



HAL
open science

Imagerie photoacoustique et caractérisation de nanoparticules pour l'étude de la thérapie photothermique

Théotim Lucas

► **To cite this version:**

Théotim Lucas. Imagerie photoacoustique et caractérisation de nanoparticules pour l'étude de la thérapie photothermique. Imagerie médicale. Sorbonne Université, 2023. Français. NNT : 2023SORUS062 . tel-04084954

HAL Id: tel-04084954

<https://theses.hal.science/tel-04084954>

Submitted on 28 Apr 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE DE DOCTORAT DE SORBONNE UNIVERSITÉ

Spécialité

Imagerie biomédicale

ÉCOLE DOCTORALE PIERRE LOUIS DE SANTÉ PUBLIQUE
ÉPIDÉMIOLOGIE ET SCIENCES DE L'INFORMATION BIOMÉDICALE (ED 393)

Présentée et soutenue par :

Théotim LUCAS

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ SORBONNE UNIVERSITÉ

Caractérisation photoacoustique et photothermique de nanoagents de thérapie optiquement absorbants

Soutenue le 20 mars 2023 à Paris, devant le jury composé de :

Mme Lori BRIDAL	Directrice de thèse
Mme Florence GAZEAU	Codirectrice de thèse
M. Jérôme GÂTEAU	Encadrant
M. Emmanuel BOSSY	Rapporteur
M. Damien MERTZ	Rapporteur
Mme Corinne CHANEAC	Présidente du jury
M. Xavier LE GUEVEL	Examineur

Remerciements

Je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont aidé et soutenu tout au long de ma thèse, et sans qui, je n'aurais jamais pu atteindre mes objectifs de recherche et accomplir ce travail important.

Je tiens tout d'abord à remercier Jérôme Gâteau, mon encadrant de thèse, pour sa disponibilité, ses conseils éclairés et sa bienveillance tout au long de ces années. Jérôme a su me guider et me soutenir dans les moments difficiles, et je lui suis très reconnaissant. Je remercie aussi mes directrices de Thèse Florence Gazeau et Lori Bridal pour leurs précieux accompagnements, leurs constants encouragements, leurs remarques éclairées qui m'ont guidée et permis d'avancer.

J'adresse mes sincères remerciements envers Corine Chaenac, Emmanuel Bossy, Damien Mertz et Xavier Le Guevel qui ont été des membres du jury de ma thèse. Leurs remarques et leurs questions ont été d'une grande aide pour moi, et j'ai beaucoup appris de leurs connaissances et de leur expérience.

Je tiens à remercier mes amis proches pour leur soutien indéfectible. Leur présence et leur encouragement m'ont été précieux, et j'ai pu compter sur eux dans les moments difficiles. Merci à Marion et Dada pour m'avoir logé et toujours soutenu et en particulier à Dada pour l'accompagnement durant mes nuits blanches. À Tristan, qui m'écoute me plaindre depuis des années. À Diane et Flo pour leur bonne humeur et les soirées passées ensemble. A Paula pour tout ton soutien. Merci Jean pour ta rigoureuse relecture. Et je tiens à remercier chaleureusement Sam, avec qui j'ai passé le confinement en colocation. Ta compagnie, ta bonne humeur et ton soutien ont rendu cette période difficile beaucoup plus supportable. Merci d'avoir été là avec moi.

Je remercie également l'équipe du LIB et l'équipe de MSC, Sonia et Giulio, pour leur collaboration fructueuse tout au long de ma thèse. Leur expertise et leur contribution ont été essentielles à la réussite de mon travail de recherche. Je tiens à remercier Clément et l'équipe PPM qui ont été des compagnons de vie quotidienne durant ces dernières années. Votre présence, votre soutien et votre amitié ont contribué à rendre mes journées de travail plus agréables. Merci d'avoir partagé ces moments avec moi. Je tiens à exprimer ma gratitude envers Seb, mon (ex)cobureau. Ton soutien, tes conseils, tes cafés laisser beaucoup trop longtemps sur ton bureau et ta présence ont été précieux pour moi tout au long de ma thèse.

Enfin, je voudrais remercier ma famille, en particulier mes parents, ma sœur et la petite famille, pour leur amour et leur soutien sans faille. Leur confiance en moi et leur encouragement m'ont permis de persévérer dans mes recherches, et je leur suis très reconnaissant. Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance envers les Haettel, ma deuxième famille, Véro, Claude, Pitouf, Marie-Anne, Féfé pour leur soutien indéfectible tout au long de ma thèse. Votre accueil chaleureux, votre soutien moral dans les moments difficiles et vos encouragements ont été des éléments essentiels pour moi, et ont contribué à la réussite de ce travail. Votre présence à mes côtés m'a permis de garder le cap et de ne jamais perdre de vue l'objectif final. Merci de tout mon cœur pour votre soutien inestimable.

Merci à toutes ces personnes qui ont été là pour moi tout au long de cette aventure. Votre soutien a été inestimable et je ne pourrais jamais vous remercier assez.

Je dédicace cette thèse à Jocelyne Lambard.

Table des matières

Résumé.....	8
Introduction.....	10
Chapitre 1 : Thérapie photothermique : agents nanoparticulaire, mode d'action, caractérisation <i>in vitro</i> et lien avec l'imagerie photoacoustique.....	16
1.I. Présentation générale de l'imagerie photoacoustique et la thérapie photothermique.....	16
1.II. Les interactions de la lumière et la matière.....	17
1.III. Les Agents Photothermiques (APT).....	22
1.IV. Les APTs pour la thérapie photothermique	26
1.V. Caractérisation photothermique <i>in vitro</i> des APT.....	32
1.VI. L'imagerie photoacoustique.....	45
Chapitre 2 : Spectroscopie Photoacoustique	54
1. Introduction.....	56
2. Materials and Methods	57
2.1. Experimental Setup and Data Acquisition.....	57
2.1.1. Sample Compartment	58
2.1.2. The Conventional PAI System.....	58
2.1.3. Measurement Process.....	58
2.2. Calibrated Measurements with the PA Spectrometer	59
2.2.1. The Photoacoustic Coefficient of a Sample $\vartheta^{PA}(\lambda)$	59
2.2.2. Theoretical Relationship between A^{PA} and $\vartheta^{PA}(\lambda)$	60
2.2.3. Statistical Evaluation	61
2.3.1. Non-Fluorescent and Non-Scattering Molecular Solutions.....	62
2.3.2. Choice of the Calibration Solution.....	63
2.3.3. Commonly Used PA Contrast Agents	64
3. Results	64
3.1. Robustness of the Measurements with the Calibration Solution	64
3.1.1. Measurement Repeatability.....	64
3.1.2. Influence of the Number of Acquisitions for the Evaluation of $A_{calibration}^{PA}(\lambda)$	65
3.1.3. Measurement Protocol for a Series of Samples.....	66
3.2. Characterization of the PA Spectrometer with Non-Fluorescent and Non-Scattering Molecular Solutions.....	66
3.2.1. Linearity of the PA Spectrometer	66
3.2.2. Evolution of $\eta_{sample}/\eta_{calibration}$ with the Concentration and the Temperature for the Different Solutions	67
3.3. Characterization of Conventional Contrast Agents.....	69
3.3.1. Gold Nanorods.....	69

3.3.2. Indocyanine Green	70
4. Discussion	72
5. Conclusions.....	74
Appendix A	75
Appendix B	75
References.....	76
Chapitre 3 : Mise en place et validation de l'instrument de caractérisation quantitatif photothermique à l'aide d'un agent d'étalonnage.	79
3.I. Hyperthermie par excitation optique des solutions in vitro	79
3.II. Etude du coefficient de conversion lumière-chaueur	93
3.III. Résultats	99
3.IV. Conclusion	105
Chapitre 4 : Caractérisation des agents nanoparticulaire.....	107
4.I. Etude d'un nano bâtonnet d'or.....	108
4.II. Etude d'un pré agrégat d'or	112
4.III. Etude d'un « smart » gel	120
4.IV. Etude d'une Suprastructure « complexe ».....	132
4.V. Etude d'armatures organométalliques (MoFs)	138
4.VI. Conclusion	140
Chapitre 5 : Vers l'In Vivo	145
1. Introduction.....	148
2. Materials and Methods	150
2.1. Presentation of the scanning scheme	150
2.2. Spatial sampling of the scan.....	151
2.3. Experimental implementation	152
2.3.1. Experimental set-up	153
2.3.2. Practical implementation of the scanning.....	155
2.3.3. Imaging phantoms.....	156
2.4. Image reconstruction algorithm.....	157
2.5. Characterization of the imaging performance	157
2.5.1. FWHM resolutions.....	157
2.5.2. The cystic resolution (CyR)	158
2.5.3. Image contrast.....	158
3. Results	159
3.1. Influence of the translation range on the imaged volume	159
3.2. The FWHM resolution	160
3.3. The cystic resolution (CyR)	162

3.4. Image contrast.....	164
3.5. Complex 3D phantom.....	165
4. Discussion.....	166
5. Conclusions.....	169
Appendix A.....	170
Appendix B.....	171
References.....	171
Conclusion.....	175
ANNEXES.....	179

Résumé

La photothermie est une thérapie innovante contre le cancer qui consiste à illuminer une zone dans laquelle sont présentes des nanoparticules optiquement absorbantes avec un laser continu afin d'induire une hyperthermie et une réponse physiologique. Cependant, la distribution effective des nanoparticules peut être variable pour chaque patient, ce qui impacte l'efficacité thérapeutique. À ce jour, les seules méthodes permettant l'appréciation de l'accumulation des nanoparticules in vivo sont la tomographie par cohérence optique [1,2] et l'imagerie photoacoustique [3–5]. L'une basée sur la diffusion optique et l'autre sur l'absorption optique. Une approche personnalisée basée sur une imagerie des nanoparticules avant traitement permettrait d'augmenter l'efficacité thérapeutique. Les particules étant optiquement absorbantes, nous proposons dans ce travail de nous intéresser à l'utilisation de l'imagerie photoacoustique afin de caractériser l'accumulation des nanoparticules dans la zone à traiter avec une résolution spatiale de l'ordre du micromètre. L'imagerie photoacoustique est une technique d'imagerie qui se base sur la transformation de l'énergie optique (excitation transitoire) absorbée par des agents de contraste en onde ultrasonore. Au cours de ces travaux de thèse, nous avons étudié les liens entre le signal photoacoustique et l'efficacité photothermique des nanoparticules in vitro, sur des échantillons des nanoparticules en solution, afin de mieux appréhender les capacités de l'imagerie photoacoustique à prédire l'effet thérapeutique de la photothermie in vivo. Tout d'abord (Chapitre 3), nous avons développé un montage expérimental calibré pour mesurer l'augmentation de température de solutions de nanoparticules lors d'une hyperthermie induite optiquement. Ceci permet de comparer les profils d'échauffement des solutions des nanoparticules de même absorbance aux concentrations différentes (entre 0.24mg/ml à 10mg/ml de particules absorbantes). Le montage a été optimisé pour des mesures assez rapides (20 minutes par échantillon) de température en degré Celsius grâce à une caméra thermique et une comparaison simple de la température des différentes solutions normalisées par rapport à une solution de référence : une solution de nigrosine. Ce composé de référence a la caractéristique de transformer toute l'énergie absorbée en chaleur et a une efficacité de conversion thermique de 100%. Cela nous a permis de développer des méthodes de caractérisation d'agent photothermique en nous aidant de la photoacoustique que l'on applique sur des particules simples. Dans un second temps (Chapitre 2), un autre montage calibré de photoacoustique a été développé pour mesurer l'absorption optique des solutions de nanoparticules. Ce montage permet d'obtenir en quelques minutes le spectre d'absorption d'une solution aqueuse de nanoparticules. L'avantage de ce montage est d'une part, d'utiliser une quantité de volume minime (15 μ L) et d'autre part, à partir d'une comparaison entre l'absorption optique et l'augmentation de chaleur produite par illumination optique, d'avoir une estimation de l'absorption optique transformée en chaleur. La spectrométrie UV-VIS, quant à elle, effectue un ratio entre la lumière incidente et la lumière reçue par le capteur et donc fournit une mesure avec une composante d'absorption et de diffusion optique que l'on appelle extinction, et ne tient pas compte du processus de désexcitation qui suit l'absorption. La combinaison de ces deux techniques (augmentation de température et absorption photoacoustique) nous a permis de caractériser (Chapitre 4), par rapport à une référence,

différentes solutions de nanoparticules innovantes comme des préagrégats d'or synthétisé avec du sel d'aluminium, des colloïdosomes de ferrite avec un assemblage interne de nanocristaux en or ou de « smart gel » avec une combinaison de nanoparticules d'or et de la cyanine, un colorant. Cette caractérisation et particulièrement le calcul du coefficient de transformation de lumière en chaleur permettent d'avoir une estimation de la capacité de chauffe et une comparaison entre nanoparticule. Cela est possible, grâce à la caractérisation photoacoustique qui permet de s'affranchir de la diffusion optique. Nous établissons la relation entre l'absorption et l'efficacité de chauffe et qu'il est possible de comparer les nanoparticules sur une même échelle. Enfin (Chapitre 5), nous avons travaillé sur un système tomographique 3D bimodales ultrason et photoacoustique, dans le but de préparer le transfert de l'imagerie photoacoustique pour l'évaluation de la répartition spatiale 3D des nanoparticules vers l'application en tissus tumoraux in vivo chez la souris.

Mots clés : Thérapie photothermique, imagerie photoacoustique, nanoparticules, conversion photothermique

1. Gobin AM, Lee MH, Halas NJ, James WD, Drezek RA, West JL. Near-infrared resonant nanoshells for combined optical imaging and photothermal cancer therapy. *Nano Lett.* 2007;7(7):1929-34.
2. Loo C, Lin A, Hirsch L, Lee MH, Barton J, Halas N, et al. Nanoshell-enabled photonics-based imaging and therapy of cancer. *Technol Cancer Res Treat.* 2004;3(1):33-40.
3. Tucker-Schwartz J, Meyer T, Patil C, Duvall C, Skala M. In vivo photothermal optical coherence tomography of gold nanorod contrast agents. *Biomed Opt Express.* 2012;3(11):2881-95.
4. Huang P, Lin J, Li W, Rong P, Wang Z, Wang S, et al. Biodegradable gold nanovesicles with an ultrastrong plasmonic coupling effect for photoacoustic imaging and photothermal therapy. *Angew Chem.* 2013;125(52):14208-14.
5. Kim S, Chen Y sheng, Luke GP, Emelianov SY. In-vivo ultrasound and photoacoustic image-guided photothermal cancer therapy using silica-coated gold nanorods. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control.* 2014;61(5):891-7.

Introduction

Le traitement du cancer est l'un des défis les plus importants auxquels est confronté le secteur de la santé aujourd'hui. Selon une étude récente de GLOBOCAN [1], en 2020, le nombre de nouveaux patients atteints de cancer dans le monde est d'environ 19 millions, et le nombre de décès a atteint 9,9 millions. La recherche dans ce domaine mène à développer des stratégies de diagnostic plus précises et plus rapides et des méthodes anticancéreuses efficaces [2]. Les traitements traditionnels (chirurgie, chimiothérapie et radiothérapie) sont les méthodes de thérapie les plus couramment utilisées en clinique. Cependant, les patients peuvent présenter un risque élevé d'échec au traitement ou d'effets secondaires pendant ou après le traitement traditionnel [3,4].

Parmi les nouvelles thérapies anticancéreuses, la thérapie photothermique (PTT) utilise la conversion en chaleur de l'énergie lumineuse absorbée par des agents photothermiques (APT) pour provoquer des brûlures thermiques dans la tumeur. La thérapie photothermique présente un grand intérêt pour la recherche en raison de sa simplicité d'utilisation, de la brièveté du traitement et de la rapidité du rétablissement [5,6]. Plus important encore, la PTT est une thérapie pouvant être utilisée pour combattre l'initiation de métastases cancéreuses dans les sites de tumeurs primaires ou les métastases précoces dans les ganglions lymphatiques [7–12]. Il est bien connu que l'objectif ultime du traitement du cancer est de tuer les cellules cancéreuses sans endommager les cellules normales [13–15]. Dans ce contexte, le choix et la caractérisation d'agents photothermiques sont primordiaux pour des effets thérapeutiques efficaces. La photoacoustique (PA) est une technique d'imagerie hybride qui combine les avantages de l'imagerie ultrasonore (US) et de l'optique. Les APT activés par une source de lumière ont une signature optique et peuvent, en théorie, être visualisés à l'aide de cette technique. La PA utilise une source lumineuse impulsionnelle pour exciter des objets absorbants, ce qui entraîne une absorption d'énergie et la génération d'ondes acoustiques enregistrables par une sonde US. La PA est donc sensible à l'absorption et la conversion de l'énergie lumineuse en chaleur par les agents, mais sur des temps d'illumination plus courts que la photothermie entraînant l'émission d'ondes ultrasonores plutôt que l'échauffement global du tissu. L'utilisation de cette technique d'imagerie pourrait permettre de s'assurer d'une bonne réponse de la thérapie et d'obtenir une thérapie ciblée tout en réduisant les effets secondaires sur les tissus sains environnants. En somme, l'utilisation de nanoparticules bimodales avec une application en thérapie PTT et en imagerie PA pourrait permettre de suivre de manière précise les nanoparticules dans les tumeurs, leur répartition spatiale, leur efficacité photothermique, d'optimiser la planification de la thérapie et d'obtenir des informations sur l'état de la tumeur, ce qui améliore l'efficacité de la thérapie. La caractérisation de ces nanoparticules et le choix des agents photothermiques sont cruciaux pour des résultats thérapeutiques efficaces.

Notre travail s'est focalisé sur une étude du lien entre l'imagerie photoacoustique et l'hyperthermie par illumination laser pour des agents APT en solution aqueuse. Pour améliorer la caractérisation des agents, nous avons détaillé les théories thermodynamiques et optiques des deux modalités et fait le lien entre elles. Dans un second temps, nous avons mis au point un outil de spectroscopie photoacoustique quantitative basé sur l'imagerie photoacoustique

à de multiples longueurs d'onde d'un petit volume de solution pour la caractérisation de futurs agents (PA ou PTT). De même, nous avons développé un montage de photothermie pour l'étude de l'élévation de température des solutions soumises à des illuminations continues en solution ou sur des cellules/tissus in vitro.

Le premier chapitre constitue un état de l'art et regroupe les notions utiles pour comprendre le travail fourni durant cette thèse. Nous traitons en particulier de la thérapie photothermique utilisant des nanoparticules comme agents, de son mode d'action, de la caractérisation in vitro des agents et du lien entre les propriétés photothermiques de ces agents et de leur utilisation en imagerie photoacoustique. Il décrit les interactions de la lumière avec la matière, les propriétés optiques des agents photothermiques (APT), leur utilisation pour cibler les tumeurs et leur caractérisation pour la thérapie photothermique. Le chapitre aborde enfin les principes de base de l'imagerie photoacoustique et son utilisation pour mesurer l'absorption des APT.

