se superpose à une composante continue. Le rapport entre l'amplitude de la composante modulée et de la composante continue est d'environ 5%. Ainsi, l'intensité de cette source de lumière est surtout continue, mais possède une faible

modulation. Le spectre optique et la modulation temporelle des tubes fluorescents sont présentés à la Figure 5.6.

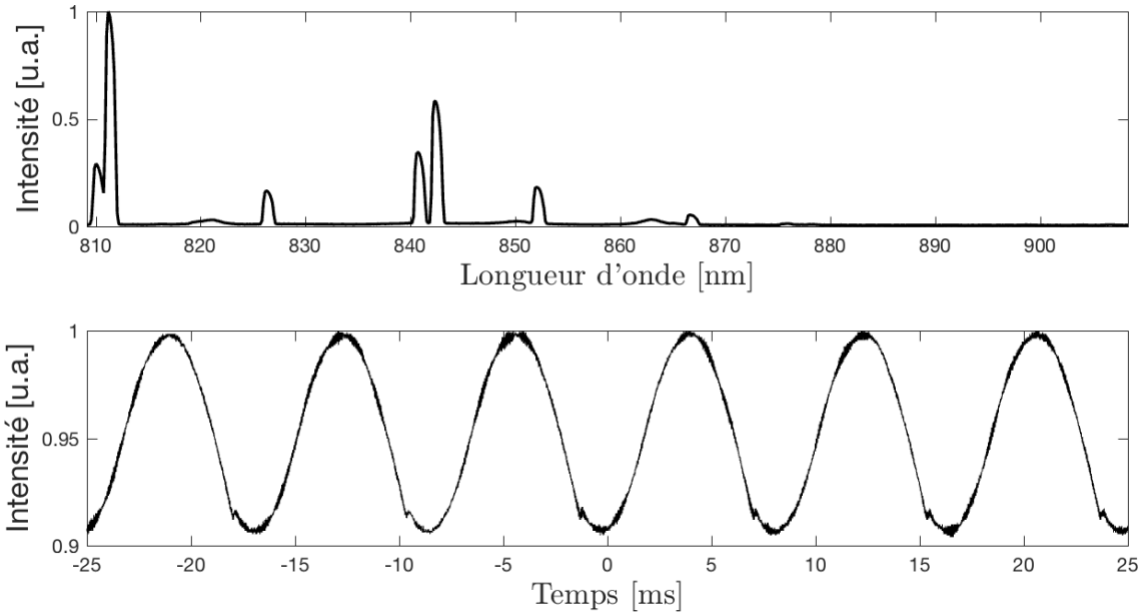

Figure 5.6 : Spectre optique et modulation temporelle de l'intensité des tubes fluorescents servant à éclairer la pièce d'une des salles d'opération du MNI

Deuxièmement, les trois modèles de lampe d'opération utilisée au MNI et au CrCHUM présentent un spectre optique lisse et monotonement décroissant vers les plus grandes longueurs d'onde. Leur intensité est toutefois modulée de façon significativement différente. La première est modulée en dent de scie à une fréquence de 120Hz et se superpose à une composante continue. Le rapport entre l'amplitude de la composante modulée et de la composante continue est aussi d'environ 5%. La deuxième est modulée sinusoïdalement à une fréquence de 50kHz et la troisième est modulée de façon quelconque à une fréquence de 20kHz. Le spectre optique et la modulation temporelle de ces trois modèles de lampe d'opération sont présentés à la Figure 5.7, Figure 5.8 et Figure 5.9.

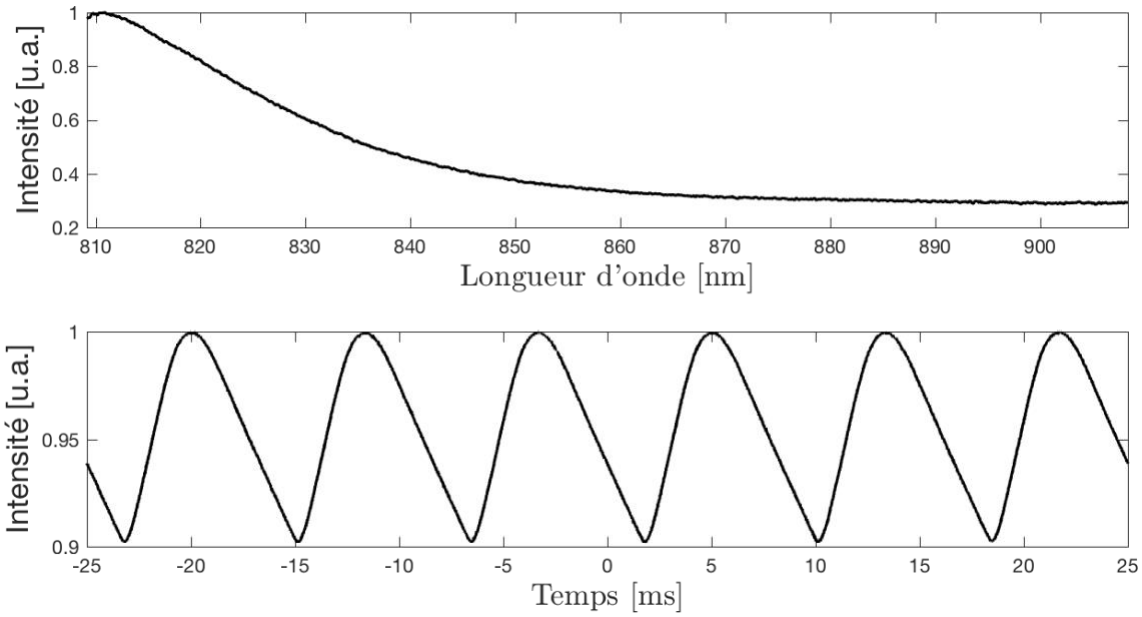

Figure 5.7 : Spectre optique et modulation temporelle de l'intensité de la lampe chirurgicale Mach 500 fabriquée par Dr. Mach et utilisée au MNI

