

Titre: Spectroscopie Raman de tissus biologiques dans le domaine
Title: temporel

Auteur: Nassim Ksantini
Author:

Date: 2021

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Ksantini, N. (2021). Spectroscopie Raman de tissus biologiques dans le domaine
Citation: temporel [Mémoire de maîtrise, Polytechnique Montréal]. PolyPublie.
<https://publications.polymtl.ca/5554/>

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

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/5554/>
PolyPublie URL:

**Directeurs de
recherche:** Frédéric Leblond, & Frédéric Lesage
Advisors:

Programme: Génie biomédical
Program:

POLYTECHNIQUE MONTRÉAL

affiliée à l'Université de Montréal

Spectroscopie Raman de tissus biologiques dans le domaine temporel

NASSIM KSANTINI

Institut de génie biomédical

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

Génie biomédical

Janvier 2021

POLYTECHNIQUE MONTRÉAL

affiliée à l'Université de Montréal

Ce mémoire intitulé :

Spectroscopie Raman de tissus biologiques dans le domaine temporel

présenté par **Nassim KSANTINI**

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

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

Denis SELETSKIY, président

Frédéric LEBLOND, membre et directeur de recherche

Frédéric LESAGE, membre et codirecteur de recherche

Kenneth M. TICHAUER, membre

REMERCIEMENTS

J'aimerais en premier lieu remercier mon directeur de recherche Pr. Frédéric Leblond, qui m'a offert l'opportunité de réaliser ce projet au sein de son laboratoire. Merci pour la confiance que tu m'as accordée. Tout en m'offrant une grande liberté d'action, tu as su être toujours à l'écoute et disponible pour me guider. Ton enthousiasme est une source de motivation supplémentaire pour travailler dans ton équipe.

Je tiens également à remercier grandement mon collègue Israël Veilleux pour toute l'aide que tu m'as apportée lors de ces 2 années. J'ai appris énormément à tes côtés. J'ai vraiment apprécié ta disponibilité et ta pédagogie. Nos discussions ont toujours été très constructives et je ne serais sans doute pas arrivé là où je suis aujourd'hui sans ton aide.

Je remercie également tous mes collègues du LRO pour leur aide au cours de ce projet. Je remercie particulièrement Fabien Picot, avec qui j'ai beaucoup travaillé et qui m'a donné beaucoup de bons conseils, Tien Nguyen pour son support moral, François Daoust pour sa bonne humeur communicative, Guillaume Sheehy pour avoir partagé avec enthousiasme ses connaissances, Andrée-Anne Grosset pour son support et sa disponibilité ainsi que Audrey Laurence et Frédéric Dallaire et qui m'ont aidé à progresser au cours de ce projet.

J'aimerais remercier enfin mon co-directeur Pr. Frédéric Lesage pour m'avoir donné la chance de travailler au sein de son laboratoire ainsi que tous les étudiants de son groupe qui m'ont apporté de l'aide lors de projet.

RÉSUMÉ

La spectroscopie Raman est un outil d'imagerie optique à la popularité grandissante pour le diagnostic du cancer. Il exploite la diffusion inélastique pour identifier la composition moléculaire d'un échantillon. Or, la probabilité d'occurrence de cette diffusion étant très faible, dans des environnements à la composition moléculaire complexe elle est très souvent masquée par un autre phénomène résultant de l'interaction lumière - matière : la fluorescence. C'est particulièrement le cas dans les tissus biologiques qui contiennent naturellement une quantité importante de molécules émettrices de fluorescence. Pour isoler le spectre Raman, on a le plus souvent recours à des algorithmes mathématiques, dont la portée reste limitée. Une méthode prometteuse pour supprimer l'effet de la fluorescence est l'utilisation du domaine temporel. Elle se base sur la différence de profil temporel entre les deux phénomènes pour rejeter la fluorescence et isoler le Raman.

Le comptage de photon unique corrélée dans le temps est une technique communément utilisée pour la mesure du temps de vie de fluorescence. Grâce à l'arrivée récente de détecteurs à photon unique ultra rapide, plusieurs systèmes de spectroscopie Raman en temporel ont été développés à partir de cette technologie. Cependant, elle n'a encore jamais été testée sur des tissus biologiques. Ce projet consiste donc à évaluer la pertinence de la spectroscopie Raman en temporel dans le contexte biomédical de la reconnaissance moléculaire de tissus.

Un premier système, utilisant un laser à lumière visible, a été conçu. À l'aide d'un détecteur à la commande ultra-rapide, il a été capable de réduire l'importante fluorescence émise à ces mêmes longueurs d'onde sur un morceau de viande de bœuf par l'application d'une fenêtre temporelle, laissant ainsi apparaître des pics Raman caractéristiques de l'échantillon. De plus, il a été démontré que la réduction progressive du signal de fond, majoritairement composé de fluorescence, permet d'augmenter la qualité des spectres Raman comparativement au seul traitement mathématique.

Un second système a alors été développé avec, cette fois, une source dans le proche infrarouge, dans le but de comparer les résultats avec un système de spectroscopie Raman conventionnel, qui utilise cette même plage spectrale. Combinant de manière inédite la mesure dans le domaine de Fourier et le comptage de photon unique corrélé dans le temps, ce nouveau système a démontré une importante réduction du signal de fond ainsi qu'une bonne correspondance avec les résultats du système conventionnel sur des échantillons biologiques.

ABSTRACT

Raman spectroscopy is an increasingly popular optical imaging tool for cancer diagnostic. It exploits inelastic scattering to identify the molecular composition of a sample. However, since the probability of occurrence of this scattering is very low, in environments with a complex molecular composition it is very often masked by another light - matter interaction: the fluorescence. This is particularly the case in biological tissues which naturally contain a significant number of fluorescence-emitting molecules. To isolate the Raman spectrum, we most often use mathematical algorithms, which remains limited. One promising method to suppress the effect of fluorescence is the use of the time domain. It is based on the difference in temporal profile between the two phenomena to reject fluorescence and isolate Raman.

Time correlated single photon counting is a commonly used technique for measuring fluorescence lifetimes. With the recent arrival of ultra-fast single-photon sensors, several time-based Raman spectroscopy systems have been developed based on this technology. However, it has never been tested in biological tissue before. This project therefore consists in evaluating the relevance of time-domain Raman spectroscopy in the biomedical context of tissue recognition.

A first system, using a visible light laser, has been designed. Using an ultra-fast controlled detector, it was able to reduce the large fluorescence emitted at these same wavelengths on a piece of beef by applying a time window, thus revealing Raman peaks characteristic of the sample. In addition, it has been shown that the gradual reduction of the background signal, mainly composed of fluorescence, makes it possible to increase the quality of Raman spectra when compared with a solely algorithmic approach.

A second system was then developed with, this time, a source in the near infrared, in order to compare the results with a conventional Raman spectroscopy system, which uses this same spectral range. Combining in an unprecedented way the measurement in the Fourier domain and the time-correlated single photon counting, this new system demonstrated a significant reduction of the background signal as well as a good correspondence with the results of the conventional system on biological samples.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	III
RÉSUMÉ	IV
ABSTRACT.....	V
TABLE DES MATIÈRES.....	VI
LISTE DES TABLEAUX	IX
LISTE DES FIGURES	X
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XII
CHAPITRE 1 INTRODUCTION.....	1
1.1 Hypothèses et objectifs	2
1.2 Plan du mémoire	2
CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE.....	4
2.1 Spectroscopie Raman : théorie et enjeux	4
2.1.1 Diffusion Raman	4
2.1.2 Fluorescence	6
2.1.3 Spectroscopie Raman pour la détection du cancer.....	8
2.2 Méthodes de suppression de la fluorescence.....	10
2.2.1 Traitement mathématique.....	10
2.2.2 Domaine spectral.....	12
2.2.3 Domaine temporel.....	13
2.2.4 Domaine fréquentiel.....	14
2.2.5 Comparaison	16
2.3 Spectroscopie Raman par TG.....	18
2.3.1 Détecteurs	18

2.3.2	Comptage de photons unique corrélé dans le temps	20
2.3.3	Développement récent du Raman TG	22
CHAPITRE 3 SPECTROSCOPIE RAMAN DANS LE DOMAINE TEMPOREL EN LUMIERE VISIBLE.....		23
3.1	Présentation générale	23
3.2	Présentation détaillée	25
3.2.1	Description des principaux composants	25
3.2.2	Montage optique	27
3.2.3	Acquisition.....	30
3.2.4	Traitement des données	31
3.3	Résultats	33
3.3.1	Caractérisation du système	33
3.3.2	Mesure sur un fantôme	34
3.3.3	Mesure sur échantillons biologiques	37
CHAPITRE 4 ARTICLE 1 : FOURIER-TRANSFORM SPECTROSCOPY AND TIME-CORRELATED SINGLE-PHOTON COUNTING DETECTION INCREASES RAMAN SCATTERING TO FLUORESCENCE RATIO IN BIOLOGICAL TISSUE.....		41
4.1	Mise en contexte	41
4.2	Fourier-transform spectroscopy and time-correlated single-photon counting detection increases Raman scattering to fluorescence ratio in biological tissue.....	42
4.2.1	Abstract.....	42
4.2.2	Introduction.....	43
4.2.3	Methods	45
4.2.4	Results	48
4.2.5	Discussion.....	53

4.2.6	Disclosures.....	54
4.2.7	Acknowledgements	54
4.2.8	References.....	54
CHAPITRE 5 DISCUSSION GÉNÉRALE.....		56
5.1	Retour sur les objectifs.....	56
5.2	Avantage des solutions proposées	57
5.3	Défis rencontrés	59
5.4	Sécurité laser	61
CHAPITRE 6 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS.....		64
RÉFÉRENCES.....		65

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1 – Synthèse des principales méthodes de suppression de la fluorescence. Adapté de [3, 4, 19].....	16
Tableau 2.2 – Comparaison des technologies de détecteurs adaptés à la spectroscopie Raman TG. Les données quantitatives sont des ordres de grandeurs (informations collectées de [4, 43]).	20

LISTE DES FIGURES

Figure 2.1 - Diagramme de Jablonski des principales interactions lumière / matière	4
Figure 2.2 – Comparaison théorique des phénomènes de diffusion Rayleigh, diffusion Raman et Fluorescence a) dans le domaine spectral b) dans le domaine temporel	6
Figure 2.3 – Spectre Raman brut de l'acétaminophène comparativement à celui d'un tissu de muscle de bœuf.....	7
Figure 2.4 – Force du signal Raman et impact de la fluorescence pour des longueurs d'onde d'excitation communément utilisées	8
Figure 2.5 – Système de spectroscopie Raman classique avec sonde Raman (Adapté de [16])	9
Figure 2.6 – Illustration de la variabilité du résultat de l'algorithme morphologique en fonction de la taille de la fenêtre.....	11
Figure 2.7 – Principe du découpage temporel en spectroscopie Raman	13
Figure 2.8 – Oscillogramme des signaux théoriques de la méthode fréquentielle.	15
Figure 2.9 – Représentation schématique d'un système TCSPC.....	21
Figure 3.1 – Représentation schématique du montage complet	24
Figure 3.2 – Interface utilisateur du logiciel de commande du détecteur SPAD.....	26
Figure 3.3 – Représentation 3D du montage épi-illumination. Vue sur l'excitation	27
Figure 3.4 – Schéma optique équivalent de l'entrée d'un monochromateur (traduit et adapté de [53])	28
Figure 3.5 - Représentation 3D du montage épi-illumination. Vue sur la collection	29
Figure 3.6 – Correction par la réponse du système a) réponse normalisée du système b) spectre d'acétaminophène avant et après correction	32
Figure 3.7 - Mesure de l'IRF a) dans le domaine temporel b) dans le domaine spectral.....	34
Figure 3.8 – Carte 3D d'une acquisition sur le mélange acétaminophène + microbilles a) vue 3D b) vue du dessus	35

Figure 3.9 - Spectre du mélange acétaminophène + microbilles avec histogramme complet.....	35
Figure 3.10 – Évolution du spectre du mélange acétaminophène + microbilles en fonction de la fenêtre temporelle.....	36
Figure 3.11 - Spectre de : a) gras de poulet, b) muscle de poulet, c) bœuf haché	37
Figure 3.12 – Variation du spectre de bœuf haché lors du décalage progressif de la fenêtre temporelle de détection.....	38
Figure 3.13 – Réduction de la fluorescence sur bœuf hachée par décalage de la fenêtre temporelle	39
Figure 3.14 – Facteur de qualité en fonction du décalage temporel de la fenêtre de détection.....	40
Figure 4.1 - Schematic representation of the Time-resolved Fourier-transform spectroscopic system. Following the optical path: 780 nm pulsed laser, beam-splitter (BS), photodiode (PD), collimator (COL), 600 μm optical fiber, band-pass filter (BP), dichroic mirror (DM), focusing lens, sample, long-pass filter (LP), NIREOS Gemini interferometer, 40x microscope objective, single-photon avalanche diode (SPAD), PicoHarp300 time-correlated single photon counter (TCSPC).	46
Figure 4.2 - Block diagram of the data processing. Example data acquired on olive oil.....	47
Figure 4.3 - Example of acetaminophen Raman spectra reconstructed from interferograms with increasing maximum values of OPD.....	49
Figure 4.4 - Raman SBR evolution depending on the numerical gate width. Left side: time distribution of fluorescence and Raman scattering and principle of fluorescence rejection with a variable size time-gate. Right side: spectra of olive oil sample for the corresponding gate width, border between green and blue define by the polynomial fitting.....	50
Figure 4.5 - Comparison of processed Raman spectra of ground beef and chicken breast samples. Data acquired with the new Time-resolved Fourier-transform spectroscopic system and a state-of-the-art dispersive spectrometer-based system with continuous wave illumination..	52

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

DCR	Taux de compte d'obscurité (<i>Dark Count Rate</i>)
FLIM	Imageries microscopique par temps de vie de fluorescence (<i>Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy</i>)
IRF	Fonction de réponse de l'instrument (<i>Instrument Response Function</i>)
LRO	Laboratoire de Radiologie Optique
OPD	Différence de parcours optique (<i>Optical Path Difference</i>)
PDE	Efficacité de détection de photons (<i>Photon Detection Efficiency</i>)
QE	Efficacité quantique (<i>Quantum Efficiency</i>)
QF	Facteur de qualité (<i>Quality Factor</i>)
SBR	Rapport signal sur signal de fond (<i>Signal to Background Ratio</i>)
SNR	Rapport signal sur bruit (<i>Signal to Noise Ratio</i>)
SPAD	Diode avalanche à photon unique (<i>Single Photon Avalanche Diode</i>)
TCSPC	Comptage de photon unique corrélé dans le temps (<i>Time-Correlated Single Photon Counting</i>)
TG	Découpage temporelle (<i>Time-Gating</i>)
TPSF	Fonction de propagation du point temporel (<i>Temporal Point Spread Function</i>)

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

En 2019, le cancer était la première cause de mortalité au Canada. Il est estimé qu'une personne sur deux en développera un au cours de sa vie[1]. Avec l'augmentation et le vieillissement de la population, le besoin en méthode de détection de la maladie est de plus en plus important. Pour y répondre, de nombreuses techniques d'imagerie optique ont été développées au cours des dernières années. Parmi elles, la spectroscopie Raman est l'une des plus prometteuses[2]. Par observation de la diffusion inélastique ou diffusion Raman, cette technique minimalement invasive permet l'identification du contenu moléculaire d'un tissu. Cette information s'avère très utile dans plusieurs applications cliniques en oncologie : diagnostic, guidage d'opération chirurgicale ou encore suivi de traitement. Mais si la spectroscopie Raman est aujourd'hui une technologie relativement commune pour l'identification de substances chimiques notamment en pharmacologie, son utilisation reste encore limitée pour la caractérisation de tissus biologiques.

En effet, dans ce milieu à la composition moléculaire complexe, le signal Raman est masqué par un important signal de fond. La source de ce signal est majoritairement une émission de fluorescence, un autre phénomène résultant de l'interaction lumière/matière, bien plus intense que la diffusion Raman. Pour l'atténuer, les appareils de spectroscopie Raman utilisent généralement des lasers dans le domaine du proche infrarouge (700-1000nm) où la fluorescence est moins forte, mais sans que cela l'élimine totalement. On a alors recours à des méthodes de traitement des données par algorithme mathématique pour retirer ce signal de fond et isoler le spectre Raman. Mais dans le cas des tissus, la fluorescence est tellement importante qu'elle masque presque entièrement le signal d'intérêt en saturant le détecteur et crée une forte variance sur la mesure en introduisant un important bruit photonique. L'opération de retrait est alors ambiguë et la répétabilité des résultats pas toujours assurée.

Une autre méthode pour séparer le Raman de la fluorescence est la mesure dans le domaine temporel[3]. Elle exploite la différence de profil d'émission dans le temps entre les phénomènes Raman et fluorescence pour les séparer. Bien que ses premières utilisations remontent aux années 80, cette méthode est restée peu utilisée, car elle nécessitait des détecteurs très sophistiqués. Mais l'arrivée des photodiodes avalanche à photon unique ultra-rapide au début des années 2000 a offert de nouvelles solutions technologiques[4]. Plusieurs systèmes de spectroscopie Raman dans le domaine temporel ont ainsi été développés en utilisant le comptage de photon unique corrélé dans

le temps. Si cette technique s'est avérée efficace pour isoler le spectre Raman sur des échantillons artificiels, elle n'a en revanche jamais été testée sur des tissus biologiques.

1.1 Hypothèses et objectifs

Ce projet a été mené au sein du Laboratoire de Radiologie Optique (LRO) dont la majorité des travaux sont axés sur l'utilisation de la spectroscopie Raman pour la détection du cancer. La reconnaissance du type de tissus est faite par des méthodes de classification dont les résultats dépendent grandement de la qualité des données. Pour répondre à la problématique du signal de fond due à la fluorescence, qui limite la mesure du spectre Raman dans ce contexte, l'utilisation du domaine temporel est envisagée pour remplacer la méthode de traitement algorithmique utilisée actuellement. Ce choix est basé sur les hypothèses suivantes :

Hypothèse 1 : La suppression du signal de fond permet d'éviter la saturation du détecteur et de réduire la variance sur la mesure, augmentant ainsi la qualité des spectres Raman.

Hypothèses 2 : La fluorescence de tissu biologique peut être rejetée grâce à un système de mesure résolu dans le temps et un détecteur à photon unique.

L'objectif final est de démontrer que la méthode temporelle est envisageable dans le contexte biomédical de la spectroscopie Raman de tissus biologiques. Pour y parvenir, des objectifs spécifiques sont formulés :

Objectif 1 : Concevoir un système de spectroscopie Raman par la méthode du comptage de photon unique corrélé dans le temps.

Objectif 2 : Réaliser des acquisitions sur tissus et observer l'effet du domaine temporel sur la qualité des spectres Raman.

Objectif 3 : Comparer les résultats obtenus avec un système dans le domaine temporel et ceux d'un système conventionnel utilisé au sein du LRO.

1.2 Plan du mémoire

Ce document est séparé en 6 chapitres, incluant celui-ci. Le chapitre 2 met le projet en contexte avec un rappel des notions physique derrière la spectroscopie Raman, une revue des différentes méthodes de suppression de la fluorescence et enfin un état de l'art de la méthode temporelle. Le

chapitre 3 présente la preuve de concept de la méthode sur un tissu biologique réalisé avec système expérimental en lumière visible. Le chapitre 4 introduit un second système qui combine, pour la première fois, mesure dans le domaine temporel et interférométrie. Le chapitre 5 revient sur les travaux réalisés lors de cette maîtrise sous la forme d'une discussion. Le dernier chapitre conclut ce mémoire sur les résultats importants obtenus et le futur du projet.

CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE

2.1 Spectroscopie Raman : théorie et enjeux

2.1.1 Diffusion Raman

La diffusion Raman doit son nom au scientifique qui, en 1928, a été le premier à l'observer[5]. L'effet Raman a lieu lors de l'interaction entre un photon, de fréquence ω_0 ayant une énergie $E_0 = h * \omega_0$, et une molécule. Lors de cette interaction, le photon transmet son énergie à la molécule. Si cette énergie correspond exactement à l'écart entre l'état fondamental et un certain état électronique de la molécule, celle-ci conserve l'énergie qui lui est transmise et reste au niveau énergétique nouvellement atteint : c'est le phénomène d'absorption. Dans le cas contraire, la molécule passe à un niveau d'énergie dit « virtuel » et réémet quasi immédiatement (~ 5 fs)[6] un nouveau photon sous forme de rayonnement : c'est le phénomène de diffusion. L'énergie de ce photon (et donc la fréquence du rayonnement) est soit égale à celle du photon incident, on parle alors de diffusion élastique ou Rayleigh, soit inférieure ou supérieure, on parle alors de diffusion inélastique ou respectivement Raman Stokes et Raman Anti-Stokes. Ces phénomènes sont illustrés sur la figure 2.1 sous la forme d'un diagramme de Jablonski.

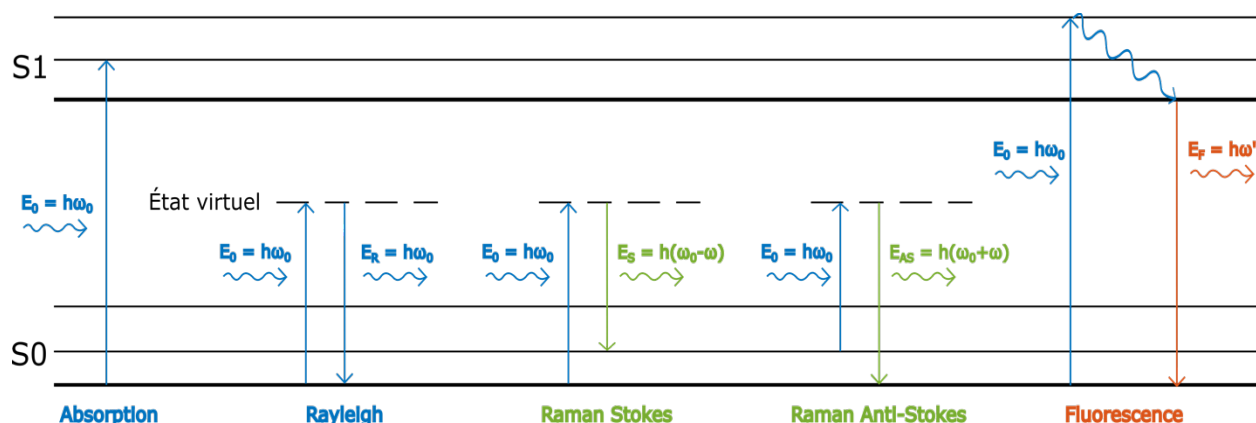


Figure 2.1 - Diagramme de Jablonski des principales interactions lumière / matière

La différence énergétique lors de la diffusion inélastique est propre à l'énergie d'un mode de vibration de la molécule excitée. Dans le cas de la diffusion Stokes, la plus probable, c'est l'énergie du photon incident qui est convertie en énergie vibrationnelle. À l'inverse, dans le cas de la diffusion Anti-Stokes c'est la molécule, alors déjà excitée, qui donne son énergie au photon

réémis. La nécessité pour la molécule de se trouver avant l'interaction dans un état d'excitation vibrationnelle rend la probabilité de ce phénomène très faible.

Le spectre Raman est la superposition des photons émis par les modes de vibration de la molécule, formant des raies spectrales très étroites et ce, avec une énergie bien précise, exprimée selon l'équation suivante :

$$E = h(\omega_0 - \omega) = hc \left(\frac{1}{\lambda_0} - \frac{1}{\lambda} \right) \quad (2.1)$$

Avec λ_0 la longueur d'onde du photon d'excitation et λ celle du photon réémis.

Un spectre Raman fournit, par observation de ces pics, une information sur le contenu moléculaire de l'échantillon analysé. La largeur des pics étant directement reliée à celle de l'excitation, les systèmes de spectroscopie Raman utilisent des sources à fréquence d'émission très précise afin de fournir une haute résolution spectrale. On représente communément les spectres selon le décalage d'énergie par rapport à la source, plutôt qu'en longueur d'onde absolue. On parle alors de décalage Raman exprimé en nombre d'onde $\Delta\omega$ en cm^{-1} . On passe d'une unité à l'autre grâce à la formule :

$$\Delta\omega [\text{cm}^{-1}] = 10^7 \left(\frac{1}{\lambda_0 [\text{nm}]} - \frac{1}{\lambda [\text{nm}]} \right) \quad (2.2)$$

En plus de sa haute précision spectrale, le phénomène Raman est aussi très rare comparativement à la diffusion Rayleigh. Dans le cas des tissus biologiques, seulement 1 photon sur 10^8 sera en moyenne réémis sous forme de diffusion Raman [7]. La nécessité d'utiliser une source à haute intensité telle qu'un laser, afin d'augmenter la quantité de signaux Raman produits, est donc un facteur à prendre en considération lors de la conception d'un système de spectroscopie Raman. Mais cela a également pour effet l'augmentation de la diffusion de Rayleigh. Cette dernière doit être obligatoirement filtrée avant détection sous peine de masquer complètement le signal d'intérêt.