Le second chapitre aborde le développement d'un dispositif expérimental de spectroscopie photoacoustique. Nous présentons une méthode pour réaliser une spectrométrie photoacoustique calibrée dans la plage de longueur d'onde de 680 à 970 nm avec un scanner d'imagerie photoacoustique (PAI) couramment utilisé. Le système résultant permet de quantifier les spectres PA en unités du Système international d'unités (SI), ce qui permet une comparaison entre échantillons. En outre, nous l'utilisons pour relier l'imagerie photoacoustique à la photothermie, en particulier à l'efficacité photothermique.

Dans le chapitre 3, nous décrivons, tout d'abord, la mise en place et la validation d'instruments de caractérisation photothermique quantitatifs en utilisant un agent d'étalonnage. Cette partie traite de l'hyperthermie par excitation optique continue de solutions in vitro, en décrivant et en validant un dispositif expérimental de mesure de la température macroscopique de la solution. Il étudie également le coefficient de conversion lumière-chaaleur, en utilisant la théorie de l'efficacité thermique décrite dans le chapitre 1 et en examinant des nanoparticules simples et déjà caractérisées par ailleurs.

Le chapitre 4 décrit l'application des méthodes de caractérisation photothermique et photoacoustique à des agents nanoparticulaires nouveaux et n'ayant pas été caractérisés par ailleurs. Il décrit les différentes études menées sur des nanoparticules telles que des préagrégats de nanosphères d'or, un "smart " microgel sensible à la température et au pH incluant des nanosphères d'or et un colorant, des colloidosomes hybrides incorporant une coque de nanoparticules de ferrite et un cœur de nanoparticules d'or et enfin une suprastructure complexe de type metal organic framework (MOF) encapsulant un colorant organique. Nous nous efforçons enfin à faire, ainsi qu'une étude comparative des différents agents utilisés. Les études incluent des analyses spectroscopiques UV-visible et photoacoustiques, ainsi que des études photothermiques.

Dans le chapitre 5, nous présentons un dispositif d'imagerie 3D à ultrasons basé sur un concept de balayage de translation-rotation. Ce dispositif a été conçu pour une utilisation in vivo et peut être adapté pour une bimodalité ultrason/photoacoustique. Le dispositif laser n'étant pas disponible lors de la conception et la réalisation de ces travaux, le concept est présenté uniquement en imagerie ultrasonore. L'utilisation de ce type de dispositif en bimodalité permet non seulement d'augmenter la résolution ou l'angle d'ouverture par rapport aux dispositifs 3D déjà existants, mais pourrait également permettre en parallèle de

suivre les nanoparticules utilisées en photothermie pour améliorer l'efficacité thérapeutique (PA), mais aussi de visualiser anatomiquement la tumeur (US).

Cette thèse est déroulée en cotutelle entre le laboratoire d'imagerie biomédicale (LIB) dans l'équipe IT2D qui développe des techniques d'imagerie biomédicale dans la lutte contre le cancer et le laboratoire de matière système complexe (MSC) qui est spécialisé dans les nanomatériaux et la manipulation cellulaire. Cette thèse a permis d'apporter des expertises sur l'imagerie PA qui est une technique innovante au sein de l'équipe IT2D (Lib) pour l'amélioration de la thérapie photothermique et l'utilisation de particules novatrices (MSC). Ces particules ont été synthétisées et développées par plusieurs équipes différentes comme l'équipe de Claire Mangeney qui étudie la conception d'outils nanométriques servant d'interfaces pour sonder les systèmes biologiques, à différentes échelles, l'équipe de Florent Carn travaillant sur des autoassemblages avec des polymères, l'équipe Marie-Paule Pileni qui étudie les suprastructures ou l'équipe de Florence Gazeau dont je fais partie. J'ai pu durant cette thèse participer à différentes réunions sur le thème de l'utilisation des nanoparticules au sens large et mener plusieurs collaborations qui seront détaillées dans ce manuscrit. En parallèle, nous avons pu développer et améliorer la technologie PA au sein du laboratoire d'Imagerie biomédicale.

Bibliographies:

- [1] Cancer (IARC) TIA for R on. Global Cancer Observatory n.d. <https://gco.iarc.fr/> (accessed October 16, 2022).
- [2] Farran B, Montenegro RC, Kasa P, Pavitra E, Huh YS, Han Y-K, et al. Folate-conjugated nanovehicles: Strategies for cancer therapy. *Mater Sci Eng C* 2020;107:110341. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110341>.
- [3] Chen S-X, Ma M, Xue F, Shen S, Chen Q, Kuang Y, et al. Construction of microneedle-assisted co-delivery platform and its combining photodynamic/immunotherapy. *J Controlled Release* 2020;324:218–27. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.05.006>.
- [4] Wang H, Revia R, Wang K, Kant RJ, Mu Q, Gai Z, et al. Paramagnetic Properties of Metal-Free Boron-Doped Graphene Quantum Dots and Their Application for Safe Magnetic Resonance Imaging. *Adv Mater* 2017;29:1605416. <https://doi.org/10.1002/adma.201605416>.
- [5] Liu Y, Crawford BM, Vo-Dinh T. Gold nanoparticles-mediated photothermal therapy and immunotherapy. *Immunotherapy* 2018;10:1175–88.
- [6] Moon HK, Lee SH, Choi HC. *In Vivo* Near-Infrared Mediated Tumor Destruction by Photothermal Effect of Carbon Nanotubes. *ACS Nano* 2009;3:3707–13. <https://doi.org/10.1021/nn900904h>.
- [7] Guo C, Yu H, Feng B, Gao W, Yan M, Zhang Z, et al. Highly efficient ablation of metastatic breast cancer using ammonium-tungsten-bronze nanocube as a novel 1064 nm-laser-driven photothermal agent. *Biomaterials* 2015;52:407–16.
- [8] Liang C, Song X, Chen Q, Liu T, Song G, Peng R, et al. Magnetic field-enhanced photothermal ablation of tumor sentinel lymph nodes to inhibit cancer metastasis. *Small* 2015;11:4856–63.
- [9] Lin Z, Liu Y, Ma X, Hu S, Zhang J, Wu Q, et al. Photothermal ablation of bone metastasis of breast cancer using PEGylated multi-walled carbon nanotubes. *Sci Rep* 2015;5:1–10.
- [10] Okuno T, Kato S, Hatakeyama Y, Okajima J, Maruyama S, Sakamoto M, et al. Photothermal therapy of tumors in lymph nodes using gold nanorods and near-infrared laser light. *J Controlled Release* 2013;172:879–84.
- [11] He X, Bao X, Cao H, Zhang Z, Yin Q, Gu W, et al. Tumor-Penetrating Nanotherapeutics Loading a Near-Infrared Probe Inhibit Growth and Metastasis of Breast Cancer. *Adv Funct Mater* 2015;25:2831–9.
- [12] He X, Bao X, Cao H, Zhang Z, Yin Q, Gu W, et al. Tumor-Penetrating Nanotherapeutics Loading a Near-Infrared Probe Inhibit Growth and Metastasis of Breast Cancer. *Adv Funct Mater* 2015;25:2831–9.

- [13] Kim J-W, Galanzha EI, Shashkov EV, Moon H-M, Zharov VP. Golden carbon nanotubes as multimodal photoacoustic and photothermal high-contrast molecular agents. *Nat Nanotechnol* 2009;4:688–94.
- [14] Li J, Xiao H, Yoon SJ, Liu C, Matsuura D, Tai W, et al. Functional Photoacoustic Imaging of Gastric Acid Secretion Using pH-Responsive Polyaniline Nanoprobes. *Small* 2016;12:4690–6.
- [15] Liu T, Zhang M, Liu W, Zeng X, Song X, Yang X, et al. Metal Ion/Tannic Acid Assembly as a Versatile Photothermal Platform in Engineering Multimodal Nanotheranostics for Advanced Applications. *ACS Nano* 2018;12:3917–27.
<https://doi.org/10.1021/acsnano.8b01456>.

Chapitre 1 : Thérapie photothermique : agents nanoparticulaire, mode d'action, caractérisation *in vitro* et lien avec l'imagerie photoacoustique

Dans ce chapitre, nous allons d'abord considérer les différents phénomènes liés à l'interaction de la lumière avec les agents photothermiques (APTs) et en particulier l'absorption optique. Ensuite, nous nous intéresserons aux agents chimiques utilisés dans les techniques de photothermie qui est une thérapie basée sur la transformation de l'énergie optique en énergie thermique et de l'imagerie photoacoustique. Nous présenterons les agents chimiques inorganiques de manière générale, et nous mettrons en avant la nigrosine, un colorant organique utilisé dans nos travaux en raison de sa forte absorption de lumière et de sa double efficacité photoacoustique et photothermique. Nous évoquerons également le suivi des APT et de leur ciblage passif dans les tumeurs, grâce à l'utilisation de la photoacoustique. Ensuite, nous étudierons les théories physiques qui sont à la base de ces deux techniques. Nous détaillerons notamment les équations de la thermodynamique pour l'hyperthermie par radiation optique et les équations de la photoacoustique, qui permettent de comprendre comment l'énergie lumineuse est convertie en chaleur ou en ondes sonores respectivement, et comment cette énergie peut être utilisée pour des applications pratiques. Nous donnerons quelques exemples des différentes applications de la photothermie et de la photoacoustique dans divers domaines de la science et de la médecine.

1.1. Présentation générale de l'imagerie photoacoustique et la thérapie photothermique

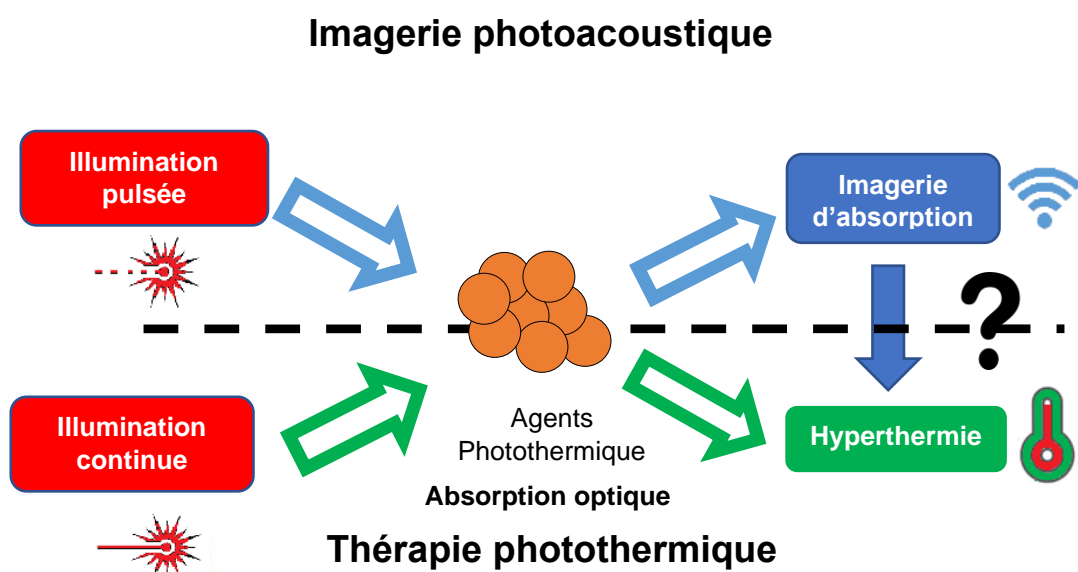


Figure 1.1. Schéma simplifié de la comparaison entre l'imagerie photoacoustique et la thérapie photothermique.

La thérapie photothermique (PTT) est une thérapie émergente pour le traitement du cancer qui utilise des agents photothermiques (APTs) pour convertir l'énergie lumineuse en chaleur. Elle se fait en utilisant un laser continu (comme montré dans la Figure 1.1) pour augmenter la température du milieu environnant et provoquer la mort des cellules qui contiennent les APTs, notamment les cellules cancéreuses [1,2]. La PTT offre certains avantages par rapport à d'autres thérapies, tels que le fait que la thérapie ne soit pas invasive ou la capacité à régler la puissance d'irradiation laser ce qui permet de cibler précisément les tumeurs de manière à minimiser les dommages causés aux tissus sains environnants [3]. Cependant, pour que la PTT soit efficace, il est nécessaire d'utiliser des APTs qui s'accumulent de manière spécifique dans les tumeurs. Il existe, en particulier, les nano APTs qui peuvent s'accumuler dans les tumeurs grâce à une perméabilité et une rétention accrues (effet EPR) et un ciblage passif[4–7] ou bien qui sont directement injectés dans des tumeurs solides accessibles, mais non résécables en l'état. Les APTs idéaux doivent avoir une efficacité de conversion photothermique élevée, une absorption dans une gamme de longueurs d'excitation qui ne se superpose pas à celle des tissus biologiques environnants, une bonne accumulation dans les tumeurs et un ciblage efficace des cellules tumorales. Cependant, il existe encore des problèmes qui limitent l'efficacité des PTT, telle que la profondeur limitée de pénétration de la lumière, qui peut conduire à une ablation incomplète des tumeurs en dehors du champ d'irradiation. De plus, l'efficacité faible de la PTT dans les tumeurs ou au contraire une possible surchauffe des zones tumorales causant des dommages inutiles aux tissus normaux adjacents, et le développement d'une résistance aux PTT en raison de la surexpression des protéines de choc thermique dans certains cancers sont des obstacles importants à surmonter [8]. Il s'avère donc intéressant de se pencher sur la caractérisation de l'élévation de température pour comprendre et maîtriser les enjeux thérapeutiques de la photothermie. En parallèle, l'imagerie photoacoustique (PAI) est une technique qui utilise, quant à elle, une illumination pulsée pour générer des ondes ultrasonores. Cette technique permet d'avoir une imagerie de l'absorption optique, ce qui permet d'obtenir les informations optiques des APTs. Dans la plupart des cas, les APTs peuvent être utilisés simultanément pour la PTT et la PAI, et les deux modalités pourraient donc être utilisées de manière complémentaire avec les mêmes agents pour guider la thérapie par imagerie.

1.II. Les interactions de la lumière et la matière

Quand on illumine un objet par une source lumineuse, plusieurs interactions rayonnement-matière se produisent. L'énergie de ce rayonnement électromagnétique peut être absorbée, redistribuée spatialement dans toutes les directions (diffusion optique ou scattering) ou transmise. Le coefficient d'extinction caractérise l'ensemble des phénomènes d'absorption et de diffusion.

1.II.A. Diffusion optique ou scattering

La diffusion optique est un phénomène où le rayonnement lumineux est dévié dans de multiples directions. Lorsque le rayon retourne dans la direction d'où elle vient, on appelle cela la rétrodiffusion. La théorie générale de la diffusion de la lumière par une particule sphérique a été décrite par la théorie de Mie [9,10]. Pour des particules absorbantes très petites (rayon \ll longueur d'onde), on peut souvent considérer que l'effet de l'absorption sur la perte d'intensité de l'onde est plus important que celui de la diffusion. La diffusion devient plus importante que l'absorption lorsque la circonférence de la particule est comparable à la longueur d'onde de la lumière. Par exemple, pour des sphères d'or dans l'eau analysées par une lumière laser de 532 nm, l'absorption est plus importante que la diffusion pour des diamètres inférieurs à 100 nm.

1.II.B. Absorption optique d'une solution moléculaire

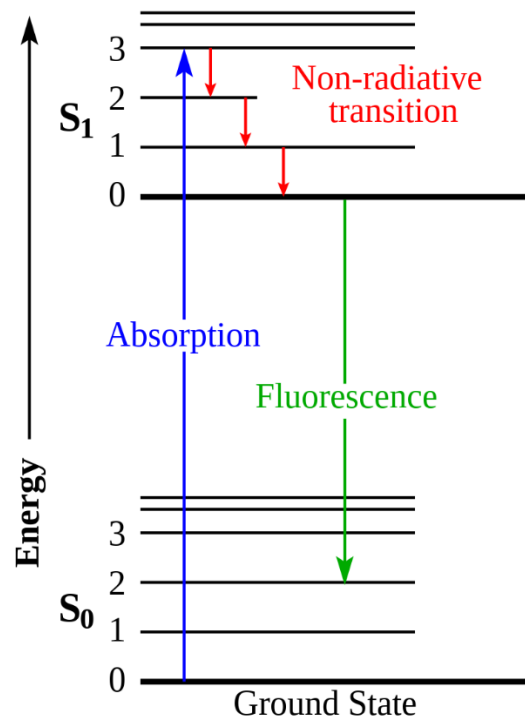


Figure 1.2. Diagrammes de Jablonski.

L'absorption optique est un phénomène physique où l'énergie de la lumière incidente est transformée en une autre forme d'énergie. Pour une molécule, cela représente une absorption de l'énergie d'un photon via une transition électronique. Le diagramme de Jablonski, présenté sur la Figure 1.2, est un outil graphique utilisé pour représenter les états électroniques et les transitions entre ces états qui se produisent lorsqu'un atome ou une molécule absorbe de la lumière. Il permet de visualiser les différents états énergétiques possibles pour un système et comment l'énergie peut être transférée entre ces états. Le diagramme de Jablonski est divisé en deux parties : l'état fondamental (ground state) et les

états excités. L'état fondamental est l'état d'énergie le plus stable d'un système, tandis que les états excités sont des états d'énergie supérieurs auxquels le système peut accéder lorsqu'il absorbe de l'énergie, par exemple sous forme de lumière. Lorsqu'un système absorbe de la lumière, un électron peut être excité à partir de l'état fondamental à un état excité supérieur. Cette transition est représentée par une flèche verticale orientée vers le haut sur le diagramme de Jablonski. L'électron peut également se désexciter vers l'état fondamental en émettant de la lumière, ce qui est représenté par une flèche verticale orientée vers le bas sur le diagramme. L'énergie de la lumière émise peut être utilisée pour exciter d'autres systèmes ou être perdue sous forme de chaleur. Le diagramme de Jablonski permet de comprendre comment l'énergie peut être transférée entre différents états énergétiques d'un système et comment cette énergie peut être utilisée ou perdue. Il peut donc y avoir plusieurs phénomènes tels que :

- L'absorption est un processus physique dans lequel un atome, une molécule ou un autre système peut accéder à des états électroniques supérieurs ou excités. L'absorption est généralement caractérisée par un coefficient d'absorption, qui mesure la capacité d'un système à absorber de l'énergie. Le coefficient d'absorption est généralement exprimé en cm^{-1} et dépend de la longueur d'onde de l'énergie absorbée. L'absorption est utilisée dans de nombreuses applications, notamment dans la détection et la quantification de substances chimiques et dans la caractérisation de matériaux. Elle est également étudiée en spectroscopie, c'est-à-dire la manière dont les atomes et les molécules absorbent et émettent de la lumière lorsqu'ils sont excités à différentes longueurs d'onde.