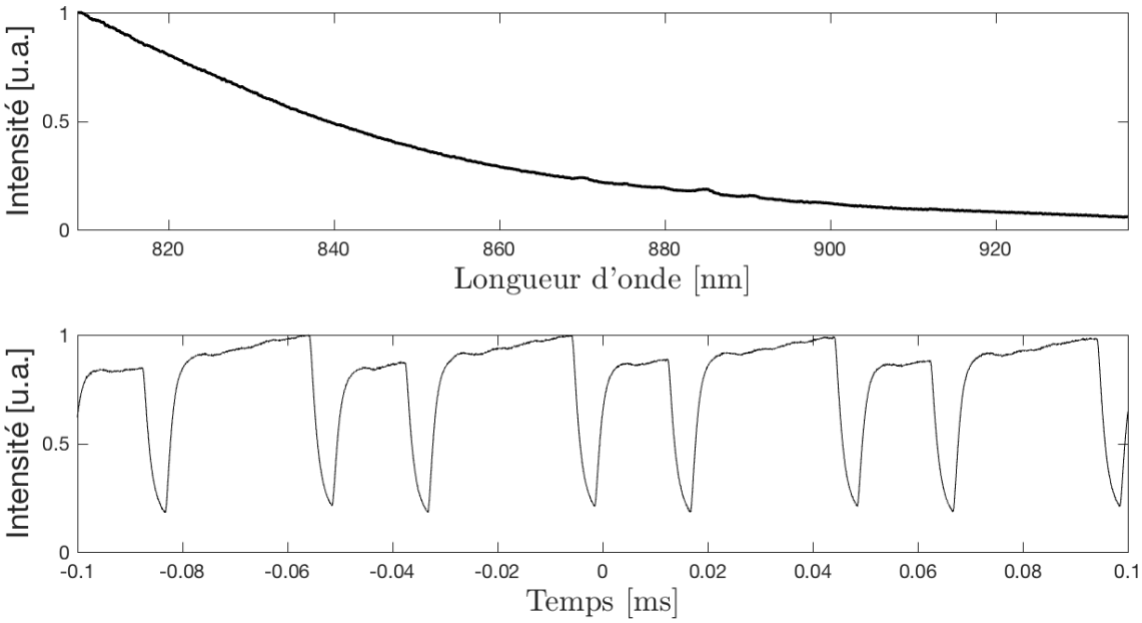

Figure 5.8 : Spectre optique et modulation temporelle de l'intensité de la lampe chirurgicale Mach 2SC fabriquée par Dr. Mach et utilisée au CrCHUM

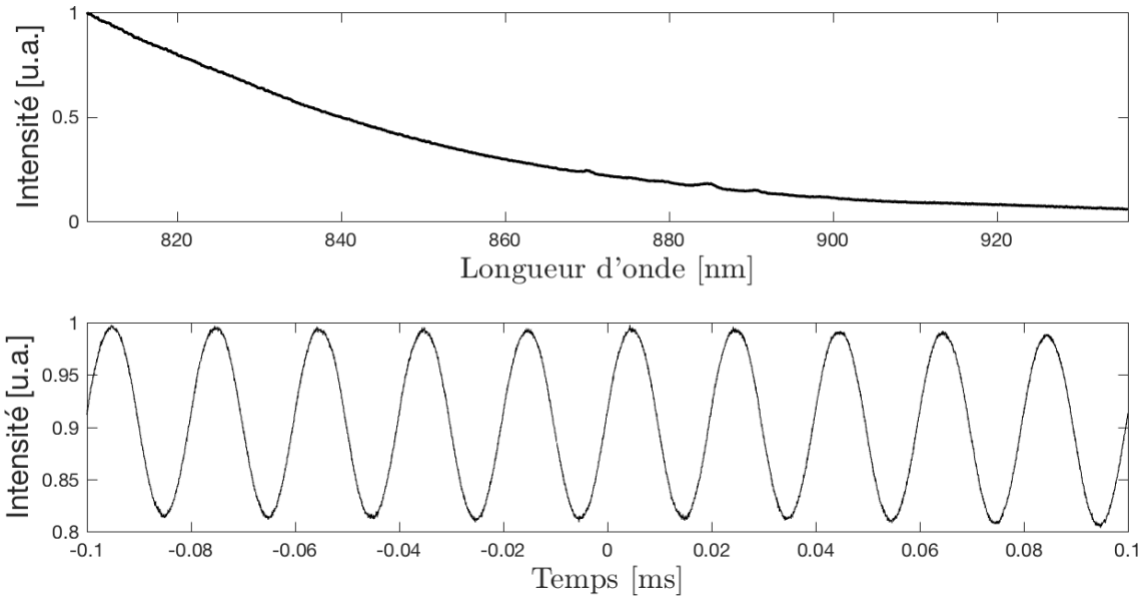

Figure 5.9 : Spectre optique et modulation temporelle de l'intensité de la lampe chirurgicale Mach 120F fabriquée par Dr. Mach et utilisée au CrCHUM