Enfin, il existe une relation de proportionnalité entre l'intensité de la diffusion Raman I_{raman} et la fréquence de la source d'excitation ω_0 à la puissance 4. Cette intensité est donc inversement proportionnelle à λ_0 [8].

$$I_{raman}(\lambda) \propto \frac{1}{\lambda_0^4} \quad (2.3)$$

Selon ce seul critère, le système de spectroscopie Raman idéal aurait donc un laser avec une longueur d'onde la plus courte possible afin de maximiser l'intensité du signal d'intérêt.

2.1.2 Fluorescence

En plus de la diffusion, un autre phénomène est responsable d'émission de photons suite à une interaction lumière / matière : c'est la fluorescence, en rouge sur le diagramme de Jablonski précédent (Figure 2.1). Lorsqu'il y a absorption, l'énergie électromagnétique du photon est convertie en énergie électronique et la molécule se trouve alors dans un état d'excitation électronique (S1 ou plus). Lors du retour à l'état fondamental (S0), l'énergie libérée peut dans certains cas être reconvertie en rayonnement électromagnétique après perte d'une partie de l'énergie initiale sous forme vibrationnelle. L'émission des nouveaux photons se fait donc, comme la diffusion Raman Stokes, à des longueurs d'onde supérieures à celle de la source. Mais contrairement à celle-ci, la fluorescence est continue sur le spectre, le signal est ainsi bien plus large comparativement aux pics Raman (Figure 2.2a).

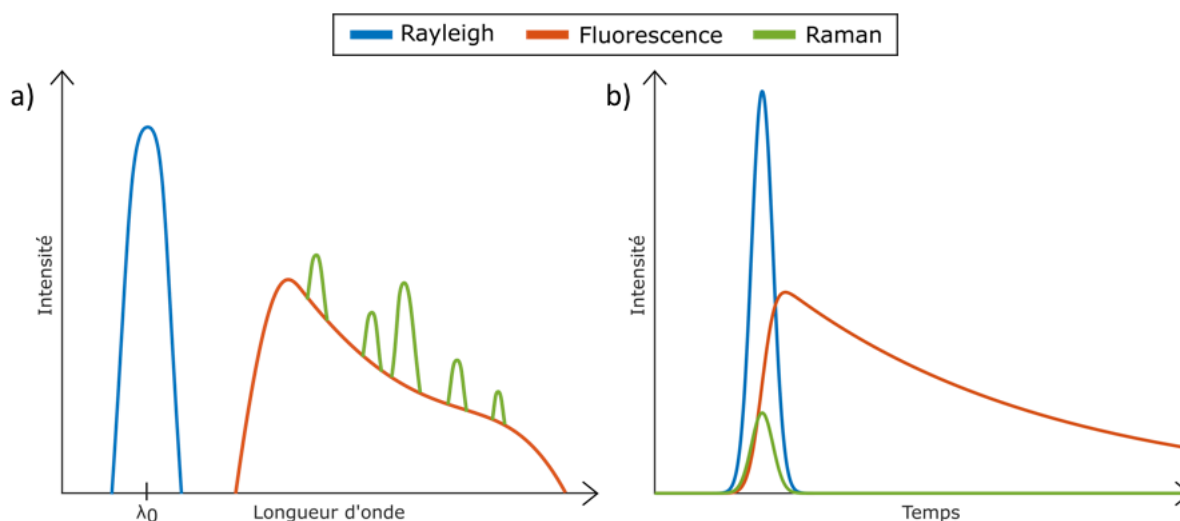


Figure 2.2 – Comparaison théorique des phénomènes de diffusion Rayleigh, diffusion Raman et Fluorescence a) dans le domaine spectral b) dans le domaine temporel

Les molécules responsables de la fluorescence sont appelées les fluorophores, et sont caractérisées par une courbe d'absorption et d'émission. Les tissus biologiques sont naturellement composés de fluorophores biologiques, aussi bien dans le milieu intracellulaire (coenzymes NADH et flavine) qu'extracellulaire (protéines collagènes et élastine)[9]. Présents en grand nombre, ils génèrent un fort signal intrinsèque au tissu : on parle d'autofluorescence. Ce phénomène a une efficacité bien supérieure à la diffusion Raman, entraînant la saturation rapide du détecteur et réduisant grandement le rapport du signal d'intérêt sur le signal de fond (figure 2.3). C'est l'un des principaux obstacles à l'utilisation de la spectroscopie Raman dans les tissus biologiques.

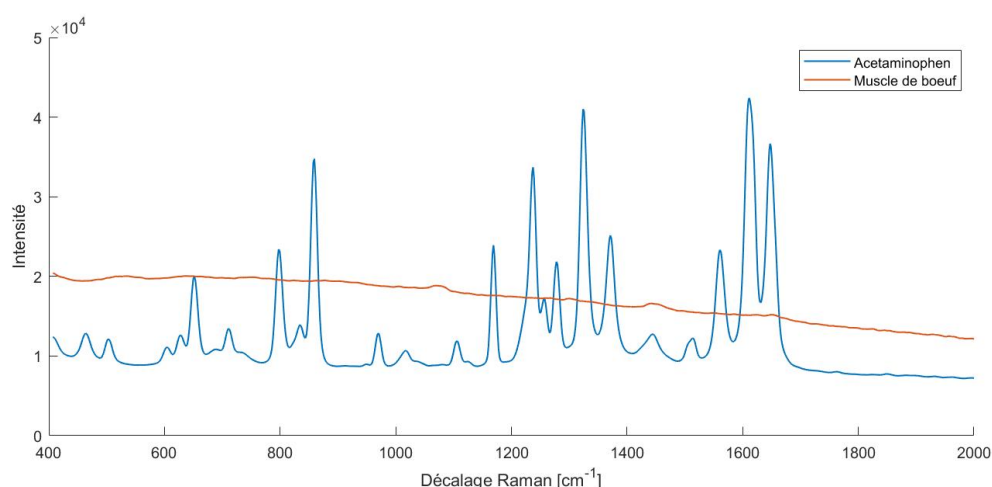


Figure 2.3 – Spectre Raman brut de l'acétaminophène comparativement à celui d'un tissu de muscle de bœuf.

Dans le domaine temporel, là où les diffusions de Rayleigh et Raman sont des phénomènes quasi instantanés, la fluorescence a une signature plus longue (Figure 2.2b), de l'ordre de la nanoseconde[10]. Son intensité I_{fluor} étant liée à l'état de désexcitation de la molécule, son profil temporel peut être défini comme une décroissance exponentielle telle que :

$$I_{fluor}(t) \propto e^{-t/\tau} \quad (2.3)$$

Avec τ le temps de vie du fluorophore, très sensible à son environnement (température, pH). Dans le cas d'un tissu biologique, ensemble complexe de plusieurs molécules, le temps de vie total est une moyenne du temps de vie de chaque fluorophore, pondérée par la contribution de chacun d'eux[10]. La microscopie par imagerie de temps de vie de fluorescence ou FLIM (de l'anglais «

Fluorescence-Lifetime Imaging Microscopy ») est la technique qui exploite cette propriété de la fluorescence afin de fournir de l'information sur l'environnement et les changements moléculaires. Elle est notamment utilisée pour l'observation de l'autofluorescence. En effet les propriétés des fluorophores endogènes qui en sont responsables sont influencées par leur environnement et constituent donc des biomarqueurs servant pour la caractérisation et le diagnostic des tissus[11].

Les fluorophores sont également caractérisés par des spectres d'absorption et d'émission. Cela signifie que l'intensité fluorescente d'une molécule dépend de la longueur d'onde de la source d'excitation. Les fluorophores endogènes émettent majoritairement entre 350nm et 600nm [12]. Cette propriété est la raison pour laquelle la grande majorité des systèmes de spectroscopie Raman, qui cherchent à s'affranchir de la fluorescence, utilisent des sources laser dans le proche infrarouge. Cela va en revanche à l'opposé de l'équation (4.3) selon laquelle le Raman s'intensifie en allant vers des longueurs d'ondes plus courtes. La figure 2.4 illustre ce compromis entre augmentation du signal Raman et réduction de l'influence de la fluorescence.

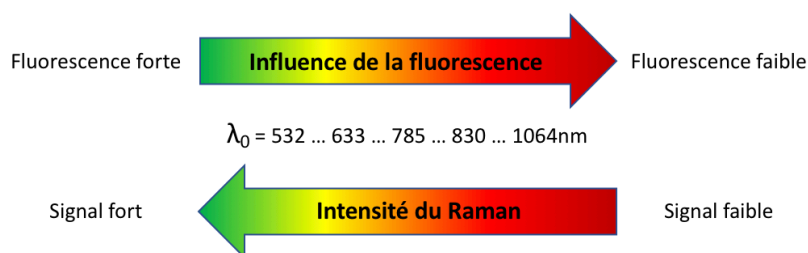


Figure 2.4 – Force du signal Raman et impact de la fluorescence pour des longueurs d'onde d'excitation communément utilisées

2.1.3 Spectroscopie Raman pour la détection du cancer

Le potentiel de la spectroscopie Raman pour la caractérisation de tissu biologique est très prometteur dans le domaine de l'oncologie. La dégradation d'un tissu sain vers un tissu cancéreux est marquée par des changements au niveau moléculaire[13]. Ces changements sont détectables par la spectroscopie Raman et servent alors de biomarqueurs pour la différenciation entre tissus sains et tissus cancéreux. La technique étant minimalement invasive, non destructive et ne nécessitant pas d'agent de contraste exogène, elle est particulièrement adaptée à des applications cliniques *in vivo*. Durant la dernière décennie, de nombreuses expérimentations ont été réalisées en

ce sens [2]. La spectroscopie Raman a ainsi été utilisée avec succès pour la détection de plusieurs types de cancers: prostate[14], sein[15], ou encore cerveau[16].

Un système de spectroscopie Raman est généralement composé d'une source laser continue et d'un spectromètre couplé à une caméra CCD (Figure 2.5). Entre les deux, un instrument optique transmet l'excitation laser à l'échantillon, collecte la lumière émise et la retourne vers le spectromètre. Cet instrument peut varier en fonction du contexte clinique. Il peut prendre la forme d'un microscope, pour une utilisation en pathologie par exemple[17]. Pour une application intra-opératoire, une sonde fibrée a été développée, permettant une reconnaissance en temps réel et in situ de tissus cancéreux[16]. Cette sonde est composée d'une fibre centrale d'excitation et de 8 fibres de collections (Figure 2.5). Celles-ci sont placées circulairement autour de la fibre du laser afin de maximiser l'efficacité de collection. Un filtre passe-bas $\lambda < 785\text{nm}$ est placé entre la fibre de collection et l'échantillon afin de supprimer les artefacts causés par la fibre optique. Un filtre passe-haut $\lambda > 785\text{nm}$ est lui placé avant les fibres de collection, afin de couper la diffusion Rayleigh.

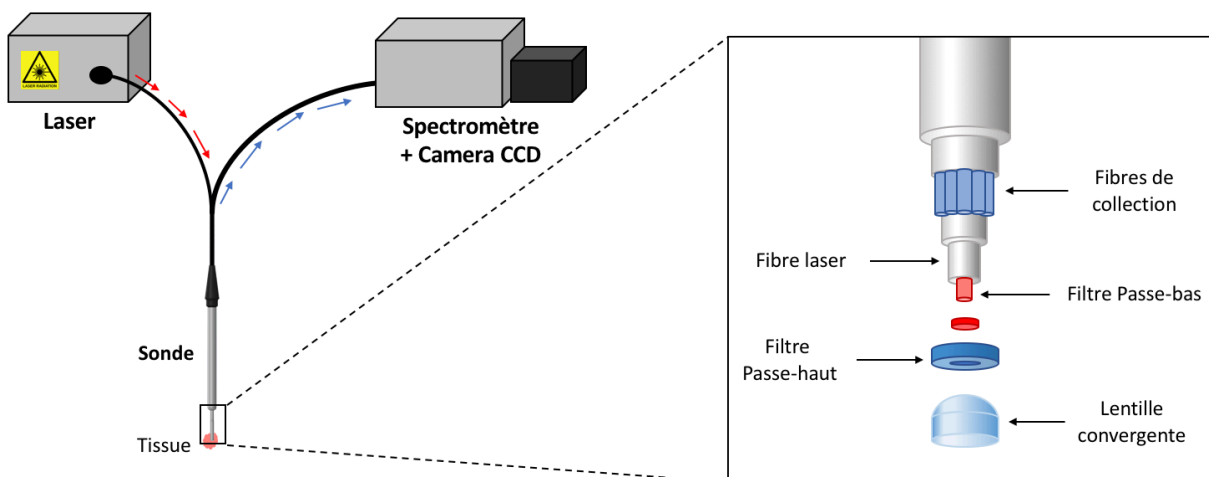


Figure 2.5 – Système de spectroscopie Raman classique avec sonde Raman (Adapté de [16])

Ces filtres ont été sélectionnés pour une utilisation de la sonde avec un laser à 785nm. Comme nous l'avons vu, à cette longueur d'onde l'autofluorescence est moins importante. On se trouve également dans la « fenêtre thérapeutique », intervalle entre 650 et 1350nm à l'intérieur duquel la diffusion est l'interaction majoritaire entre photon et tissu[18]. Mais cela ne suffit pas pour supprimer entièrement son influence sur la mesure, comme on peut le constater sur le spectre de tissu de bœuf, en orange sur la figure 4.3.

2.2 Méthodes de suppression de la fluorescence

La faiblesse du signal Raman, comparativement à la fluorescence, est le principal obstacle au développement de la spectroscopie Raman, et ce particulièrement dans un contexte biomédical. Plusieurs méthodes ont été explorées pour répondre à ce problème, chacune exploitant une différence dans les propriétés physiques des deux phénomènes Raman et fluorescence. Plusieurs articles proposent une revue de ces méthodes [3, 19] et les regroupent sous 4 catégories: le traitement mathématique post-acquisition (2.2.1), le domaine spectral (2.2.2), le domaine temporel (2.2.3) et le domaine fréquentiel (2.2.4).

On évalue généralement la qualité d'un signal Raman par le calcul du rapport signal-sur-bruit, noté SNR (de l'anglais « Signal-to-noise ratio »), exprimé par la formule :

$$SNR_{raman} = \frac{Raman}{\sqrt{Raman + Signal\ de\ fond}}$$

Les deux composantes principales du signal de fond sont la fluorescence et le bruit d'obscurité. Ce bruit, appelé couramment par son nom anglais « dark noise » est la production de signal par le détecteur malgré l'absence de lumière. La formule du SNR est adaptée en fonction du type de détecteur et du signal qu'il fournit (intensité, compte de photon). Pour comparer des données acquises avec un système donné, on normalise par le temps d'acquisition et la puissance de la source laser.

2.2.1 Traitement mathématique

Le traitement mathématique en post-acquisition est la méthode standard de suppression de la fluorescence. Le signal de sortie d'un spectroscope Raman conventionnel est une courbe d'intensité en fonction de la longueur d'onde où sont confondue diffusion Raman et fluorescence. Plusieurs techniques et algorithmes ont été développés afin d'exploiter les différences spectrales entre les deux phénomènes dans le but d'isoler le Raman.

Parmi elles, la régression polynomiale est sans doute la plus populaire[20]. La courbe de fluorescence est approximée par un polynôme d'ordre 4 à 7, que l'on soustrait ensuite au signal complet. Cette opération a l'avantage de conserver la forme originale des pics Raman. L'algorithme I-ModPoly[21], bien que vieux de plusieurs années, est encore utilisé aujourd'hui.

C'est une version améliorée de l'approximation par polynôme qui prend en compte l'influence du bruit sur le signal ainsi que les pics Raman les plus larges pouvant être éliminés par le polynôme. Bien qu'elle soit facile à implémenter et relativement rapide d'exécution, cette méthode repose grandement sur l'expérience de l'utilisateur pour évaluer la correspondance entre le polynôme et le signal de fond de fluorescence.

Un autre algorithme plus récent[22] se sert de la morphologie mathématique pour automatiser l'isolation du Raman. Cette technique d'analyse d'image est ici adaptée au traitement de signal à une dimension. L'ouverture et la fermeture sont ses deux opérations de base. Elles consistent en l'application consécutive de deux opérateurs : l'érosion et la dilatation, définis respectivement comme le minimum et le maximum d'une fonction sur une fenêtre dont la taille est définie par l'utilisateur. En parcourant l'ensemble du spectre avec cette fenêtre, l'algorithme forme point par point une ligne de base qui s'apparente à la fluorescence. Comme pour la régression polynomiale, on obtient finalement le Raman par soustraction de cette ligne par rapport au signal complet. Cet algorithme a récemment été utilisé avec succès pour une évaluation quantitative de spectres Raman *in vivo*[23]. Son utilisation repose néanmoins là encore sur l'expertise de l'utilisateur pour choisir la taille de la fenêtre et évaluer l'efficacité du processus.

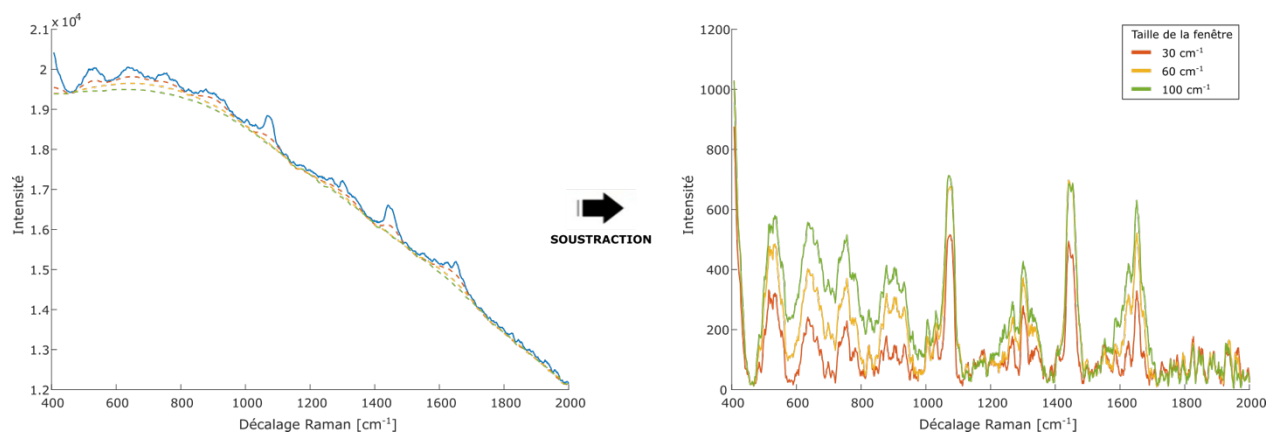


Figure 2.6 – Illustration de la variabilité du résultat de l'algorithme morphologique en fonction de la taille de la fenêtre

D'autres méthodes existent telles que la transformée en ondelette[24]. On part généralement du principe que le spectre est composé de trois sources : le bruit à haute fréquence, les pics Raman à fréquence moyenne et enfin le signal de fluorescence à basse fréquence. La transformée en ondelette permet de diviser le signal en composantes fréquentielles pour ensuite sélectionner les

fréquences moyennes. Bien que théoriquement viable, cette méthode reste néanmoins très limitée en pratique, particulièrement sur des échantillons biologiques[25], lorsque le signal Raman est très faible et se confond alors avec la fluorescence dans le domaine fréquentiel. Le résultat dépend en plus d'un grand nombre de paramètres. Le calcul de dérivée pour supprimer la fluorescence est une autre méthode populaire, relativement simple à implémenter. Mais son utilisation modifie la forme des pics Raman et conserve les petites variations dues au bruit[26].

Bien que le traitement mathématique post-acquisition soit aujourd'hui l'approche la plus simple pour isoler le signal Raman, elle repose grandement sur l'expérience de l'utilisateur pour juger de la fiabilité des résultats. Mais la principale limite rencontrée par cette méthode reste surtout la limitation de la plage dynamique des détecteurs. Il a été démontré que le SNR Raman pouvait être amélioré en augmentant le temps d'intégration[23]. Mais lorsque le ratio Raman / Fluorescence est très faible comme c'est le cas dans les tissus biologiques *in vivo*, le détecteur sera saturé par le signal de fond avant même de pouvoir capter le Raman. Son isolation par traitement mathématique est alors quasi impossible. Or il n'existe à ce jour aucune comparaison quantitative de ces différents algorithmes entre eux, le jugement sur leur efficacité doit être fait de manière qualitative à l'appui de la littérature et des expertises du laboratoire.

2.2.2 Domaine spectral

Cette méthode se base également sur une différence spectrale entre Raman et fluorescence. En changeant légèrement ($\sim 1\text{nm}$) la longueur d'onde d'excitation, les pics Raman vont eux aussi être décalés du même intervalle. La fluorescence elle, est moins sensible aux variations de longueur d'onde et restera relativement inchangée. La principale technique basée sur cette méthode est la spectroscopie par différence Raman à excitation décalée ou SERDS (de l'anglais « *Shifted Excitation Raman Difference Spectroscopy* »). Elle requiert l'utilisation d'un laser capable d'émettre à deux longueurs d'onde différentes, mais très proches, ainsi qu'un post-traitement des données afin de reconnaître les variations dans la forme du signal.

Le SERDS a été testé sur des échantillons biologiques de tissus de bœuf et de porc[27]. Les résultats de cette étude sont concluants à des longueurs d'onde d'excitation proche de l'infrarouge (671nm et 783nm) : les signaux Raman sont reconnaissables et la fluorescence bien éliminée. Mais la méthode montre ses limites dans le domaine visible (laser à 488nm), la fluorescence recouvrant alors la quasi-totalité du Raman. Une autre étude a été réalisée *in vivo* sur la peau humaine [28]

mais les résultats présentés sont mitigés : le traitement des données est complexe et la reproduction d'un même spectre obtenu avec un système Raman conventionnel moins évidente.

La méthode de suppression de la fluorescence par le domaine spectral possède l'avantage de réutiliser les mêmes spectromètre et caméra qu'un système Raman conventionnel. Le laser doit en revanche être choisi en conséquence. Cette méthode est aussi dépendante d'un traitement de données après acquisition complexe ainsi que de la reproductibilité du bruit entre les spectres mesurés.

2.2.3 Domaine temporel

Nous l'avons vu, de par leur nature physique, diffusion Raman et fluorescence sont deux phénomènes au profil temporel très différent. Le Raman est quasi instantané, là où la fluorescence décroît exponentiellement sur plusieurs centaines de picosecondes voire plusieurs nanosecondes. On parle communément de découpage temporel noté TG (de l'anglais « *Time-Gating* ») s'agissant des techniques qui exploitent le domaine temporel afin d'isoler le signal Raman. Il s'agit théoriquement et conceptuellement du moyen le plus efficace et le plus direct pour répondre à la problématique de la saturation des détecteurs par la fluorescence. Les systèmes de spectroscopie Raman TG se développent de plus en plus avec les avancées technologiques notamment en matière de microélectronique et ont récemment fait l'objet d'une revue détaillée[4].

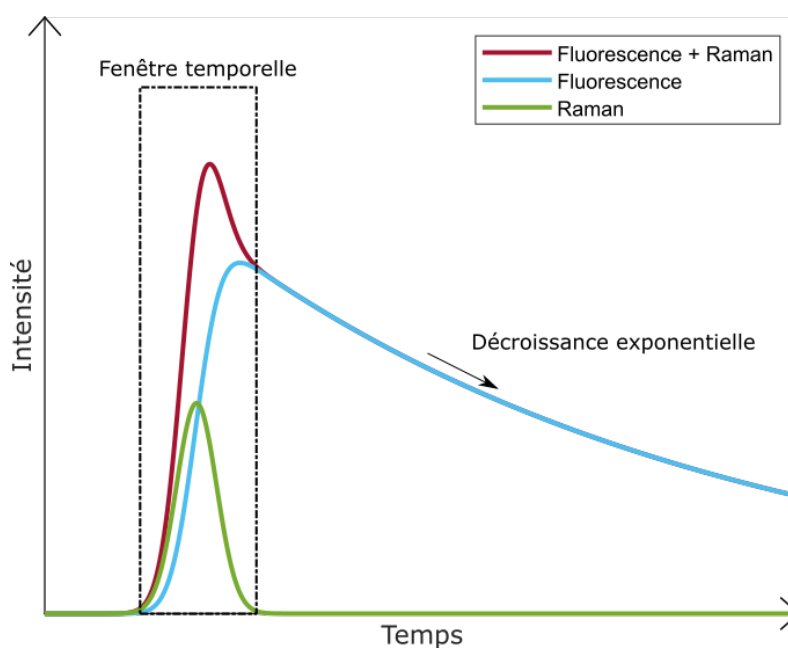


Figure 2.7 – Principe du découpage temporel en spectroscopie Raman

Pour concevoir un système TG, la première nécessité est une source laser à pulse ultra rapide. Les premières expérimentations coïncident ainsi avec le développement des lasers nanosecondes dans les années 70. À cette époque, Yaney[29] implémente le premier système TG et conclut à une importante amélioration du SNR Raman sur un composé chimique artificiel. Plusieurs expérimentations suivront[30, 31], on constate alors que la réduction de la taille de fenêtre temporelle améliore la qualité du rejet de la fluorescence, d'où l'importance de la résolution temporelle du système.