- La transition non radiative est une transition électronique dans laquelle l'électron passe d'un état excité à un état inférieur sans émettre de photon de lumière. Cela peut se produire lorsque l'électron se désexcite par collision avec un autre atome ou une molécule, ou lorsqu'il perd son énergie sous forme de chaleur. La transition non radiative est opposée à la transition radiative, qui est une transition électronique dans laquelle l'électron se désexcite en émettant un photon de lumière. La transition non radiative est souvent considérée comme étant moins efficace que la transition radiative, car elle permet de convertir moins efficacement l'énergie absorbée en énergie utilisable. Cependant, elle peut être utile dans certaines applications, par exemple pour la production de chaleur ou pour l'excitation de certains états électroniques qui ne peuvent pas être atteints par la transition radiative. C'est cette transition qui va nous intéresser en imagerie photoacoustique et dans la thérapie photothermique.

- La fluorescence est un phénomène physique qui émet de la lumière de longueur d'onde différente lorsqu'il se désexcite à un état inférieur d'énergie. La fluorescence est une forme de luminescence qui se distingue de l'émission continue de lumière, comme cela se produit dans les lampes à incandescence. Pour qu'un atome ou une molécule puisse être fluorescent, il doit posséder un état excité stable dans lequel l'électron peut être excité pendant un certain temps avant de se désexciter en émettant de la lumière. La lumière émise lors de la fluorescence a généralement une longueur d'onde plus grande que la lumière absorbée. La fluorescence est utilisée dans de nombreuses applications, notamment dans la détection et la quantification de substances chimiques, dans la microscopie, dans l'étude de la structure des molécules.

1.II.C. Interactions optiques avec des particules plasmoniques

Une particule plasmonique ou une nanoparticule métallique est composée d'un nombre réduit d'atomes et peut être considérée comme un objet intermédiaire entre l'atome individuel et le matériau massif. À cette échelle, le volume de la nanoparticule est réduit et les effets des électrons de surface deviennent très importants, et pour cette raison, les propriétés optiques des petites nanoparticules métalliques sont dominées par l'oscillation collective des électrons de conduction [11,12]. Une bande d'absorption apparaît lorsque la fréquence du photon incident entre en résonance avec l'oscillation collective des électrons de la bande de conduction ; elle est connue sous le nom de résonance plasmonique de surface (SPR) [13]. La fréquence de résonance de ce SPR dépend fortement de la taille, de la forme, des interactions interparticulaires, des propriétés diélectriques et de l'environnement local de la nanoparticule [14–17]. La bande d'absorption d'une particule plasmonique est donc modifiable et peut être déplacée dans des gammes de longueurs d'onde compatibles avec l'utilisation de la PTT et de la PAI dans les tissus biologiques (domaine du proche infrarouge par exemple).

De plus, lorsque des nanoparticules plasmoniques sont placées à proximité les unes des autres, l'effet de couplage interparticulaire devient très important et de nouvelles propriétés optiques peuvent apparaître. C'est ce que l'on nomme le couplage plasmonique [18,19]. En principe, les séparations interparticulaires, la taille des particules et la stœchiométrie des particules peuvent être manipulées individuellement pour produire des agrégats et donc permettraient de contrôler les propriétés optiques. Cependant, l'accumulation des nanoparticules dans les tumeurs grâce à un phénomène de perméabilité et une rétention (EPR) ne permet pas d'obtenir une agrégation contrôlée d'où l'intérêt d'essayer de favoriser le couplage plasmonique en amont par la synthèse chimique d'autoassemblages de nanoparticules.

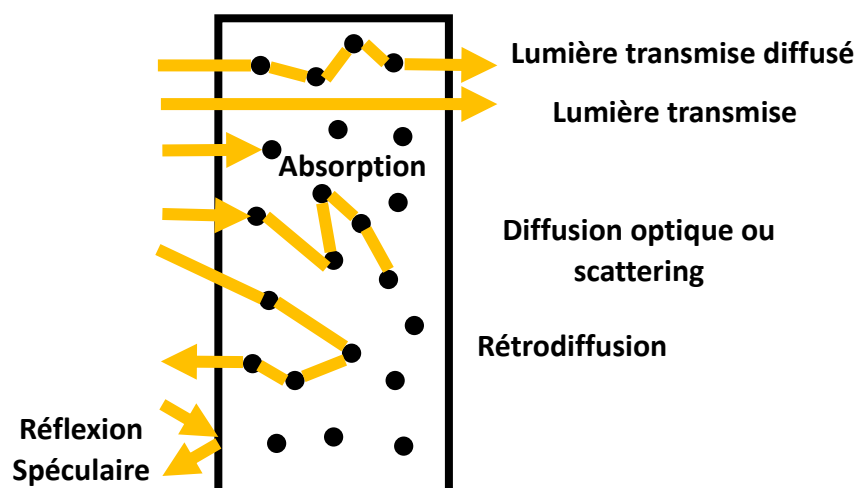


Figure 1.3. Schéma des différents modes d'interactions rayonnement-matière.

Ces phénomènes d'interaction sont quantifiables grâce à différentes grandeurs mathématiques, nous décrivons quelques exemples ci-après.

1.II.D. Le coefficient d'atténuation ou le coefficient d'extinction

Le coefficient d'extinction ou d'atténuation μ^{att} est la quantité qui mesure la décroissance exponentielle de l'intensité optique à la traversée d'une épaisseur d'une solution, c'est-à-dire la valeur de la perte de l'intensité d'origine par une unité (par exemple un mètre) d'épaisseur de matériau. Ce coefficient est mesuré à une seule longueur d'onde optique. En faisant varier la longueur d'onde, on obtient un spectre d'extinction. Ce spectre d'extinction, ou d'atténuation, est mesuré généralement avec un spectromètre UV-Visible. Ce facteur d'extinction a alors une composante liée à l'absorption et une autre composante liée à la diffusion optique.

1.II.E. Le coefficient de transmission, d'absorption et de diffusion

La transmission optique est la portion de lumière qui va « traverser » l'objet. On parle généralement de transmittance totale d'un système qui est définie comme le rapport entre l'intensité du rayonnement transmis et l'intensité incidente.

$$T(\lambda) = \frac{I_t(\lambda)}{I_0(\lambda)} \quad (1.1)$$

Avec I_0 l'intensité énergétique incidente et I_t l'intensité énergétique transmise à une même longueur d'onde λ .

L'absorbance optique ou densité optique est une grandeur sans unité qui correspond à la quantité de lumière absorbée par une solution à une longueur d'onde donnée. Elle peut s'écrire comme le logarithme décimal du rapport entre I_0 et I_t , tel que :

$$Abs(\lambda) = \log_{10} \frac{I_0(\lambda)}{I_t(\lambda)} = -\log_{10} T(\lambda) \quad (1.2)$$

On définit le coefficient d'atténuation μ^{att} , exprimé en mm^{-1} ou cm^{-1} , par :

$$Abs(\lambda) = \frac{\mu^{att}(\lambda)}{\ln(10)} \cdot L = \mu_{10}^{att}(\lambda) \cdot L \quad (1.3)$$

On note μ_{10}^{att} Le coefficient d'atténuation décadique. Abs l'absorbance et L l'épaisseur de matériaux traversée soit la longueur de la cuvette lors de la mesure avec un spectromètre UV-Vis. Dans un spectromètre UV-Visible, les cuvettes ont généralement une épaisseur de 1 cm. Le coefficient d'atténuation contient les contributions de diffusion et d'absorption. Il peut s'exprimer comme la somme du coefficient d'absorption μ_a et du coefficient de diffusion μ_s .

$$\mu^{att}(\lambda) = \mu_a(\lambda) + \mu_s(\lambda) \quad (1.4)$$

En spectrométrie photoacoustique, la grandeur mesurée est le coefficient d'absorption optique $\mu_a(\lambda)$. Pour une solution non diffusante optiquement, on considère que le coefficient d'absorption est égal au coefficient d'atténuation μ^{att} . Le coefficient de diffusion est une mesure de la capacité des particules à diffuser les photons d'un faisceau lumineux. Ce paramètre μ_s est exprimé, à l'image du coefficient d'absorption, par un nombre proportionnel à la quantité de photons, ici diffusés, par unité de longueur.

L'absorption a une composante d'énergie radiative et non radiative. On note le produit $\mu_a(\lambda) \cdot E_{pt}$ la composante de la lumière absorbée qui devient de l'énergie non radiative. E_{pt} est le coefficient d'efficacité de la transmission non radiative.

Le coefficient d'absorption molaire est une mesure de l'absorption d'une substance par unité de concentration (par mole). Il est généralement exprimé en $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ et est utilisé pour mesurer l'absorption d'une substance en solution.

La loi de Beer-Lambert est une loi de la physique qui décrit l'absorption de la lumière par une substance en fonction de sa concentration en solution et de la longueur d'onde de la lumière incidente. Elle est souvent utilisée pour mesurer la quantité de substance présente dans une solution en mesurant l'absorption de la lumière par la solution. Selon la loi de Beer-Lambert, l'absorption de la lumière par une solution est proportionnelle à la concentration de la substance dans la solution et à la longueur d'onde de la lumière utilisée. La loi de Beer-Lambert est généralement exprimée sous la forme suivante :

$$A = \varepsilon \cdot L \cdot c \quad (1.5)$$

Où :

A est l'absorption de la lumière par la substance (mesurée en absorbance)

ε est le coefficient d'absorption molaire de la substance (mesuré en $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$)

L est la longueur du chemin parcouru par la lumière dans la substance (mesurée en cm)

c est la concentration molaire de la substance dans la solution (mesurée en $mol \cdot L^{-1}$)

Ainsi, le coefficient d'absorption molaire (ε) peut être utilisé dans la loi de Beer-Lambert pour mesurer la concentration de la substance dans une solution à partir de l'absorption de la lumière par la solution. Le coefficient d'atténuation décadique (μ_{10}^{att}) peut être utilisé pour déterminer le coefficient d'absorption molaire (ε) en mesurant l'absorption de la substance à différentes longueurs d'onde et en combinant les deux Équations (1.3) et (1.5).

1.III. Les Agents Photothermiques (APT)

1.III.A. Présentation générale des agents Photothermiques

La photothermie laser est une technique qui utilise des lasers pour chauffer localement des tissus biologiques, ce qui peut être utilisé dans le traitement de différentes maladies. La photothermie laser peut-être améliorée en utilisant des nanoparticules qui absorbent de manière sélective la lumière laser et qui peuvent être ciblées vers les tissus à traiter. Plusieurs types de nanoparticules peuvent être utilisés dans la photothermie laser, notamment :

- Les nanoparticules métalliques : ces nanoparticules peuvent être fabriquées à partir de différents métaux, tels que l'or, l'argent, le cuivre, etc.
- Les nanoparticules d'alliages métalliques : ces nanoparticules sont fabriquées à partir d'alliages, tels que l'or-argent, l'or-cuivre, etc.
- Les nanoparticules de semiconducteurs : ces nanoparticules sont fabriquées à partir de semiconducteurs, tels que l'oxyde de zinc, le dioxyde de titane, etc.
- Les colorants (ou dyes) sous forme moléculaire ou encapsulée dans des nanoparticules peuvent absorber efficacement la lumière. C'est le cas de l'indocyanine verte qui a un pic d'absorption vers 800 nm.

Parmi ces nanoparticules, on distingue les nanoparticules de métaux, en particulier les nanoparticules d'or, notée par la suite AuNP. En utilisant des nanoparticules d'or dans la photothermie laser, on peut améliorer l'efficacité de la PTT en augmentant la sélectivité de l'absorption de la lumière laser et en ciblant les cellules cibles de manière précise. On présente dans le Tableau 1.1. quelques exemples de nanoparticules d'or. Ces différentes géométries peuvent parfois être étendues à différents matériaux.






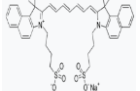
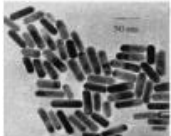
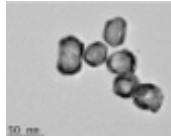
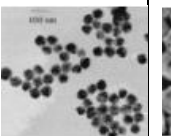
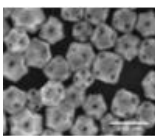

	Nanobatônnets	Nano coques	Nano sphères	Nanocages	Nano étoiles	Vert d'Indocyanine (colorant)
Structure						
Imagerie TEM						
Tailles de NPs	~40-100 nm en longueur avec un rapport longueur/diamètre ~2-4	~100-150 nm de diamètre	~5 nm-100 nm de diamètre	~40-60 nm	~30-100 nm	Moléculaire
Avantages	Deux bandes de résonance Plasmon de surface	Structure noyau et coque	Synthèse simple	Capacité d'encapsulation	Grande surface	Propriété d'absorption et de fluorescence connue

Tableau 1.1. Les types les plus courants de nanoparticules d'or pour une application potentielle de thérapie photothermique et un exemple de colorant (Nanosphères, Nano Shells, Nano batônnets, Nanocages, Nanoétoiles et vert d'indocyanine)[22–24].

Il est important de sélectionner les nanoparticules appropriées et de prendre en compte leur stabilité, leur toxicité éventuelle, leur devenir dans le milieu biologique et leur mode d'administration. Un autre aspect est la facilité de synthèse et la capacité à produire de grosses quantités (mise à l'échelle) pour les applications.

1.III.B. Propriétés optiques des APT (Agent Photothermique)

Ces nanoparticules peuvent être utilisées pour absorber de manière sélective la lumière laser aux différentes longueurs d'onde, en fonction de leur composition chimique et de leur structure. La sélection de la nanoparticule appropriée pour une application de PTT dépend de nombreux facteurs, tels que la longueur d'onde de la lumière laser utilisée, la profondeur de pénétration souhaitée dans les tissus biologiques, la toxicologie, etc.

L'utilisation de nanoparticules en photothermie laser permet de concentrer l'absorption de la lumière laser et de chauffer localement les tissus biologiques, ce qui peut être très utile pour le traitement de différentes maladies. L'absorption optique de nanoparticules est une caractéristique majeure pour la thérapie. Cela va déterminer la quantité de chaleur transférée par l'illumination du laser au milieu environnant, ce qui va avoir un impact direct sur l'hyperthermie obtenue et sur les dommages tissulaires.

Il est important de noter que l'absorption optique des nanoparticules est impactée par les propriétés physico-chimiques des nanoparticules utilisées et notamment la charge de surface, la taille, la forme ou la structure [25]. Par exemple, en modifiant la composition chimique des nanoparticules, on peut déplacer le pic d'absorption vers des longueurs d'onde plus courtes ou plus longues.

En photothermie, il est important de bien comprendre et de maîtriser l'absorption des nanoparticules dans la fenêtre optique illustrée sur le graphique de la Figure 1.4, car cela permet d'optimiser l'utilisation des APTs. En effet, ce graphique résume les absorptions optiques des différents éléments endogènes constituant les tissus biologiques et montre l'intervalle de longueur d'onde où les tissus biologiques absorbent le moins. Ainsi en s'assurant que les nanoparticules absorbent le plus possible de lumière dans la gamme de longueurs d'onde incidentes appropriée, on peut obtenir un maximum de chaleur et une meilleure efficacité de la photothermie.

En parallèle, pour être efficace en imagerie photoacoustique et en thérapie photothermique, un agent de contraste doit posséder des propriétés photophysiques telles qu'un faible rendement de fluorescence (rendement quantique), un coefficient d'extinction molaire élevé, un pic d'absorption dans le proche infrarouge (NIR) et une excellente photostabilité, ainsi qu'une biocompatibilité élevée, une faible toxicité et immunogénicité, une affinité et une spécificité élevée pour la cible [26].

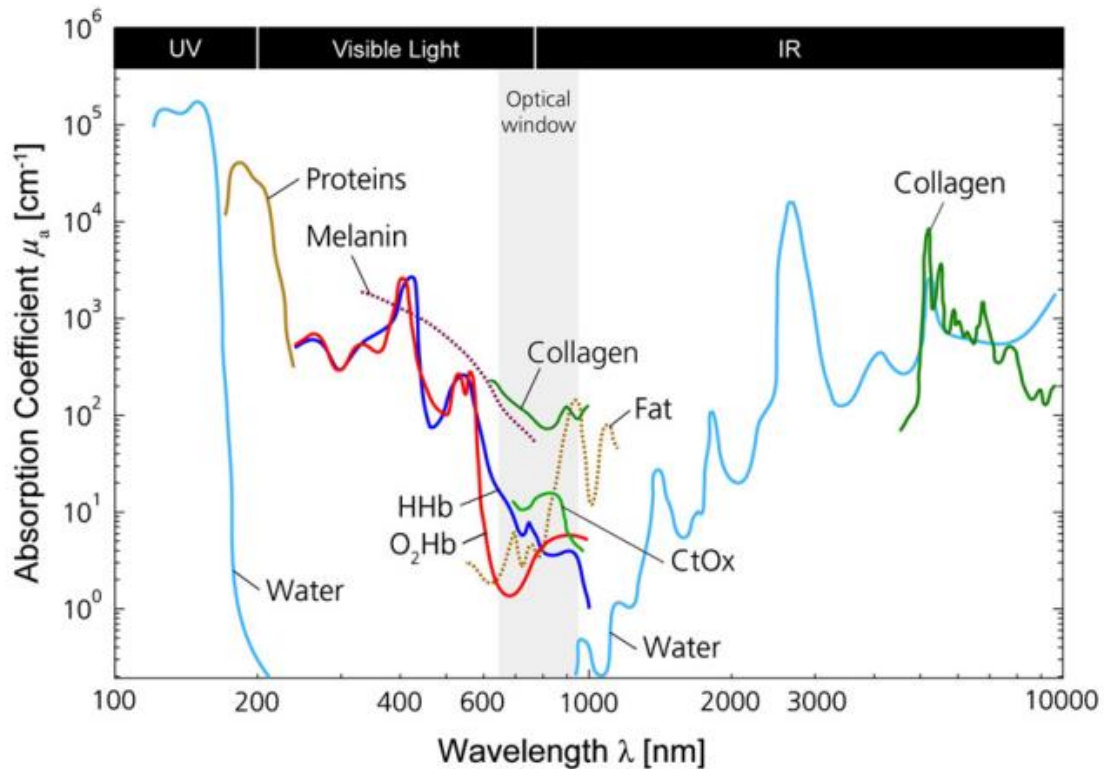


Figure 1.4. Graphique montrant les différents composants des tissus biologiques et leur absorption ainsi que la première fenêtre de transparence des tissus en jaune (issu de [27]).

1.III.C. Notre agent moléculaire de référence : la nigrosine

Dans ces travaux de thèse à la fois pour la photoacoustique et pour la photothermie nous utiliserons un composé moléculaire que l'on considère comme notre composé de référence : la nigrosine. Sa qualité d'agent de référence tient au fait qu'il est fortement absorbant, non fluorescent et soluble dans l'eau.