Troisièmement, le microscope chirurgical utilisé au MNI présente un spectre optique lisse, mais composé de trois pics importants aux longueurs d'onde supérieures à 880nm. Son intensité n'est pas modulée à toute fin pratique. Le spectre optique et la modulation temporelle de cette source de lumière ambiante sont présentés à la Figure 5.10.

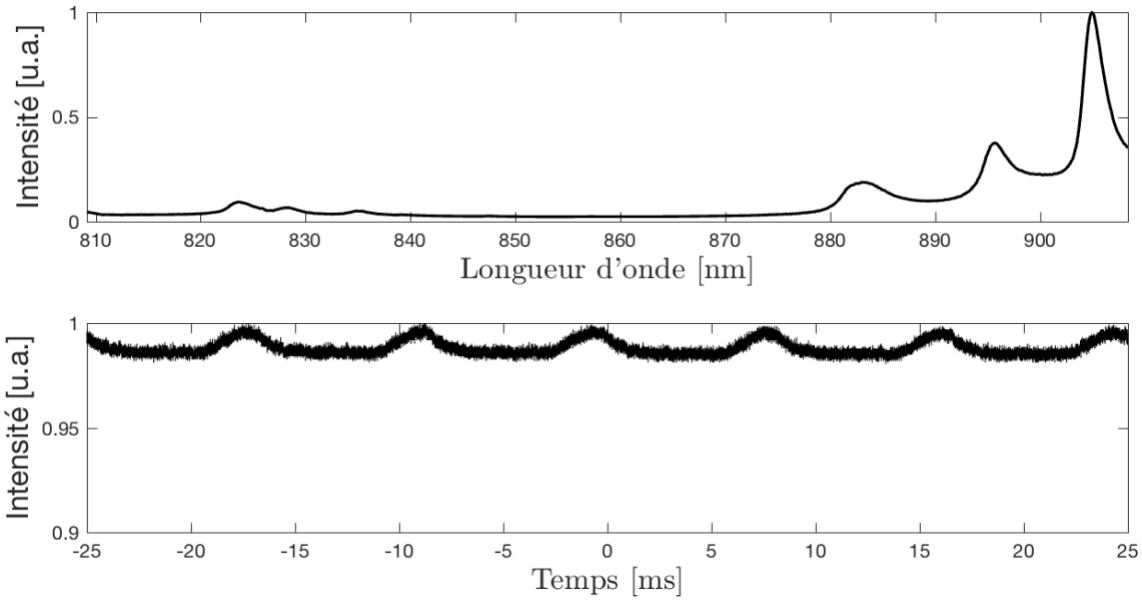

Figure 5.10 : Spectre optique et modulation temporelle de l'intensité de la lampe du microscope chirurgical Pentero 900 fabriqué par Zeiss et utilisé au MNI

Finalement, le système de neuronavigation utilisé au MNI présente un spectre optique distribué en gaussienne centrée à 870nm. La modulation de son intensité est particulière : elle est constante pendant 2ms, puis elle est nulle pendant 48ms. Son rapport cyclique est donc de 4.2%. Le spectre optique et la modulation temporelle du système de neuronavigation sont présentés à la Figure 5.11.