La «*Kerr-gate*», littéralement la porte Kerr, est une technique exploitant le domaine temporel. L'effet Kerr est la variation de la biréfringence d'un matériau par application d'un champ électromagnétique. Un montage *Kerr-gate* utilise un matériau de ce type combiné à des polariseurs pour rejeter avec une haute résolution temporelle (~ 3 ps) la fluorescence du spectre Raman[32]. La fenêtre temporelle est ajustée en jouant sur le champ qui provient du pulse laser et sur les dimensions du milieu à effet Kerr. Cette technique a été utilisée pour la mesure de signaux Raman sur des tissus osseux[33] et de couches profondes de la prostate et de la vessie[34]. Mais elle est peu adaptée au contexte biologique *in vivo*, car elle requiert des pulses laser à très haute énergie ($> \mu\text{J}$) en plus d'un montage optique complexe et très encombrant.

Une autre méthode consiste à utiliser un détecteur à découpage temporel ultra rapide. Plus simple dans sa conception, un tel système possède en plus l'avantage de réduire statistiquement l'influence de la lumière ambiante et du bruit sur la mesure. L'enjeu est d'avoir une commande d'activation et désactivation de la détection très rapide afin de garder la fenêtre d'ouverture la plus courte possible, le tout à une fréquence suffisamment rapide pour maintenir un rapport cyclique acceptable. On parle de fenêtre temporelle pour désigner cet intervalle de temps durant lequel la détection de signal va avoir lieu (figure 2.7). L'efficacité de la méthode est donc très dépendante des performances du détecteur et notamment de l'électronique de commande. Les évolutions récentes de ce type de détecteurs, comme nous le verrons par la suite, permettent aujourd'hui d'envisager l'implémentation de cette méthode pour la suppression de l'autofluorescence de tissus dans le cadre d'applications biomédicales.

2.2.4 Domaine fréquentiel

L'utilisation du domaine fréquentiel constitue un autre moyen d'exploiter la différence temporelle entre Raman et fluorescence. En effet cette méthode est reliée à la précédente par la transformée

de Fourier. Si la source d'excitation est modulée en intensité, le long temps de vie de la fluorescence se traduit par un signal démodulé dans le domaine fréquentiel, alors que le Raman instantané va suivre la modulation d'origine (figure 2.8). La méthode nécessite donc utilisation d'un laser à intensité modulé et très haute fréquence ($> \text{MHz}$).

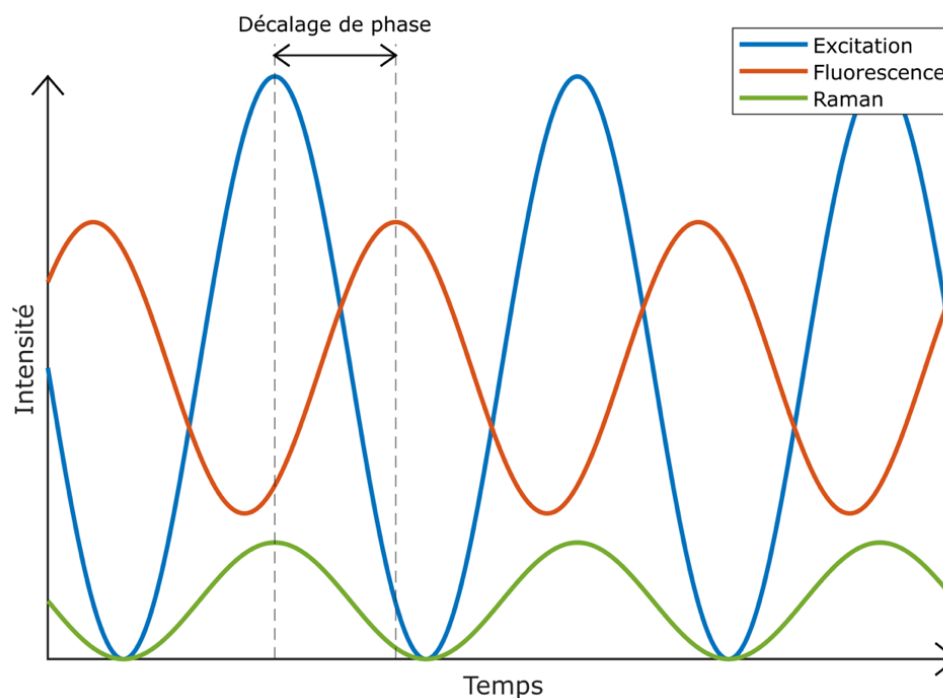


Figure 2.8 – Oscillogramme des signaux théoriques de la méthode fréquentielle.

Il existe alors deux approches pour exploiter le décalage et éliminer la fluorescence. La première consiste à extraire les hautes fréquences (le Raman) à l'aide d'un analyseur de spectre[35]. La seconde est d'utiliser un amplificateur à détection synchrone pour supprimer tout signal présentant un décalage de phase avec la sinusoïde d'origine[36]. En 1988, Wirth présente une comparaison entre les méthodes fréquentielle et temporelle[37]. La mesure du décalage de phase présente alors un meilleur rejet de la fluorescence. Mais cette conclusion est très contrastée, car la méthode ne fonctionne que pour des échantillons ayant naturellement un signal Raman très intense. La complexité du montage est un autre argument qui joue en la défaveur du domaine fréquentiel, qui a donc été très peu développé par la suite.

Par ailleurs, la méthode de suppression de la fluorescence par domaine fréquentiel ne doit pas être confondue avec la spectroscopie Raman par transformée de Fourier. Celle-ci décrit un système qui utilise le décalage temporel, créé par interférométrie, pour mesurer un spectre dans le domaine du

temps. La finalité de ces deux concepts n'est donc pas la même, bien qu'ils exploitent tous deux le passage d'un domaine à l'autre grâce à la transformée de Fourier.

2.2.5 Comparaison

Ci-dessous un tableau de comparaison des méthodes décrites précédemment. L'évaluation de la performance correspond à l'amélioration du ratio Raman / fluorescence que l'on retrouve typiquement dans la littérature pour une méthode donnée. L'évaluation du coût correspond aux modifications nécessaires par rapport à un système de spectroscopie Raman classique pour mettre en place la méthode.

Tableau 2.1 – Synthèse des principales méthodes de suppression de la fluorescence. Adapté de [3, 4, 19]

Méthode	Traitement mathématique	Domaine spectral	Domaine temporel	Domaine fréquentiel
Coût	Faible	Moyen	Élevé	Élevé
Performance	Élevée	Moyenne	Élevée	Moyenne
Avantage(s)	<ul style="list-style-type: none"> Pas de modification de matériel Conserve toutes les caractéristiques spectrales 	<ul style="list-style-type: none"> Modification modérée du système 	<ul style="list-style-type: none"> La méthode la plus efficace Réduction statistique du bruit 	<ul style="list-style-type: none"> Théoriquement très efficace
Inconvénients	<ul style="list-style-type: none"> Limité par la plage dynamique Résultats dépendants de l'utilisateur Introduction d'artefacts 	<ul style="list-style-type: none"> Traitement des données complexe Dépendant de la reproduction des résultats 	<ul style="list-style-type: none"> Importante modification de matériel Kerr-gate : nécessité de pulses à haute énergie 	<ul style="list-style-type: none"> Installation complexe et encombrante Nécessité d'un signal Raman intense

On constate que le traitement mathématique est l'approche offrant le meilleur compromis entre un faible coût (car aucune modification de matériel n'est nécessaire) et des performances relativement élevées (au vu du grand panel de solutions développées). Certaines limites telles que la variabilité des résultats et l'introduction d'artefacts viennent contraster cette conclusion. Dans le cas des tissus biologiques, le plus gros problème est la saturation de la plage dynamique du détecteur par l'autofluorescence. Le domaine temporel, souvent cité dans la littérature comme la méthode la plus performante théoriquement, apparaît alors comme une solution alternative à envisager.

Nous nous limitons ici uniquement aux méthodes applicables à la spectroscopie Raman spontanée qui est la plus répandue et la plus adaptée au contexte biomédical de tissus *in vivo*. Ces méthodes utilisent l'approche de la réduction du signal de fond pour augmenter le SNR Raman. Mais à noter qu'il existe d'autres techniques, qui à l'inverse, se basent sur une augmentation du signal Raman pour y parvenir. La spectroscopie Raman améliorée en surface est une technique qui repose sur l'utilisation de surfaces ou nanostructures métalliques. Le champ électrique généré à proximité de celles-ci permet une augmentation de la diffusion Raman des molécules qui se trouvent dans la zone, par effet plasmonique. Mais cette technique semble peu adaptée à l'imagerie de tissus *in-situ* car elle nécessiterait l'injection de nanoparticules dans le corps du patient au niveau de la zone d'intérêt.

D'autres techniques telles que la spectroscopie Raman stimulée utilisent les effets d'optique non linéaire pour augmenter le signal d'intérêt. La diffusion Raman stimulée est générée en excitant l'échantillon avec deux faisceaux appelés pompe et Stokes de fréquence respective ω_p et ω_s . Lorsque la différence entre ces deux fréquences correspond à un niveau vibrationnel de la molécule, l'intensité au niveau du faisceau pompe va connaître une diminution et celle du faisceau Stokes va être augmentée. La technique repose alors sur l'observation des changements du faisceau pompe lors de la modulation du faisceau Stokes et permet une détection du signal Raman sans fluorescence. En effet, lorsque la différence de fréquence ne rencontre pas un niveau vibrationnel, aucun changement n'est observable au niveau des faisceaux, il n'y a donc pas de signal de fond. Néanmoins, pour envisager une utilisation de cette technique dans un cadre clinique, des améliorations doivent d'abord être faites au niveau matériel, car elle repose actuellement sur une installation très complexe comparativement à un système de spectroscopie Raman standard.

2.3 Spectroscopie Raman par TG

Nous revenons plus en détail dans la présente section sur l'utilisation du domaine temporel en spectroscopie Raman, et plus particulière son implémentation à l'aide d'un détecteur TG. Comme nous l'avons vu, l'efficacité de la méthode dépend grandement de la rapidité et de la sensibilité de celui-ci. Son choix est donc crucial. Il en existe plusieurs types, aux caractéristiques très différentes.

L'efficacité quantique QE (pour « *Quantum Efficiency* ») est la métrique communément utilisée pour caractériser la sensibilité d'un dispositif photosensible. C'est la fraction de photons incidents à la surface du détecteur qui produisent un photoélectron, charge collectée par le détecteur.

2.3.1 Détecteurs

Pour mettre en place la méthode TG, le détecteur doit avoir une très haute sensibilité et une résolution temporelle sous la nanoseconde en plus d'offrir une commande rapide [4]. Parmi les caméras CCD généralement utilisées pour la spectroscopie Raman, les iCCD intègrent un intensificateur qui permet à la fois une augmentation conséquente du gain et une activation / désactivation très rapide de la détection. Martyskhin démontre, sur des échantillons de cristaux, la capacité d'un tel appareil pour le rejet de fluorescence avec un laser pulsé à 785nm[38]. La caméra Streak est une alternative de détecteur ultra rapide, précédemment utilisé[39], et qui offre une meilleure résolution temporelle, mais avec une moins bonne sensibilité de détection[40]. Ces appareils restent néanmoins extrêmement coûteux et encombrants avec notamment la nécessité d'un important système de refroidissement. Ce qui limite leur utilisation à des applications très spécifiques, majoritairement en laboratoire.

Les détecteurs traditionnellement utilisés pour la détection de lumière à faible intensité sont les tubes photomultiplicateurs ou PMT (de l'anglais « *Photomultiplier tubes* »). Par effet photoélectrique externe et grâce à une chambre scellée à vide, un PMT est capable de générer un signal électrique à partir d'un signal lumineux très faible, voire même un simple photon. Ils sont utilisés lors des premières expériences de spectroscopie Raman en domaine temporel[29]. Le découpage temporel était alors fait par une commande extérieure. Avec intégration d'un plateau à microcanaux (MCP pour « *microchannel plate* »), un dispositif d'amplification de charge, on obtient un détecteur à la réponse ultra rapide (~picosecondes), le rendant particulièrement adéquat pour un système résolu dans le temps. Un MCP-PMT a par exemple été utilisé pour la conception

d'un spectroscope Raman compact[41]. Les PMTs possèdent de plus une large surface active (plusieurs millimètres) ainsi qu'un faible niveau de bruit d'obscurité. Ils sont en revanche complexes, donc relativement coûteux, et très fragiles. Leur exposition à une lumière trop intense peut les endommager de manière irréversible. S'ils restent aujourd'hui très populaires notamment pour des systèmes de mesure de temps de vie de fluorescence, ces détecteurs à la technologie vieillissante ont peu à peu été remplacés par les photodiodes avalanche à photon unique, les SPADs (de l'anglais « Single-photon avalanche diode »), dans les systèmes à découpage temporel. Contrairement au PMTs, leur fonctionnement provient de l'effet photoélectrique interne.

Une photodiode à avalanche est un semi-conducteur sur lequel est appliqué une tension de biais inverse, afin de créer un courant par effet avalanche, suite à l'absorption de photons. Lorsque la tension dépasse un seuil dit « de claquage », un seul photon suffit à créer l'effet avalanche. Une SPAD est un photo-détecteur qui opère dans ce mode, appelé « Geiger ». Du fait de son mode de fonctionnement non linéaire, on utilise l'efficacité de détection de photon noté PDE, produit du QE et de la probabilité de déclenchement d'avalanche, pour la caractériser[42]. La majorité des SPADs sont faites en silicium, avec une sensibilité maximum dans le visible et proche infrarouge pouvant atteindre les 75%[43]. Cela les rend en revanche plus sensibles au bruit comparativement aux MCP-PMTs. Le taux de compte d'obscurité ou « *Dark Count Rate* » (DCR) est utilisé pour quantifier cet effet. De forme circulaire, elles sont de très petite taille avec un diamètre allant de 10 μ m à 500 μ m.

Les SPAD ont récemment bénéficié du développement en microélectronique du standard de fabrication CMOS pour s'imposer comme une solution viable de détecteur à commande à faible coût et à la taille réduite. Ce type de circuit est particulièrement adapté pour des systèmes résolus dans le temps, du fait de sa très haute vitesse de commutation. En 2011, les premières applications de la technologie CMOS-SPAD à la spectroscopie Raman par TG sont réalisées par Nissinen[44] et Blacksberg[45]. Nissinen présente un détecteur spécialement conçu pour cette application. Il démontre que l'activation de la détection dans une fenêtre de temps paramétrable permet une réduction effective du signal de fond de fluorescence en plus de réduire le DCR.

Tableau 2.2 – Comparaison des technologies de détecteurs adaptés à la spectroscopie Raman TG. Les données quantitatives sont des ordres de grandeurs (informations collectées de [4, 43]).

Type de détecteur	iCCD	MCP-PMT	CMOS-SPAD
Complexité	Haute	Moyenne	Faible
Taille de l'appareil	~ dm	~ cm	< cm
Surface de détection	~ mm (multi pixels)	~ mm	~ μm
Sensibilité (QE)	40%	20%	75%
Bruit	Faible	Faible	Moyen
Résolution temporelle	Picosecondes	Picosecondes	Picosecondes
Coût	~ 100k \$	~ 25k \$	< 10k \$

Les SPADs fabriquées par technologie CMOS ont plusieurs avantages par rapport aux autres technologies de photo-détection pour la mise en place de la méthode TG. On peut les résumer ainsi :

- Commande à haute précision temporelle → réponse du système plus courte
- Très haute sensibilité → meilleure efficacité de détection
- Conception moins complexe → moins chère à la production
- Taille réduite → intégration simplifiée dans le système

2.3.2 Comptage de photons unique corrélé dans le temps

Afin d'étudier la temporalité de phénomènes physiques tels que le temps de vie de fluorescence, on utilise communément le comptage de photon unique corrélé dans le temps noté TCSPC. Cette technique analyse l'intervalle de temps entre l'excitation par un pulse lumineux, le « Start », et la libération d'un photon, le « Stop ». En répétant cette opération à plusieurs reprises, on constitue le profil temporel de l'émission. Une photodiode est communément utilisée pour fournir le signal de Start. Pour le signal de stop, on utilise un détecteur à photon unique (PMT, SPAD)[46].

L'acronyme TCSPC est par extension utilisé pour décrire l'appareil électronique qui effectue la mesure de l'intervalle de temps et la convertit en information numérique. Ces appareils sont aujourd'hui très performants avec une précision temporelle sur la mesure de l'ordre de quelques picosecondes.

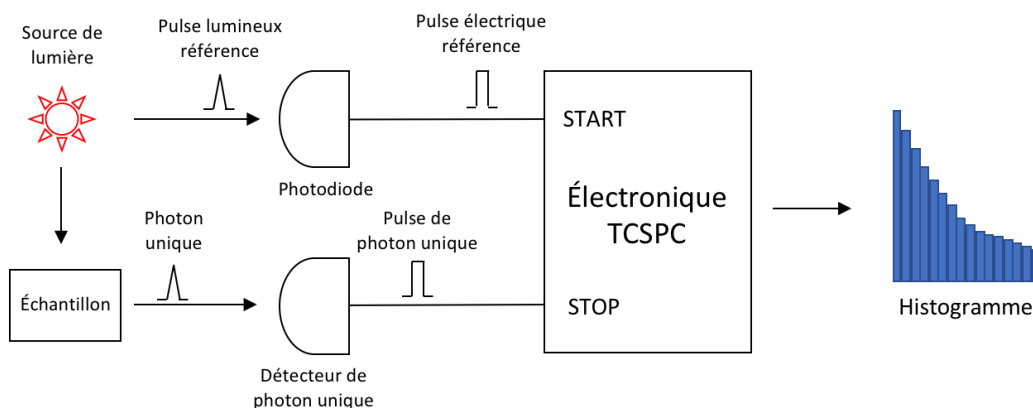


Figure 2.9 – Représentation schématique d'un système TCSPC

Pour garantir une représentation réaliste du profil temporel, il est nécessaire de maintenir une faible probabilité d'avoir plus d'un photon par pulse de référence. Pour maintenir cette statistique de photon unique, on utilise la « règle du pouce » suivante : minimum 20 pulses de référence pour 1 pulse compté. En d'autres termes, le taux du compte de photon ne doit pas excéder les 5%[47].

La fonction de réponse de l'instrument (IRF pour « *instrument response function* ») caractérise la précision temporelle d'un système TCSPC. C'est la largeur du pulse obtenu par une mesure sur un échantillon très diffusif (phénomène quasi instantané). Un système idéal aurait une réponse de la même longueur que celle du pulse d'excitation. Mais les différents éléments qui le composent (montage optique, détecteur, électronique) introduisent en pratique une certaine variabilité, qui allonge la durée du pulse. Les détecteurs sont la principale source d'imprécision temporelle. Leur choix et paramétrage est donc un point clé lors de l'élaboration d'un tel système.

La haute résolution temporelle offerte par un TCSPC est un atout pour l'application de la méthode TG en spectroscopie Raman. Zhang présente un système basé sur cette technique avec un IRF mesuré de 400ps[48]. En sélectionnant une plage temporelle sur la mesure, puis en la réduisant progressivement jusqu'à la limite de l'IRF, il démontre une augmentation progressive du ratio des pics Raman par rapport au signal de fond sur un échantillon non biologique (TNT).

2.3.3 Développement récent du Raman TG

Au cours de la dernière décennie, plusieurs systèmes de spectroscopie Raman basés sur le comptage de photon unique et des détecteurs à découpage temporel ont été développés. L'équipe de I. Nissinen de l'université d'Oulu, Finlande, est à l'origine de plusieurs publications sur le sujet. En 2013, ils présentent en détail la méthode TG sur un échantillon d'huile d'olive grâce au même détecteur CMOS-SPAD introduit 2 ans plus tôt et un laser pulsé à 532nm[49]. L'utilisation d'une longueur d'onde courte prend ici tout son sens : augmentation du signal Raman et de l'efficacité de détection du détecteur. La fenêtre temporelle appliquée sur la détection se charge d'éliminer la forte fluorescence qui normalement masque totalement le reste du signal. Cela a pour effet direct l'augmentation du SNR Raman, bien que cette conclusion soit faite par simple observation et non basée sur un calcul.

En 2018, Nissinen présente une évolution de la simple SPAD vers un champ de SPAD 16x256[50]. En plus de la photo-détection, l'appareil intègre l'électronique d'un TCSPC directement sur une même puce grâce à la fabrication CMOS. Un tel détecteur permet la mesure de l'ensemble du spectre en simultané et pourrait se substituer directement à une caméra CCD. Il a déjà été utilisé pour l'imagerie de dents humaines[51]. Sur 3 échantillons différents, une cartographie de la composition chimique est faite par mesures successives du spectre Raman à différents points. L'étude présente une classification de différentes zones de la dent basée sur le ratio des pics Raman entre eux. Elle compare également la mesure domaine temporel avec un spectroscopie Raman conventionnel à laser continu et montre une augmentation du SNR Raman allant jusqu'à un facteur 8 par rapport au système classique. La classification n'aurait ainsi pas pu être réalisée avec un tel système. Bien que la dent soit fortement minéralisée, donc moins bruitée qu'un tissu biologique tel que le muscle, cette étude démontre le potentiel de la méthode TG par comptage de photon unique pour l'utilisation de la spectroscopie Raman dans un contexte biomédical.

CHAPITRE 3 SPECTROSCOPIE RAMAN DANS LE DOMAINE TEMPOREL EN LUMIERE VISIBLE

Ce chapitre présente la première expérience de spectroscopie Raman dans le domaine temporel réalisée dans le cadre de cette étude. Elle consiste en l'élaboration d'un montage expérimental afin de mesurer un spectre Raman en lumière visible à l'aide d'un détecteur commandé dans le temps. Nous commencerons par une présentation générale du système et de ses enjeux. Nous nous intéresserons ensuite plus en détail à son fonctionnement et aux différents éléments qui le composent. Nous présenterons finalement les résultats qu'il a permis d'obtenir.

3.1 Présentation générale

Nous l'avons vu, la suppression de la fluorescence est une problématique centrale pour la spectroscopie Raman. La revue de littérature a permis de mettre en lumière la pertinence du découpage temporel pour y parvenir. L'objectif de cette expérience est de démontrer l'efficacité de la méthode TG pour le rejet de l'autofluorescence des tissus biologiques, qui sature les détecteurs et limite le développement de la spectroscopie Raman pour des applications biomédicales à plus grande échelle. Une démonstration dans les longueurs d'onde visibles serait d'autant plus éloquente puisque – malgré l'augmentation de l'intensité du signal Raman – l'autofluorescence est particulièrement problématique dans cette région du spectre.

Un montage expérimental a été développé en partant du principe que l'application d'une fenêtre temporelle à l'aide d'un détecteur à photon unique est l'option à privilégier afin d'exploiter la différence de profil temporel entre les deux phénomènes. On dispose pour cela d'un module de détection à commande ultrarapide basé sur une SPAD en silicium. Comme c'est généralement le cas des détecteurs conçus avec ce matériau, son efficacité de détection est meilleure pour des longueurs d'onde autour de 500nm. Un système dans le domaine temporel doit en plus répondre aux critères suivants :

- Une excitation pulsée sous la nanoseconde et une fréquence de répétition élevée,
- Une puissance moyenne de plusieurs dizaines de milliwatts,
- Une précision spectrale sous le nanomètre.

Dans un système de spectroscopie Raman conventionnel, le détecteur, généralement une caméra CCD, est placé à la sortie d'un spectromètre qui décompose le signal en longueur d'onde sur chaque pixel de la caméra. Comme le détecteur dont nous disposons est d'un seul pixel, on utilise un monochromateur, qui est un spectromètre à réseau de diffraction ajustable permettant de balayer les longueurs d'onde en sortie. Cette solution offre une liberté quant au choix de la plage spectrale mesurée contrairement à un spectromètre conventionnel où le réseau est fixe. En revanche, cela augmente la durée totale de l'acquisition puisque les longueurs d'onde sont capturées une à une. À chacun de ces points du spectre, on obtient, à l'aide d'un module TCSPC, un histogramme du temps d'arrivée des photons par mesure successive de l'intervalle de temps entre le pulse laser et la détection d'un photon. Entre l'excitation et la détection, un montage optique envoie le laser sur l'échantillon puis collecte la lumière réémise pour l'amener sur le détecteur via le monochromateur. Le montage expérimental du système est représenté schématiquement sur la figure 3.1. Il est composé d'une partie optique et d'une partie électronique.