La nigrosine (Nigrosine, 198285, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) est un colorant non fluorescent qui a un pic d'absorption qui se trouve autour de 570 nm et est photostable sous illumination infrarouge. Cela signifie que la nigrosine ne subit pas de changements significatifs de couleur ou de propriété optique lorsqu'elle est exposée à la lumière laser ce qui en fait un choix de colorant très intéressant pour la PTT ou la PA. La nigrosine est un mélange de colorants organiques synthétiques noirs fabriqués en chauffant un mélange de nitrobenzène, d'aniline et d'acide chlorhydrique en présence de cuivre ou de fer. Il est donc important de noter que, étant un mélange de composés, la nigrosine peut varier d'un lot à l'autre. Elle appartient à la famille des composés à base de phénazine. La nigrosine est principalement utilisée dans l'industrie comme colorant pour les laques et les vernis, ainsi que dans les encres de marqueurs.

L'hypothèse principale que l'on fait (et qui a été vérifiée) pour la nigrosine est que toute l'énergie optique absorbée est transférée à la solution sous forme de chaleur. À notre connaissance, il n'existe pas d'autre voie de désexcitation pour ce composé. Cela nous permet d'avoir une molécule commerciale, en grande quantité que nous considérons

comme une référence (car elle a une efficacité de 100% de transformation d'énergie en chaleur) à la fois pour la photoacoustique, mais aussi pour la photothermie. Bien que la forme du spectre optique de la nigrosine ne présente pas de réel pic d'absorption dans la gamme de l'infrarouge, elle absorbe tout de même la lumière dans le proche infrarouge (808nm) avec des concentrations faibles. Pour obtenir, une solution de nigrosine de $\mu_{a,10} = 1 \text{ cm}^{-1}$ il suffit de 8.7mg pour 50ml de solvant (eau).

1.IV. Les APTs pour la thérapie photothermique

1.IV.A. Propriétés des APTs (Agent Photothermique) pour le ciblage passif des tumeurs

L'utilisation de nanoparticules permet de renforcer l'efficacité thérapeutique de la PTT ou la visibilité en imagerie PA par rapport à une absorption uniquement par les absorbeurs endogènes comme l'hémoglobine. Outre, les propriétés optiques des nanoparticules, leur biodistribution permet d'optimiser les effets d'imagerie et thérapeutiques. La biodistribution désigne la répartition spatiale des nanoparticules au sein d'un organe biologique ou dans notre cas, au sein du tissu et des cellules tumorales. Cette biodistribution est une caractéristique très importante. En effet, une certaine concentration des nanoparticules et une répartition homogène sur l'ensemble des cellules tumorales est nécessaires un traitement efficace de l'ensemble de la tumeur.

Après injection des nanoparticules par voie intraveineuse, le but est d'internaliser les APTs dans les cellules cancéreuses. L'effet de perméabilité et de rétention accrue (Enhanced Permeability and Retention, EPR) décrit un phénomène pathophysiologique par lequel des nanoparticules peuvent passer la barrière endothéliale des vaisseaux sanguins et s'accumuler progressivement dans les tissus de la zone vascularisée de la tumeur. Ainsi, les nanoparticules peuvent être délivrées de manière ciblée et le tissu tumoral peut les retenir pour l'imagerie PA, la délivrance de composés anticancéreux ou/et la PTT.

Pour le développement des tissus tumoraux, les cellules tumorales vont développer une néovascularisation afin d'assurer un approvisionnement adéquat en nutriments et en oxygène. Au fur et à mesure de leur croissance, les tumeurs recrutent de nouveaux vaisseaux ou absorbent les vaisseaux sanguins existants. Contrairement aux vaisseaux sanguins normaux, la vascularisation tumorale présente généralement une barrière endothéliale incomplète provoquant des pores relativement larges (0,1-3 μm de diamètre), ce qui entraîne une perméabilité vasculaire nettement plus élevée [30,31].

Matsumura et Maeda [32] ont été les premiers à montrer que les nanoparticules sont capables d'extravaser à travers le système vasculaire des tumeurs, peu compact et plus perméable, pour atteindre l'espace tumoral extravasculaire et y rester en raison du mauvais drainage lymphatique des tumeurs. Ce phénomène a ensuite été appelé l'effet EPR et a ouvert la voie au ciblage passif des tumeurs à l'aide de médicaments de taille nanométrique. Cependant, l'administration de médicaments grâce à la EPR reste limitée, car le taux de fuite des vaisseaux est lent et le médicament peut être excrété ou métabolisé pendant le temps nécessaire pour que l'accumulation atteigne des niveaux thérapeutiques [33]. De plus, il est nécessaire de comprendre les limites de l'effet, telles que l'hétérogénéité de l'accumulation

et de la rétention dans différents types de tumeurs solides sous différents environnements tissulaires. Cet effet EPR reste très controversé : s'il peut être efficace chez la souris, on connaît encore mal la réalité de l'effet EPR pour des tumeurs solides chez l'homme. Il est donc intéressant de développer des stratégies pour améliorer l'efficacité de l'administration et de l'accumulation, en travaillant sur la taille, l'enrobage et la charge de surface des nanoparticules, un mécanisme plus intelligent pour la libération du médicament (par exemple provoquée par un changement de pH ou de température) et la cinétique d'administration. Le flux sanguin joue également un rôle crucial dans la délivrance des nanomédicaments dans les tissus tumoraux [34].

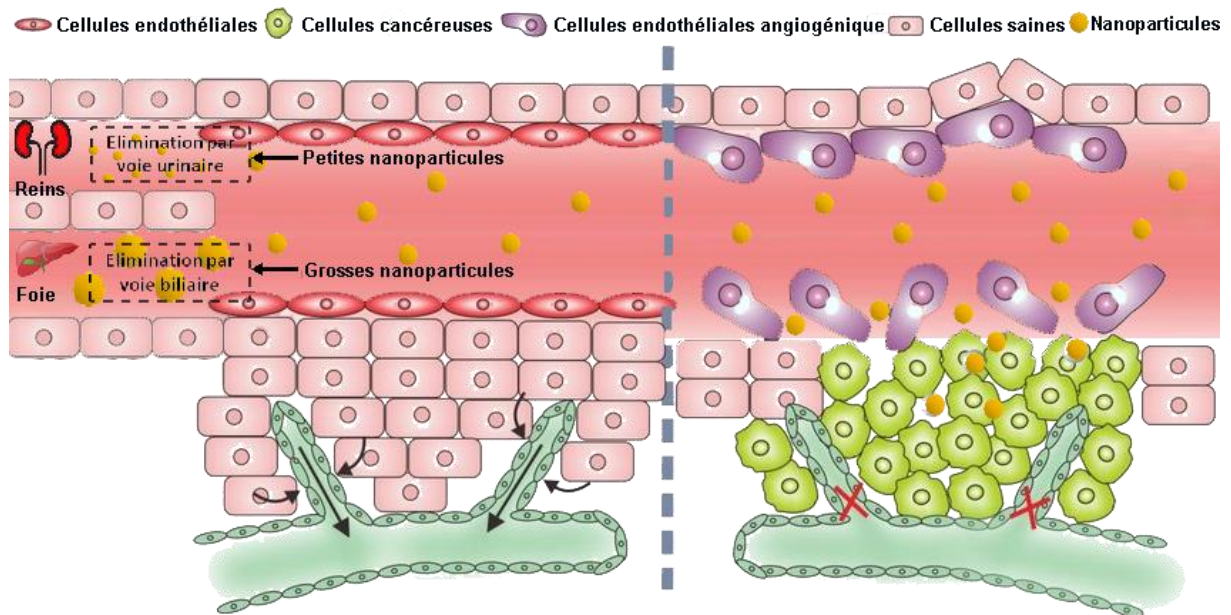


Figure 1.5. Schéma des mécanismes des éliminations des nanoparticules et de l'EPR. Ce schéma est adapté de celui de Kim et al et Xie et al [25,35].

Après l'acheminement des nanoparticules jusqu'aux cellules cancéreuses, les nanoparticules doivent être internalisées. Nous ne détaillerons pas les différents moyens d'internalisation, dont les mécanismes de l'endocytose. La phagocytose, qui concerne plus spécifiquement les microparticules que l'on utilisera pour la PTT, est un processus cellulaire permettant d'ingérer et d'éliminer des particules d'un diamètre inférieur à 0,5 μm ou des substances étrangères. La phagocytose est présente dans de nombreux types de cellules et c'est, par conséquent, un processus essentiel pour l'homéostasie des tissus. Le processus de phagocytose implique plusieurs phases : 1) détection de la particule à ingérer et l'activation du processus d'internalisation, 2) formation d'une vacuole spécialisée appelée phagosome, 3) maturation du phagosome pour le transformer en phagolysosome et 4) transformation en lysosomes.

La première phase de la phagocytose est la détection de la particule cible. La détection est régulée par des récepteurs spécifiques sur les cellules phagocytaires. Ces récepteurs sont spécifiques pour chaque type de particules cibles (microorganismes, cellules apoptotiques ou

particules étrangères). Lorsqu'une particule est reconnue par les récepteurs phagocytaires, diverses voies de signalisation sont activées pour initier la phagocytose.

La phagocytose débute lorsque les récepteurs phagocytaires déclenchent des ligands sur la particule à ingérer. Ensuite, les récepteurs activent des voies de signalisation qui modifient la composition de la membrane, ce qui entraîne la formation de protubérances membranaires pour recouvrir la particule. Enfin, ces protubérances membranaires fusionnent et créent une nouvelle vésicule qui se détache de la membrane plasmique. Cette nouvelle vésicule contenant la particule ingérée est nommée le phagosome.

Au dernier stade de la maturation du phagosome, les phagosomes fusionnent avec les lysosomes pour devenir des phagolysosomes. En raison de l'accumulation de nombreuses molécules de V-ATPase sur leur membrane[36], les phagolysosomes sont très acides (pH aussi bas que 4,5). De plus, leurs compositions biologiques sont très particulières, notamment dues à la présence de plusieurs enzymes hydrolytiques, comme les cathepsines, les protéases, les lysozymes et les lipases, qui contribuent à dégrader les micro-organismes ingérés[37]. Le contenu des phagolysosomes est ensuite dégradé par hydrolyse catalysée par des enzymes et devient un lysosome.

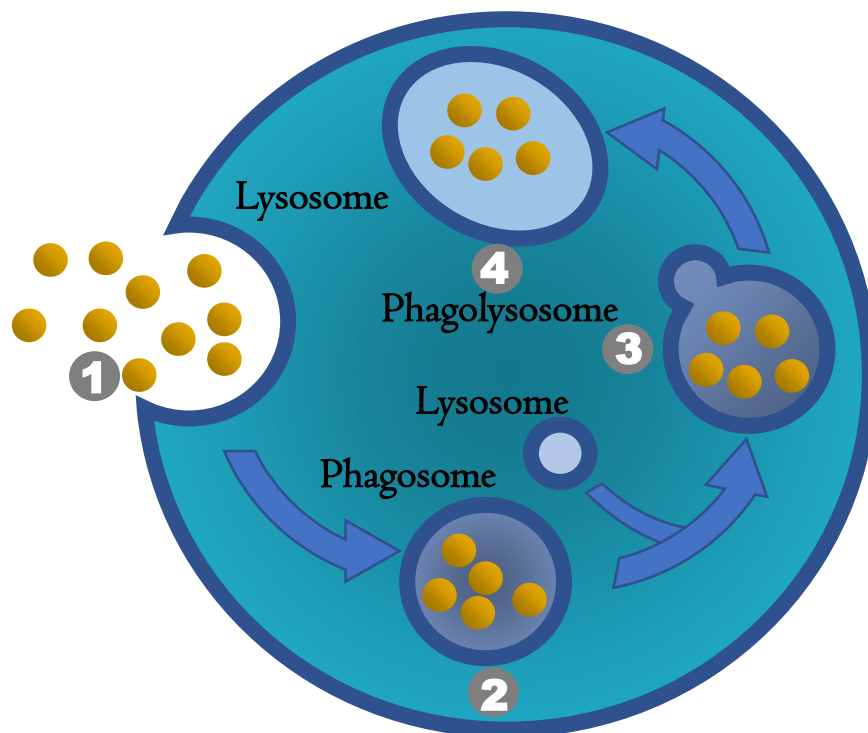


Figure 1.6. Schéma du transport vésiculaire vers l'intérieur d'une cellule ou l'Endocytose et particulièrement la phagocytose. Ce schéma adapté à partir de celui proposé dans l'étude de Stern et al [38].

L'administration des nanoparticules s'effectue par voie intraveineuse. Après circulation dans le système sanguin pendant une certaine durée, les nanoparticules sont progressivement éliminées par deux mécanismes principaux : l'élimination rénale, l'élimination hépatobiliaire.

Pour l'élimination par voie rénale, et particulièrement pour les nanoparticules de diamètre inférieur à 5.5 nm, une excrétion urinaire rapide et efficace résulte de la limite de taille des pores de filtration glomérulaire dans le rein [39]. De nombreuses stratégies pour l'élimination rénale des nanoparticules ont été développées en utilisant la taille des nanoparticules, la charge de surface et la chimie de surface [40–42]. Les petites nanoparticules, avec un diamètre hydrodynamique inférieur à 8 nm pour les nanoparticules d'or, peuvent également excréter par les urines via les reins.

1.IV.B. Effet de l'hyperthermie sur les tissus biologiques

La thérapie photothermique (PTT) utilise des rayonnements lumineux pour le traitement du cancer. Cette approche utilise des photosensibilisateurs qui vont être excités dans une bande spectrale lumineuse spécifique. Cette activation amène les sensibilisateurs à un état excité où il libère alors de l'énergie thermique (chaleur) par relaxation non radiative. L'augmentation de température peut induire différentes morts cellulaires illustrées dans les Figures 1.7 et 1.8 [43,44].

La PTT est un traitement prometteur, car les cellules ne résistent généralement pas à la chaleur et présente des effets directs de mort cellulaire à des températures allant de 41 à 47 °C chez l'animal et in vitro [45,46]. De plus, l'irradiation laser à puissance réglable permet l'élimination sélective de divers types de cancers et minimise les dommages aux tissus non malins environnants. Dans le cas de la PTT utilisant un dispositif laser sans agents PTT spécifique, le faisceau laser est dirigé sur le tissu cible, provoquant une augmentation de la température qui peut entraîner la mort de ces cellules. Cette technique présente l'intérêt de ne pas injecter des agents APT, avec toutes les questions de toxicité et de devenir de ces agents, mais elle peut être moins précise et moins efficace, car elle ne cible pas spécifiquement les cellules anormales ou cancéreuses.

Il est possible d'utiliser des agents photothermiques qui répondent à une réponse optique. Les APTs ciblant préférentiellement les zones tumorales sont préférables, car ils peuvent être plus efficaces et plus sélectifs, mais ils peuvent être plus complexes à mettre en œuvre et nécessiter l'utilisation d'agent d'adressage pour cibler spécifiquement les cellules cibles. Il est important de maintenir une densité de puissance élevée et une répartition homogène des agents sur la zone de traitement pour obtenir un effet thérapeutique efficace.

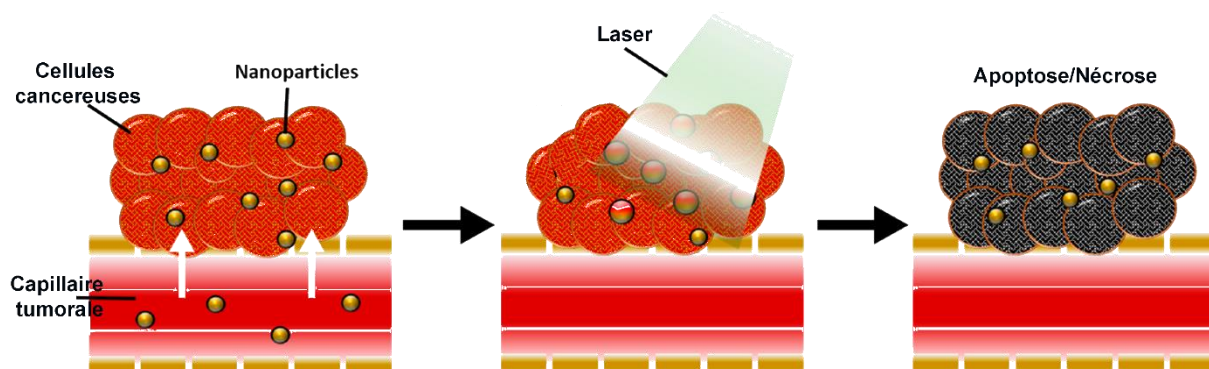


Figure 1.7. Schéma du fonctionnement de la thérapie photothermique

La température est un facteur important qui influence le fonctionnement des cellules et des tissus biologiques, le flux sanguin et la réponse immunitaire. Elle peut avoir des effets directs sur le métabolisme cellulaire et la régulation des processus biologiques tels que la division cellulaire, la différenciation et l'apoptose (mort cellulaire programmée) et l'activation de système immunitaire. La mort cellulaire est schématiquement abordée selon deux notions : l'apoptose ou la nécrose. L'apoptose est décrite comme un processus actif et programmé de démantèlement cellulaire autonome qui évite de déclencher une inflammation. La nécrose a été caractérisée comme une mort cellulaire passive et accidentelle résultant de perturbations environnementales avec libération incontrôlée de contenus cellulaires inflammatoires. L'apoptose est considérée comme un processus régulé et contrôlé. La Figure 1.8 montre la différence de structure entre l'apoptose et la nécrose cellulaire.

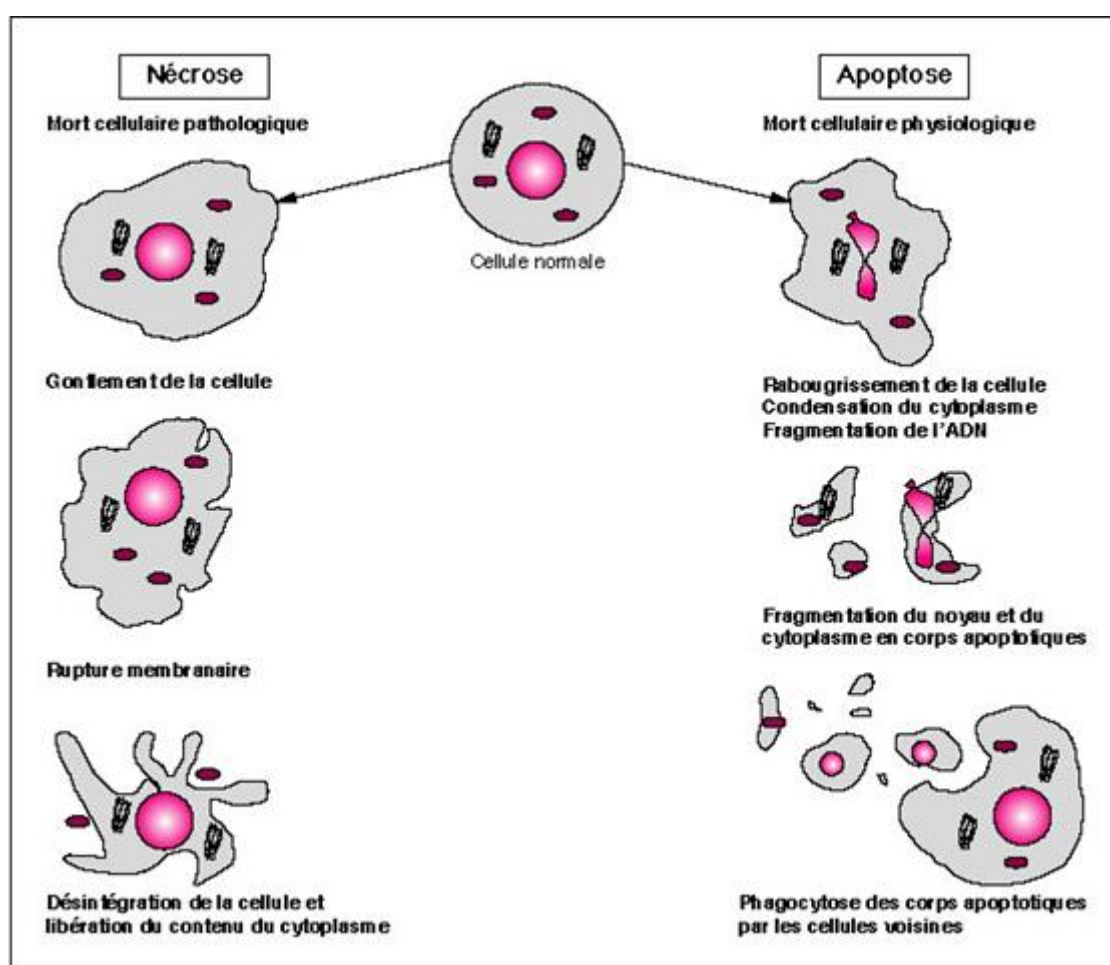


Figure 1.8. Schéma des différentes morts cellulaires. Ce schéma adapté à partir de celui proposé dans l'étude de Gougeon et al [47].