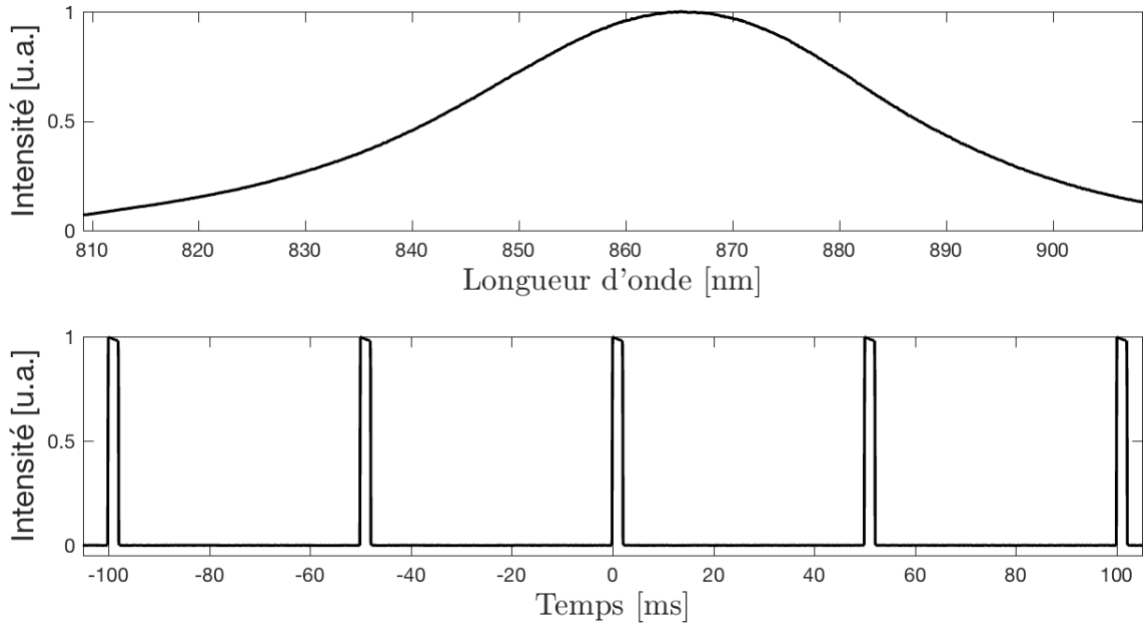

Figure 5.11 : Spectre optique et modulation temporelle de l'intensité de l'émission infrarouge du système de neuronavigation StealthStation S8 fabriqué par Medtronics et utilisé au MNI

5.4 Discussion sur les limites de la DC et sur des solutions spécifiques

Il est à noter que la contribution de la lumière ambiante dans l'expression du SNR Raman présentée à l'équation (5.13) est multipliée par un facteur deux. Ainsi, dans le contexte de la DC, la contribution de la lumière ambiante sur le SNR Raman est deux fois plus importante que celle du signal d'AF, l'autre source de bruit en jeu dans la mesure du spectre Raman. Ainsi, malgré le fait qu'il soit possible d'utiliser la DC pour soustraire le spectre de la lumière ambiante au signal détecté, le BG causé par celle-ci va demeurer et peut devenir très important. La conséquence est une détérioration importante du signal Raman.

Une situation particulièrement problématique survient lorsque le spectre optique de la lumière ambiante est composé de pics de faible étendue spectrale. Les plages de longueurs d'ondes j touchées ont alors un BG de très grande amplitude comparativement à celui des plages adjacentes, ce qui donne l'impression de la présence d'un pic résiduel s'élevant aléatoirement au-dessus ou en

dessous du *baseline* du spectre Raman estimé par l'Algorithme de Régression Polynomiale Automatisée (ARPA). Ce pic résiduel peut avoir un aspect similaire à celui d'un pic Raman et constitue un facteur confondant. Le phénomène peut survenir même lorsque l'intensité de la lumière ambiante mesurée est relativement faible. Une solution spécifique à cette problématique est d'utiliser consécutivement deux longueurs d'onde d'excitation Raman espacées d'une dizaine de nanomètres. Entre d'autres mots, il s'agit d'effectuer la DC avec une acquisition de type $A_{785\mathrm{nm}}$ et une de type $A_{775\mathrm{nm}}$, séparées par des acquisitions de type B. Ainsi, les pics Raman de ces deux types d'acquisitions de type A sont observés à des longueurs d'onde légèrement différentes, contrairement aux pics résiduels de lumière ambiante, ce qui permet de reconstruire un spectre Raman sans le BG induit par ceux-ci.

À l'inverse le spectre optique de certaines sources de lumière ambiante, telles que les lampes chirurgicales, est très lisse et ne présente pas de pics. Ces caractéristiques étant partagées par le spectre d'AF, il est donc possible d'utiliser l'ARPA pour enlever la contribution de la lumière ambiante sur la mesure de la même façon que s'il s'agissait du signal d'AF. Ainsi, nul besoin d'utiliser la DC. Le facteur 2 devant $l^{(j)}$ dans l'équation (5.12) disparait donc et le facteur 2.23 est reprend la valeur 3.16.

D'autre part, l'intensité du rayonnement du système de neuronavigation étant modulée de façon binaire avec un rapport cyclique de seulement 4.2% et une période de 50ms, différentes solutions spécifiques sont possibles. D'abord, l'utilisation d'un temps d'exposition de 10ms ferait en sorte qu'en moyenne 80% des acquisitions ne seraient pas affectées par le rayonnement de celui-ci. Un simple test sur les spectres individuels retournés par la caméra permettrait de déterminer lesquels sont affectés afin de ne pas en tenir compte dans le calcul du spectre démodulé. Ensuite, une photodiode positionnée sur le patient et reliée au microcontrôleur permettrait de détecter les impulsions pour ensuite soit déclencher des acquisitions de façon synchrone avec le moment où l'intensité du système de neuronavigation est nulle, soit d'activer l'opacité d'un dispositif à cristaux liquides placé dans le chemin optique du signal de façon synchrone avec le moment où son intensité est non-nulle.

Autrement, la DC ne permettant pas d'éviter le BG causé par la seule présence de sources de lumière ambiante sur la mesure, celle-ci n'est pas suffisante pour assurer la qualité d'une mesure et il faut tenter de minimiser autant que possible la quantité de lumière ambiante collectée par la

sonde Raman. Cela peut être réalisé en éteignant toutes les sources non nécessaires au déroulement de la chirurgie lors de la mesure ou en plaçant devant elles un filtre optique passe-haut bloquant seulement la lumière infrarouge.