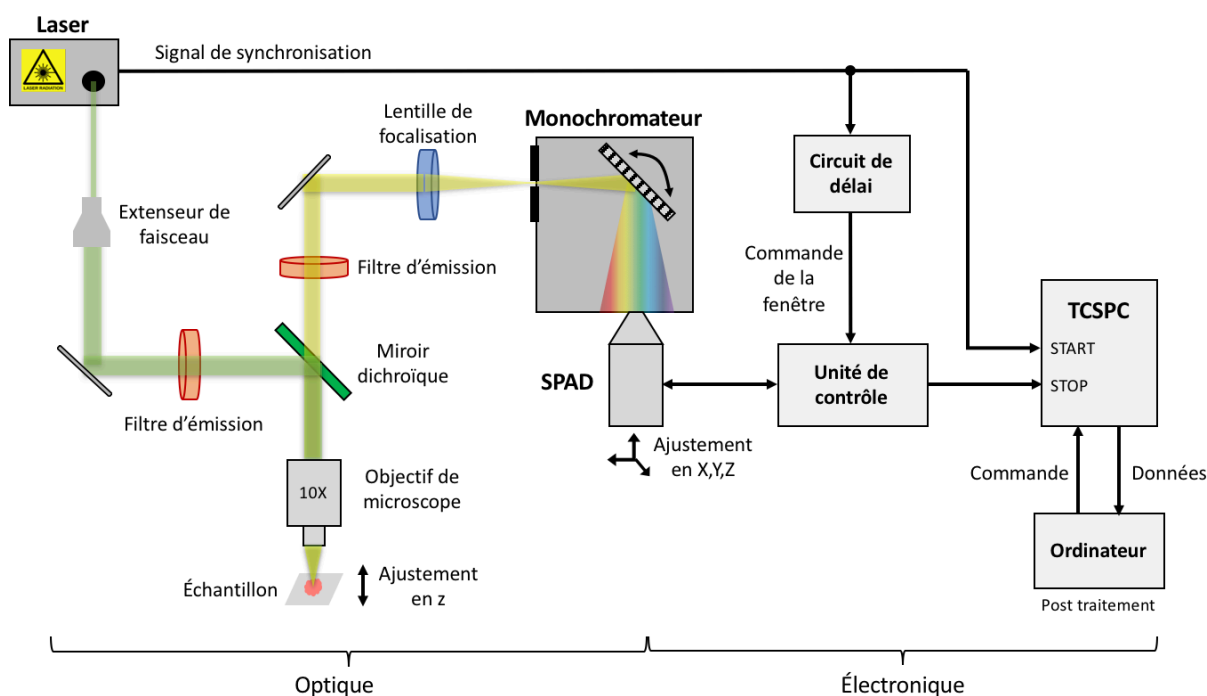


Figure 3.1 – Représentation schématique du montage complet

3.2 Présentation détaillée

3.2.1 Description des principaux composants

La tête laser est le modèle LDH-P-FA-515L de PicoQuant. L'émission se fait à 515nm avec une largeur spectrale inférieure au nanomètre et une sortie du laser en espace libre (non fibrée). La puissance moyenne maximum est de 20mW avec un faisceau de 2mm de diamètre. La durée du pulse est d'environ 100ps avec une fréquence allant jusqu'à 80MHz. La tête est reliée à un module de commande (PicoQuant PDL 800-D) qui permet de modifier directement l'intensité et la fréquence. Le laser offre également une sortie de synchronisation de type NIM : un signal à front descendant de 0 à -800mV. Ce signal sert de référence au TCSPC et au contrôle du détecteur.

Ce dernier est composé de deux blocs : la tête de détection, qui inclut la SPAD, son circuit de commande, un système de refroidissement et une unité de contrôle. Sa conception est le fruit des travaux d'un laboratoire de l'École Polytechnique de Milan[52]. Un générateur de pulse basé sur un transistor à haute mobilité électronique permet l'activation et la désactivation ultra rapide de la détection de photons par modulation de la tension de biais appliqué sur la SPAD. La transition entre les deux états se fait en moins de 110ps avec, comme le laser, une fréquence maximale de 80MHz. Si la période d'activation mène à la détection d'un photon, la SPAD doit ensuite rester désactivée pendant un certain temps pour limiter le phénomène « *afterpulse* » : la génération d'un second signal après l'effet d'avalanche. La longueur de la fenêtre de détection peut être ajustée manuellement et réduite jusqu'à 2ns. La commande se fait par une application fournie par les concepteurs (figure 3.2). Elle permet en plus d'ajuster différents paramètres avancés au niveau de la SPAD : la tension de biais appliquée sur la SPAD, le seuil de la tension pour la détection de l'effet avalanche, le courant de biais appliqué sur le transistor du générateur de pulse ainsi que le temps de désactivation après détection d'un photon. La modification de ces paramètres permet d'influencer l'efficacité de détection, la sensibilité au bruit et la résolution temporelle. La température du système de refroidissement peut également être choisie. Plus elle est basse, plus le DCR est réduit. Le mode « Free-running » permet d'utiliser le détecteur sans fenêtre de détection (SPAD toujours active).

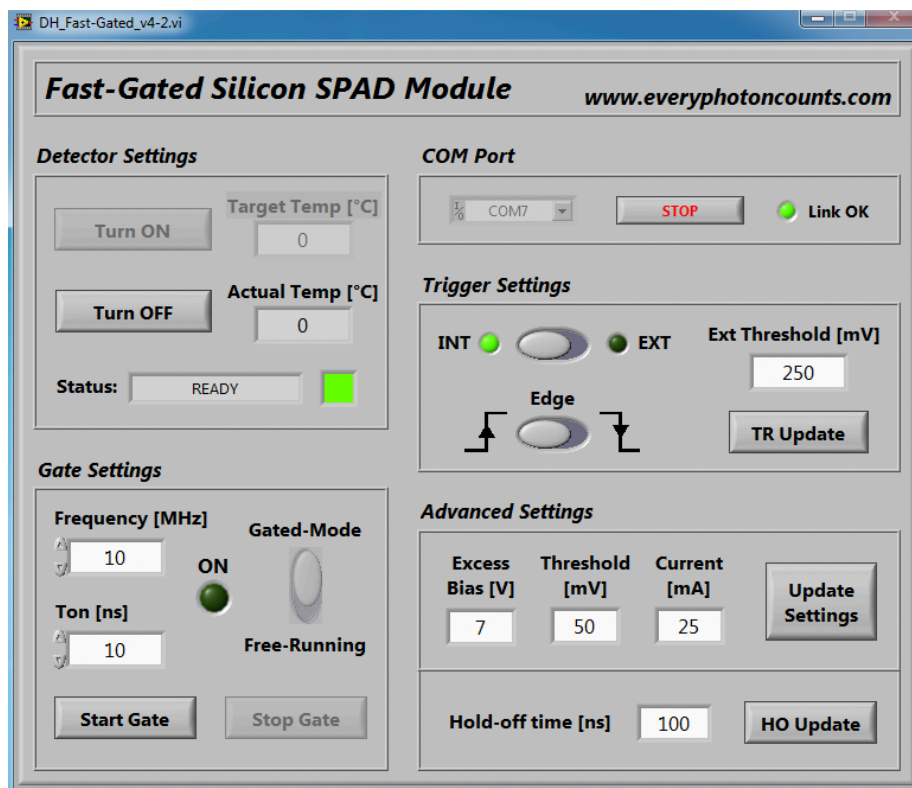


Figure 3.2 – Interface utilisateur du logiciel de commande du détecteur SPAD

La SPAD a un diamètre de $50\mu\text{m}$ et une PDE allant jusqu'à 40% à 400nm. Le concepteur donne une résolution temporelle de 38ps, obtenus dans des conditions de mesure particulières (tension de biais de 7V, longueur d'onde à 850nm et fréquence à 100kHz). Le signal de sortie de détection d'un photon est de type NIM. L'activation de la SPAD est synchronisée en externe avec le laser à l'aide du signal venant du module de commande de celui-ci. Entre les deux, on passe à travers un circuit de délai programmable qui permet de décaler dans le temps le signal de synchronisation (et donc la fenêtre de détection) avec une résolution de 10ps. Cette opération est nécessaire afin de se placer sur l'intervalle de temps contenant le Raman.

Le monochromateur est un SpectraPro 2150 de Princeton. Il est caractérisé par une distance focale de 150mm et un nombre d'ouverture $f/4$. À l'intérieur se trouve un réseau de diffraction en réflexion de 1800 lignes/mm monté sur une tourelle commandée. En jouant sur l'angle de la tourelle on modifie la longueur d'onde envoyée vers la sortie de l'appareil. C'est à ce point que l'on positionne la tête de détection à l'aide d'un support réglable en 3 dimensions par vis micrométriques. Du fait de la taille réduite de la SPAD, son ajustement est une opération délicate et très critique dont dépendent l'efficacité de détection et la résolution spectrale du système complet.

3.2.2 Montage optique

Le montage optique se base sur la configuration en épi-illumination. C'est-à-dire que l'illumination et la détection se font du même côté de l'échantillon. On utilise pour cela un objectif de microscope Olympus plan Achromat RMS10X avec un grossissement de 10 et une ouverture numérique de 0.25. C'est un objectif corrigé à l'infini, ce qui veut dire que la lumière collectée ressort collimatée de l'objectif. Cet objectif est placé sous un miroir dichroïque (SemrockDi02-R514) qui permet de séparer les voies d'illumination et de détection. La figure 3.3 illustre le montage du côté de l'illumination.

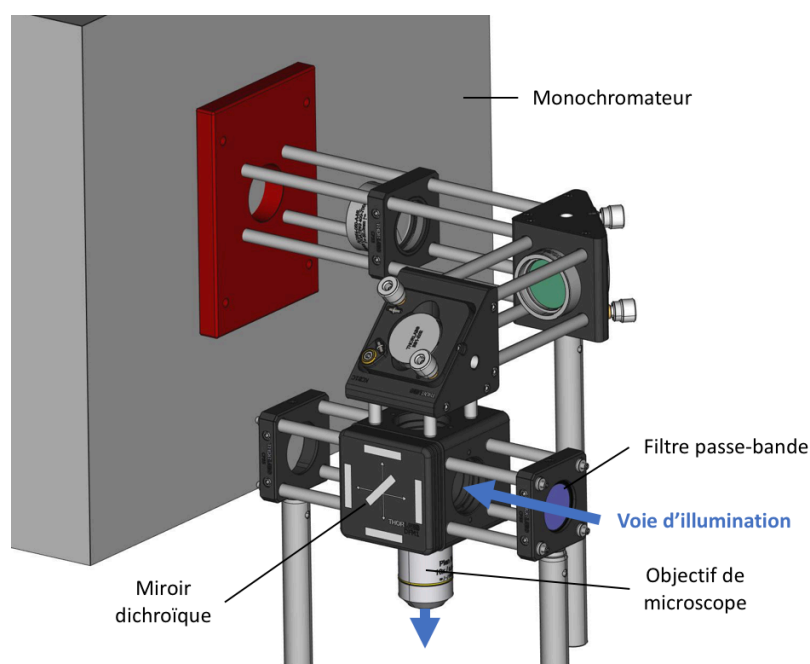


Figure 3.3 – Représentation 3D du montage épi-illumination. Vue sur l'excitation

Le laser est envoyé par la droite et son positionnement se fait grâce à un système à 2 miroirs orientables. Il passe avant cela par un extenseur de faisceau (Thorlabs GBE05) qui agrandit son diamètre initial (2mm) pour correspondre au diamètre de la pupille d'entrée (9mm). Un filtre passe-bande (Semrock FF01-514/3) supprime les possibles artefacts afin de s'assurer d'une excitation de l'échantillon à la fréquence du laser. Le laser est ensuite réfléchi vers le bas par le miroir dichroïque et rentre dans l'objectif de microscope. L'échantillon est placé en dessous sur un support ajustable en hauteur. Dans un cas théorique (faisceau collimaté à l'infini et alignement parfait), la taille du spot d'illumination au point focal de l'objectif correspond à la résolution de ce dernier. Celle-ci dépend de la longueur d'onde d'illumination, dans notre cas :

$$res = \frac{\lambda_{illumination}}{2 * NA} = \frac{515 \text{ nm}}{2 * 0.25} \approx 1 \mu m$$

En pratique le spot est d'environ 15 μ m. Il est mesuré en plaçant une micro-caméra au-dessus du miroir dichroïque.

Pour envoyer la lumière dans le monochromateur, il faut tenir compte de son nombre d'ouverture afin de limiter les pertes. En effet, seule la lumière qui atteint le réseau de diffraction en passant par la fente sera renvoyée vers la sortie de l'appareil, tout le reste étant perdu. Le nombre d'ouverture est ainsi défini par le rapport entre la distance focale de l'appareil (distance entre la fente et le réseau) et la hauteur du réseau, comme illustré sur la figure 3.4. Il forme en entrée une pyramide d'acceptation de la lumière.

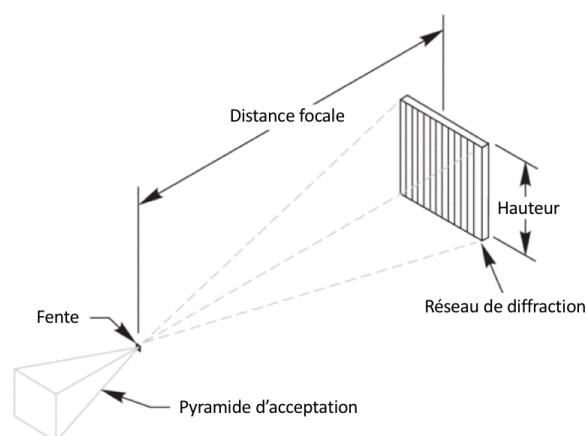


Figure 3.4 – Schéma optique équivalent de l'entrée d'un monochromateur (traduit et adapté de [53])

La fente standard du monochromateur SpectraPro 2150 est à largeur réglable. La réduction de la taille de la fente permet, dans le cas d'une large surface de détection en sortie, d'augmenter la résolution spectrale, au détriment de la perte de lumière au niveau de la fente. Or, dans notre cas, la résolution spectrale est déjà réduite par la petite surface de détection de la SPAD. On cherche de plus à minimiser les pertes, car le signal d'intérêt est très faible. La fente standard a ainsi été remplacée par une pièce faite sur mesure par impression 3D (en rouge sur la figure 3.5) qui laisse entrer toute la lumière. Sur cette pièce on vient visser un système de rails de 30mm de largeur. Ce système est utilisé pour l'ensemble du montage afin de faciliter l'ajustement et la conservation de l'alignement du circuit optique. La voie de détection se charge d'amener la

lumière émise par l'échantillon, et collectée par l'objectif de microscope, vers l'entrée du monochromateur, en respectant la géométrie d'entrée de celui-ci.

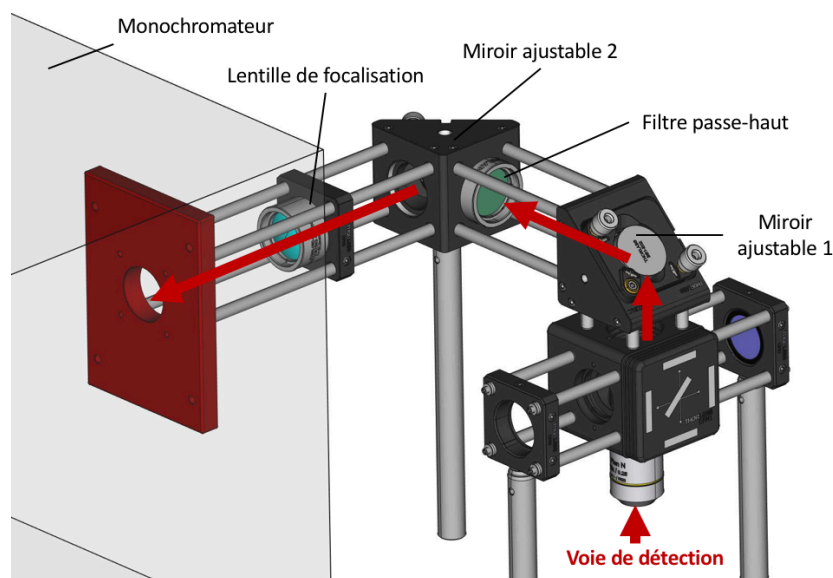


Figure 3.5 - Représentation 3D du montage épi-illumination. Vue sur la collection

À la sortie de l'objectif de microscope, la voie de détection passe à travers le miroir dichroïque. Celui-ci filtre une première fois la diffusion Rayleigh qui a lieu à la même longueur d'onde que l'émission (densité optique 2). Un système à 2 miroirs orientables dirige le faisceau à l'entrée du monochromateur. Un filtre passe-haut (Semrock FF01-515/LP-25) est ajouté pour couper efficacement le restant de diffusion Rayleigh et les réflexions possibles du laser (densité optique 6). On le place entre les deux miroirs de manière à pouvoir le retirer facilement au besoin. Enfin, une lentille (Thorlabs AC252-050) focalise le faisceau au point d'entrée du monochromateur. Le cône ainsi formé doit s'inscrire dans la pyramide d'acceptance précédemment décrite. Sachant que la taille du faisceau correspond à la pupille d'entrée de l'objectif de microscope (9mm) et connaissant le nombre d'ouverture du monochromateur ($f/4$), on en déduit une distance focale théorique de la lentille de 36mm. En choisissant une lentille à la distance focale supérieure, on s'assure que l'angle du cône formé par le focus est bien inférieur à celui de la pyramide d'acceptance et qu'ainsi toute la lumière arrive sur le réseau. En revanche, une conséquence indésirable de l'augmentation de la distance focale est l'augmentation du grossissement. En effet, l'image créée au point focal de la lentille correspond à la taille du spot d'illumination ($15\mu\text{m}$), multiplié par le rapport des distances focales de la lentille et de l'objectif

de microscope(18mm). Afin de maximiser la collection sur la SPAD, il faut que cette image ne dépasse pas sa taille, soit 50µm. Le monochromateur ayant un grossissement de 1, la distance focale maximum pour la lentille est calculée comme suit :

$$d_{image} = \frac{f_{lentille}}{f_{microscope}} d_{spot} \Leftrightarrow f_{lentille} = \frac{18 * 0.05}{0.015} = 60 \text{ mm}$$

Une distance de 50mm permet de respecter ces deux contraintes. La distance qui sépare la lentille de l'entrée du monochromateur est ajustée en faisant glisser la lentille sur les rails en maximisant la puissance du signal en sortie. Cette distance étant critique pour le bon fonctionnement du système, la lentille choisie est un doublet achromate. Cela permet de réduire le phénomène d'aberration chromatique, c'est-à-dire la variation du point focal en fonction de la longueur d'onde.

3.2.3 Acquisition

La mesure de l'intervalle de temps est faite par un module TCSPC commercial (PicoQuant PicoHarp 300). Celui-ci offre une résolution d'échantillonnage de 4ps et une précision de 12ps. Entre chaque mesure, le traitement de l'opération par l'électronique crée un temps mort pouvant aller jusqu'à 95ns. L'appareil accumule les comptes de photons sur un temps d'acquisition minimum de 1ms et forme l'histogramme sur une plage dynamique à 16bits, soit 65536 comptes avant saturation. Les ports d'entrée START et STOP, reliés respectivement au signal de synchronisation du laser et à la sortie de détection de la SPAD, acceptent un signal de type NIM.

L'acquisition se fait sur Matlab, à l'aide de la librairie PHLib fournie par le constructeur du TCSPC. La communication avec le monochromateur se fait par commande série RS232. Le laser et le détecteur sont paramétrés indépendamment : directement sur le module de contrôle pour le premier et avec son logiciel pour le second. Une acquisition complète consiste en la mesure successive d'histogrammes à chaque point spectral. Pour passer d'un point à l'autre, on donne au monochromateur la valeur absolue de la longueur d'onde au dixième près. Les paramètres à spécifier sont :

- La plage spectrale à scanner
- La résolution spectrale
- Le temps d'intégration de l'histogramme (temps d'acquisition à chaque point)

La plage spectrale utilisée par défaut va de 520nm à 620nm. En décalage Raman, cela correspond à une fenêtre allant de 200cm⁻¹ à 3200cm⁻¹, pour une excitation à 515nm. On couvre ainsi pour une même acquisition les régions de l’empreinte digitale (400-1800cm⁻¹) et des hauts nombres d’onde (2400-3200cm⁻¹) du spectre Raman. Pour une plage de 100nm, à la résolution maximum de 0.1nm et avec une intégration sur 1s de chaque histogramme, on obtient un temps total supérieur à 16min, sans compter le temps de rotation du réseau dans le monochromateur. Afin de réduire cette durée, on limite par défaut la résolution à 0.2nm. Cela donne une résolution de 7cm⁻¹ autour de 520nm et de 5cm⁻¹ proche de 620nm.

3.2.4 Traitement des données

L’information brute en sortie du système est une carte 3D du compte de photon en fonction de la longueur d’onde commandée au monochromateur et du temps mesuré par le TCSPC. Avant de pouvoir être analysée, elle passe par 3 étapes de traitement: la conversion des longueurs d’onde en décalage Raman, la sommation sur l’axe temporel et enfin la correction de l’intensité par la réponse du système. Chacune de ces opérations peut être réalisée indépendamment.

Pour pouvoir interpréter les potentiels pics Raman, l’axe spectral doit être converti en décalage Raman. Pour cela on utilise simplement la formule qui permet de passer de longueur d’onde à nombre d’onde Raman (Équation 2.1) en prenant $\lambda_0 = 515\text{nm}$. Ici on admet que la longueur d’onde d’émission réelle du laser correspond exactement à la valeur attendue et que la longueur d’onde commandée au monochromateur est bien celle qui sera envoyée sur le détecteur lors de toute l’acquisition. Cette opération n’est pas une calibration de l’axe spectral à proprement parler, mais elle est suffisante dans la mesure où la finalité du système est seulement la preuve de concept de la méthode TG.

Pour passer d’une donnée en 3 dimensions à un spectre classique, on calcul la somme des comptes de photon des histogrammes à chaque point spectral. À cette étape, il est possible de choisir la plage d’intérêt sur l’histogramme, de la même manière que pour la fenêtre temporelle à la détection (voir section 6.3.2). On profite alors de la haute résolution offerte par le TCSPC pour obtenir une sélection très précise qui supprime toutes les mesures parasites (fluorescence, lumière ambiante, bruit d’obscurité) situées hors de la plage d’intérêt, et réduit ainsi leur impact sur le spectre final.

Dans un système optique, l'efficacité quantique du détecteur est un facteur particulièrement influent sur l'intensité du signal mesuré. Pour les photodétecteurs en silicium, cette efficacité quantique est généralement élevée dans la gamme de longueurs d'onde visibles pour ensuite décroître rapidement dans l'infrarouge. Il en résulte un biais spectral des données qui peut être corrigé en post-traitement. Cela est particulièrement important avec la SPAD utilisée sur le présent système. En plus d'avoir une valeur moyenne qui décroît en allant vers l'infrarouge, sa PDE varie très rapidement avec le changement de la longueur d'onde, résultant en des oscillations de large amplitude sur le spectre (courbe figure 3.6a). Afin de corriger cela, on calibre le nombre de comptes en fonction de l'efficacité de détection réel du système à chaque point spectral. On utilise pour cela une source de lumière blanche. Son spectre est mesuré avec le système (en mode « Free-running ») et avec un spectromètre commercial (Ocean Optics QE 65Pro) comme référence. Comme il s'agit d'une source continue, le domaine temporel n'est pas variable. C'est tout l'histogramme qui est utilisé. La référence est normalisée par son maximum. En divisant le spectre obtenu avec cette nouvelle référence, puis en normalisant à nouveau par le maximum, on obtient la réponse du système en fonction de la longueur d'onde (figure 3.6a). C'est par cette fonction que l'on multiplie chaque acquisition pour finalement arriver à supprimer l'effet du système sur la mesure (voir courbe figure 3.6b).

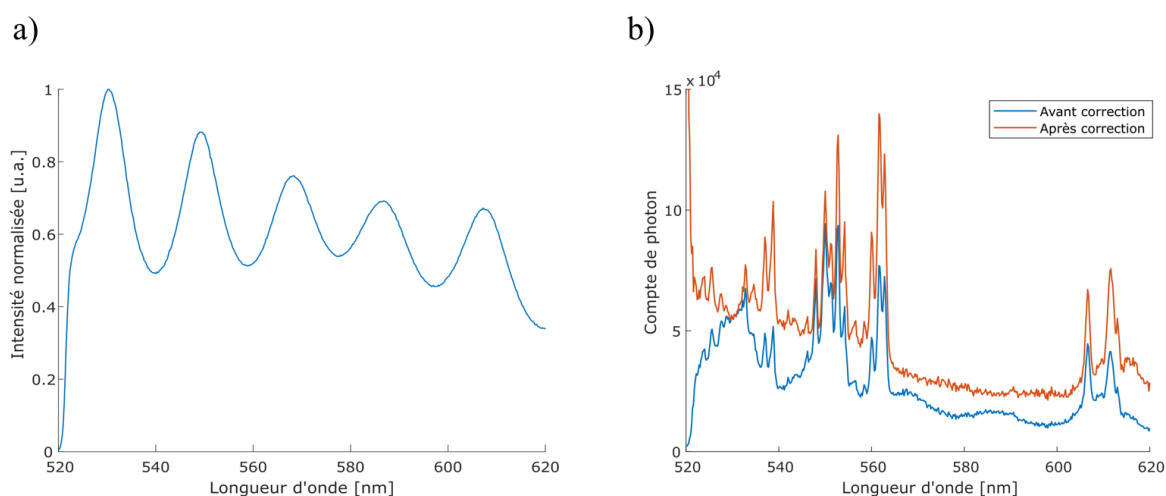


Figure 3.6 – Correction par la réponse du système a) réponse normalisée du système b) spectre d'acétaminophène avant et après correction

3.3 Résultats

3.3.1 Caractérisation du système

La première mesure réalisée est celle de la fonction de réponse de l'instrument (IRF de l'anglais « *Instrument response function* »). Elle permet d'obtenir, tant dans le domaine spectral que temporel, la résolution intrinsèque de l'instrument. On différencie ici l'IRF, qui correspond à la donnée obtenue en sortie pour une entrée ponctuelle, et la réponse du système en fonction de la longueur d'onde, présentée précédemment et utilisée pour la calibration.