Une étude récente a considéré l'effet du temps d'irradiation par un laser et de la puissance laser sur la mort cellulaire de cellules du type fibroblastes embryonnaires de souris (MEF) [48]. Les résultats ont montré que la mort cellulaire due à la photothermie est principalement dirigée par un processus apoptotique dans un premier temps, qui peut finalement donner lieu

à une nécrose secondaire. En d'autres termes, la mort cellulaire de type apoptose peut être régulée par l'intensité de l'irradiation ou en modulant le temps d'exposition.

La nécrose se caractérise par une mort brutale et non organisée de la cellule, qui peut entraîner la dégradation de ses composants et la libération de substances toxiques dans l'organisme. Cela peut s'accompagner d'inflammation et/ou de dommages aux tissus voisins.

En général, on essaie de favoriser la mort cellulaire par apoptose plutôt que par nécrose, car elle est considérée comme plus efficace et plus "propre", c'est-à-dire qu'elle ne provoque pas de libération de substances toxiques ni d'inflammation. Cependant, dans certains cas, la nécrose peut être utilisée intentionnellement, par exemple pour détruire des tumeurs cancéreuses de manière plus rapide et plus efficace.

La température peut également avoir des effets indirects sur les tissus biologiques en modifiant la circulation sanguine et la régulation de la température.

À des températures modérées, la température peut avoir des effets bénéfiques sur les tissus biologiques. Par exemple, une augmentation de la température peut améliorer la circulation sanguine en dilatant les vaisseaux sanguins et en augmentant le débit sanguin. Cela peut entraîner une amélioration de l'oxygénation et de la nutrition des tissus, ce qui peut accélérer la cicatrisation des plaies et réduire l'inflammation et la douleur. La température modérée peut également être utilisée dans le traitement de certaines maladies ou conditions médicales telles que l'arthrite, la fibromyalgie et la thérapie médicale.

À des températures plus élevées, l'hyperthermie peut endommager les tissus biologiques. Elle peut entraîner une déshydratation des cellules et une perturbation de leur métabolisme, ce qui peut entraîner des lésions cellulaires et tissulaires. L'hyperthermie peut également provoquer une réaction de stress oxydatif, ce qui peut entraîner une augmentation de l'inflammation et de la mort cellulaire. L'hyperthermie peut également perturber la régulation de la température et entraîner une hyperthermie systémique, ce qui peut être dangereux pour l'organisme.

L'hyperthermie peut être utilisée dans le traitement du cancer. Le but de l'hyperthermie est de tuer les cellules cancéreuses en augmentant la température des tissus ciblés. Cependant, il y a un risque de lésions des tissus sains environnants, ce qui peut entraîner des effets secondaires tels que la douleur, la fatigue et la réduction de l'immunité. Enfin l'hyperthermie a de forts effets sur le système immunitaire, comme en témoigne l'importance de la fièvre.

Il y a plusieurs méthodes pour appliquer la température et l'hyperthermie aux tissus biologiques. Ces méthodes peuvent être externes, comme l'utilisation de champs électromagnétiques ou de dispositifs de chauffage externes, ou internes, comme l'injection de nanoparticules chauffantes dans les tissus cibles, mais activées par un champ extérieur.

Les effets de la température et de l'hyperthermie sur les tissus biologiques dépendent également de la durée d'exposition. Des expositions de courte durée peuvent avoir des effets bénéfiques, tandis que des expositions de longue durée peuvent endommager les tissus. Les effets biologiques de l'hyperthermie sont multifactoriels dans le traitement de maladies[49].

La température à atteindre pour provoquer une mort cellulaire dépend de plusieurs facteurs, tels que le type de cellule, la durée d'exposition et l'environnement dans lequel se trouve la cellule. En général, une augmentation de la température peut entraîner une perturbation du métabolisme cellulaire et une déshydratation des cellules, ce qui peut finalement entraîner la mort cellulaire. Cependant, la température à atteindre pour provoquer

la mort cellulaire varie selon le type de cellule et la durée d'exposition. Par exemple, les cellules cancéreuses ont tendance à être plus sensibles à la chaleur que les cellules saines, ce qui peut rendre l'hyperthermie plus efficace pour tuer les cellules cancéreuses[50]. Cependant, il y a un risque de lésions des tissus sains environnants lors de l'utilisation de l'hyperthermie pour le traitement du cancer. La dose thermique désigne l'ensemble des effets thermiques d'une exposition à une source de chaleur sur un tissu biologique. Elle peut être utilisée pour évaluer l'efficacité de la température ou de l'hyperthermie dans le traitement de maladies. La dose thermique est généralement exprimée en joules par kilogramme (J/kg) et peut être calculée en utilisant la formule suivante :

$$Dose\ thermique = \frac{E_T\ délivré}{m_{tissus\ exposés}} \quad (1.6)$$

E_T délivré est l'énergie thermique délivrée en Joule

$m_{tissus\ exposés}$ est la masse du tissu biologique exposé

La dose thermique est aussi définie par plusieurs facteurs, tels que la température atteinte, la durée d'exposition, la nature et l'étendue de la maladie à traiter, ainsi que les caractéristiques du patient (par exemple, l'âge, le genre, la taille, le poids, la santé générale). Il est important de noter que la dose thermique ne prend pas en compte les effets de la température ou de l'hyperthermie sur les tissus biologiques, mais elle peut être utilisée comme un indicateur de l'efficacité du traitement[51–53].

Avant d'étudier l'effet de la thérapie photothermique *in vivo*, il est nécessaire de mesurer au préalable la température au sein des échantillons d'APT en solution (*in vitro*) après l'exposition au laser pour s'assurer de l'efficacité des nanoparticules étudiées. Cette mesure de température peut être réalisée de différentes manières, par exemple en utilisant des thermocouples ou des caméras infrarouges.

La mesure de la température permet de mieux comprendre comment la thérapie photothermique pourra agir sur les cellules et les tissus, et de déterminer les paramètres optimaux de traitement (par exemple la puissance du laser et le temps d'exposition). Elle peut également aider à prédire l'efficacité et les effets secondaires de la thérapie photothermique *in vivo* (c'est-à-dire sur l'organisme entier).

1.V. Caractérisation photothermique in vitro des APT

1.V.A. Principes généraux

1.V.A.a. Les différents modes de transfert de chaleur

L'efficacité de l'hyperthermie par excitation optique en continu repose sur la capacité de la nanoparticule à transformer l'énergie lumineuse en chaleur et à transférer cette chaleur à son milieu environnant afin d'induire une augmentation de la température.

Il existe 3 types de transfert de chaleur qui sont la conduction, le rayonnement thermique et la convection.

La conduction thermique (ou diffusion thermique) est le transfert d'énergie thermique entre un solide ou un milieu fluide due à un gradient de température interne ou entre deux milieux en contact physique direct. C'est ce phénomène que l'on retrouve dans notre cas d'hyperthermie par excitation optique.

Le rayonnement thermique, quant à lui, représente l'énergie thermique via les actions des ondes électromagnétiques générées par l'agitation thermique entre deux systèmes à différentes températures sans contact. Pour résumer, le corps chauffé va émettre des rayonnements (notamment infrarouges) et la température va influencer sur l'intensité et la longueur d'onde des photons rayonnés.

Enfin, **la convection thermique** est le transfert d'énergie dans un fluide due au mouvement de masse du fluide ou entre un fluide en mouvement et une paroi solide.

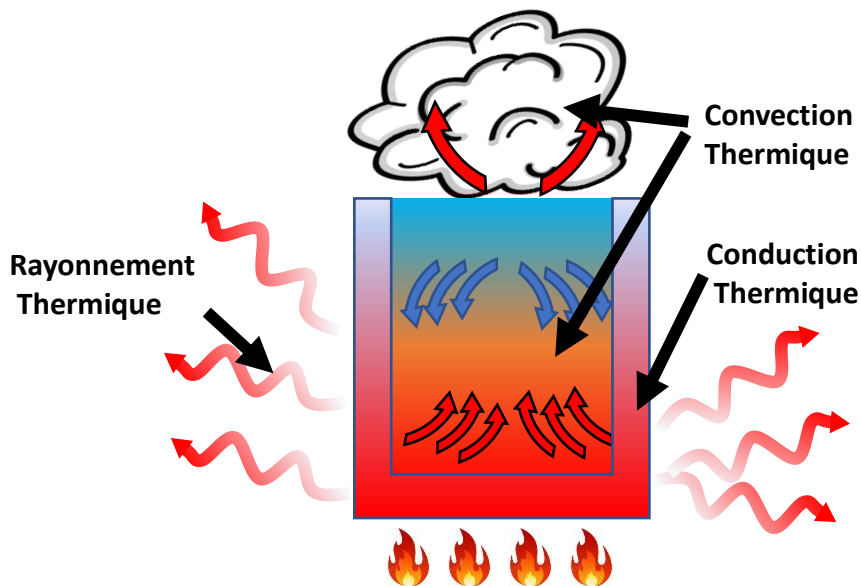


Figure 1.9. Schéma des différents types de transfert de chaleur.

1.V.A.b. Mesure de l'augmentation de température in vitro

Pour une mesure d'augmentation de température dans une solution *in vitro*, on utilise classiquement un capteur thermique [54]. Les capteurs thermiques sont répartis en plusieurs catégories, principalement, les thermocouples et les thermorésistances. Ce type de capteurs doivent être en contact direct avec la source de chaleur pour pouvoir mesurer la température, qui va influencer soit sur la résistance (thermorésistance) soit sur la tension entre deux métaux (thermocouples). Le contact direct, avec la sonde, peut donc avoir une influence sur la température de l'échantillon et peut ne pas être inerte au point de vue chimique. Cependant, d'autres moyens peuvent être envisagés comme l'utilisation d'une caméra infrarouge[55]

basée sur le rayonnement thermique. L'avantage de la caméra est d'être à distance et donc ne pas induire de perturbation physique ou chimique.

D'autre part, une mesure effectuée à l'extérieur de l'échantillon (sans contact) permet de s'affranchir de la problématique d'encombrement spatial. En effet, il faut un minimum de volume d'échantillon pour pouvoir mettre en place un capteur de façon à ce qu'il soit dans une bonne situation de mesure. Dans notre cas d'hyperthermie par illumination optique, la notion d'encombrement spatial doit aussi être pensée pour qu'il n'y ait aucune interaction, absorption ou réflexion de la sonde avec le laser.

Enfin, un capteur peut avoir des interactions thermiques avec les échantillons et peut ainsi altérer la mesure. En effet, pour pouvoir mesurer une température, un capteur thermique doit être au contact de l'échantillon que l'on veut observer. Or cela rajoute un nouveau milieu où des transferts de chaleur peuvent s'opérer. Par ailleurs, pour une utilisation ou un transfert de la méthode dans les tissus biologiques, les mesures en contact direct seront invasives et des mesures à distance semblent préférables dans un premier temps. Cependant, de nouveaux outils tels que des nanothermomètres (Ag_2S) émettant des signaux fluorescents en fonction de la température est une piste novatrice et développé dans le laboratoire MSC cf. Chapitre 3 Partie 3.II.

La mesure par caméra thermique semble, dans notre cas, être une bonne alternative. La mesure se base essentiellement sur la loi du corps noir [56]. Le modèle du « corps noir », introduit en 1900 par Max Planck, est un objet idéal qui absorbe tous les rayonnements électromagnétiques, donc toutes les longueurs d'onde sans réflexion ni transmission. L'absorption de ce rayonnement aurait pour conséquence une augmentation de température et ainsi un rayonnement que l'on appelle le rayonnement du corps noir ou rayonnement thermique. Grâce à ce modèle, on peut ainsi déterminer son spectre d'émission dans tous les spectres électromagnétiques c'est-à-dire quelle énergie il rayonne pour quelle longueur d'onde. C'est ce qui est décrit par la loi de Planck :

$$B_{\lambda}(T_s) = \frac{2hv^3}{c^2} \frac{1}{e^{\frac{hv}{kT_s}} - 1} \quad (1.7)$$

v est la fréquence du rayonnement du corps noir, en s^{-1} ;

$h = 6,626\ 070\ 15 \times 10^{-34}$ J.s est la constante de Planck ;

$c = c_0/n$, est la vitesse de propagation du rayonnement du corps noir dans le milieu ;

$c_0 = 299\ 792\ 458$ $\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ la vitesse de la lumière dans le vide ;

n l'indice de réfraction du milieu ;

$k = 1,380\ 649 \times 10^{-23}$ $\text{J} \cdot \text{K}^{-1}$ est la constante de Boltzmann ;

T_s est la température de la surface du corps noir, en Kelvin ;

Une seconde loi importante est celle de la loi de Wien :

$$\lambda_{max} = \frac{2.898 \cdot 10^{-3}}{T} \quad (1.8)$$

Avec T en kelvin et lambda en m ;

Cette loi nous permet de savoir à quelle longueur d'onde maximum va rayonner le corps noir. Pour un corps noir de 20°C, on obtient une longueur d'onde de 9.88 μm qui est dans la gamme de l'infrarouge. Nos objets se situant entre 30°C et 90°C on obtient une gamme de longueurs d'onde entre [7.98 ;9.56] μm.

Cependant, les échantillons analysés sont des objets réels. Le modèle du corps noir est, pour rappel, un corps théorique. En effet, les objets ou solutions n'absorbent pas la totalité des rayonnements électromagnétiques, il y a une partie des rayonnements qui sont réfléchis ou transmis [57,58]. C'est pourquoi il faut déterminer un facteur qui nous permet de faire le lien entre le corps réel et le corps noir. On appelle ce coefficient, l'émissivité [59,60]. L'émissivité ϵ_A est définie comme le rapport entre le rayonnement $L_\lambda(T_s)$ émis par un corps à la température T_s et le rayonnement $B_\lambda(T_s)$ émis par un corps noir à la même température T_s [61], telle que :

$$\epsilon_A = \frac{L_\lambda(T_s)}{B_\lambda(T_s)} \quad (1.9)$$

Les valeurs d'émissivité varient entre 0 (réflecteur/miroir parfait) ce qui signifie qu'il réfléchit tous les rayonnements qu'il reçoit et 1 (émetteur parfait/corps noir) [62]. Pour la mesure de nos solutions, l'émissivité est basée sur celle du solvant principal qui est l'eau. Cette valeur est obtenue dans des tables de la littérature et est de 0.95. Pour mesurer avec précision, la distance entre la caméra et l'objet doit être prise en compte pour éviter les effets de l'air entre eux, tels que l'absorption du rayonnement de l'objet par l'atmosphère et la détection de l'émission de l'atmosphère.

1.V.B. Théorie thermodynamique de la PTT

Pour comprendre l'évolution de la température suite à une illumination laser et décrire le profil de température, l'étude théorique thermodynamique et la détermination des différentes caractéristiques physiques sont nécessaires. En nous basant sur nos données expérimentales et en nous inspirant du modèle macroscopique utilisé par Roper et al [63] , nous avons pu extraire des variables propres à la thermodynamique des solutions. Ces variables nous ont permis de caractériser et d'étudier les phénomènes de photothermie dans les solutions de référence (Chapitre 3) et des solutions de nanoparticules (Chapitre 4). Nous avons pu comparer le modèle théorique aux valeurs expérimentales mesurées, afin de décrire l'élévation (heating), mais aussi le refroidissement (cooling) de la température en fonction du temps avec seulement quelques variables et des fonctions mathématiques classiques (loi exponentielle).

1.V.B.a. Bilan d'énergie thermodynamique

Nous effectuons alors un bilan d'énergie thermodynamique interne que l'on nomme U (en Joule) sur notre système composé d'une solution aqueuse absorbante illuminée par un laser. La variation d'énergie interne en deux instants t et $t+dt$ s'écrit :

$$dU = dU_{\text{échangé}} + dU_{\text{Créé}} \quad (1.10)$$

Ce bilan renvoie au fait que la variation de l'énergie interne est due à deux contributions. $dU_{\text{échangé}}$ qui désigne l'énergie échangée avec le milieu extérieur de notre système. On compte négatif ce qui sort de notre système et positif ce qui entre dans notre système. $dU_{\text{Créé}}$ est l'énergie générée à l'intérieur de notre système.

L'étude se fait entre unités de temps tel qu'entre t et $t+dt$:

$$\frac{dU}{dt} = \frac{dU_{\text{échangé}}}{dt} + \frac{dU_{\text{Créé}}}{dt} \quad (1.11)$$

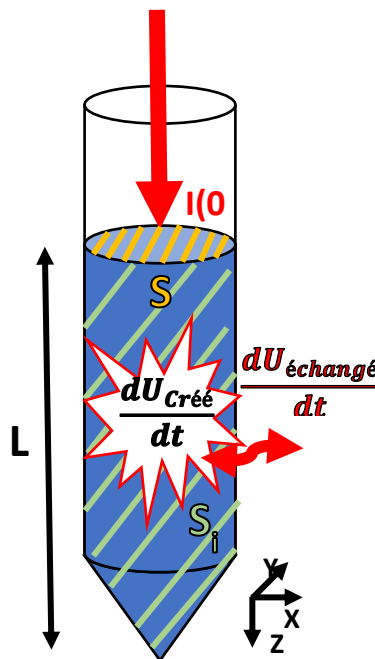


Figure 1.10. Schéma bilan énergétique dans un Eppendorf

1.V.B.b. Expression de l'énergie interne

L'énergie interne s'écrit :

$$U = \sum_i C_{p,i} \cdot m_i \cdot T \quad (1.12)$$

Avec $C_{p,i}$ la capacité thermique massique des composants du système à pression constante exprimé en $J.K^{-1}.kg^{-1}$ et m_i la masse exprimée en kg de ces mêmes composants, et T la température de la solution. Pour la suite, nous considérons que la masse du solvant (eau ici, car les solutions étudiées sont des solutions aqueuses) est très supérieure à la masse des nanoparticules diluée dans l'ensemble de l'échantillon. Ainsi, le produit des $C_{p,nanoparticules} \cdot m_{nanoparticules}$ devient négligeable devant celui du solvant. On peut alors simplifier l'Equation (1.12) en :

$$U = C_{p,eau} \cdot m_{eau} \cdot T \quad (1.13)$$

On obtient alors :

$$\frac{dU}{dt} = C_{p,eau} \cdot m_{eau} \cdot \frac{dT}{dt} \quad (1.14)$$

En considérant que la capacité thermique massique de l'eau est constante dans la gamme de température considérée.