En résumé, la première étape est de vérifier si le spectre de la lumière ambiante est suffisamment lisse pour être complètement retiré lors de l'application de l'ARPA. Autrement, la DC doit être utilisé. Dans tous les cas, il faut utiliser l'intensité maximale permise pour le laser d'excitation afin de maximiser le SNR Raman. Le Tableau 5.1 récapitule les solutions spécifiques proposées pour les sources de lumière ambiantes présentées à la section 5.3.

Tableau 5.1 : Résumé des solutions spécifiques proposées pour les sources de lumière ambiantes présentées à la section 5.3

Source de lumière ou de radiation infrarouge	**Solutions spécifiques**	**Justification**
Tubes fluorescents	(1) Utiliser $f_R < 50$Hz (2) Utiliser deux longueurs d'onde d'excitation Raman (3) Éteindre si possible	(1) La fréquence de modulation est de 120Hz (2) Spectre optique composé de pics de faible étendue spectrale (3) Peut-être pas nécessaire pendant la chirurgie
Lampe d'opération Mach 500, Dr. Mach	(1) Utiliser $f_R < 50$Hz (2) Mettre à intensité minimale (3) Installer un filtre passe-haut (4) Utiliser ARPA	(1) La fréquence de modulation est de 120Hz (2) Pour minimiser le BG (3) Afin de ne transmettre que le visible et non l'infrarouge (4) Spectre suffisamment lisse
Lampe d'opération Mach 2SC, Dr. Mach	(1) Mettre à intensité minimale (2) Installer un filtre passe-haut (3) Utiliser ARPA	(1) Pour minimiser le BG (2) Afin de ne transmettre que le visible et non l'infrarouge (3) Spectre suffisamment lisse
Lampe d'opération Mach 120F, Dr. Mach	(1) Mettre à intensité minimale (2) Installer un filtre passe-haut (3) Utiliser ARPA	(1) Pour minimiser le BG (2) Afin de ne transmettre que le visible et non l'infrarouge (3) Spectre suffisamment lisse
Microscope chirurgical Pentero 900, Zeiss	(1) Installer un filtre passe-haut (2) Installer un obturateur mécanique	(1) Afin de ne transmettre que le visible et non l'infrarouge (2) Afin de bloquer la lumière au moment de l'acquisition
Équipement de neuronavigation StealthStation S8, Medtronics	(1) Utiliser $f_R = 100$Hz	(1) Afin que 80% des acquisitions ne soient pas affectées. Le 20% restant ne doit pas être considéré lors de la démodulation

CHAPITRE 6 CONCLUSION ET RECOMMENDATIONS

Dans le cadre de ce mémoire, les sources de bruit et les facteurs confondants sur la mesure du spectre Raman de tissu biologique sont étudiés. L'objectif est de recommander au partenaire industriel ODS Médical différentes stratégies permettant d'évaluer et de maximiser la qualité du signal Raman lors des mesures effectuées en salle d'opération avec son système de spectroscopie. Le corps de ce mémoire est composé de trois chapitres.

Une étude approfondie des bruits de la caméra en fonction des paramètres d'acquisition est d'abord effectuée au Chapitre 3. Un modèle de la mesure de l'intensité d'un signal optique par la caméra ainsi que du SNR est d'abord établi. Cela permet alors de calculer le bruit pour plusieurs combinaisons de paramètres d'acquisition afin de déterminer celle qui minimise le bruit de la caméra. Plus spécifiquement, il est montré qu'en utilisant une température du détecteur de $-80°\mathrm{C}$ le bruit thermique devient complètement négligeable, que le bruit de lecture devient aussi négligeable si l'intensité du signal optique mesuré est supérieure à 1000 unités arbitraires d'intensité et que le bruit de grenaille peut être directement relié à l'intensité du signal optique mesuré via un coefficient de proportionnalité de 0.1. Les paramètres d'acquisition recommandés sont présentés au Tableau 3.1.

Dans le Chapitre 4, le contexte de la spectroscopie Raman sur tissu biologique est introduit et le modèle de la mesure est adapté afin de tenir compte que le signal optique mesuré est en fait une combinaison de deux signaux, le signal Raman et le signal d'Auto-Fluorescence (AF). Il est aussi adapté afin de tenir compte de la réponse du système. Un indicateur numérique de la qualité du signal Raman sur une mesure est alors proposé, le SNR Raman moyen, et est évalué expérimentalement sur des mesures de matière grise de cerveau de porc frais. Ensuite, la stratégie d'utiliser le photo-blanchiment des tissus afin d'améliorer le SNR Raman moyen est explorée. D'abord, le système de spectroscopie du partenaire industriel est modifié afin d'améliorer la synchronisation entre le laser d'excitation et les acquisitions. Il est ensuite montré que le taux de décroissance de l'intensité du signal d'AF est une fonction logarithmique du temps. Cela permet d'ajuster le modèle du SNR Raman moyen afin de tenir compte de la dépendance temporelle de la contribution du signal d'AF. Son comportement dans le temps est tracé pour des valeurs arbitraires, ce qui montre que le gain de qualité du signal Raman par photo-blanchiment est plus rapide au début de l'exposition, mais ralenti rapidement. Des mesures expérimentales du SNR Raman moyen

en fonction du temps sur cerveau de porc semblent corroborer la validité du modèle. Un gain de SNR Raman moyen d'environ 10% est observé sur le cerveau de porc lorsque les tissus sont préexposés au laser d'excitation 3 secondes avant la mesure. Tout porte à croire que ce gain serait supérieur pour des tissus biologiques présentant un très fort signal d'AF, tel que la prostate.