D'un point de vue théorique, l'IRF se calcule par la moyenne quadratique de la réponse de chacun des éléments qui l'influencent. Dans le domaine temporel les principaux éléments sont la longueur du pulse laser (σ_{laser}), la résolution du détecteur (σ_{SPAD}) et la précision du TCSPC (σ_{TCSPC}) :

$$IRF_{temp} = \sqrt{\sigma_{laser}^2 + \sigma_{SPAD}^2 + \sigma_{TCSPC}^2} = \sqrt{100^2 + 38^2 + 12^2} \approx 108ps$$

Pour chacun on prendra la valeur de la pleine largeur à mi-hauteur, FWHM (« *full-width half-maximum* »).

Dans le domaine des longueurs d'onde, l'IRF est dépendant de la largeur spectrale du laser et de la résolution du monochromateur. Or la seule information donnée par le fabricant sur la largeur spectrale est qu'elle est très inférieure au nanomètre, sans qu'aucune valeur précise ne soit communiquée. De plus, pour le monochromateur, la résolution dépend à la fois de l'ouverture en entrée, du nombre de lignes sur le réseau de diffraction et du positionnement du détecteur en sortie. Dans ces conditions, il devient complexe d'estimer par le calcul la résolution spectrale du système, et nous nous limiterons à une approximation expérimentale.

L'IRF est obtenue expérimentalement sur un échantillon mince très diffusif (feuille de papier blanc). L'objectif est de mesurer la diffusion Rayleigh, qui est instantanée et à la même longueur d'onde que l'excitation. Pour cela le filtre passe-haut de la voie de détection est retiré. L'acquisition est faite de 512 à 518nm avec la résolution de 0.2nm et avec un temps d'intégration de 1s. La puissance moyenne du laser est abaissée à 0.5mW afin de ne pas saturer le détecteur. La donnée brute permet d'obtenir la forme de l'IRF dans le domaine temporel en faisant la somme de toutes les longueurs d'onde (figure 3.7a) et inversement pour le domaine spectral par la somme de chaque histogramme (figure 3.7b).

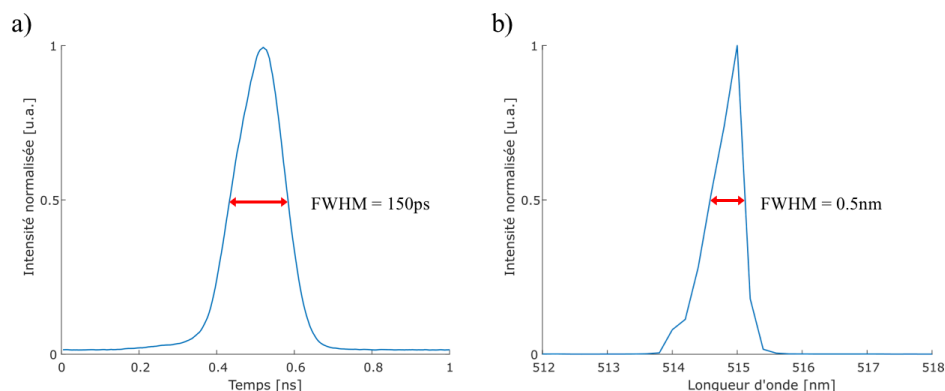


Figure 3.7 - Mesure de l'IRF a) dans le domaine temporel b) dans le domaine spectral

La résolution temporelle mesurée est de 150ps. La valeur réelle est donc plus grande que celle calculée précédemment. Cela s'explique fort probablement par la non prise en compte dans le calcul de l'effet du parcours optique sur l'allongement du pulse. La résolution spectrale mesurée est de 0.5nm. La forme non symétrique de l'IRF dans ce domaine vient probablement d'un léger angle entre la sortie du monochromateur et le positionnement de la SPAD à sa sortie.

3.3.2 Mesure sur un fantôme

Dans le but de valider le fonctionnement du système, une acquisition est réalisée sur un fantôme optique : un échantillon créé artificiellement dont on connaît le contenu moléculaire, afin de simuler un cas réel dans un environnement contrôlé. L'objectif ici est de confirmer la théorie sur le rejet de la fluorescence par le domaine temporel et ainsi d'identifier un spectre Raman connu sur un échantillon fortement fluorescent. Le problème rencontré est la longue durée des acquisitions, qui entraîne un phénomène de photo-blanchiment avec la disparition progressive et définitive de la fluorescence au cours de l'acquisition. Cela limite alors l'impact du système, censé supprimer lui-même la fluorescence. Pour répondre à cette problématique, un mélange de poudre d'acétaminophène et de microbilles fluorescentes est utilisé. L'acétaminophène est une molécule à la signature spectrale caractéristique, souvent utilisée pour la calibration des systèmes de spectroscopie Raman du fait de sa forte diffusion. Les microbilles sont des particules sphériques en polyéthylènes d'un diamètre d'environ 70 μ m, avec un spectre d'émission autour de 515nm (Cospheric UVPMS-BG-1.00). Leur fluorescence est extrêmement intense et très résistante au photo-blanchiment. Le rapport de masse acétaminophène / microbille est de 100 pour 1.

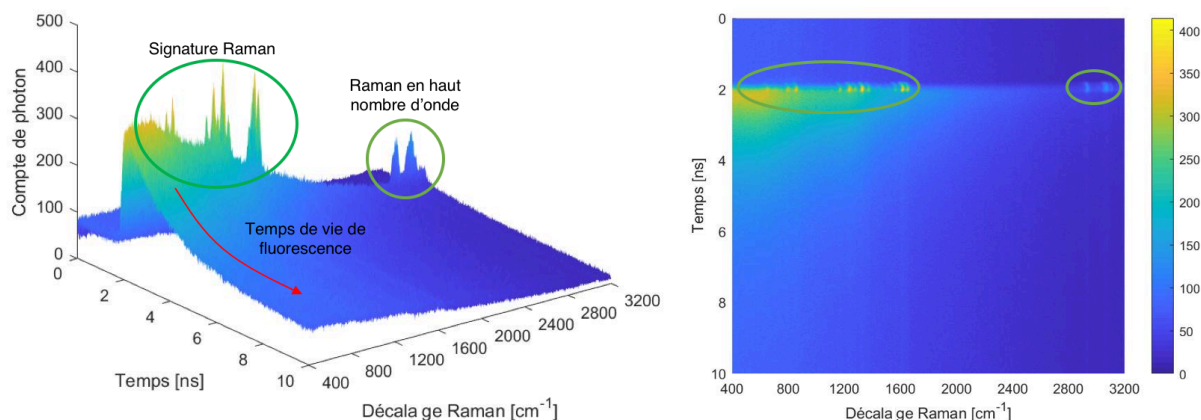


Figure 3.8 – Carte 3D d’une acquisition sur le mélange acétaminophène + microbilles a) vue 3D
b) vue du dessus

La figure 3.8 montre le résultat d’une acquisition réalisée sur ce mélange avec les paramètres d’acquisitions par défaut: laser à 20mW de puissance moyenne, plage spectrale de 520 à 620nm, résolution de 0.2nm, temps d’intégration de 1s et détecteur laissé en mode « *Free-running* ». Sur la donnée présentée, les étapes 1 et 3 du traitement ont été effectuées (conversion des longueurs d’onde en décalage Raman et correction par la réponse du système). Des pics Raman sont facilement identifiables dans les 2 zones spectrales de l’empreinte digitale et des hauts nombres d’onde. La fluorescence est également bien visible sous la forme d’un signal de fond continu et décroissant dans le temps, mais aussi en décalage Raman (donc en longueur d’onde). Cela s’explique par le spectre d’émission des billes fluorescentes, centré à 515nm, et qui décroît jusqu’à 600nm ainsi que par le photo-blanchiment qui s’accroît au fur et à mesure de l’acquisition.

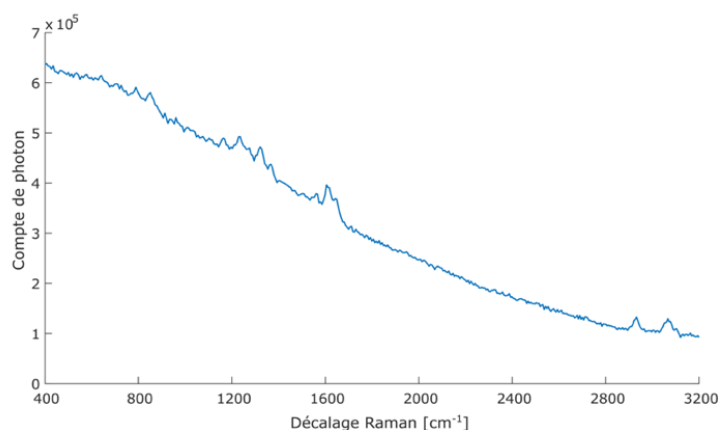


Figure 3.9 - Spectre du mélange acétaminophène + microbilles avec histogramme complet

En faisant la somme des histogrammes sur la totalité de l'axe temporel, le spectre résultant est équivalent à ce qui serait mesuré par une caméra CCD avec un système de spectroscopie conventionnel (figure 3.9). Sur ce spectre on observe encore les pics Raman de l'acétaminophène, mais leur rapport d'intensité avec la fluorescence est très faible. Il faudrait alors appliquer une méthode de traitement mathématique pour être capable d'isoler le signal.

L'intérêt de la mesure par TCSPC est d'obtenir le profil temporel complet. Il est alors possible de choisir une fenêtre temporelle précise. La figure 3.10 montre l'évolution du spectre en fonction de la position de la fenêtre sur l'axe du temps. Pour une meilleure lisibilité, seule la région de l'empreinte digitale Raman est affichée. La diffusion Raman étant un phénomène quasi instantané, son profil temporel suit celui de l'IRF. La longueur de la fenêtre est donc choisie à 150ps.

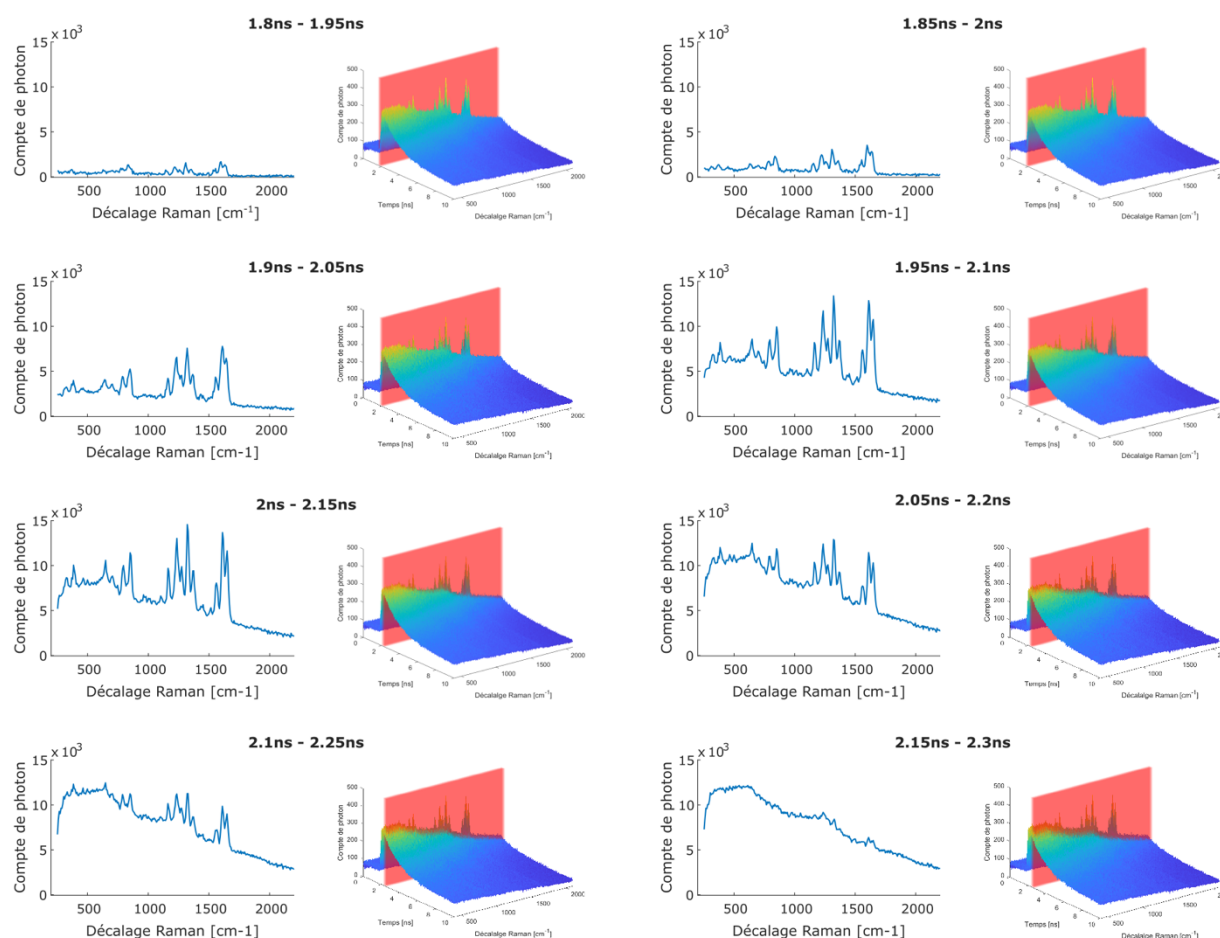


Figure 3.10 – Évolution du spectre du mélange acétaminophène + microbilles en fonction de la fenêtre temporelle

Le décalage dans le domaine temporel met en lumière l'apparition successive des pics Raman puis de la fluorescence et finalement la disparition des pics. La sélection d'une fenêtre temporelle permet bien d'augmenter le ratio de signal Raman par rapport à la fluorescence. En revanche, celle-ci n'est pas totalement supprimée. Elle est déjà visible lorsque les pics Raman sont à leur amplitude maximale (fenêtre 2-2.15ns). Il faudrait alors idéalement combiner cette méthode avec un algorithme de traitement mathématique pour la supprimer totalement. Cette expérience permet de valider en pratique la théorie de la méthode temporelle sur un échantillon au contenu contrôlé.

3.3.3 Mesure sur échantillons biologiques

Le système d'acquisition est finalement testé sur des échantillons biologiques de tissus d'animaux. L'objectif de cette expérience est de démontrer la suppression de l'autofluorescence dans un cas *ex vivo* par la méthode TG. Trois types de tissus sont testés : du gras de poulet, du muscle de poulet et du bœuf haché, achetés dans un supermarché local. Les échantillons sont préparés en découpant une fine tranche de tissu déposée sur une lame d'aluminium (matériau non diffusif), le but étant d'éviter les possibles artefacts créés par la profondeur du tissu. Les acquisitions sont réalisées avec les paramètres par défaut et aucune fenêtre temporelle n'est sélectionnée sur les histogrammes afin d'évaluer uniquement l'effet de la fenêtre de détection. Dans un premier temps, la SPAD est laissée en mode « Free-running ». Les spectres résultants sont présentés figure 3.11. Sur les échantillons de poulet (gras et muscle) de nombreux pics Raman très intenses sont visibles. Cela s'explique par le photo-blanchiment qui, en raison du long temps d'acquisition, « tue » l'autofluorescence du tissu avant qu'elle ait pu être mesurée. En revanche, sur le spectre de bœuf haché aucun pic n'est visible. Ils sont entièrement masqués par la fluorescence, qui semble plus résistante.

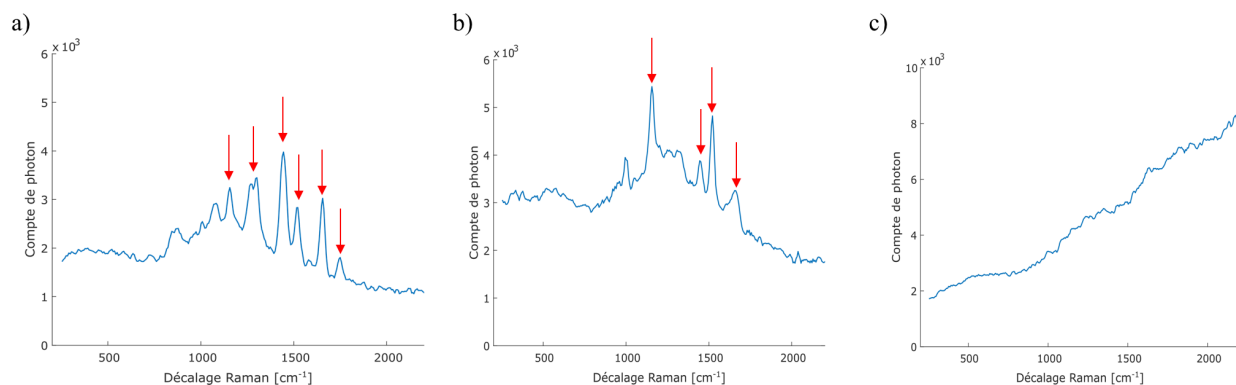


Figure 3.11 - Spectre de : a) gras de poulet, b) muscle de poulet, c) bœuf haché

Différentes acquisitions sont alors reproduites sur ce même échantillon en activant la fenêtre temporelle sur la commande du détecteur. La réduction de la taille de la fenêtre devrait réduire la fluorescence et l'on s'attend à voir apparaître des pics Raman. Comme la taille minimale de la fenêtre est limitée à 2ns par le détecteur, elle est laissée fixe et c'est sa position dans le temps par rapport au pulse laser qui est modifiée par programmation du circuit de délai. Chaque acquisition est faite à un nouveau point de l'échantillon pour se mettre dans les mêmes conditions initiales de photo-blanchiment. En avançant progressivement la fenêtre dans le temps, et en coupant ainsi la décroissance de fluorescence, des pics émergent sur le spectre (figure 3.12). Cela a en revanche pour effet de faire chuter le compte de photon. Le bœuf haché étant un mélange assez hétérogène, la mesure varie en fonction du point où l'on se place sur l'échantillon, rendant les résultats assez variables. On constate par exemple que le signal obtenu avec un décalage de la fenêtre à 0.4ns est globalement moins intense que le suivant à 0.35ns.

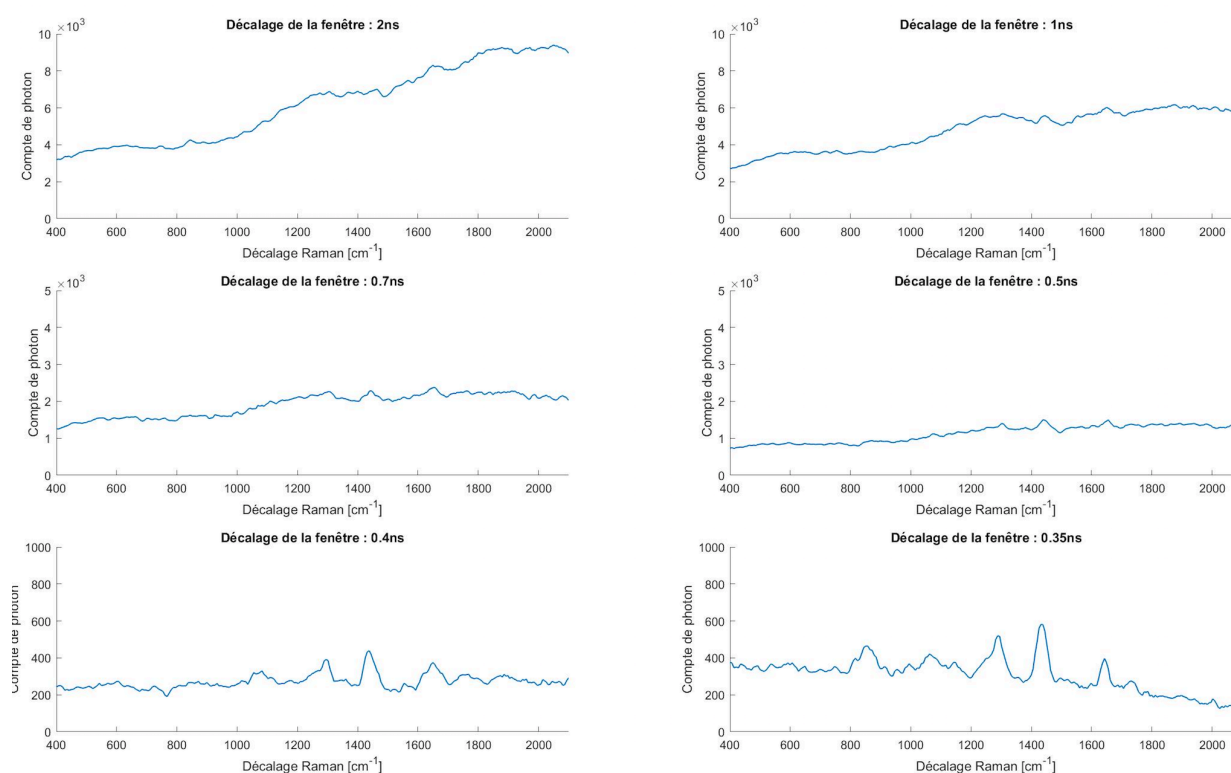


Figure 3.12 – Variation du spectre de bœuf haché lors du décalage progressif de la fenêtre temporelle de détection

Pour mieux se rendre compte de l'effet de la fenêtre de détection, les données sont traitées avec l'algorithme morphologique mentionné dans la revue de littérature[22]. La figure 3.13 présente 3

spectres de la figure précédente mis sur la même échelle. Le résultat de l'algorithme est la courbe en pointillé, qui délimite une séparation entre le Raman et un signal de fond qui inclut la fluorescence et le bruit d'obscurité. Ce bruit est estimé constant sur chaque spectre. La suppression graduelle du signal de fond apparaît alors comme évidente. Sur la partie Raman, cela a pour effet la diminution du bruit photonique (introduit en majorité par la fluorescence), augmentant la précision sur la mesure. Trois pics émergent aux nombres d'onde suivants : 1300cm^{-1} , 1440cm^{-1} et 1650cm^{-1} . Ils sont connus comme étant les marqueurs de regroupement moléculaire caractéristiques des protéines, respectivement : Amide III, $\delta(\text{CH}_2)$ et Amide I[54].

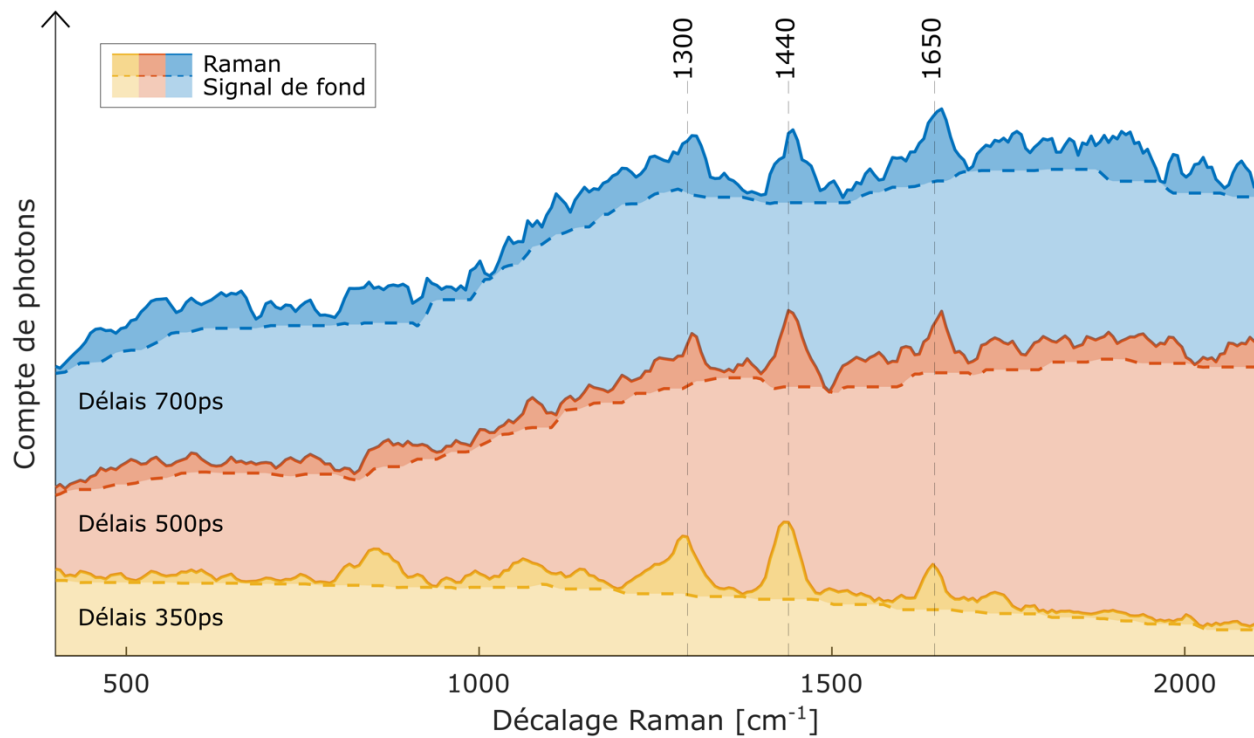


Figure 3.13 – Réduction de la fluorescence sur bœuf hachée par décalage de la fenêtre temporelle

La qualité des spectres est évaluée quantitativement par le calcul d'un facteur de qualité (QF ou « *Quality factor* ») pour chacun des 3 pics. La pertinence de cette méthode d'évaluation a été démontrée sur des mesures de tissus *in vivo*[23]. Le QF y est défini comme :

$$QF = \sum_{j=1}^k Raman\ SNR_j$$

Soit la somme du SNR Raman sur une bande d'intérêt centrée sur le pic. Une quatrième bande est délimitée dans une zone sans signal Raman (1900cm^{-1}). La largeur de la bande k est choisi

arbitrairement à 6 unités, soit environ 30cm^{-1} . Le SNR est calculé en chaque point du spectre à partir de la formule :

$$SNR_{\text{raman}} = \frac{\text{Raman}}{\sqrt{\text{Raman} + \text{Signal de fond}}}$$

L'observation de la courbe du QF en fonction de la fenêtre temporelle (figure 3.14) permet de constater la réussite de l'expérience : le QF des bandes Raman augmente avec le décalage de la fenêtre et le rejet graduel de la fluorescence. C'est particulièrement le cas pour la bande à 1440cm^{-1} , qui est couramment utilisé pour évaluer la qualité d'un spectre Raman. À l'inverse le QF de la bande à 1900cm^{-1} , qui ne contient que du bruit, décroît continuellement. Au-delà d'un certain délai (0.3ns), toutes les courbes chutent. La fenêtre de détection se situe alors avant le Raman sur l'histogramme et il ne reste que du bruit. Ces observations viennent confirmer la théorie de l'augmentation du SNR Raman dans un tissu biologique grâce à la méthode TG.