1.V.B.c. Expression de l'énergie échangée

On se place dans la situation où l'échantillon (fluide) est immobile, le transport d'énergie n'est que faiblement aidé par les courants de mélange à échelle macroscopique. Au voisinage immédiat de la paroi, la chaleur est transmise par conduction pure, les molécules du fluide étant stationnaires par rapport à la frontière de la couche limite. On obtient alors un flux échangé tel que :

$$\frac{dU_{\text{échangé}}}{dt} = hS_i(T - T_0) \quad (1.15)$$

Avec T la température de la solution (K) et T_0 la température ambiante extérieure (K). Avec h le coefficient de transfert thermique ($W.m^{-2}.K^{-1}$), S_i la surface d'échange thermique entre la solution et l'extérieur (m^2).

1.V.B.d. Terme Source

Le terme source est l'énergie interne créée à l'intérieur du système. On considère que la seule source d'énergie à l'intérieur du système est le flux d'énergie optique absorbé et transformé en chaleur. On note $I(x,y,z)$ la puissance de la lumière incidente en $W.m^{-2}$ qui représente la puissance apportée par le laser sur l'échantillon. μ_a est le coefficient d'absorption exprimé en cm^{-1} qui représente la part de la lumière incidente absorbée par l'échantillon. E_{pt} est le coefficient qui traduit la quantité d'énergie absorbée transformée directement en chaleur. Il représente la part d'énergie absorbée convertie en chaleur. On peut donc écrire le terme source comme suivant :

$$\frac{dU_{Créé}}{dt} = \iiint E_{pt} \cdot \mu_a \cdot I(x, y, z) \cdot dV \quad (1.16)$$

On peut émettre l'hypothèse que la fluence optique n'a qu'une unique dépendance avec la profondeur de pénétration du laser afin de passer le problème à une seule dimension. On se place dans la configuration de la Figure 1.10 dans laquelle la direction de propagation de la lumière est l'axe z. On appelle S la surface d'illumination de l'échantillon. On intègre entre $z=0$ (la surface incidente) et $z=L$ la dimension du contenant suivant z. On obtient alors :

$$\frac{dU_{Créé}}{dt} = \int_0^L E_{pt} \cdot \mu_a \cdot I(z) \cdot S \cdot dz \quad (1.17)$$

La puissance de la lumière incidente suivant z dans le milieu peut s'exprimer comme :

$$I(z) = I_0 e^{-\mu^{att} \cdot z} \quad (1.18)$$

μ^{att} est le coefficient d'atténuation provenant à la loi de Beer-Lambert. On suppose que le coefficient d'atténuation ne varie pas selon l'axe z (solution homogène et illumination faiblement divergente) et on obtient avec les Équations (1.17) et (1.18) entre 0 et L :

$$\frac{dU_{Créé}}{dt} = E_{pt} \cdot \frac{\mu_a}{\mu_{10}^{att} \cdot \ln(10)} \cdot S \cdot I(0) \cdot \left(1 - e^{-\mu_{10}^{att} \cdot L \cdot \ln(10)}\right) \quad (1.19)$$

Après introduction de μ_{10}^{att} , nous obtenons :

$$\frac{dU_{Créé}}{dt} = E_{pt} \cdot S \cdot \frac{\mu_a}{\mu_{10}^{att} \cdot \ln(10)} \cdot I(0) \cdot \left(1 - 10^{-\mu_{10}^{att} \cdot L}\right) \quad (1.20)$$

Avec S la surface d'illumination, perpendiculaire à l'illumination laser (m²).

En réunissant les équations (1.11), (1.14), (1.15) et (1.20) on obtient :

$$C_{p,eau} \cdot m_{eau} \cdot \frac{dT}{dt} = hS_i(T_{systeme} - T_0) + Ept \cdot S \cdot \frac{\mu_a}{\mu_{10}^{att} \cdot \ln(10)} \cdot I(0) \cdot (1 - 10^{-\mu_{10}^{att} \cdot L}) \quad (1.21)$$

1.V.B.e. Résolution de l'équation de la chaleur

On procède à un changement de variable de l'Equation (1.21) tel que Δ_T est la différence de température (T-T₀) :

$$\frac{d\Delta_T}{dt} = \varphi - \beta \Delta_T \quad (1.22)$$

φ et β représentent le taux d'absorption d'énergie (en K.s⁻¹) et la constante associée à la perte de chaleur (en s⁻¹), respectivement. On obtient ainsi :

$$\begin{cases} \varphi = \frac{Ept \cdot S \cdot \frac{\mu_a}{\mu_{10}^{att} \cdot \ln(10)} \cdot I(0) \cdot (1 - 10^{-\mu_{10}^{att} \cdot L})}{m_{eau} C_{p,eau}} \\ \beta = \frac{hS_i}{m_{eau} C_{p,eau}} \end{cases} \quad (1.23)$$

Et on notera τ le temps caractéristique où le système atteint environ 63% de son amplitude maximale. On obtient ainsi :

$$\tau = \frac{1}{\beta} \quad (1.24)$$

La résolution de l'Equation différentielle (1.22) se fait selon deux cas. Le premier cas représente le profil de température pendant l'illumination avec le laser (qui débute à t=0). Cela se traduit par $\varphi \neq 0$ et $\Delta_T(0) = 0$. Le second cas représente le profil de température pendant le retour à la température ambiante après l'arrêt de l'illumination par le laser à t=t_{laser off}. On écrit alors les paramètres tels que $\varphi = 0$ et $\Delta_T(t_1) = (T(t_{laser\ off}) - T_0)$ où T(t_{laser off}) est la température seuil atteinte après illumination. On obtient alors un système d'équations :

$$\begin{cases} \Delta_T(t) = \frac{\varphi}{\beta} \left(1 - e^{-\frac{t}{\tau_{montant}}} \right) & \text{pour } \varphi \neq 0 \text{ et } t \in [0; t_1] \\ \Delta_T(t) = (T(t_{laser\ off}) - T_0) e^{-\frac{t}{\tau_{descendant}}} & \text{pour } \varphi = 0 \text{ et } t > t_1 \end{cases} \quad (1.25)$$

On écrira par la suite pour la phase de chauffe, la plus grande différence de température qui peut être obtenue par l'échantillon ΔT_{max} exprimée par :

$$\Delta T_{max} = \frac{\varphi}{\beta} \quad (1.26)$$

En développant, on obtient :

$$\Delta T_{max} = \frac{Ept \cdot S \cdot \frac{\mu_a}{\mu_{10}^{att} \cdot \ln(10)} \cdot I(0) \cdot (1 - 10^{-\mu_{10}^{att} \cdot L})}{hSi} \quad (1.27)$$

L'Equation (1.27) décrit la variation de la température maximale (ΔT_{max}) en fonction de l'atténuation (μ_{10}^{att}). Cette équation met en avant qu'à partir d'une certaine extinction, la température maximale atteint un palier. Cela signifie que même si l'on continue à augmenter l'extinction optique, la température ne continuera pas à augmenter de manière significative.

Ces équations ont été définies dans le travail de Roper et al[63] ou Richardson et al [51]. Cependant, il a été observé (cf. chapitre 3 et chapitre 4) que le τ n'était pas égal dans les différents régimes de chauffe et de refroidissement, contrairement à la théorie annoncée par Roper. On notera alors $\tau_{montant}$ le temps caractéristique au régime de chauffe avec laser et $\tau_{descendant}$ le temps caractéristique au régime de refroidissement après illumination laser.

De même, Roper introduit une métrique permettant d'estimer l'efficacité d'une solution à convertir la lumière absorbée en chaleur que l'on notera η . Il définit ce terme nommé coefficient de conversion lumière en chaleur (light-to-heat conversion) et se place dans le régime permanent tel que $\frac{dT}{dt} = 0$. on obtient alors :

$$\eta = \frac{h \cdot S \cdot \Delta T_{max} - Q_0}{I(1 - 10^{-A_\lambda})} \quad (1.28)$$

Avec A_λ l'absorbance et Q_0 le terme source qui représente la chaleur dissipée par le contenant. Dans sa méthode, ce coefficient est calculé à partir du coefficient de transfert thermique h qu'il détermine expérimentalement grâce au régime de refroidissement. Dans notre système d'équations, et particulièrement dans l'Equation du terme source (1.20) on peut déterminer le coefficient de conversion lumière en chaleur plus facilement tel que :

$$\eta = Ept \cdot \frac{\mu_a}{\mu_{10}^{att} \cdot \ln(10)} \quad (1.29)$$

Nous présentons donc l'efficacité de conversion photothermique d'une solution comme le rapport entre le coefficient d'absorption ($E_{pt} \cdot \mu_a$) que l'on peut obtenir grâce à une mesure spectrométrique photoacoustique que l'on détaillera le chapitre 2 et le coefficient d'atténuation obtenu par une mesure spectrométrique UV-Vis. Cette méthode semble être un moyen alternatif pour évaluer et caractériser l'efficacité de conversion de lumière en chaleur d'une solution. Cela est concordant avec les résultats présentés par Wang [65].

Pour rappel, E_{pt} est le coefficient traduisant la quantité d'énergie absorbée transformé directement en chaleur. η est l'efficacité de conversion photothermique qui peut être représentée comme l'effet de l'absorption par rapport à l'extinction. On obtient alors l'Equation (1.29).

1.V.B.f. Le taux d'absorption spécifique (SAR)

Dans la littérature, une autre métrique est utilisée pour évaluer les performances hyperthermiques d'une solution. On appelle cette efficacité de chauffage le taux d'absorption spécifique (SAR)[66] elle est exprimée en $W \cdot g^{-1}$ et elle est calculée à partir de la pente initiale des courbes de température en fonction du temps. Elle s'exprime selon l'équation suivante :

$$SAR \left(\frac{W}{g} \right) = \frac{C \cdot V}{m} \cdot \left(\frac{dT}{dt} \right) |_{t=0} \quad (1.30)$$

Où C est la capacité thermique spécifique du solvant par unité de volume ($J \cdot K^{-1} \cdot L^{-1}$) et m est la masse (g) du matériau absorbant en solution et V le volume de la solution (L). Cette formule est valable uniquement dans des conditions non adiabatiques. En développant l'Equation (1.31) et en dérivant l'Equation (1.25) on obtient :

$$SAR \left(\frac{W}{g} \right) = \frac{C \cdot V}{m} \cdot \frac{\varphi}{\beta \cdot \tau_{montant}} \quad (1.31)$$

Pour la mesure du SAR, on mesure la pente à l'origine de l'augmentation de température. Ainsi seulement, les premières secondes de la mesure sont utilisées. Cette mesure nous renseigne sur la température pouvant être atteinte et l'efficacité thermique d'un échantillon. Cependant, différents aspects extérieurs peuvent influencer la pente de l'élévation de température, cela peut conduire à des erreurs importantes dans le SAR mesuré. Par exemple, les pertes de chaleur deviennent importantes lorsque le volume de l'échantillon est faible ainsi que le changement de forme potentiel du liquide (évaporation).

En utilisant la mesure du taux d'absorption spécifique (SAR) pour *in vivo*, il est possible d'estimer les dommages thermiques qui peuvent être causés aux tissus biologiques. Cependant, il est important de prendre en compte la perfusion des tissus lors de l'analyse de l'impact de l'exposition à la lumière sur les tissus biologiques. Une étude menée par Skinner et al[67] a montré que pour les tissus à faible perfusion tels que le sein, le rayon de la lésion

thermique peut augmenter de 15 % (ce qui équivaut à une augmentation de 50 % du volume) après l'arrêt de l'illumination, tandis que pour les tissus à perfusion élevée tels que le foie, le volume du dommage thermique ne devrait pas augmenter après l'arrêt de l'illumination. Il est également important de prendre en compte les effets de la modification du flux sanguin sur les dommages thermiques. En effet, la puissance requise pour atteindre la température cible est plus élevée et le volume des dommages thermiques prédits est plus faible si la perfusion est modélisée. En outre, les propriétés des tissus, telles que leur capacité d'absorption et de diffusion de la lumière, sont généralement considérées comme étant constantes au cours du traitement. Cependant, il a été observé que ces propriétés peuvent changer avec la coagulation des tissus[68]. Par conséquent, il est important de prendre en compte les modifications des coefficients d'atténuation qui peuvent survenir au cours des dommages thermiques accumulés. Cela est particulièrement important lors de l'utilisation de la lumière laser, où les coefficients de diffusion des tissus peuvent augmenter de plusieurs facteurs lors de la coagulation.

1.IV.C. État de l'art des dispositifs existants

Il existe plusieurs types de montages de photothermie permettant de mesurer la température et l'efficacité photothermique *in vitro*. Ils sont généralement composés d'une source de lumière continue. Le laser peut être dirigé sur le matériau ou le tissu cible à l'aide de miroirs ou de lentilles, et la chaleur produite peut être contrôlée en modulant l'intensité et la durée de l'exposition. La mesure de température en PTT et du coefficient de conversion lumière-chaleur a donc souvent été réalisée en utilisant une cuvette standard comme porte-échantillon. Cette méthode a l'avantage de la simplicité, mais elle nécessite une quantité plus ou moins importante d'échantillons et peut prendre du temps pour atteindre une température stable (dépendant du volume utilisé). C'est le cas de l'équipe de Mathieu Ciancone d'Institut des Sciences Chimiques de Rennes [69] qui utilise un montage expérimental qui comprend une cuve en quartz de 2 ml contenant une solution de 10 μM de composé étudié solubilisée dans du toluène. La cuve est placée dans un porte-cuve spécialement conçu pour l'expérience, qui est opaque aux longueurs d'onde utilisées (808 ou 940 nm), mais possède une ouverture circulaire de 1 cm de diamètre. Une diode laser est reliée à une fibre optique et dirigée vers l'ouverture du porte-cuve. Une lentille est utilisée pour focaliser le faisceau laser sur l'ouverture du porte-cuve et ajuster sa taille à cette dernière (diamètre égal à 1 cm). La mesure de température s'effectue avec un thermocouple placé dans la solution, au-dessus du passage du faisceau laser et permet l'acquisition de la température chaque seconde. Roper et al. de l'Université de l'Utah [63], quant à lui, utilise une cuvette standard de 0.4×0.02×1 cm comme porte-échantillon. Un laser à ions (514 et 488 nm) est utilisé pour illuminer un échantillon à travers une fenêtre en quartz dans une chambre à vide. Comme pour le montage précédent, un thermocouple est utilisé pour la mesure de température de plus un contrôle de la pression est fixé avec une chambre à vide. La pression dans la chambre est réduite à <1 torr (133 Pa) pour éliminer le transfert de chaleur par convection de la surface de l'échantillon. L'utilisation de cuvette et un temps d'exposition trop long peuvent être problématiques, car il est difficile de compenser les fluctuations à long terme des sources de lumière, des capteurs de température et de la température ambiante,

et l'ajout de masse de la cuvette peut affecter les résultats. Pour remédier à ces problèmes, certaines équipes ont adopté une autre approche a été proposée par Richardson et al. de l'université de l'Ohio [64], consistant à remplacer la cuvette par une gouttelette de l'échantillon formée à l'aide d'une pointe de micropipette. Cette méthode nécessite des volumes d'échantillon généralement beaucoup plus petits (environ 10 μ L) et permet une stabilisation de la température beaucoup plus rapide à puissance laser égale pendant les étapes de chauffage et de refroidissement. Toutefois, en raison du rapport surface/volume élevé de la gouttelette, l'évaporation du solvant peut affecter la précision de la mesure du coefficient de conversion lumière-chaaleur. Pour minimiser l'évaporation, d'autres équipes comme celle de Agnieszka Paściak et Artur Bednarkiewicz de Institute of Low Temperature and Structure Research, Polish Academy of Sciences [70,71] ont ajouté une chambre humide afin de maintenir des conditions d'humidité élevées dans la chambre de mesure, d'éviter un chauffage excessif et de maintenir l'étanchéité du système.

Un des principaux avantages du montage du type de celui de Richardson est qu'il permet de mesurer l'efficacité photothermique de très petites quantités de matériau, jusqu'à quelques microlitres. Cela le rend particulièrement utile pour l'étude de matériaux dont les quantités disponibles sont limitées, tels que les nanoparticules ou les échantillons de petite taille. Toutefois, il ne peut pas être utilisé pour mesurer l'efficacité photothermique de matériaux solides, car il nécessite une goutte de liquide ou de solution contenant le matériau à étudier. De plus, ce montage ne peut pas être utilisé pour mesurer l'efficacité photothermique de matériaux à haute température, car la goutte peut être instable ou s'évaporer à des températures élevées. En outre, le montage de Richardson peut être sensible aux perturbations de l'environnement, telles que la convection de l'air, qui peuvent affecter les mesures de température. Enfin, ce montage peut nécessiter des précautions spéciales pour éviter la contamination de l'échantillon.

À l'inverse, l'utilisation de cuvettes pour mesurer l'efficacité photothermique présente plusieurs avantages. Tout d'abord, elle peut permettre de mesurer l'efficacité photothermique de matériaux solides, ce qui n'est pas possible avec le montage de Richardson. De plus, l'utilisation de cuvettes permet de faire des mesures de matériaux à haute température, à condition d'utiliser des cuvettes résistantes à la chaleur et un système de refroidissement pour prévenir de la surchauffe de l'échantillon ou de la cuvette. En outre, l'utilisation de cuvettes est moins sensible aux perturbations de l'environnement, telles que la convection de l'air, ce qui peut conduire à des mesures de température plus précises. Enfin, l'utilisation de cuvettes est généralement moins coûteuse à mettre en place et à utiliser que le montage de Richardson, qui nécessite des dispositifs optiques coûteux ou une chambre permettant un contrôle de l'humidité. Malgré ces avantages, l'utilisation de cuvettes présente également des inconvénients. Tout d'abord, elle ne permet pas de mesurer l'efficacité photothermique de petites quantités de matériau, qui doivent être dissoutes dans un solvant ou une solution et dont la quantité doit être suffisamment importante pour remplir la cuvette. De plus, l'utilisation de cuvettes peut être limitée par la forme et la taille pour permettre une irradiation uniforme. L'inertie thermique du matériau de la cuvette peut avoir une influence sur la mesure, en comparaison avec la goutte ou les transferts de chaleur se font directement avec l'extérieur. Enfin, il est nécessaire d'adapter les cuvettes pour qu'elles absorbent faiblement la lumière incidente et qu'elles ne soient pas des barrières thermiques.