Finalement, dans le Chapitre 5, les sources de lumière ambiante présentes dans le contexte clinique sont considérées. En effet, le partenaire industriel vise commercialiser son prototype pour des applications en milieu clinique. Étant donné que le signal Raman est très faible, il est probable que celui-ci soit contaminé par des sources de lumière ou des équipements émettant du rayonnement infrarouge. Afin de pouvoir détecter le signal Raman malgré tout, la détection cohérente est implémentée sur le système de spectroscopie à partir des modifications effectuées au Chapitre 4 et une preuve de concept en laboratoire montre la validité de la stratégie. Le modèle de la mesure et du SNR Raman moyen sont ensuite modifiés afin de tenir compte de la contribution de la lumière ambiante sur celle-ci. D'autre part, les principales sources de lumière ambiante pouvant contaminer la mesure du spectre Raman sont identifiées dans les salles d'opération du MNI et du CrCHUM. Leur spectre optique et leur intensité en fonction du temps ont été mesurés. Finalement, une discussion sur les limites de la DC et sur des solutions spécifiques à chacune de ces sources de lumière est faite, le Tableau 5.1 les résume. La plus importante limitation de la DC est qu'elle ne permet pas d'éviter le BG induit par les sources de lumière ambiante. Il faut donc malgré tout tenter de minimiser la quantité de lumière ambiante collectée par la sonde Raman.

En conclusion, le projet a permis d'optimiser le système de spectroscopie Raman du partenaire industriel sans altérations matérielles majeures et de proposer des stratégies crédibles afin d'améliorer la qualité du signal Raman. Ces stratégies se basent sur l'établissement de modèles robustes pour la mesure et pour le SNR Raman ainsi qu'une analyse rigoureuse des données. Obtenir un signal Raman de meilleure qualité permettra de détecter les tissus cancéreux avec une plus grande précision, ce qui augmentera l'espérance de vie postopératoire du patient. Aussi, son intégration plus transparente dans le contexte clinique malgré la présence de sources de lumière ambiante facilitera sa commercialisation, ce qui permettra à plus de patients de bénéficier de cette technologie.

Finalement, par manque de temps, certaines avenues demeurent inexplorées. La plus importante consiste en établir et mettre en œuvre une procédure permettant de déterminer le SNR Raman

moyen minimal pour assurer la performance du classificateur. Ensuite, il est mentionné au Chapitre 4 que le gain de SNR Raman par photo-blanchiment des tissus serait plus élevé pour ceux présentant un signal d'auto-fluorescence plus intense. Il serait ainsi intéressant de répéter l'expérience de la section 4.2.4 avec des tissus de prostate afin de corroborer cette affirmation. Finalement, afin de s'assurer que les solutions spécifiques couvrent la plupart des cas de figure, il serait intéressant de caractériser le spectre optique et la modulation temporelle de l'intensité d'un plus grand nombre de sources de lumière ambiante présentes dans diverses salles d'opération. Des ententes à cet effet pourraient relativement facilement être établies avec d'autres hôpitaux de la région de Montréal.

RÉFÉRENCES

[1] F. Fleming, A. Hill, E. Mc Dermott, A. O'Doherty, N. O'Higgins and C. Quinn, "Intraoperative margin assessment and re-excision rate in breast conserving surgery", *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)*, vol. 30, no. 3, pp. 233-237, 2004.

[2] M. Jermyn, K. Mok, J. Mercier, J. Desroches, J. Pichette, K. Saint-Arnaud, L. Bernstein, M. Guiot, K. Petrecca and F. Leblond, "Intraoperative brain cancer detection with Raman spectroscopy in humans", *Science Translational Medicine*, vol. 7, no. 274, pp. 274ra19-274ra19, 2015.

[3] I. Nagtegaal, C. Marijnen, E. Kranenbarg, C. van de Velde and J. van Krieken, "Circumferential Margin Involvement Is Still an Important Predictor of Local Recurrence in Rectal Carcinoma", *The American Journal of Surgical Pathology*, vol. 26, no. 3, pp. 350-357, 2002.

[4] W. Stummer, J. Tonn, H. Mehdorn, U. Nestler, K. Franz, C. Goetz, A. Bink and U. Pichlmeier, "Counterbalancing risks and gains from extended resections in malignant glioma surgery: a supplemental analysis from the randomized 5-aminolevulinic acid glioma resection study", *Journal of Neurosurgery*, vol. 114, no. 3, pp. 613-623, 2011.

[5] R. Beets-Tan, G. Beets, R. Vliegen, A. Kessels, H. Boven, A. Bruine, M. von Meyenfeldt, C. Baeten and J. van Engelshoven, "Accuracy of magnetic resonance imaging in prediction of tumour-free resection margin in rectal cancer surgery", *The Lancet*, vol. 357, no. 9255, pp. 497-504, 2001.

[6] M. Reinges, H. Nguyen, T. Krings, B. Hütter, V. Rohde and J. Gilsbach, "Course of brain shift during microsurgical resection of supratentorial cerebral lesions: limits of conventional neuronavigation", *Acta Neurochirurgica*, vol. 146, no. 4, pp. 369-377, 2004.