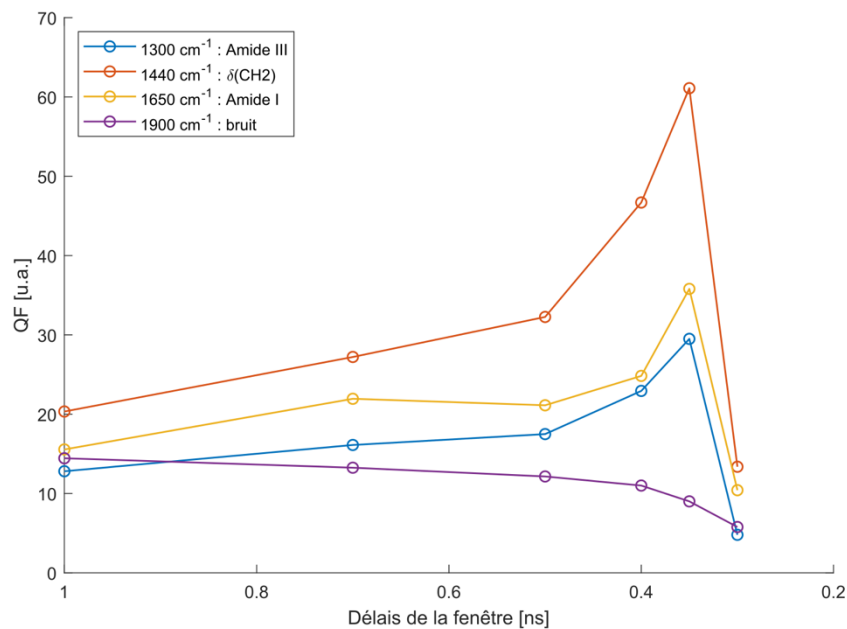


Figure 3.14 – Facteur de qualité en fonction du décalage temporel de la fenêtre de détection

CHAPITRE 4 ARTICLE 1 : FOURIER-TRANSFORM SPECTROSCOPY AND TIME-CORRELATED SINGLE-PHOTON COUNTING DETECTION INCREASES RAMAN SCATTERING TO FLUORESCENCE RATIO IN BIOLOGICAL TISSUE

4.1 Mise en contexte

L'expérience présentée dans ce chapitre a pour but de comparer les résultats obtenus à l'aide de la méthode temporelle et ceux d'un système de spectroscopie Raman en lumière continue tel que celui présenté section 2.1.3. Ce type de système est couramment utilisé dans divers projets au sein du LRO. On cherche donc à évaluer la possibilité de le remplacer par un nouveau système temporel en comparant les spectres mesurés sur des tissus biologiques à l'aide des deux technologies. Pour cela, il est pertinent de réaliser les acquisitions à travers le même instrument optique, afin de s'assurer de se placer dans les mêmes conditions d'excitation et de collection. En conséquence, un nouveau système est conçu avec cette fois une source d'excitation dans le proche infrarouge.

Pour parcourir le domaine spectral, le précédent système reposait sur un monochromateur, un appareil dont le fonctionnement est basé sur la dispersion spatiale des longueurs d'onde. En plus d'être encombrant et complexe à installer, ce type d'appareil engendre des pertes non négligeables et rend la résolution spectrale dépendante de la taille et du positionnement du détecteur. L'interférométrie est une autre technique de spectroscopie qui se base sur le domaine de Fourier pour mesurer le spectre. Malgré plusieurs avantages, elle reste peu commune dans le domaine de la spectroscopie Raman. Le système conçu dans le cadre de cette expérience propose de combiner pour la première fois cette technologie avec une mesure résolue dans le temps pour effectuer la spectroscopie Raman d'échantillons biologiques.

Les résultats ont été soumis pour publication à la revue *Journal of Biomedical Optics* le 11 décembre 2020. La contribution du premier auteur est estimée à 75% pour sa participation à la gestion des expériences et à la production de l'article. Il a conçu et monté le système, réalisé les acquisitions, analysés les données et produit les figures ainsi qu'un squelette de l'article. La rédaction finale est attribuée principalement aux co-auteur Israël Veilleux.

4.2 Fourier-transform spectroscopy and time-correlated single-photon counting detection increases Raman scattering to fluorescence ratio in biological tissue

Journal: Journal of biomedical optics

Nassim Ksantini,^{a,b} Israel Veilleux,^{a,b} Marie-Maude de Denus-Baillargeon,^c Patrick Orsini,^c Isabelle Dicaire,^c Jean-Bernard Lecourt,^d Alexandre Gognau,^d Yves Hernandez,^d Antonio Baylon,^e Maroun Massabki,^c Frederic Lesage,^f and Frederic Leblond^{a,b*}

*Corresponding author: frederic.leblond@polymtl.ca

^aPolytechnique Montreal, Department of Engineering Physics, Montreal, QC, Canada

^bUniversity of Montreal Hospital Research Centre (CRCHUM), Montreal, QC, Canada

^cOptech, 1111 Lapierre Street, LaSalle, QC, Canada

^dMultitel Innovation Centre, rue Pierre et Marie Curie 2, 7000 Mons, Belgium

^eEuro-Multitel SA, rue Pierre et Marie Curie 2, 7000 Mons, Belgium

^fPolytechnique Montreal, Department of Electrical Engineering, Montreal, QC, Canada

4.2.1 Abstract

Significance: Attainable levels of signal-to-background ratio (SBR) in Raman spectroscopy of biological tissue is limited by the presence of endogenous fluorophores, especially when using visible excitation wavelengths. It is customary to isolate inelastic scattering contributions, and thus the Raman spectrum, by removing this ubiquitous fluorescence background using post-acquisition data processing. However, new approaches are needed to reduce background contributions and maximize the fraction of the sensor dynamical range occupied by Raman photons.

Aim: Time-resolved detection using pulsed lasers and time-gated measurements is used to address the Raman SBR problem in biological tissue by limiting light detection to non-resonant interaction phenomena with relaxation time scales occurring on sub-nanosecond time scales, thereby excluding contributions from resonant phenomena such as fluorescence.

Approach: A time-gated Fourier-transform tissue interrogation spectrometer was assembled using a commercially available interferometer, a single channel single-photon avalanche diode (SPAD) sensor and time tagging electronics. The potential of this approach is demonstrated in terms of background suppression enabled by the time-resolved detection and variable spectral resolutions enabled by the interferometer. The spectra acquired by this new system are compared with those obtained from a state-of-the-art continuous-wave dispersive Raman spectrometer.

Results: Time-gating increased the signal-to-background-ratio of the 1440cm^{-1} Raman band from 36% to 69%, while spectral reconstruction from the interferometric measurements showed good correspondence with a state-of-the-art dispersive spectrometer.

Conclusions: This proof of concept could pave the way of new Raman spectroscopy method for biomedical applications, including applications using visible light excitation.

4.2.2 Introduction

In Raman spectroscopy (RS) of biological tissue, attainable signal-to-background ratio (SBR) can be severely limited by the presence of endogenous fluorophores¹. The biomolecular sources of tissue autofluorescence include extra-cellular matrix proteins such as elastin and collagen, but also biomolecules indicative of metabolic cellular activity, including NADH, flavins and porphyrins. When interrogating tissue with instruments designed for inelastic scattering detection, increasing the relative fraction of detected Raman scattered light compared to background fluorescence is crucially important to identify often subtle changes between normal or benign tissue and pathological alterations. Other sources of background signal can be intrinsic to the measurement system, including fluorescence from the optical components (e.g. optical fibers, lenses, filters) but also Raman scattering from the optical fibers (e.g. silica). However, in well-designed Raman systems the importance of these system-specific sources of background is usually up to a few orders of magnitude smaller when compared to autofluorescence.

In Raman spectroscopy systems, autofluorescence is commonly mitigated by shifting the narrow linewidth excitation from visible light towards longer near-infrared (near-IR) wavelengths. In the near-IR, non-resonant inelastic scattering phenomena can be detected albeit with reduced photoluminescent re-emission, since the main tissue fluorophores have excitation bands either in the ultra-violet (UV) or in the visible domain of the electromagnetic spectrum. On the other hand,

the Raman scattering cross-section of biomolecules is inversely proportional to the fourth power of the excitation wavelength ($\sim 1/\lambda^4$), as is the case for the elastic scattering of light from small atoms and molecules. Facing this Raman signal versus background compromise, biomedical applications usually favor an illumination in the near-IR region. Excitation with 785 nm light sources is most common both because of the commercial availability of wavelength-stabilized sources around that wavelength and because of the favorable trade-off reached between inelastic scattering and background signals. However, fluorescence emission spectra are not entirely attenuated in the near-IR and autofluorescence cannot be completely eliminated through excitation wavelength modulation. As a result, the limited Raman signal-to-background ratio (SBR) attainable in tissue with current near-IR Raman systems remains an issue negatively impacting the ability of Raman spectroscopy methods to detect inelastic scattering signals with sufficiently low levels of photonic noise (shot noise) to detect subtle molecular tissue alterations resulting from molecular manifestations of disease onset.

Devising a way to further reduce the background and thus increase the Raman SBR is the goal of the emerging field of time-gated Raman spectroscopy²⁻³. Raman scattering is a non-resonant phenomenon occurring on the femtosecond time scale, as is the case for other competing phenomena including elastic scattering, either Rayleigh scattering for small atoms and molecules or Mie scattering occurring when light interacts with larger biological entities, including cells membranes, organelles and complex biomolecules. Compared to non-resonant light-matter interaction phenomena, fluorescence from organic molecules implies absorption and re-emission from resonant electronic states associated with slower processes, with typical endogenous fluorophores having lifetimes on the order of 0.1 to 7 nanoseconds⁴. With the help of pulsed lasers, fast detectors, and time-stamping electronics, it is therefore conceivable to discriminate the near-instantaneous Raman signal from longer-lived photoluminescence phenomena.

Spectral detection in Raman spectroscopy systems is mostly achieved based on spectral detection techniques that can be classified either as dispersive or interferometric. In a dispersive instrument, light re-emitted from the interrogated medium is focused onto an entrance slit (~ 10 - $200\ \mu\text{m}$ width) and then propagated to an optical diffraction grating (~ 600 - 1800 lines/mm) in order to disperse its spectral content across a detector, e.g. a charge-coupled device (CCD), an avalanche photodiode (APD) or a photo-multiplier tubes (PMT). The slit width, grating spatial frequency, and sensor/pixel size of the detector are the main factors affecting spectral resolution and spectral

coverage. Given the commercial availability of CCD arrays with high quantum efficiency in the near-IR, this approach is widely used in biomedical Raman spectroscopy.

Interferometric approaches are less common in Raman spectroscopy. They involve a Fourier-transform spectrometer where a continuously variable optical pathlength difference (OPD) is introduced between two components of the incident light, allowing them to interfere. Scanning the OPD over a predetermined range ΔOPD with a resolution δOPD , the varying interference conditions will produce a fringe interference pattern with a central peak at zero pathlength difference (ZPD). The spectrum –light intensity as a function of the wavenumber k in cm^{-1} with spectral range Δk and spectral resolution δk – is then reconstructed from the resulting interferogram by applying a Fourier transform⁵. Based on the Fourier theorem, the larger the maximum achievable OPD range, the more accurately the spectral content can be captured ($\delta k \sim 1/\Delta\text{OPD}$), and the smallest the OPD resolution, the broader the spectral content can be captured ($\Delta k \sim 1/\delta\text{OPD}$). The ability to easily modify ΔOPD and δOPD renders Fourier-transform Raman systems adaptable to RS biomedical applications having different requirements in terms of spectral resolution and coverage. Moreover, because this technique frees itself from the requirements of an entrance slit and a grating, it can also be advantageous in terms of increased light throughput.

In this letter, we report the development of a single-point RS system detecting the main biomolecular tissue features (e.g. amide bands, phenylalanine peaks, etc.) using a time-gated Fourier-transform (TG-FT) spectrometry approach. As proof-of-principle, *ex vivo* tissue samples are measured with high spectral resolution, demonstrating increased levels of Raman SBR when restricting detection mostly to non-resonantly scattered photons associated with time delays <300 picoseconds with respect to the laser pulse.

4.2.3 Methods

The optical setup is designed to measure both the temporal and spectral responses of a sample to an excitation light pulse (Fig. 4.1). A narrow bandwidth 780 nm pulsed laser (15 ps, 60 MHz) (Multitel ASBL, Photon070) having a collimated free-space output acts as the excitation light source. Reference timing of the laser pulse is obtained by diverting a small fraction of the excitation light to a photodiode (PicoQuant, TDA200) while the remaining power is launched into a 600 μm core low-OH optical fiber. The collimated fiber output delivers the light to a bandpass filter

(Semrock, FF01-775/46), a longpass dichroic mirror (Semrock, FF801-Di01), and a near-IR-coated achromatic focusing lens ($f = 30$ mm) configured to epi-illuminate the sample of interest. Longer wavelength light re-emitted from the sample passes through the dichroic mirror and is collected by a large beam collimator (Thorlabs, F810SMA) to be propagated through a second low-OH 600 μm optical fiber.

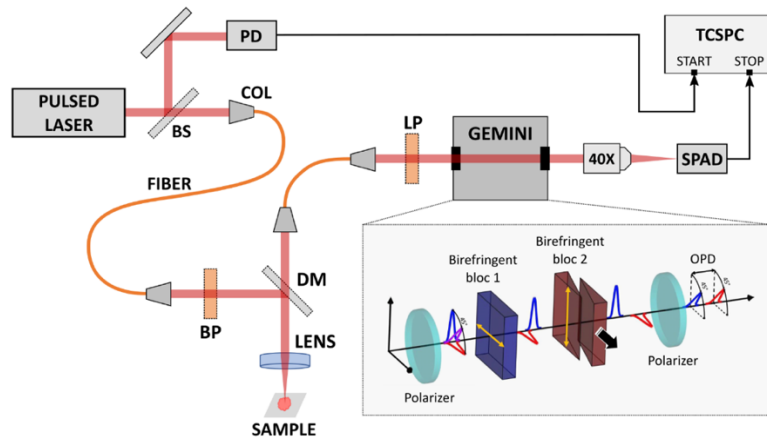


Figure 4.1 - Schematic representation of the Time-resolved Fourier-transform spectroscopic system. Following the optical path: 780 nm pulsed laser, beam-splitter (BS), photodiode (PD), collimator (COL), 600 μm optical fiber, band-pass filter (BP), dichroic mirror (DM), focusing lens, sample, long-pass filter (LP), NIREOS Gemini interferometer, 40x microscope objective, single-photon avalanche diode (SPAD), PicoHarp300 time-correlated single photon counter (TCSPC).

Light re-emitted from the sample is then collimated, cleaned-up from Rayleigh scattering (bleed-through) by a longpass filter (Semrock, BLP01-808), and directed towards a broadband common-path Fourier-transform interferometer (NIREOS, Gemini). Inside the interferometer, a translating wedge of birefringent material introduces a selectable OPD between two orthogonal linear polarization light states. In order to enable ZPD measurements, a 90-degree rotated plate of birefringent material sets an initial (negative) offset between the polarization components. At the output, a 45-degree polarizer allows the beams to interfere with each other⁶.

Leaving the interferometer, light is focused onto a 100 μm active area Single Photon Avalanche Diode (SPAD) (Micro Photon Device, PDM) using a 40X/0.80NA microscope objective (Olympus, LUMPLFLN). A Time Correlated Single Photon Counting (TCSPC) module

(PicoQuant, PicoHarp 300) then measures the arrival time of individual photonic events with respect to the reference trigger. This operation is repeated over millions of light pulse events allowing the TCSPC module to reconstruct a histogram of the photon distribution over time for each OPD value. The temporal point spread function (TPSF) is acquired over a 20 nanoseconds time window with a resolution of 4 picoseconds (5000 points).

Several steps led to the recovery of a Raman spectrum from a measurement made with the TG-FT system (Fig. 4.2). Each measurement consists of a large number of TPSFs acquired for a range $\Delta\text{OPD}=0.67$ mm with a resolution $\delta\text{OPD}=0.2$ μm . The resulting dataset can also be considered as a succession of interferograms, one for each time window. For a given photons arrival time window, an inverse Fourier transform is performed to recover a spectrum in wavenumber shift space (k -space). This computation is repeated for every time window to obtain the full k -space emission map. Each spectrum has a spectral resolution of ~ 15 cm^{-1} and a spectral coverage of ~ 500 - 2500 cm^{-1} .

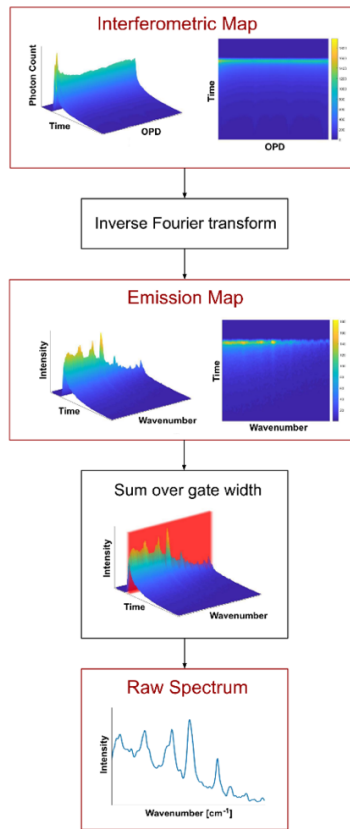


Figure 4.2 - Block diagram of the data processing. Example data acquired on olive oil.

4.2.4 Results

An experiment was initially conducted to demonstrate that the spectral resolution can be varied through modulation of the ΔOPD parameter. For this, a sample with low fluorescence and well-defined narrow Raman peaks was selected, namely 4-acetamidophenol which is the active ingredient of Tylenol. The sample consisting of a whole 500 mg tablet was placed under the epi-illumination setup and the focus of the instrument was adjusted to obtain the highest TCSPC count rate with the laser power set to an average power of 200 mW. The interferometer was then programmed to scan across 3300 OPD steps from -0.03 mm to 0.67 mm ($\delta\text{OPD}=0.2\text{ }\mu\text{m}$). For each step, a TPSF was detected with 100 ms integration time. Adding the time required by the interferometer to mechanically translate the birefringent wedge and the TCSPC accumulation time, acquiring a complete interferometric map took approximately 8 minutes with an active signal integration time of 330 s. A single interferogram was formed by integrating the signal acquired over the whole TPSF (0-20 ns), resulting in a vector with 3300 entries. This vector was then truncated to $\Delta\text{OPD} = 0.03\text{ mm}$, 0.06 mm , 0.12 mm , 0.20 mm , 0.33 mm and 0.67 mm . A Fourier-transform was applied to each of these shortened interferograms resulting in k -space spectra of varying spectral resolutions (Fig. 4.3). As expected, the maximum OPD value - a data acquisition parameter of the system - can be considered an optimization parameter selected according to the level of spectral resolution required for a specific biomedical application. It was demonstrated that $\Delta\text{OPD} \geq 0.33\text{ nm}$ allows the main molecular vibrational peaks of the molecule 4-acetamidophenol to be detected.

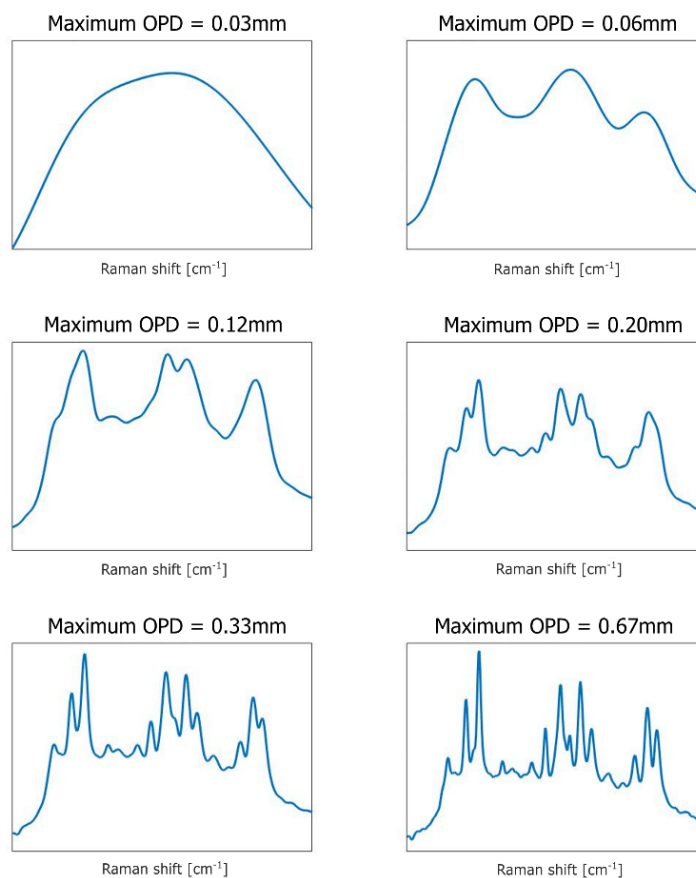


Figure 4.3 - Example of acetaminophen Raman spectra reconstructed from interferograms with increasing maximum values of OPD.

We next evaluated the effect of time-gating on the ability of the system to isolate inelastic scattering from fluorescence, by studying signals variations as the detection time window varies from 20 nanoseconds (whole TPSF) down to 300 ps (early photons) where a majority of the signal is expected to come from non-resonant phenomena. To demonstrate the effect, an organic material with easily identifiable Raman peaks and relatively high fluorescence was sought and olive oil was selected. A few drops were placed on aluminium foil that were then placed under the epi-illumination setup. An aluminum substrate was used as is often done in Raman micro-spectroscopy because it has low background signal compared to other more standard substrates such as glass slides⁷. The laser power was set to an average of 200 mW and the focus was adjusted to maximize the number of counts, resulting to an illumination/detection spot size of diameter $\sim 100 \mu\text{m}$. Interferometer and TCSPC settings were also kept the same as the previous experiment: 3300 OPD steps from -0.03 mm to 0.67 mm and an integration time of 100 ms for each TPSF. Time-gating

was performed numerically for different window widths: 10 ns, 2 ns, 1 ns, and 0.3 ns from signal onset. This was done by summing over a finite number of time bins within the TPSF obtained at every OPD step, resulting in one 3300 points interferogram for each time window. A Fourier transform was then applied to each interferogram leading to one k -space spectrum per time window. Because the background contributions (mostly fluorescence) were associated with lower k -space frequencies when compared to Raman spectral features, the two signal contributions were isolated from each other using a 6th order polynomial fitting algorithm, as is customary in the bio-Raman spectroscopy literature⁸.

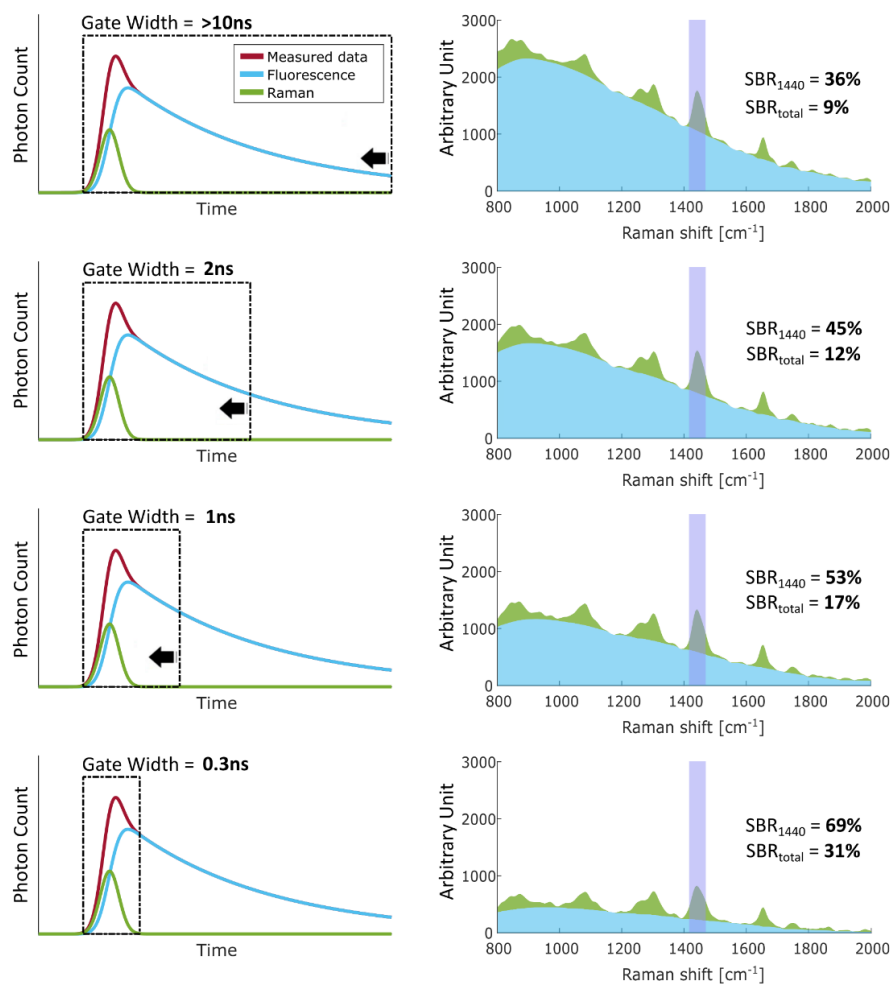


Figure 4.4 - Raman SBR evolution depending on the numerical gate width. Left side: time distribution of fluorescence and Raman scattering and principle of fluorescence rejection with a variable size time-gate. Right side: spectra of olive oil sample for the corresponding gate width, border between green and blue define by the polynomial fitting.