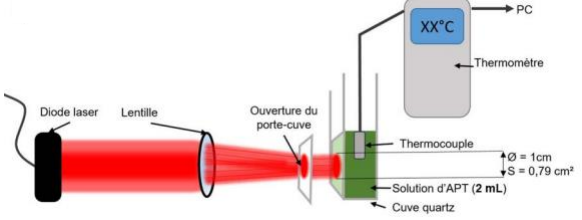
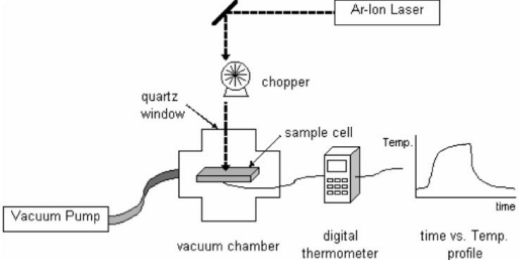
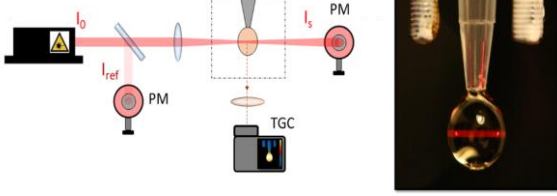
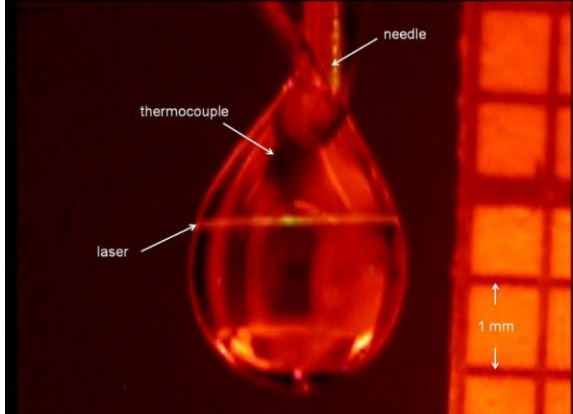
Équipes & laboratoires	Schéma des dispositifs	Descriptions
Mathieu Ciancone de Institut des Sciences Chimiques de Rennes [66]		Dispositif utilisant un thermocouple pour la mesure de température et une cuvette traversée par une diode laser focalisée
D. Keith Roper de l'Université de l'Utah[60]		Un laser irradie l'échantillon dans une chambre à vide. Un thermocouple attaché à la cellule mesure la température.
Agnieszka Paściak et Artur Bednarkiewicz de l'Institute of Low Temperature and Structure Research, Polish Academy of Sciences [67,68]		Montage utilisant une goutte en suspension et illuminé par un laser. La mesure de température est faite par caméra thermique.
Hugh H. Richardson de l'université de l'Ohio [61]		Montage utilisant une goutte en suspension et illuminé par un laser. La mesure de température est faite par un thermocouple. La taille (volume) de la gouttelette est déterminée par comparaison avec une grille placée à côté de la gouttelette.

Tableau 1.2. Résumer de différents montages et technique de mesure de température pour la PTT.

1.VI.L'imagerie photoacoustique

1.VI.A. Principes généraux

L'imagerie photoacoustique (PAI) est une technique d'imagerie biomédicale qui permet de visualiser la distribution de molécules ou de structures optiquement absorbantes en profondeur dans les tissus biologiques en utilisant une combinaison de lumière et de son. Elle dispose de nombreux avantages, notamment sa haute résolution, sa profondeur de pénétration centimétrique dans les tissus par rapport à l'imagerie optique et d'être faiblement invasive. Le principe de l'imagerie PAI est simple : on utilise une source de lumière (par exemple un laser) pour envoyer un faisceau de lumière se propageant dans les tissus biologiques par exemple. Lorsque la lumière traverse les tissus, elle est absorbée par les molécules ou les structures qui y sont présentes. Cette absorption de lumière entraîne une augmentation de la température de l'environnement local, ce qui à son tour entraîne une expansion du milieu. Cette expansion du milieu est à l'origine d'une onde de pression, appelée onde photoacoustique, qui peut être détectée à l'aide d'un capteur acoustique (par exemple une sonde échographique). L'imagerie PAI permet de visualiser la distribution de molécules ou de structures dans un milieu en mesurant le champ d'ondes photoacoustiques généré par chaque point du tissu. La production d'un signal PA efficace nécessite généralement une durée d'impulsion laser (que l'on notera t_{laser}) dans la plage des nanosecondes, ce qui est inférieur au temps des conditions de confinements thermiques et de contraintes.

Le confinement thermique indique que la diffusion thermique pendant l'illumination laser peut-être négligée[72]. Cette condition s'écrit :

$$t_{laser} < t_{th} = \frac{d_c^2}{4D_T} \quad (1.32)$$

Où t_{th} est le seuil de confinement thermique, d_c est la résolution spatiale souhaitée et D_T est la diffusivité thermique ($\sim 0,14 \text{ mm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ pour les tissus mous [73]).

Le confinement de contrainte quant à lui, signifie que l'expansion volumique de l'absorbeur pendant la période d'illumination peut être négligée. Cette condition peut être écrite tel que :

$$t_{laser} < t_{co} = \frac{d_c}{v_s} \quad (1.33)$$

Où v_s est la vitesse du son. Et t_{co} est le seuil de confinement de contrainte.

Pour donner un ordre d'idée, pour une résolution spatiale de 100 μm , le temps de confinement thermique est de 18 ms et celui de confinement de contrainte est de 67 ns. Ces conditions sont remplies dans le cas d'un laser pulsé communément utilisé de pulse de durée de 10 ns.

Il existe plusieurs types d'imagerie PAI, qui diffèrent par rapport à la source de lumière utilisée et par rapport au capteur acoustique utilisé. On donne ci-dessous des exemples de sources de lumière utilisées en PAI :

Une source laser : le laser est la source de lumière la plus couramment utilisée en imagerie PAI. Il permet d'obtenir un faisceau de lumière monochromatique et de haute intensité, ce qui permet de générer des ondes photoacoustiques de haute qualité. On utilise souvent le laser dans un régime pulsé.

Une source LED : les LEDs (diode électroluminescente) sont une source de lumière à haute efficacité énergétique qui peut être utilisée en imagerie PAI. Elles permettent d'obtenir un faisceau de lumière polychromatique et de faible intensité, ce qui peut être utile pour l'imagerie de surface ou pour l'imagerie de profondeur limitée [74].

Suivant les différents types d'imagerie photoacoustique et en analysant ces mesures, on peut obtenir une image de la distribution de la lumière absorbée, ce qui permet de visualiser et étudier les structures ou les molécules. L'imagerie PAI a de nombreuses applications dans différents domaines tels que la tomographie ou la microscopie et peut être utilisée pour visualiser la distribution de molécules dans les tissus biologiques, pour détecter des lésions ou des tumeurs, pour suivre l'absorption de médicaments par l'organisme, ou encore pour étudier le fonctionnement des organes et des systèmes du corps humain.

1.VI.B. Mesure d'absorption

La mesure de l'absorption optique par imagerie photoacoustique se base sur les ondes photoacoustiques qui résultent de l'absorption de lumière par un matériau en utilisant des impulsions lumineuses de haute intensité et qui se transforment en onde ultrasonore. Dans les applications de PA, on suppose généralement que la thermalisation domine et que, par conséquent, toute l'énergie des photons est convertie en chaleur. Cette augmentation localisée de chaleur entraînera une légère augmentation de la température locale et une augmentation correspondante de la pression locale notée P_0 . L'équation fondamentale de la photoacoustique montre que la pression acoustique est directement proportionnelle à l'absorption de lumière et à sa fluence. Elle s'écrit quand les régimes thermiques et de stress sont validés :

$$p_0(\lambda) = \Gamma(\lambda) \cdot E_{pt}(\lambda) \cdot \mu_a(\lambda) \cdot I(\lambda) \quad (1.34)$$

Où Γ est le paramètre de Grüneisen de l'échantillon qui traduit la quantité de chaleur transformée en ultrason. I est la fluence lumineuse, E_{pt} le coefficient traduisant la quantité d'énergie absorbée transformée directement en chaleur et μ_a est le coefficient d'absorption optique. C'est cette augmentation de pression décrite par l'Equation 1.34 qui est à l'origine d'une onde acoustique (ultrasonore) qui se propage. On parle donc de la distribution de la

pression acoustique initiale P_0 . En utilisant cette équation, il est possible de calculer la distribution de l'absorption de la lumière dans un matériau en mesurant la pression acoustique à différents points et l'intensité de lumière incidente.

Lorsque l'absorption est due à des nanoparticules, dont les propriétés physico-chimiques diffèrent du solvant, l'efficacité de la PA ne peut pas être simplement liée au paramètre de Grüneisen. Le signal PA proviendra du chauffage du fluide entourant les nanoparticules par conduction thermique à partir de ces dernières. En d'autres termes, plutôt que de chauffer le fluide directement par absorption de la lumière, il y a une étape intermédiaire : la lumière est absorbée par les nanoparticules et la chaleur est ensuite transférée au fluide traduit par le coefficient E_{pt} . Cette chaleur est ensuite transformée en pression acoustique (Γ) que l'on récupère pour calculer l'absorption optique. Le signal photoacoustique généré par les particules elles-mêmes sera un effet de second ordre, car, bien que l'augmentation de température générée par des nanoparticules elles-mêmes puisse être plus importante que dans le cas d'un fluide (la capacité thermique spécifique ayant tendance à être plus faible dans les solides que dans les fluides), la contrainte générée et l'expansion thermique des particules sont faibles, car la densité et le module de masse sont généralement plus élevés que dans un fluide[75].

Outre les différentes applications de la photoacoustique, il est possible, en modulant les longueurs d'onde avec un laser accordable, de mesurer le spectre d'absorption d'un échantillon. La mesure d'absorption en photoacoustique et la mesure d'absorption en UV-visible sont deux techniques de mesure qui permettent de quantifier l'absorption de la lumière par un milieu. Cependant, elles fonctionnent de manières différentes. La mesure d'absorption en photoacoustique se base sur le principe de conversion de l'énergie lumineuse en énergie thermique par absorption. La mesure en UV-visible utilise, quant à elle, le principe d'un faisceau de lumière à travers un milieu qui en absorbe une partie. Pour la mesure, on utilise le rapport entre faisceau incident et le faisceau reçu. On appelle cela le spectre d'extinction, car cela prend en compte une composante de diffusion optique et l'absorption. Plus le milieu est concentré, plus la quantité de lumière absorbée est importante. En mesurant l'intensité de la lumière transmise à différentes longueurs d'onde, on peut déterminer la quantité de lumière absorbée par le milieu et, par conséquent, sa mesure d'extinction.

En résumé, la mesure d'absorption en photoacoustique est une mesure de l'absorption intéressante dans le domaine de l'hyperthermie optique, car la technique utilise la conversion de l'énergie optique (absorption) en onde acoustique et donc en chaleur. En UV-visible, au contraire, on mesure l'extinction, car on utilise le rapport des intensités des faisceaux, ce qui inclut l'absorption et la diffusion, et ne permet donc pas de caractériser de manière spécifique l'efficacité de conversion de la lumière en chaleur.

Bibliographie :

- [1] Beik J, Abed Z, Ghoreishi FS, Hosseini-Nami S, Mehrzadi S, Shakeri-Zadeh A, et al. Nanotechnology in hyperthermia cancer therapy: From fundamental principles to advanced applications. *J Controlled Release* 2016;235:205–21.
- [2] Abadeer NS, Murphy CJ. Recent progress in cancer thermal therapy using gold nanoparticles. *Nanomater Neoplasms* 2021:143–217.
- [3] Gai S, Yang G, Yang P, He F, Lin J, Jin D, et al. Recent advances in functional nanomaterials for light-triggered cancer therapy. *Nano Today* 2018;19:146–87.
- [4] Matsumura Y, Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res* 1986;46:6387–92.
- [5] Bertrand N, Wu J, Xu X, Kamaly N, Farokhzad OC. Cancer nanotechnology: the impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. *Adv Drug Deliv Rev* 2014;66:2–25.
- [6] Setyawati MI, Tay CY, Chia SL, Goh SL, Fang W, Neo MJ, et al. Titanium dioxide nanomaterials cause endothelial cell leakiness by disrupting the homophilic interaction of VE-cadherin. *Nat Commun* 2013;4:1–12.
- [7] Matsumoto Y, Nichols JW, Toh K, Nomoto T, Cabral H, Miura Y, et al. Vascular bursts enhance permeability of tumour blood vessels and improve nanoparticle delivery. *Nat Nanotechnol* 2016;11:533–8.
- [8] Ciocca DR, Calderwood SK. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress Chaperones* 2005;10:86–103.
- [9] Hulst HC, van de Hulst HC. Light scattering by small particles. Courier Corporation; 1981.
- [10] Fu Q, Sun W. Mie theory for light scattering by a spherical particle in an absorbing medium. *Appl Opt* 2001;40:1354–61.
- [11] Metiu H, Das P. The electromagnetic theory of surface enhanced spectroscopy. *Annu Rev Phys Chem* 1984;35:507–36.
- [12] Moskovits M. Surface-enhanced spectroscopy. *Rev Mod Phys* 1985;57:783.
- [13] Ghosh SK, Pal T. Interparticle coupling effect on the surface plasmon resonance of gold nanoparticles: from theory to applications. *Chem Rev* 2007;107:4797–862.
- [14] Efrima S, Metiu H. Classical theory of light scattering by an adsorbed molecule. I. Theory. *J Chem Phys* 1979;70:1602–13.
- [15] Gersten J, Nitzan A. Electromagnetic theory of enhanced Raman scattering by molecules adsorbed on rough surfaces. *J Chem Phys* 1980;73:3023–37.
- [16] Wold DJ, Haag R, Rampi MA, Frisbie CD. Distance dependence of electron tunneling through self-assembled monolayers measured by conducting probe atomic force

microscopy: Unsaturated versus saturated molecular junctions. *J Phys Chem B* 2002;106:2813–6.

- [17] Kerker M, Wang D-S, Chew H. Surface enhanced Raman scattering (SERS) by molecules adsorbed at spherical particles. *Appl Opt* 1980;19:3373–88.
- [18] Enoch S, Bonod N. *Plasmonics: from basics to advanced topics*. vol. 167. Springer; 2012.
- [19] Maier SA. *Plasmonics: fundamentals and applications*. vol. 1. Springer; 2007.
- [20] Wertheim GK. *Mössbauer effect: principles and applications*. Academic Press; 2013.
- [21] Boyle AJF, Hall HE. The mössbauer effect. *Rep Prog Phys* 1962;25:441.
- [22] Zhang L, Chen P, Loiseau A, Brouri D, Casale S, Salmain M, et al. Spatially controlled reduction and growth of silver in hollow gold nanoshell particles. *J Phys Chem C* 2019;123:10614–21.
- [23] Huang X, Jain PK, El-Sayed IH, El-Sayed MA. Plasmonic photothermal therapy (PPTT) using gold nanoparticles. *Lasers Med Sci* 2008;23:217–28.
- [24] Riley RS, Day ES. Gold nanoparticle-mediated photothermal therapy: applications and opportunities for multimodal cancer treatment. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* 2017;9:e1449.
- [25] Kim S-W, Khang D. Multiple cues on the physiochemical, mesenchymal, and intracellular trafficking interactions with nanocarriers to maximize tumor target efficiency. *Int J Nanomedicine* 2015;10:3989.
- [26] Weber J, Beard PC, Bohndiek SE. Contrast agents for molecular photoacoustic imaging. *Nat Methods* 2016;13:639–50. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3929>.
- [27] Scholkmann F, Kleiser S, Metz AJ, Zimmermann R, Mata Pavia J, Wolf U, et al. A review on continuous wave functional near-infrared spectroscopy and imaging instrumentation and methodology. *NeuroImage* 2014;85:6–27. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2013.05.004>.
- [28] Li N, Zhao P, Astruc D. Anisotropic gold nanoparticles: synthesis, properties, applications, and toxicity. *Angew Chem Int Ed* 2014;53:1756–89.
- [29] Chen X, Li T, Shen J, Hu Z. Fractal design of microfluidics and nanofluidics—A review. *Chemom Intell Lab Syst* 2016;155:19–25.
- [30] McDONALD DM, Thurston G, Baluk P. Endothelial gaps as sites for plasma leakage in inflammation. *Microcirculation* 1999;6:7–22.
- [31] Danquah MK, Zhang XA, Mahato RI. Extravasation of polymeric nanomedicines across tumor vasculature. *Adv Drug Deliv Rev* 2011;63:623–39.

- [32] Matsumura Y, Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res* 1986;46:6387–92.
- [33] Prabhakar U, Maeda H, Jain RK, Sevick-Muraca EM, Zamboni W, Farokhzad OC, et al. Challenges and Key Considerations of the Enhanced Permeability and Retention Effect for Nanomedicine Drug Delivery in Oncology. *Cancer Res* 2013;73:2412–7.
- [34] Wu J. The enhanced permeability and retention (EPR) effect: The significance of the concept and methods to enhance its application. *J Pers Med* 2021;11:771.
- [35] Xie X, Zhang Y, Li F, Lv T, Li Z, Chen H, et al. Challenges and opportunities from basic cancer biology for nanomedicine for targeted drug delivery. *Curr Cancer Drug Targets* 2019;19:257–76.
- [36] Marshansky V, Futai M. The V-type H⁺-ATPase in vesicular trafficking: targeting, regulation and function. *Curr Opin Cell Biol* 2008;20:415–26.
- [37] Kinchen JM, Ravichandran KS. Phagosome maturation: going through the acid test. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9:781–95. <https://doi.org/10.1038/nrm2515>.
- [38] Stern ST, Adisheshaiah PP, Crist RM. Autophagy and lysosomal dysfunction as emerging mechanisms of nanomaterial toxicity. *Part Fibre Toxicol* 2012;9:1–17.
- [39] Soo Choi H, Liu W, Misra P, Tanaka E, Zimmer JP, Ito I, et al. Renal clearance of quantum dots. *Nat Biotechnol* 2007;25:1165–70.
- [40] Chen H, Wang GD, Tang W, Todd T, Zhen Z, Tsang C, et al. Gd-encapsulated carbonaceous dots with efficient renal clearance for magnetic resonance imaging. *Adv Mater* 2014;26:6761–6.
- [41] Benezra M, Penate-Medina O, Zanzonico PB, Schaer D, Ow H, Burns A, et al. Multimodal silica nanoparticles are effective cancer-targeted probes in a model of human melanoma. *J Clin Invest* 2011;121:2768–80.
- [42] Soo Choi H, Liu W, Misra P, Tanaka E, Zimmer JP, Ito I, et al. Renal clearance of quantum dots. *Nat Biotechnol* 2007;25:1165–70.
- [43] Chen J, Ning C, Zhou Z, Yu P, Zhu Y, Tan G, et al. Nanomaterials as photothermal therapeutic agents. *Prog Mater Sci* 2019;99:1–26.
- [44] Abadeer NS, Murphy CJ. Recent progress in cancer thermal therapy using gold nanoparticles. *Nanomater Neoplasms* 2021:143–217.
- [45] Dewhirst MW, Prosnitz L, Thrall D, Prescott D, Clegg S, Charles C, et al. Hyperthermic treatment of malignant diseases: current status and a view toward the future. *Semin. Oncol.*, vol. 24, 1997, p. 616–25.
- [46] Urano M. Invited review: for the clinical application of thermochemotherapy given at mild temperatures. *Int J Hyperthermia* 1999;15:79–107.