[7] H. Dickhaus, K. Ganser, A. Stauber, M. Bonsanto, C. Wirtz, V. Tronnier and S. Kunze, "Quantification of brain shift effect by MR-Imaging", *19th international conference - IEEE/EMBS*, 1997.

[8] N. Sanai and M. Berger, "Glioma extent of resection and its impact on patient outcome ", *Neurosurgery*, vol. 62, no. 4, pp. 753-766, 2008.

[9] D. Evers, B. Hendriks, G. Lucassen and T. Ruers, "Optical spectroscopy: current advances and future applications in cancer diagnostics and therapy", *Future Oncology*, vol. 8, no. 3, pp. 307-320, 2012.

[10] J. Desroches, M. Jermyn, K. Mok, C. Lemieux-Leduc, J. Mercier, K. St-Arnaud, K. Urmey, M. Guiot, E. Marple, K. Petrecca and F. Leblond, "Characterization of a Raman spectroscopy probe system for intraoperative brain tissue classification", *Biomedical Optics Express*, vol. 6, no. 7, p. 2380, 2015.

[11] "ODS Medical Inc", *Odsmed.com*, 2018. [En ligne]. URL: https://odsmed.com/about/. [Consulté le: 29- Jan- 2018].

[12] M. Ramírez-elías, J. Alda and F. González, "Noise and Artifact Characterization of in Vivo Raman Spectroscopy Skin Measurements", *Applied Spectroscopy*, vol. 66, no. 6, pp. 650-655, 2012.

[13] E. Smith and G. Dent, *Modern raman spectroscopy*. Hoboken, N.J.: Wiley, 2013.

[14] C. RAMAN, "A Change of Wave-length in Light Scattering", *Nature*, vol. 121, no. 3051, pp. 619-619, 1928.

[15] W. Wang, J. Zhao, M. Short and H. Zeng, "Real-time in vivocancer diagnosis using raman spectroscopy", *Journal of Biophotonics*, vol. 8, no. 7, pp. 527-545, 2014.

[16] Z. Movasaghi, S. Rehman and I. Rehman, "Raman Spectroscopy of Biological Tissues", *Applied Spectroscopy Reviews*, vol. 42, no. 5, pp. 493-541, 2007.

[17] S. Hanash, C. Baik and O. Kallioniemi, "Emerging molecular biomarkers—blood-based strategies to detect and monitor cancer", *Nature Reviews Clinical Oncology*, vol. 8, no. 3, pp. 142-150, 2011.

[18] K. Vishwanath, H. Yuan, W. Barry, M. Dewhirst and N. Ramanujam, "Using Optical Spectroscopy to Longitudinally Monitor Physiological Changes within Solid Tumors", *Neoplasia*, vol. 11, no. 9, pp. 889-900, 2009.

[19] G. Wagnieres, W. Star and B. Wilson, "In Vivo Fluorescence Spectroscopy and Imaging for Oncological Applications", *Photochemistry and Photobiology*, vol. 68, no. 5, pp. 603-632, 1998.

[20] R. McDonough and A. Whalen, *Detection of signals in noise*. San Diego: Academic Press, 1995.

[21] G. James, D. Witten, T. Hastie and R. Tibshirani, *An introduction to statistical learning*, 1st ed. Springer, 2013.

[22] G. Holst, *CCD arrays, cameras, and displays*. Bellingham, Wash.: SPIE Optical Engineering Press, 2000.

[23] "CCD Sensitivity and Noise - What is noise and what does it matter?", *Andor.com*, 2018. [En ligne]. URL: http://www.andor.com/learning-academy/ccd-sensitivity-and-noise-what-is-noise-and-what-does-it-matter. [Consulté le: 07- Feb- 2018].

[24] P. Hobbs, *Building electro-optical systems*. Hoboken, N.J.: Wiley, 2013.

[25] S. Howell, *Handbook of CCD astronomy*. Cambridge: Cambridge University Press, 2006.

[26] "Poisson Distribution - MATLAB & Simulink - MathWorks United Kingdom", *Mathworks.com*, 2018. [En ligne]. URL: https://www.mathworks.com/help/stats/poisson-distribution.html?requestedDomain=www.mathworks.com. [Consulté le : 15- Fév- 2018].

[27] P. Hobbs, *Building electro-optical systems*. Hoboken, N.J.: Wiley, 2013.

[28] M. Monici, "Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications", *Biotechnology Annual Review*, pp. 227-256, 2005.

[29] J. Stockert and A. Blázquez-Castro, *Fluorescence Microscopy In Life Sciences*. Sharjah: Bentham Science Publishers, 2017.

[30] "Jablonski diagram", *Chemistry LibreTexts*, 2018. [En ligne]. URL: https://chem.libretexts.org/Core/Physical_and_Theoretical_Chemistry/Spectroscopy/Electronic_Spectroscopy/Jablonski_diagram. [Consulté le: 20- Feb- 2018].

[31] D. Murphy and M. Davidson, *Fundamentals of light microscopy and electronic imaging*. Hoboken (Nueva Jersey): Wiley-Blackwell [etc.], 2013.

[32] S. Meyer, E. Ru and P. Etchegoin, "Quantifying Resonant Raman Cross Sections with SERS", *The Journal of Physical Chemistry A*, vol. 114, no. 17, pp. 5515-5519, 2010.