As the time-gate width was narrowed from 10 ns to 300 ps, the fluorescence background progressively diminished whilst the Raman signal remained largely unaffected (Fig. 4.4). To quantify this effect, Raman signal-to-background ratio (SBR) metrics were computed corresponding to the ratio of inelastic scattering to background contributions, either integrated across the whole spectrum from 400 to 2000 cm^{-1} ($\text{SBR}_{\text{total}}$) or restricted to the band for $1440 \pm 30 \text{ cm}^{-1}$ that is predominantly associated with CH_2 vibrational modes (SBR_{1440}). Narrowing the time window from 10 ns to 300 ps, the SBR around the 1440 cm^{-1} band increased from 36% to 69% while the SBR associated with the full spectrum increased from 9% to 31%.

We last sought to compare the tissue imaging performance of the TG-FT system with a standard dispersive spectrometer for which time-gating was not feasible. To this end, measurements were made on fresh ground beef and chicken breast with both systems. Measurements with the TG-FT system were performed using the same setup and acquisition parameters described for the 4-acetamidophenol and olive oil experiments. The resulting ground beef and chicken breast datasets were then processed to restrict interferometric data to the early 300 ps time window and to remove any remaining fluorescence background using the polynomial fitting algorithm.

The continuous-wave system used the same epi-illumination optical setup as the TG-FT system albeit with the excitation and collection optical fibers connected to a different light source and a different detector. Specifically, the excitation laser was replaced by a continuous-wave 785 nm laser (M-Type, IPS) while a high-throughput dispersive spectrometer (EmVision LLC, HT model) using a near-IR optimized back-illuminated CCD camera (Oxford Instruments, Andor Newton 920) was used on the detection end. The laser power was adjusted to obtain 200 mW at the sample. Camera integration time was set to 1 second and 100 spectra were acquired and averaged for a total active signal integration time of 100 s for each sample. Several processing steps were applied to both continuous-wave and TG-FT measurements: i) the Raman shift axis was calibrated using known emission peaks from a 4-acetamidophenol measurement, ii) a dark-noise measurement (with laser turned off) was subtracted, iii) the intensity was corrected for the system response by normalizing to a measurement made on a NIST standard (SRM 2241), iv) the background was removed based on the same polynomial fitting procedure as described for the TG-FT system, v) each spectrum was normalized with the standard normal variate (SNV) method to have a mean of

zero and standard deviation of one⁸⁻⁹⁻¹⁰. The spectra acquired for ground beef and chicken breast with both systems revealed all the main biological tissue peaks, including the amide bands and principal lipid peaks¹¹ (Fig. 4.5). However, inspection of the Raman spectra revealed an increased level of spectral details observed with the continuous-wave system due to the superior spectral resolution associated with datasets: 10 cm⁻¹ versus 15 cm⁻¹ for the TG-FT system.

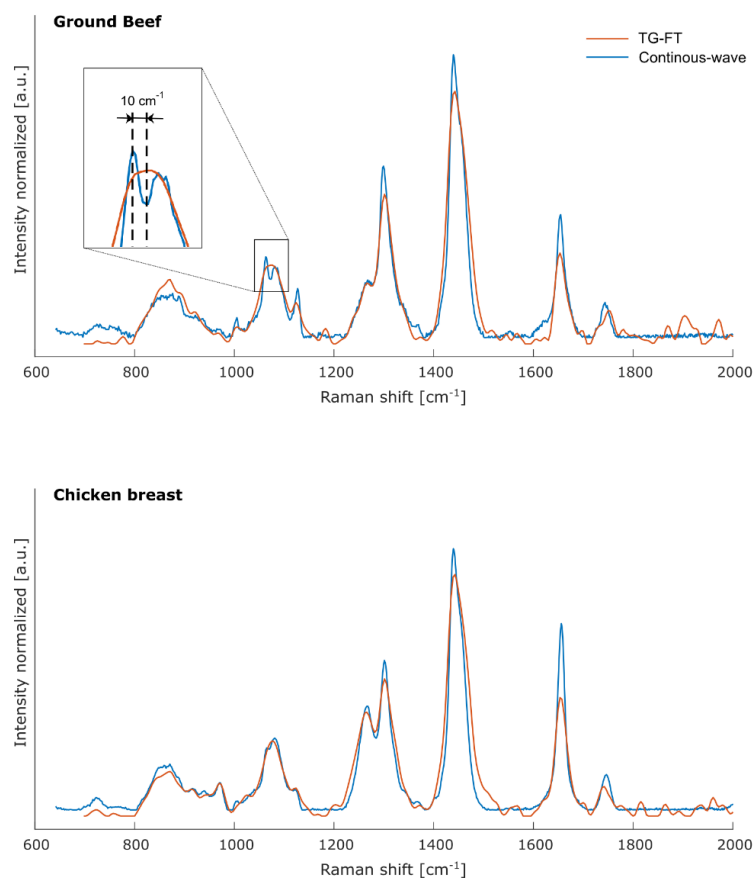


Figure 4.5 - Comparison of processed Raman spectra of ground beef and chicken breast samples. Data acquired with the new Time-resolved Fourier-transform spectroscopic system and a state-of-the-art dispersive spectrometer-based system with continuous wave illumination.

4.2.5 Discussion

We have demonstrated the potential of a system integrating interferometry with time-domain detection to enhance spectroscopic data acquisition flexibility and, perhaps more importantly, to improve the levels of inelastic scattering signal to background ratio in biological tissues.

As shown, Fourier-transform spectroscopy provides a uniform wavenumber resolution over the whole reconstructed Raman spectrum and allows easy control over spectral coverage as well as spectral resolution. Moreover, the interferometry technique requires only a single sensor unit to reconstruct a full Raman spectrum. Those features are in contradistinction with more standard Raman spectroscopy approaches where a diffraction grating is required in conjunction with a detector array to provide a spectrum with non-uniform resolution, and for which modifications in spectral resolution/coverage require optical design changes and/or switching between entrance slits of different widths. Data acquisition flexibility can be important in developing new Raman applications that may be associated with different spectroscopic data requirements. As an example, detecting subtle pathophysiological changes associated with brain cancer invasions may require more Raman bands and increased resolution¹²⁻¹³ when compared to an application that would only require different tissue types to be distinguished, e.g. white brain matter vs. gray matter¹⁴. Fourier-transform spectroscopy also theoretically offers increased light throughput but realizing this would require the current setup to be modified in order to optimize light collection efficiency. Multiple optical design features of this system negatively impact light throughput including the small detection area of the SPAD sensor, the low quantum efficiency of the SPAD sensor in the near-IR and the fact both illumination and collection fibers are acting as input and output apertures, respectively.

Perhaps the most enticing finding here is that time-gating has the potential to improve the quality of Raman measurements performed on highly fluorescent biological samples as measured through inelastic scattering SBR improvements. However, more work is required to devise an optical system optimizing the specificity to inelastic scattering detection with respect to resonant background sources. This can be achieved by optimizing the early time-window width to values <300 ps while ensuring the laser pulse length and the detector transit time are minimized. In this paper we performed numerical time-gating by selecting a portion of the TPSF, but detector having on-chip programmable time-gating capabilities are becoming available. These could

simplify implementation and reduce cost. Time-gating opens the door to using visible excitation wavelengths where Raman signal is increased compared to near-IR excitation but where strong fluorescence to this date prevented the development of tissue interrogation applications.

4.2.6 Disclosures

The authors have no financial or other potential conflicts of interests to disclose.

4.2.7 Acknowledgements

The authors would like thank Nick Bertone from PicoQuant and Fabrizio Preda from NIREOS for lending equipment used in these experiments. This work is supported by the Discovery Grant program from Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), the Ministry of Education and Innovation of Quebec (MEI), the European CORNET program through the AMARANTA project, and MITACS.

4.2.8 References

1. J. Zhao, H. Lui, D.I. McLean, H. Zeng, "Automated Autofluorescence Background Subtraction Algorithm for Biomedical Raman Spectroscopy, " *Applied Spectroscopy*, 61(11), 1225-1232 (2007). [doi: 10.1366/000370207782597003]
2. D. Wei, S. Chen, Q. Liu, "Review of Fluorescence Suppression Techniques in Raman Spectroscopy," *Applied Spectroscopy Reviews*, 50(5), 387–406 (2015). [doi: 10.1080/05704928.2014.999936]
3. M. Kögler, B. Heilala, "Time-gated Raman spectroscopy - A review," *Measurement Science and Technology* 32(1), 1-17 (2021), 012002 [doi: 10.1088/1361-6501/abb044]
4. M. Y. Berezin, S. Achilefu, "Fluorescence Lifetime Measurements and Biological Imaging, " *Chemical Reviews*, 110(5), 2641-2684 (2010). [doi: 10.1021/cr900343z]
5. B. C. Smith, "Fundamentals of Fourier transform infrared spectroscopy," 2nd edition, CRC Press (2011). [isbn: 9781420069297]
6. F. Preda et al., "Linear and Nonlinear Spectroscopy by a Common-Path Birefringent Interferometer," *Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, 23(3), 88-96 (2017). [doi: 10.1109/JSTQE.2016.2630840]

7. L. Cui, H. Butler, P. Martin-Hirsch, F. Martin, (2015). "Aluminium Foil as a Potential Substrate for ATR-FTIR, Transflection FTIR or Raman Spectrochemical Analysis of Biological Specimens, " *Analytical Methods*, 8, 481-487 (2016). [doi: 10.1039/C5AY02638E]
8. J. Zhao, H. Lui, D. I. Mclean, and H. Zeng, "Automated auto fluorescence background subtraction algorithm for biomedical Raman spectroscopy," *Applied Spectroscopy*, 61(11), 1225-1232 (2007). [doi: 10.1366/000370207782597003]
9. S. J. Choquette, E. S. Etz, W. S. Hurst, et al., "Relative Intensity Correction of Raman Spectrometers: NIST SRMs 2241 through 2243 for 785 nm, 532 nm, and 488 nm/514.5 nm Excitation, " *Applied Spectroscopy*, 61(2), 117–129 (2007). [doi: 10.1366/000370207779947585]
10. P. Lasch, "Spectral Pre-Processing for Biomedical Vibrational Spectroscopy and Microspectroscopic Imaging," *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 117, 100-114 (2012). [doi: 10.1016/j.chemolab.2012.03.011]
11. C. S. Talari, Z. Movasaghi, S. Rehman, et al., "Raman Spectroscopy of Biological Tissues, " *Applied Spectroscopy Reviews*, 50(1), 46–111 (2015). [doi: 10.1080/05704928.2014.923902]
12. M. Jermyn, J. Mercier, J. Desroches, K. Aubertin, K. Umrey, E. Marple, M. C. Guiot, F. Leblond & K. Petrecca, "Highly Accurate Detection of Cancer In Situ with Intraoperative, Label-Free, Multimodal Optical Spectroscopy," *Cancer Research*, 77 (14), 3942-3950 (2017). [doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-0668]
13. M. Jermyn, K. Mok, J. Mercier, J. Desroches, J. Pichette, K. St-Arnaud, M. C. Guiot, K. Petrecca, F. Leblond, "Intraoperative Brain Cancer Detection with Raman Spectroscopy in Humans," *Science Translational Medicine*, 7 (274), 274ra19 (2015). [doi: 10.1126/scitranslmed.aaa2384]
14. F. Picot, F. Daoust, G. Sheehy, F. Dallaire, L. Chaikho, T. Bégin, S. Kadoury, F. Leblond, "Data Consistency and Classification Model Transferability Across Biomedical Raman Spectroscopy Systems," *Translational Biophotonics*, e202000019 (2020). [doi: 10.1002/tbio.202000019]

CHAPITRE 5 DISCUSSION GÉNÉRALE

Deux systèmes de spectroscopie Raman dans le domaine temporel ont été présentés. Ces systèmes ont permis avec succès la mesure du spectre Raman sur des échantillons de tissus biologiques. Ce chapitre reviendra donc tout d'abord sur les objectifs initiaux au regard des résultats obtenus. Les avantages apportés par les deux systèmes seront ensuite abordés ainsi que les limites rencontrées lors du projet. Finalement, une étude des exigences en matière de sécurité liées à l'utilisation d'un laser pulsé sera présentée.

5.1 Retour sur les objectifs

L'Objectif 1 visait à développer un système de spectroscopie Raman qui intégrerait dans son fonctionnement le comptage de photon résolu dans le temps dans son fonctionnement. Cet objectif a été atteint par deux fois. Les systèmes présentés dans ce mémoire comprennent tous deux un détecteur à photon unique de type SPAD et réalisent leur mesure grâce à un module TCSPC. En outre, leur capacité à acquérir des spectres Raman connus a été démontrée. Bien qu'ils aient été conçus comme des montages expérimentaux et donc éphémères, ces systèmes peuvent néanmoins servir de guide en vue de l'élaboration d'une plateforme pérenne de spectroscopie Raman en temporel.

L'Objectif 2 est atteint suite à l'acquisition et l'analyse de spectres de tissus biologiques. Les résultats obtenus permettent de confirmer **l'Hypothèse 2** : la fluorescence a pu être rejetée grâce à l'application d'une fenêtre temporelle. Dans le proche infrarouge, où la fluorescence est généralement moins importante, cette fenêtre temporelle peut être appliquée par un traitement post-acquisition des données. En effet, comme l'illustre la figure 4.4, l'histogramme temporel complet est mesuré et c'est en réduisant la plage de sélection sur celui-ci que l'opération est réalisée.

En revanche, dans le domaine de la lumière visible (premier système), le rejet de l'autofluorescence est effectif grâce à l'activation et désactivation ultrarapide du détecteur et au décalage progressif de cette fenêtre de détection, résultat illustré par la figure 3.12. Cela a en plus pour effet de maximiser la plage dynamique disponible pour le Raman et réduit le bruit photonique qui était induit par la fluorescence. On voit alors sur les spectres de la figure 3.13, des pics qui semblent émerger du signal de fond. C'est cette opération qui améliore la qualité des spectres Raman, exprimée par le SNR à travers l'évolution du facteur de qualité, figure 3.14.

L'Objectif 3 concernait la comparaison entre la méthode proposée et les systèmes de spectroscopie Raman conventionnel tel qu'ils sont décrits dans la revue de littérature section 2.1.3. Si la sonde illustrée figure 2.5 n'a pas pu être intégrée (voir section 5.3), la conception du second système a été l'occasion d'acquérir des données par les deux méthodes et via le même instrument optique, en l'occurrence le montage en épi-illumination. Les résultats présentés sur la figure 4.5 illustrent la comparaison inter-système qui a été faite dans le cadre de cette expérience. Si en l'état il y a une différence de résolution spectrale compte tenue des méthodes d'acquisition, la juxtaposition quasi parfaite des pics permet néanmoins de valider son fonctionnement.

5.2 Avantage des solutions proposées

Le premier avantage des systèmes conçus dans le cadre de ce projet consiste évidemment en leur capacité à supprimer une fraction significative du signal de fond et ainsi renforcer la qualité des spectres Raman. Une étude menée au sein de LRO et publiée tout récemment montre que la qualité des données, exprimée par le SNR Raman et le facteur de qualité correspondant, est critique pour le développement de modèles de classifications fiables[55]. Dans le contexte de la reconnaissance de tissus cancéreux à l'aide de ces modèles, l'utilisation d'un système de spectroscopie dans le domaine temporel apparaît alors comme très avantageuse. Le premier a en effet permis de démontrer que la qualité d'un spectre pouvait être améliorée par cette méthode à l'aide d'une commande ultra-rapide de la détection. À l'inverse, avec un système de spectroscopie Raman conventionnel, la qualité des données est dépendante du nombre n de spectres mesurés lors d'une même acquisition. Or il a été démontré que cette amélioration, quantifiée par l'évolution du facteur de qualité, suit une fonction \sqrt{n} [23]. Cela limite dans ce cas la qualité optimale pouvant être atteinte avec des acquisitions à la durée acceptable s'agissant d'applications cliniques. En effet, l'augmentation du nombre de mesures rallonge le temps d'exposition au laser, ce qui peut s'avérer délétère pour les tissus biologiques (voir section 5.4).

Un second avantage, démontré lors de la seconde expérience, est la possibilité d'intégrer les données issues de la spectroscopie en temporel dans les méthodes d'analyse du laboratoire. Un processus de normalisation des données a été développé au sein du LRO afin d'harmoniser les données issues de différents systèmes[56]. Ce processus a été utilisé lors de l'étude mentionnée précédemment pour une comparaison inter-système[55]. Avec la même idée, les données acquises avec le second système et un système conventionnel ont toutes été normalisées. Les spectres

résultants sont très similaires, au regard de la position des pics sur l'axe horizontale mais aussi de leur intensité relative. On peut alors envisager par exemple d'utiliser ces deux sources de données indifféremment pour le développement de méthode de classification, bien que cette hypothèse soit à confirmer sur un plus large éventail d'échantillons.

La spectroscopie par interférométrie possède plusieurs avantages comme mentionnés dans le chapitre 4. L'interféromètre biréfringent utilisé est extrêmement compact ($<1\text{dm}^3$, 1kg) comparativement au monochromateur Princeton du chapitre 3 ($>5\text{dm}^3$, 4.2kg). Son intégration dans un montage est plus simple : il accepte un faisceau collimaté en entrée, ce qui réduit les pertes encourues par une adaptation de la divergence du faisceau à une ouverture numérique restreinte. Son efficacité de transmission est également plus grande étant donnée l'absence de réseau de diffraction et de fente en entrée comme en sortie. Et le signal de sortie étant également collimaté, la résolution spectrale du système ne dépend plus de la position du détecteur en sortie. Plus généralement, la mesure dans le domaine de Fourier amène une nouvelle information à exploiter : la décomposition du signal en fréquences. Compte tenu du fait que la fluorescence évolue lentement dans le domaine spectral, on pourrait théoriquement la supprimer à l'aide d'un filtre passe-haut qui couperait les basses fréquences et donc la fluorescence. Un autre avantage de l'interférométrie est de pouvoir mesurer une très large plage spectrale, qui est inversement proportionnelle à la résolution dans le domaine de Fourier. On obtient donc pour une seule et même acquisition les sections Raman de l'empreinte digitale et des hauts nombres d'onde, là où un spectroscope classique a besoin d'un laser à double longueur d'onde. À noter que cela est également possible avec un monochromateur, mais cela rallonge la durée totale de l'acquisition.

Pour finir, une option envisageable avec la mesure par TCSPC, mais qui n'a pas été testée dans le cadre de ce projet, est la possibilité de combiner la spectroscopie Raman avec du FLIM, l'imagerie du temps de vie de fluorescence mentionnée dans la revue de littérature (section 2.1.2). En mesurant l'histogramme au complet, cette information est obtenue généralement par déconvolution de la courbe par l'IRF de manière à obtenir une fonction exponentielle décroissante $e^{-t/\tau}$, avec τ le temps de vie. Le FLIM est une technique d'imagerie mature, utilisée avec succès lors du diagnostic de différents types de cancers et notamment pour la reconnaissance intra-opératoire des tissus tumoraux dans le cerveau par mesure de l'autofluorescence[11]. Avec un système tel que ceux présentés dans ce mémoire, l'acquisition du spectre Raman et du temps de vie de l'autofluorescence

pourraient se faire en simultané, et leurs résultats combinés pour renforcer la fiabilité des modèles de reconnaissance de tissus.

5.3 Défis rencontrés

Les premiers défis rencontrés lors de ce projet étaient liés aux contraintes matérielles. L'expérience présentée dans le chapitre 3 repose sur la commande ultra-rapide de la détection. Les systèmes les plus récents utilisent pour cela des matrices de SPADs (section 2.3.3). Ce type de détecteur peut directement suppléer une caméra CCD sur un système conventionnel et acquérir ainsi tout le spectre simultanément. Or, le seul détecteur dont nous disposions dans le cadre de ce projet était une SPAD à point unique. Le choix a alors été fait d'inclure un monochromateur afin de pouvoir balayer l'ensemble des longueurs d'onde en ce point. Les mesures successives de chaque point du spectre engendrent des temps d'acquisition très longs (8 minutes en moyenne) comparativement à un système classique ($\sim 100\text{ms}$). En l'état, il est donc impossible d'envisager une utilisation de ce système dans un contexte intra-opératoire, où les temps d'acquisition ne peuvent aller au-delà de la minute, notamment pour garantir la stabilité de l'instrument optique (la sonde dans ce cas) manipulé par le chirurgien.

En outre, ces temps d'acquisition prolongent l'illumination de l'échantillon, ce qui engendre un important photo-blanchiment. La disparition de la fluorescence par ce phénomène a été un réel frein pour démontrer l'efficacité de la méthode TG, objectif annoncé de ce projet. Sur la grande majorité des échantillons, la fluorescence avait déjà disparu avant que le spectre n'ait pu être mesuré au complet, celui-ci laissait alors apparaître clairement le Raman sans même avoir recours à la fenêtre temporelle (Figure 3.11). L'échantillon qui a permis de réaliser l'expérience du chapitre 3, le bœuf haché, est un mélange de différents types de tissus, ce qui pourrait expliquer sa meilleure résistance au photo-blanchiment. De plus, afin de se remettre dans des conditions semblables d'autofluorescence, il fallait périodiquement changer l'emplacement illuminé sur l'échantillon. La nature hétérogène d'un échantillon comme le bœuf haché et la dimension réduite du spot d'illumination ($\sim 15\mu\text{m}$) introduisent une variabilité importante et compliquent l'analyse des résultats. Ainsi, les spectres présentés dans le chapitre 3 et ceux issus du système interférométrique du chapitre 4 sont le fruit d'une acquisition unique. Au contraire, avec un système de spectroscopie classique, on acquiert généralement plusieurs dizaines de spectres que l'on moyenne ensuite (comme c'est le cas des spectres en bleu sur la figure 4.5). D'un point de vu

logistique, nous avons eu à composer avec un accès limité à de l'équipement essentiel aux mesures temporelles (le laser PicoQuant étant un prêt à durée limitée de la compagnie). De cette limitation résulte notamment un nombre limité de points pour évaluer les courbes d'évolution du facteur de qualité sur la figure 3.14. De cette même figure, on déduit la qualité des spectres Raman en fonction d'un décalage de la fenêtre de détection. Or il serait plus intuitif de regarder l'effet de la taille de la fenêtre plutôt que sa position. Une étude existe sur l'effet de ces deux paramètres sur le SNR Raman[57]. Elle arrive à la conclusion que le début de la fenêtre devrait coïncider avec le front montant du pulse laser (soit le début du Raman), sans collecter le bruit d'obscurité qui le précède sur l'histogramme. Avec ce moment d'activation fixe, la décroissance de fluorescence est ensuite coupée par réduction de la fenêtre. Le meilleur SNR est alors obtenu avec une fenêtre d'une largeur proche de celle du pulse laser. Dans notre cas, l'intervalle d'activation minimum du détecteur est de 2ns, une longueur plus de 10 fois supérieure à celle de l'IRF (150ps). En raison de cette limite, nous avons été obligés de jouer sur le paramètre de la position plutôt que sur celui de la taille. Heureusement, grâce au système de refroidissement de la SPAD, le niveau du bruit d'obscurité était maintenu très bas (10 comptes par seconde à 0°C). Combiné à une isolation totale à la lumière ambiante (qui crée sinon un bruit de fond continu sur tout l'histogramme), le nombre de photons compté avant le pulse est quasi-nul.

Au-delà de ces obstacles liés aux limites du matériel à disposition, ce sont les difficultés rencontrées lors de la construction des systèmes qui ont le plus freiné l'avancée du projet. Dans le cas de l'expérience en lumière visible, la conception du montage optique en entrée du monochromateur et le positionnement du détecteur en sortie ont nécessité plusieurs itérations d'essais/erreurs avant d'arriver à un montage satisfaisant, qui restait néanmoins très sensible. De la position du point de collection sur l'échantillon, à l'alignement de la SPAD en sortie du monochromateur, en passant par la position de la lentille en entrée de celui-ci, tous les éléments qui composent la voie de détection ont un rôle critique dans l'obtention des résultats présentés dans le chapitre 3. Par exemple, un décalage de quelques micromètres de la SPAD pouvait faire chuter de plusieurs ordres de grandeur l'efficacité de détection, en se désaxant du point de sortie du monochromateur.