[33] J. Zhao, H. Lui, D. McLean and H. Zeng, "Automated Autofluorescence Background Subtraction Algorithm for Biomedical Raman Spectroscopy", *Applied Spectroscopy*, vol. 61, no. 11, pp. 1225-1232, 2007.

[34] M. Jermyn, J. Desroches, J. Mercier, K. St-Arnaud, M. Guiot, F. Leblond and K. Petrecca, "Raman spectroscopy detects distant invasive brain cancer cells centimeters beyond MRI capability in humans", *Biomedical Optics Express*, vol. 7, no. 12, p. 5129, 2016.

[35] J. Zhao, H. Lui, D. McLean and H. Zeng, "Automated Autofluorescence Background Subtraction Algorithm for Biomedical Raman Spectroscopy", *Applied Spectroscopy*, vol. 61, no. 11, pp. 1225-1232, 2007.

[36] A. Shreve, N. Cherepy and R. Mathies, "Effective Rejection of Fluorescence Interference in Raman Spectroscopy Using a Shifted Excitation Difference Technique", *Applied Spectroscopy*, vol. 46, no. 4, pp. 707-711, 1992.

[37] K. Sowoidnich and H. Kronfeldt, "Fluorescence Rejection by Shifted Excitation Raman Difference Spectroscopy at Multiple Wavelengths for the Investigation of Biological Samples", *ISRN Spectroscopy*, vol. 2012, pp. 1-11, 2012.

[38] S. McCain, R. Willett and D. Brady, "Multi-excitation Raman spectroscopy technique for fluorescence rejection", *Optics Express*, vol. 16, no. 15, p. 10975, 2008.

[39] M. Morris, P. Matousek, M. Towrie, A. Parker, A. Goodship and E. Draper, "Kerr-gated time-resolved Raman spectroscopy of equine cortical bone tissue", *Journal of Biomedical Optics*, vol. 10, no. 1, p. 014014, 2005.

[40] P. Matousek, M. Towrie, A. Stanley and A. Parker, "Efficient Rejection of Fluorescence from Raman Spectra Using Picosecond Kerr Gating", *Applied Spectroscopy*, vol. 53, no. 12, pp. 1485-1489, 1999.

[41] T. Hasegawa, J. Nishijo and J. Umemura, "Separation of Raman spectra from fluorescence emission background by principal component analysis", *Chemical Physics Letters*, vol. 317, no. 6, pp. 642-646, 2000.

[42] C. Lieber and A. Mahadevan-Jansen, "Automated Method for Subtraction of Fluorescence from Biological Raman Spectra", *Applied Spectroscopy*, vol. 57, no. 11, pp. 1363-1367, 2003.

[43] P. Cadusch, M. Hlaing, S. Wade, S. McArthur and P. Stoddart, "Improved methods for fluorescence background subtraction from Raman spectra", *Journal of Raman Spectroscopy*, vol. 44, no. 11, pp. 1587-1595, 2013.

[44] C. Galloway, E. Ru and P. Etchegoin, "An Iterative Algorithm for Background Removal in Spectroscopy by Wavelet Transforms", *Applied Spectroscopy*, vol. 63, no. 12, pp. 1370-1376, 2009.

[45] C. Eggeling, J. Widengren, R. Rigler and C. Seidel, "Photobleaching of Fluorescent Dyes under Conditions Used for Single-Molecule Detection: Evidence of Two-Step Photolysis", *Analytical Chemistry*, vol. 70, no. 13, pp. 2651-2659, 1998.

[46] J. Schleusener, J. Lademann and M. Darvin, "Depth-dependent autofluorescence photobleaching using 325, 473, 633, and 785 nm of porcine ear skin ex vivo", *Journal of Biomedical Optics*, vol. 22, no. 9, p. 091503, 2017.

[47] A. Macdonald and P. Wyeth, "On the use of photobleaching to reduce fluorescence background in Raman spectroscopy to improve the reliability of pigment identification on painted textiles", *Journal of Raman Spectroscopy*, vol. 37, no. 8, pp. 830-835, 2006.

[48] D. Shea and M. Morris, "Bone Tissue Fluorescence Reduction for Visible Laser Raman Spectroscopy", *Applied Spectroscopy*, vol. 56, no. 2, pp. 182-186, 2002.

[49] J. Zhao, M. Short, T. Braun, H. Lui, D. McLean and H. Zeng, "Clinical Raman measurements under special ambient lighting illumination", *Journal of Biomedical Optics*, vol. 19, no. 11, p. 111609, 2014.

[50] Analog Devices, "Use Synchronous Detection to Make Precision, Low Level Measurements", 2014.

[51] The University of Tennessee, "Phase Sensitive detection : the lock-in amplifier", Knoxville, Tennessee, 2008.

[52] *User's Guide to Andor SDK*. Andor, 2009.

[53] ASTM International, "E2911 - 13 : Standard Guide for Relative Intensity Correction of Raman Spectrometers", 2013.

[54] H. Wang, J. Zhao, A. Lee, H. Lui and H. Zeng, "Improving skin Raman spectral quality by fluorescence photobleaching", *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, vol. 9, no. 4, pp. 299-302, 2012.