Pour le cas du système interférométrique du chapitre 4, la principale difficulté rencontrée a été de réduire les pertes autour de l'interféromètre. La première approche envisagée lors de la conception du système a été de remplacer le montage optique en épi-illumination par une sonde Raman

similaire à celle présentée dans la revue de littérature (section 2.1.3). L'idée était d'augmenter la taille du spot d'illumination par rapport au premier système (500 μ m de diamètre avec la sonde contre 15 μ m avec l'objectif de microscope) et d'augmenter la quantité de signal grâce aux 7 fibres de collection. Or la voie de détection de ces sondes est conçue pour être reliée à l'entrée d'un spectromètre. Les fibres sont ainsi alignées verticalement afin de maximiser la plage de pixels utilisés sur la caméra, et leur ouverture numérique correspond exactement à celle du spectromètre. Tandis que dans notre cas, l'interféromètre Gemini prend en entrée un faisceau collimaté. De plus, en sortie de l'appareil, un objectif de microscope est placé pour concentrer la lumière sur le détecteur. Il fallait donc convertir le faisceau issu de 7 fibres alignées et d'un NA de 0.22 en un faisceau collimaté et circulaire. Pour répondre à cette problématique, plusieurs options ont été envisagées comme l'utilisation d'une lentille cylindrique ou encore celle d'un ensemble de fibres linéaire à circulaire, mais aucune n'a permis de réduire significativement les importantes pertes. Le choix a donc été fait d'abandonner la sonde et de se rabattre sur un second montage en épi-illumination où l'objectif de microscope était remplacé par une simple lentille achromatique. Ce qui a tout de même permis d'augmenter la taille du spot d'illumination ($\sim 100\mu$ m), mais a en revanche réduit l'efficacité de collection. De plus des pertes de signal étaient toujours constatées à trois endroits clés : au niveau du collimateur utilisé en sortie de la fibre de collection, au niveau de l'interféromètre lui-même, et enfin au niveau de l'objectif de microscope. Les pertes sur le montage final étaient estimées à environ 50%, ce qui est relativement important lorsque l'on cherche à observer un phénomène à intensité très faible comme le Raman.

5.4 Sécurité laser

Un aspect important à considérer lors de la conception d'un appareil d'imagerie optique est la sécurité liée au laser. Pour s'assurer d'une utilisation sans danger pour l'utilisateur, il est important de ne pas dépasser un seuil d'exposition maximum permissible (EMP). C'est une limite théorique, généralement fixée à 10% de la dose d'irradiation qui aurait 50% de risque de créer un dommage[58]. L'EMP est communiqué en fonction de la longueur d'onde et du temps d'exposition pour l'œil et la peau humaine dans la norme ANSI Z136.1. Dans le cas de ce projet, on considère l'EMP pour la peau, car on vise une utilisation sur du tissu biologique. Le faisceau étant par ailleurs très dispersif à la sortie de l'instrument optique (grande ouverture

numérique pour un objectif de microscope ou une sonde), il y a peu de chance que l'œil de l'utilisateur soit atteint avec une haute densité de puissance.

Selon la norme, pour un laser à lumière pulsé, deux conditions doivent être respectées :

Règle #1 : l'exposition sur la peau ne doit pas dépasser l'EMP basé sur l'exposition à un seul pulse,

Règle #2 : l'irradiance moyenne ne doit pas dépasser l'EMP pour le train d'impulsion au complet.

Deux valeurs sont donc à rechercher : EMP_{pulse} pour la première règle et EMP_{moy} pour la seconde.

En se basant sur les données du projet, le temps d'exposition totale est estimé à 8min, la durée du pulse à 100ps et la longueur d'onde est choisie à 515nm.

Pour une durée d'exposition entre 10^{-9} et 10^{-7} seconde :

$$EMP = 2.0 * C_A * 10^{-2} (J.cm^{-2})$$

Avec $C_A = 1.0$ entre 400 et 700nm. Comme aucune formule n'est donnée pour une exposition moins longue, on utilise celle-ci par extension pour le pulse de 100ps :

$$EMP_{pulse} = 2 * 10^{-2} J.cm^{-2}$$

La laser PicoQuant utilisé dans le premier système est à 80MHz avec une puissance moyenne de 20mW, soit un pulse de 0.25nJ. Selon la norme, l'exposition doit être moyennée sur un spot de 3.5mm diamètre :

$$E_{pulse} = \frac{2.5 * 10^{-10}}{\pi * 0.175^2} = 2.6 * 10^{-9} J.cm^{-2}$$

L'énergie du pulse est très largement inférieure à l'EMP pour un pulse de même durée, la **Règle #1** est donc respectée.

Pour une exposition entre 10 et 3×10^4 secondes :

$$EMP = 0.2 * C_A (W.cm^{-2})$$

Donc

$$EMP_{moy} = 200 mW.cm^{-2}$$

En comparaison, avec le laser PicoQuant :

$$P_{moy} = \frac{2 * 10^{-2}}{\pi * 0.175^2} = 208 mW.cm^{-2}$$

L'EMP est alors légèrement dépassé. Bien que cette limite soit donnée pour un cas extrême, il est préférable de ne jamais l'atteindre. Les solutions envisageables sont la réduction de la puissance ou celle du temps d'exposition. Dans le cas du premier système, si le détecteur à un seul point était remplacé par un champ multi-pixels composé de plusieurs SPADs, il serait alors possible de réduire très fortement la durée de l'acquisition en mesurant tous les points spectraux simultanément.

Pour une durée d'exposition t entre 10^{-7} et 10 secondes :

$$EMP = 1.1 * C_A * t^{0.25} (J.cm^{-2})$$

En admettant l'hypothèse d'un détecteur multi-pixels, le temps d'acquisition total serait alors la durée d'intégration d'un seul histogramme, soit 1 seconde :

$$EMP_{moy} = 1.1 W.cm^{-2}$$

La **Règle #2** est alors respectée : la puissance moyenne est inférieure à EMP_{moy} d'un facteur 5. Il serait alors possible d'envisager une augmentation de la puissance laser, ce qui augmenterait encore fort probablement la qualité des spectres Raman mesurés.

CHAPITRE 6 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

L'objectif initial de ce projet de recherche était d'étudier la faisabilité de mesurer des spectres Raman de tissus biologiques en supprimant simultanément l'autofluorescence grâce à la méthode temporelle. Après avoir passé en revue les différentes techniques de rejet de la fluorescence, le choix a été fait d'utiliser le comptage de photon unique corrélé dans le temps pour y parvenir. Un système expérimental composé d'un laser pulsé 515nm, d'un montage optique en épi-illumination, d'un monochromateur et d'un détecteur CMOS-SPAD a alors été conçu. La longueur d'onde d'excitation a été choisie dans le domaine visible afin de bénéficier de l'augmentation de l'intensité du signal Raman et de l'efficacité du détecteur. Grâce à une commande ultra-rapide du détecteur, une fenêtre temporelle est appliquée afin de capter uniquement le signal d'intérêt. Des acquisitions ont alors été réalisées en faisant varier la position de la fenêtre dans le temps. Malgré plusieurs obstacles rencontrés, des résultats montrant une augmentation du SNR Raman ont pu être obtenus sur un échantillon de tissu de bœuf. L'expérience démontre ainsi une amélioration de la qualité des spectres lors de la suppression progressive de la fluorescence par la méthode TG.

Un second système, dans le proche infrarouge, a ensuite été conçu afin de comparer les résultats avec un système de spectroscopie conventionnel utilisant cette même plage spectrale. Ce second système combine pour la première fois spectrométrie par transformée de Fourier et comptage de photon unique pour l'obtention de spectre Raman. La mesure résolue dans le temps a permis d'augmenter significativement le SBR Raman à l'aide d'une fenêtre temporelle numérique, tandis que la résolution spectrale pouvait être ajustée jusqu'à un minimum de 15cm^{-1} grâce à l'interféromètre. Malgré cette limite de résolution, ce nouveau système, compact et flexible d'utilisation, est capable d'identifier les principaux pics Raman dans des tissus.

En conclusion, ce mémoire présente la preuve de concept de la spectroscopie Raman en temporel dans des tissus biologiques. Face à la nécessité d'obtenir des données de qualité pour la mise en place de méthodes intelligentes de reconnaissance des tissus, cette technique pourrait s'avérer pertinente et utile. Des moyens pour la mettre en place ont été proposés, mais plusieurs améliorations doivent être apportées avant de pouvoir l'utiliser dans des applications cliniques, essentiellement pour raccourcir la durée des acquisitions. Le passage à un détecteur matriciel, l'optimisation de la taille de la fenêtre temporelle ou encore la combinaison de l'interférométrie et d'une source de lumière visible sont autant d'avenues possibles pour la suite du projet.

RÉFÉRENCES

- [1] C. C. S. A. Committee, "Canadian Cancer Statistics 2019," Canadian Cancer Society, 2019.
- [2] M. Jermyn *et al.*, "A review of Raman spectroscopy advances with an emphasis on clinical translation challenges in oncology," (in eng), *Phys Med Biol*, vol. 61, no. 23, pp. R370-r400, Dec 7 2016, doi: 10.1088/0031-9155/61/23/r370.
- [3] D. Wei, S. Chen, and Q. Liu, "Review of Fluorescence Suppression Techniques in Raman Spectroscopy," *Applied Spectroscopy Reviews*, vol. 50, 05/28 2015, doi: 10.1080/05704928.2014.999936.
- [4] K. Martin and H. Bryan, "Time-gated Raman spectroscopy – a review," *Measurement Science and Technology*, 2020. [Online]. Available: <http://iopscience.iop.org/10.1088/1361-6501/abb044>.
- [5] C. V. Raman, "A Change of Wave-length in Light Scattering," *Nature*, vol. 121, no. 3051, pp. 619-619, 1928/04/01 1928, doi: 10.1038/121619b0.
- [6] S. O. Williams and D. G. Imre, "Raman spectroscopy: time-dependent pictures," *The Journal of Physical Chemistry*, vol. 92, no. 12, pp. 3363-3374, 1988/06/01 1988, doi: 10.1021/j100323a012.
- [7] H. J. Butler *et al.*, "Using Raman spectroscopy to characterize biological materials," (in eng), *Nat Protoc*, vol. 11, no. 4, pp. 664-87, Apr 2016, doi: 10.1038/nprot.2016.036.
- [8] M. Kögler, "Advanced Raman spectroscopy for bioprocess monitoring," Doctoral Thesis, Technische Universität Berlin, Technische Universität Berlin, Berlin, 2018. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.14279/depositonce-6684>
- [9] M. Monici, "Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications," in *Biotechnology Annual Review*, vol. 11: Elsevier, 2005, pp. 227-256.
- [10] R. Datta, T. M. Heaster, J. T. Sharick, A. A. Gillette, and M. C. Skala, "Fluorescence lifetime imaging microscopy: fundamentals and advances in instrumentation, analysis, and applications," *Journal of Biomedical Optics*, vol. 25, no. 7, p. 071203, 2020.
- [11] L. Marcu, "Fluorescence lifetime techniques in medical applications," (in eng), *Ann Biomed Eng*, vol. 40, no. 2, pp. 304-31, Feb 2012, doi: 10.1007/s10439-011-0495-y.
- [12] G. A. Wagnières, W. M. Star, and B. C. Wilson, "In vivo fluorescence spectroscopy and imaging for oncological applications," (in eng), *Photochem Photobiol*, vol. 68, no. 5, pp. 603-32, Nov 1998.
- [13] J. W. Chan, D. S. Taylor, T. Zwerdling, S. M. Lane, K. Ihara, and T. Huser, "Micro-Raman spectroscopy detects individual neoplastic and normal hematopoietic cells," (in eng), *Biophys J*, vol. 90, no. 2, pp. 648-656, 2006, doi: 10.1529/biophysj.105.066761.
- [14] K. Aubertin *et al.*, "Mesoscopic characterization of prostate cancer using Raman spectroscopy: potential for diagnostics and therapeutics," *BJU International*, vol. 122, no. 2, pp. 326-336, 2018/08/01 2018, doi: 10.1111/bju.14199.

- [15] S. H. Abigail *et al.*, "Diagnosing breast cancer using Raman spectroscopy: prospective analysis," *Journal of Biomedical Optics*, vol. 14, no. 5, pp. 1-8, 9/1 2009, doi: 10.1117/1.3247154.
- [16] M. Jermyn *et al.*, "Intraoperative brain cancer detection with Raman spectroscopy in humans," *Science Translational Medicine*, vol. 7, no. 274, p. 274ra19, 2015, doi: 10.1126/scitranslmed.aaa2384.
- [17] A.-A. Grosset *et al.*, "Raman microscopy: A diagnostic and prognostic tool for pathologists," *Canadian Journal of Pathology*, vol. 10, pp. 54-54, 2018. [Online]. Available: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=ccm&AN=139556862&lang=fr&site=ehost-live>.
- [18] C. Boudoux, *Fundamentals of Biomedical Optics*. 2016.
- [19] A. C. De Luca, K. Dholakia, and M. Mazilu, "Modulated Raman Spectroscopy for Enhanced Cancer Diagnosis at the Cellular Level," (in eng), *Sensors (Basel)*, vol. 15, no. 6, pp. 13680-13704, 2015, doi: 10.3390/s150613680.
- [20] C. A. Lieber and A. Mahadevan-Jansen, "Automated method for subtraction of fluorescence from biological Raman spectra," (in eng), *Appl Spectrosc*, vol. 57, no. 11, pp. 1363-7, Nov 2003, doi: 10.1366/000370203322554518.
- [21] J. Zhao, H. Lui, D. I. McLean, and H. Zeng, "Automated autofluorescence background subtraction algorithm for biomedical Raman spectroscopy," (in eng), *Appl Spectrosc*, vol. 61, no. 11, pp. 1225-32, Nov 2007, doi: 10.1366/000370207782597003.
- [22] R. Perez-Pueyo, M. J. Soneira, and S. Ruiz-Moreno, "Morphology-based automated baseline removal for Raman spectra of artistic pigments," (in eng), *Appl Spectrosc*, vol. 64, no. 6, pp. 595-600, Jun 2010, doi: 10.1366/000370210791414281.
- [23] D. Frédérick *et al.*, "Quantitative spectral quality assessment technique validated using intraoperative *in vivo* Raman spectroscopy measurements," *Journal of Biomedical Optics*, vol. 25, no. 4, pp. 1-8, 4/1 2020, doi: 10.1117/1.JBO.25.4.040501.
- [24] C. Galloway, E. Le Ru, and P. Etchegoin, "An Iterative Algorithm for Background Removal in Spectroscopy by Wavelet Transforms," *Applied spectroscopy*, vol. 63, pp. 1370-6, 12/01 2009, doi: 10.1366/000370209790108905.
- [25] C. Camerlingo, F. Zenone, G. M. Gaeta, R. Riccio, and M. Lepore, "Wavelet data processing of micro-Raman spectra of biological samples," *Measurement Science and Technology*, vol. 17, no. 2, pp. 298-303, 2006/01/04 2006, doi: 10.1088/0957-0233/17/2/010.
- [26] M. N. Leger and A. G. Ryder, "Comparison of Derivative Preprocessing and Automated Polynomial Baseline Correction Method for Classification and Quantification of Narcotics in Solid Mixtures," *Applied Spectroscopy*, vol. 60, no. 2, pp. 182-193, 2006/02/01 2006. [Online]. Available: <http://as.osa.org/abstract.cfm?URI=as-60-2-182>.
- [27] K. Sowoidnich and H.-D. Kronfeldt, "Fluorescence Rejection by Shifted Excitation Raman Difference Spectroscopy at Multiple Wavelengths for the Investigation of Biological

- Samples," *ISRN Spectroscopy*, vol. 2012, p. 256326, 2012/08/08 2012, doi: 10.5402/2012/256326.
- [28] M. Martins, D. Ribeiro, E. Santos, A. Martin, A. Fontes, and H. Martinho, "Shifted-excitation Raman Difference Spectroscopy for In Vitro and In Vivo Biological Samples Analysis," *Biomed. Opt. Express*, vol. 1, pp. 617-626, 09/01 2010, doi: 10.1364/BOE.1.000617.
 - [29] P. P. Yaney, "Reduction of Fluorescence Background in Raman Spectra by the Pulsed Raman Technique*," *J. Opt. Soc. Am.*, vol. 62, no. 11, pp. 1297-1303, 1972/11/01 1972, doi: 10.1364/JOSA.62.001297.
 - [30] R. P. Van Duyne, D. L. Jeanmaire, and D. F. Shriver, "Mode-locked laser Raman spectroscopy. New technique for the rejection of interfering background luminescence signals," *Analytical Chemistry*, vol. 46, no. 2, pp. 213-222, 1974/02/01 1974, doi: 10.1021/ac60338a012.
 - [31] J. M. Harris, R. W. Chrisman, F. E. Lytle, and R. S. Tobias, "Sub-nanosecond time-resolved rejection of fluorescence from Raman spectra," *Analytical Chemistry*, vol. 48, no. 13, pp. 1937-1943, 1976/11/01 1976, doi: 10.1021/ac50007a033.
 - [32] P. Matousek, M. Towrie, A. Stanley, and A. W. Parker, "Efficient Rejection of Fluorescence from Raman Spectra Using Picosecond Kerr Gating," *Applied Spectroscopy*, vol. 53, no. 12, pp. 1485-1489, 1999/12/01 1999. [Online]. Available: <http://as.osa.org/abstract.cfm?URI=as-53-12-1485>.
 - [33] D. M. Michael, M. Pavel, T. Michael, W. P. Anthony, E. G. Allen, and R. C. D. Edward, "Kerr-gated time-resolved Raman spectroscopy of equine cortical bone tissue," *Journal of Biomedical Optics*, vol. 10, no. 1, pp. 1-7, 1/1 2005, doi: 10.1117/1.1827605.
 - [34] M. C. Prieto *et al.*, "Use of picosecond Kerr-gated Raman spectroscopy to suppress signals from both surface and deep layers in bladder and prostate tissue," (in eng), *J Biomed Opt*, vol. 10, no. 4, p. 44006, Jul-Aug 2005, doi: 10.1117/1.1991848.
 - [35] F. V. Bright and G. M. Hieftje, "A New Technique for the Elimination of Fluorescence Interference in Raman Spectroscopy," *Applied Spectroscopy*, vol. 40, no. 5, pp. 583-587, 1986/07/01 1986, doi: 10.1366/0003702864508511.
 - [36] F. V. Bright, "Multicomponent suppression of fluorescent interferents using phase-resolved Raman spectroscopy," *Analytical Chemistry*, vol. 60, no. 15, pp. 1622-1623, 1988/08/01 1988, doi: 10.1021/ac00166a027.
 - [37] M. J. Wirth and S. H. Chou, "Comparison of time and frequency domain methods for rejecting fluorescence from Raman spectra," *Analytical Chemistry*, vol. 60, no. 18, pp. 1882-1886, 1988/09/15 1988, doi: 10.1021/ac00169a009.
 - [38] D. V. Martyshkin, R. C. Ahuja, A. Kudriavtsev, and S. B. Mirov, "Effective suppression of fluorescence light in Raman measurements using ultrafast time gated charge coupled device camera," *Review of Scientific Instruments*, vol. 75, no. 3, pp. 630-635, 2004/03/01 2004, doi: 10.1063/1.1646743.

- [39] T. Tahara and H.-O. Hamaguchi, "Picosecond Raman Spectroscopy Using a Streak Camera," *Applied Spectroscopy*, vol. 47, no. 4, pp. 391-398, 1993/04/01 1993. [Online]. Available: <http://as.osa.org/abstract.cfm?URI=as-47-4-391>.
- [40] A. Ehn, M. Levenius, M. Jonsson, M. Aldén, and J. Bood, "Temporal filtering with fast ICCD cameras in Raman studies," *Journal of Raman Spectroscopy*, vol. 44, no. 4, pp. 622-629, 2013/04/01 2013, doi: 10.1002/jrs.4235.
- [41] Z. Meng *et al.*, "Lightweight Raman spectroscope using time-correlated photon-counting detection," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 112, no. 40, p. 12315, 2015, doi: 10.1073/pnas.1516249112.
- [42] F. Acerbi and M. Perenzoni, "High Sensitivity Photodetector for Photon-Counting Applications," in *Photon Counting - Fundamentals and Applications*, 2018.
- [43] A. Bülter, "Single-Photon Counting Detectors for the Visible Range Between 300 and 1,000 nm," 2014, pp. 23-42.
- [44] I. Nissinen *et al.*, "A sub-ns time-gated CMOS single photon avalanche diode detector for Raman spectroscopy," in *2011 Proceedings of the European Solid-State Device Research Conference (ESSDERC)*, 12-16 Sept. 2011 2011, pp. 375-378, doi: 10.1109/ESSDERC.2011.6044156.
- [45] J. Blacksberg, Y. Maruyama, E. Charbon, and G. R. Rossman, "Fast single-photon avalanche diode arrays for laser Raman spectroscopy," *Opt. Lett.*, vol. 36, no. 18, pp. 3672-3674, 2011/09/15 2011, doi: 10.1364/OL.36.003672.
- [46] W. Becker, "Advanced Time-Correlated Single Photon Counting Techniques," *Springer Series in Chemical Physics*, vol. 81, pp. I-387, 01/01 2005, doi: 10.1007/3-540-28882-1_9.
- [47] M. Wahl, "Time-Correlated Single Photon Counting," Technical Note 2014. [Online]. Available: https://www.picoquant.com/images/uploads/page/files/7253/technote_tcspec.pdf.
- [48] C. Zhang, L. Zhang, R. Yang, K. Liang, and D. Han, "Time-Correlated Raman and Fluorescence Spectroscopy Based on a Silicon Photomultiplier and Time-Correlated Single Photon Counting Technique," *Applied Spectroscopy*, vol. 67, no. 2, pp. 136-140, 2013/02/01 2013. [Online]. Available: <http://as.osa.org/abstract.cfm?URI=as-67-2-136>.
- [49] J. Kostamovaara, J. Tenhunen, M. Kögler, I. Nissinen, J. Nissinen, and P. Keränen, "Fluorescence suppression in Raman spectroscopy using a time-gated CMOS SPAD," *Opt. Express*, vol. 21, no. 25, pp. 31632-31645, 2013/12/16 2013, doi: 10.1364/OE.21.031632.
- [50] I. Nissinen, J. Nissinen, P. Keränen, D. Stoppa, and J. Kostamovaara, "A 16×256 SPAD Line Detector With a 50-ps, 3-bit, 256-Channel Time-to-Digital Converter for Raman Spectroscopy," *IEEE Sensors Journal*, vol. 18, no. 9, pp. 3789-3798, 2018.
- [51] J. Kekkonen, M. A. J. Finnilä, J. Heikkilä, V. Anttonen, and I. Nissinen, "Chemical imaging of human teeth by a time-resolved Raman spectrometer based on a CMOS single-photon avalanche diode line sensor," (in eng), *Analyst*, vol. 144, no. 20, pp. 6089-6097, Oct 21 2019, doi: 10.1039/c9an01136f.

- [52] M. Buttafava, G. Boso, A. Ruggeri, A. Dalla Mora, and A. Tosi, "Time-gated single-photon detection module with 110 ps transition time and up to 80 MHz repetition rate," *Review of Scientific Instruments*, vol. 85, no. 8, p. 083114, 2014/08/01 2014, doi: 10.1063/1.4893385.
- [53] "Getting Light into a Monochromator." Newport Corporation. <https://www.newport.com/t/getting-light-into-a-monochromator> (accessed 2020).
- [54] S. Ostovar pour, S. M. Fowler, D. L. Hopkins, P. J. Torley, H. Gill, and E. W. Blanch, "Investigation of chemical composition of meat using spatially off-set Raman spectroscopy," *Analyst*, 10.1039/C8AN01958D vol. 144, no. 8, pp. 2618-2627, 2019, doi: 10.1039/C8AN01958D.
- [55] F. Picot *et al.*, "Data consistency and classification model transferability across biomedical Raman spectroscopy systems," *Translational Biophotonics*, <https://doi.org/10.1002/tbio.202000019> vol. n/a, no. n/a, p. e202000019, 2020/09/27 2020, doi: <https://doi.org/10.1002/tbio.202000019>.
- [56] G. SHEEHY, "DEVELOPMENT OF A SPATIAL OFFSET RAMAN SPECTROSCOPY (SORS) PLATFORM FOR BIOLOGICAL TISSUE INTERROGATION," DÉPARTEMENT DE GÉNIE PHYSIQUE, ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL, 2018.
- [57] I. Nissinen, J. Nissinen, P. Keränen, and J. Kostamovaara, "On the effects of the time gate position and width on the signal-to-noise ratio for detection of Raman spectrum in a time-gated CMOS single-photon avalanche diode based sensor," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 241, pp. 1145-1152, 2017/03/31/ 2017, doi: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.10.021>.
- [58] R. Henderson and K. Schulmeister, *Laser Safety: For Users and Manufacturers of Laser Equipment*. Taylor & Francis, 2008.