- [47] Gougeon M-L. Apoptose et virus: les voies de signalisation de la mort cellulaire et les stratégies virales mises en jeu pour moduler ces voies. *Virologie* 2001;5:347–60.
- [48] Pérez-Hernández M, Del Pino P, Mitchell SG, Moros M, Stepien G, Pelaz B, et al. Dissecting the molecular mechanism of apoptosis during photothermal therapy using gold nanoprisms. *ACS Nano* 2015;9:52–61.
- [49] Aliannezhadi M, Minbashi M, Tuchin VV. Effect of laser intensity and exposure time on photothermal therapy with nanoparticles heated by a 793-nm diode laser and tissue optical clearing. *Quantum Electron* 2018;48:559.
- [50] Brown SL, Hunt JW, Hill RP. Differential thermal sensitivity of tumour and normal tissue microvascular response during hyperthermia. *Int J Hyperthermia* 1992;8:501–14.
- [51] Ren Y, Qi H, Chen Q, Ruan L. Thermal dosage investigation for optimal temperature distribution in gold nanoparticle enhanced photothermal therapy. *Int J Heat Mass Transf* 2017;106:212–21.
- [52] Sapareto SA, Dewey WC. Thermal dose determination in cancer therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1984;10:787–800.
- [53] Falk MH, Issels RD. Hyperthermia in oncology. *Int J Hyperthermia* 2001;17:1–18.
- [54] Paul G, Chopkar M, Manna I, Das PK. Techniques for measuring the thermal conductivity of nanofluids: A review. *Renew Sustain Energy Rev* 2010;14:1913–24. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2010.03.017>.
- [55] Usamentiaga R, Venegas P, Guerediaga J, Vega L, Molleda J, Bulnes FG. Infrared Thermography for Temperature Measurement and Non-Destructive Testing. *Sensors* 2014;14:12305–48. <https://doi.org/10.3390/s140712305>.
- [56] Modest MF. Radiative heat transfer. Third Edition. New York: Academic Press; 2013.
- [57] Möllmann K-P, Pinno F, Vollmer M. Selected Critical Applications for Thermography: Convections in Fluids, Selective Emitters and Highly Reflecting Materials 2005.
- [58] Howell JR, Menguc MP, Siegel R. Thermal Radiation Heat Transfer. 5th ed. Boca Raton: CRC Press; 2010. <https://doi.org/10.1201/9781439894552>.
- [59] Standard Test Methods for Measuring and Compensating for Emissivity Using Infrared Imaging Radiometers n.d.
- [60] 14:00-17:00. ISO 18434-1:2008. ISO n.d. <https://www.iso.org/cms/render/live/en/sites/isoorg/contents/data/standard/04/16/41648.html> (accessed August 16, 2022).
- [61] Becker F, Li Z. Surface temperature and emissivity at various scales: Definition, measurement and related problems. *Remote Sens Rev* 1995;12:225–53. <https://doi.org/10.1080/02757259509532286>.
- [62] Incropera FP, Incropera FP, editors. Fundamentals of heat and mass transfer. 6th ed. Hoboken, NJ: John Wiley; 2007.

- [63] Roper DK, Ahn W, Hoepfner M. Microscale heat transfer transduced by surface plasmon resonant gold nanoparticles. *J Phys Chem C* 2007;111:3636–41.
- [64] Richardson HH, Carlson MT, Tandler PJ, Hernandez P, Govorov AO. Experimental and Theoretical Studies of Light-to-Heat Conversion and Collective Heating Effects in Metal Nanoparticle Solutions. *Nano Lett* 2009;9:1139–46. <https://doi.org/10.1021/nl8036905>.
- [65] Wang X, Li G, Ding Y, Sun S. Understanding the photothermal effect of gold nanostars and nanorods for biomedical applications. *RSC Adv* 2014;4:30375–83.
- [66] Das R, Rinaldi-Montes N, Alonso J, Amghouz Z, Garaio E, Garcia JA, et al. Boosted hyperthermia therapy by combined AC magnetic and photothermal exposures in Ag/Fe₃O₄ nanoflowers. *ACS Appl Mater Interfaces* 2016;8:25162–9.
- [67] Skinner MG, Iizuka MN, Kolios MC, Sherar MD. A theoretical comparison of energy sources-microwave, ultrasound and laser-for interstitial thermal therapy. *Phys Med Biol* 1998;43:3535.
- [68] Nau WH, Roselli RJ, Milam DF. Effect of thermal changes on optical properties in fresh and previously frozen prostate tissue. *Lasers Surg. Adv. Charact. Ther. Syst. VII*, vol. 2970, SPIE; 1997, p. 476–83.
- [69] Ciancone M. Complexes de métal-bis(dithiolène) pour la théranostique du cancer : thérapie photothermique, délivrance photocontrôlée de principes actifs et propriétés photoacoustiques. Thèse de doctorat. Rennes 1, 2019.
- [70] Paściak A, Marin R, Abiven L, Pilch-Wróbel A, Misiak M, Xu W, et al. Quantitative Comparison of the Light-to-Heat Conversion Efficiency in Nanomaterials Suitable for Photothermal Therapy. *ACS Appl Mater Interfaces* 2022;14:33555–66. <https://doi.org/10.1021/acsami.2c08013>.
- [71] Paściak A, Pilch-Wróbel A, Marciniak Ł, Schuck PJ, Bednarkiewicz A. Standardization of Methodology of Light-to-Heat Conversion Efficiency Determination for Colloidal Nanoheaters. *ACS Appl Mater Interfaces* 2021;13:44556–67. <https://doi.org/10.1021/acsami.1c12409>.
- [72] Wang LV. Tutorial on photoacoustic microscopy and computed tomography. *IEEE J Sel Top Quantum Electron* 2008;14:171–9.
- [73] Krumholz A, VanVickle-Chavez SJ, Yao J, Fleming TP, Gillanders WE, Wang LV. Photoacoustic microscopy of tyrosinase reporter gene in vivo. *J Biomed Opt* 2011;16:080503–080503.
- [74] Zhu Y, Feng T, Cheng Q, Wang X, Du S, Sato N, et al. Towards clinical translation of LED-based photoacoustic imaging: a review. *Sensors* 2020;20:2484.
- [75] Banfi F, Juvé V, Nardi D, Dal Conte S, Giannetti C, Ferrini G, et al. Temperature dependence of the thermal boundary resistivity of glass-embedded metal nanoparticles. *Appl Phys Lett* 2012;100:011902.

Chapitre 2 : Spectroscopie Photoacoustique

Nous avons développé un montage de photoacoustique permettant de mesurer l'absorption optique d'une solution *in vitro*. Le montage de photoacoustique développé est utilisé pour répondre à la problématique de caractérisation d'agents photothermiques. Les mesures obtenues grâce au montage photoacoustique peuvent être intégrées aux équations thermodynamiques développées dans le Chapitre 1, Partie III.B, pour déterminer les propriétés optiques des agents photothermiques. Cela peut servir à caractériser de potentiels agents photothermiques innovants et à valider leur efficacité. Ce montage permet d'étudier l'absorption optique d'échantillons dont le solvant principal est l'eau à l'aide d'impulsions lumineuses générant des ondes sonores. L'utilisation de l'eau comme solvant assure une estimation correcte de l'efficacité de la conversion photothermique via le coefficient de Grüneisen. En outre, le montage expérimental nous permet d'obtenir une mesure de l'absorption décadique μ_{10}^{PA} que l'on définit comme :

$$\mu_{10}^{PA}(\lambda) \cdot \ln(10) = \frac{\Gamma(\lambda)_{\text{échantillon}}}{\Gamma(\lambda)_{\text{eau}}} \cdot Ept(\lambda) \cdot \mu_a(\lambda) \quad (2.1)$$

$$\mu_{10}^{PA}(\lambda) = Ept(\lambda) \cdot \frac{\Gamma(\lambda)_{\text{échantillon}}}{\Gamma(\lambda)_{\text{eau}}} \cdot \mu_{a,10}(\lambda) \approx Ept(\lambda) \cdot \mu_{a,10}(\lambda) \quad (2.2)$$

En première approximation, on peut supposer que le coefficient de Grüneisen de l'échantillon est égal à celui de l'eau pour les solutions diluées.

Avec

$$\mu_{a,10}(\lambda) = \frac{\Gamma(\lambda)_{\text{échantillon}}}{\Gamma(\lambda)_{\text{eau}}} \cdot \frac{\mu_a(\lambda)}{\ln(10)} \quad (2.3)$$

et

$$\mu_{10}^{PA}(\lambda) = \frac{\mu^{PA}(\lambda)}{\ln(10)} \quad (2.4)$$

Ces mesures sont obtenues grâce à une solution de calibration (CuSO₄). L'avantage de ce montage est aussi d'utiliser des très petits volumes d'échantillon (15 μ L). Ces échantillons sont injectés dans des tubes de PTFE et illuminés par un laser à impulsion nanoseconde (pulses laser de durée inférieure à 8 ns et de fréquence de 20 Hz). Le laser est capable de balayer une plage de longueur d'onde allant de 680 à 980 nm. Comme expliqué dans le Chapitre 1 Partie VI.B, l'énergie optique va être transformée en onde acoustique par effet photoacoustique. Cette onde ultrasonore va ensuite être récupérée par une sonde échographique commerciale. Pour la mesure, on effectue 15 balayages successifs des longueurs d'onde pour ensuite calculer la moyenne pour chaque longueur d'onde. Ce processus permet d'augmenter le ratio signal sur bruit de la mesure. De plus, elle permet d'avoir un contrôle sur une potentielle photo dégradation des nanoparticules étudiées. Après la mesure du « blank » (soustraction du

blanc), beamforming (formation de l'image) et extraction de l'amplitude de chaque tube comme détaillé dans l'article, on obtient un spectre d'absorption de l'échantillon. Cela permet d'évaluer de manière plus précise, par la suite, l'efficacité de conversion lumière-chaueur en négligeant la partie de l'atténuation due à la diffusion optique. En effet, pour un échantillon non fluorescent, nous sommes capables de comparer, en fonction d'une solution de référence, l'efficacité de conversion lumière-chaueur. La méthode de spectroscopie photoacoustique que nous avons développée est décrite dans « *Calibrated Photoacoustic Spectrometer Based on a Conventional Imaging System for In Vitro Characterization of Contrast Agents* » publié dans *Sensors* 2022, no. 17. Les noms de variables utilisés sont spécifiques à cet article. On notera η l'efficacité de génération photoacoustique (PGE) uniquement pour ce chapitre 2. De plus le coefficient d'absorption décrit dans l'article est exprimé en logarithme népérien et non en logarithme décimal (puissance de 10).

Calibrated Photoacoustic Spectrometer Based on a Conventional Imaging System for In Vitro Characterization of Contrast Agents

Théotim Lucas ^{1,2,†}, Mitradeep Sarkar ^{3,†}, Yoann Atlas ¹, Clément Linger ^{1,4}, Gilles Renault ⁵, Florence Gazeau ²
and Jérôme Gateau ^{1,*}

¹ Laboratoire d'Imagerie biomédicale, Sorbonne Université, CNRS, INSERM, LIB, 75006 Paris, France

² Matière et Systèmes Complexes, Université Paris Cité, CNRS, MSC, 75006 Paris, France

³ Paris Cardiovascular Research Center, Université Paris Cité, INSERM, PARCC, 75015 Paris, France

⁴ Institut Galien Paris-Saclay, Université Paris-Saclay, CNRS, IGPS, 91400 Orsay, France

⁵ Institut Cochin, Université Paris Cité, INSERM, CNRS, 75014 Paris, France

* Correspondence: jerome.gateau@sorbonne-universite.fr; Tel.: +33-144272265

† These authors contributed equally to this work.

Abstract: Photoacoustic (PA) imaging systems are spreading in the biomedical community, and the development of new PA contrast agents is an active area of research. However, PA contrast agents are usually characterized with spectrophotometry or uncalibrated PA imaging systems, leading to partial assessment of their PA efficiency. To enable quantitative PA spectroscopy of contrast agents *in vitro* with conventional PA imaging systems, we have developed an adapted calibration method. Contrast agents in solution are injected in a dedicated non-scattering tube phantom imaged at different optical wavelengths. The calibration method uses a reference solution of cupric sulfate to simultaneously correct for the spectral energy distribution of excitation light at the tube location and perform a conversion of the tube amplitude in the image from arbitrary to spectroscopic units. The method does not require any precise alignment and provides quantitative PA spectra, even with non-uniform illumination and ultrasound sensitivity. It was implemented on a conventional imaging setup based on a tunable laser operating between 680 nm and 980 nm and a 5 MHz clinical ultrasound array. We demonstrated robust calibrated PA spectroscopy with sample volumes as low as 15 μ L of known chromophores and commonly used contrast agents. The validated method will be an essential and accessible tool for the development of new and efficient PA contrast agents by improving their quantitative characterization.

Keywords: calibration; quantitative photoacoustic spectroscopy; contrast agents

1. Introduction

Photoacoustic imaging (PAI) is an emerging multi-wave biomedical imaging modality able to reveal molecular information at centimeter depths in biological tissues and with sub-millimeter resolution [10]. PAI is based on the photoacoustic (PA) effect: optically absorbing materials emit ultrasound waves when excited with transient illumination. The ultrasound waves are generated by thermoelastic expansion, and their amplitude is proportional to the absorbed optical energy at the excitation wavelength. Therefore, successive acquisitions of PA images at different optical wavelengths may allow spectral discrimination and quantification of the various absorbers in the imaged region [11].

To enhance this hybrid imaging modality beyond the information provided by endogenous absorbers such as hemoglobin, the injection of absorbing exogenous contrast agents is often required [12]. Recently, the material science community has shown a growing interest in the development of novel PA contrast agents [13,14], resulting in a strong need for techniques able to characterize them in terms of effective PA spectra and efficiency to generate ultrasound. Spectrophotometry (SPP), based on the transmission of light by a sample, usually measures the optical attenuation: the sum of losses due to the absorption and the scattering of light. However, the latter does not contribute to PA signal

generation. Moreover, SPP does not account for the photophysical and thermoelastic processes that occur during optical absorption and the subsequent ultrasound pressure generation.

For many of the developed PA contrast agents, the *in vivo* detectability with PAI is demonstrated using commercial PAI systems or conventional prototypes. Therefore, PAI systems are available to many research groups and could be advantageously used to perform a more quantitative *in vitro* PA characterization of the agents than with SPP. Commercial PAI systems [15,16] have already been proposed to measure the PA spectral response of contrast agents. However, no calibration was performed for such systems, leading to PA spectral assessments in arbitrary units. On the other hand, dedicated calibrated PA spectrometers have also been developed. However, they do not use a PAI system and therefore require a specific instrument. Beard et al. [17–20] developed a PA spectrometer able to measure the absolute optical absorption coefficient by fitting an analytic expression to the photoacoustically generated ultrasound signal. Furthermore, photoacoustic specific coefficients could be calculated with this system: the photothermal conversion efficiency E_{pt} , which represents the conversion efficiency of the absorbed optical energy to heat, and the Grüneisen coefficient Γ (relative to water), which describes the conversion of the heat energy to the initial pressure rise resulting in the ultrasound waves. However, this PA spectrometer requires large sample volumes (mL) and a specific ultrasound detector with a very broadband and flat frequency response to correctly resolve the ultrasound waveform [19]. Other PA spectrometers based on dedicated single-element detectors place fewer constraints related to the ultrasound frequency response of the detector. They evaluate the optical absorption coefficient using calibration with a known reference solution [21,22]. For these PA spectrometers, small sample volumes (3 μL [22] and 200 μL [21]) are placed in optically transparent cells, and SPP is performed on the same sample to concurrently measure the optical attenuation.

We have developed and we present herein a calibration method using a reference solution to transform a conventional multispectral PAI system into a calibrated PA spectrometer for the *in vitro* characterization of PA contrast agents. We implemented the method in a conventional configuration for PAI [23,24]: a clinical linear ultrasound detector array with light delivered from the side. For PA contrast agent characterization, small sample volumes (15 μL) were injected in tubes whose diameter was chosen such that the ultrasound emission matches the frequency bandwidth of the detector. We demonstrate that our simple experimental setup enables robust calibrated spectroscopic measurements of photoacoustic contrast agents.

2. Materials and Methods

2.1. Experimental Setup and Data Acquisition

The experimental setup is presented in Figure 1a. It is comprised of a sample compartment and a conventional multispectral PAI system.

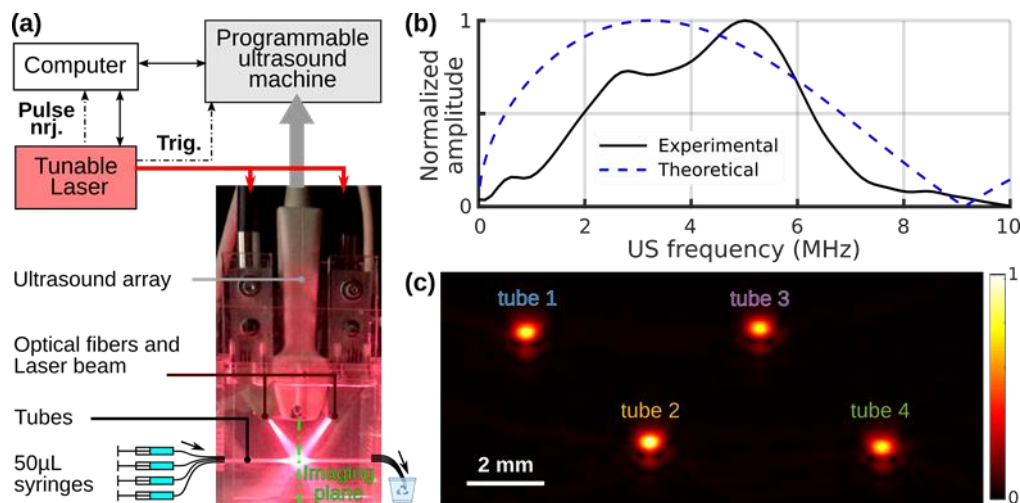


Figure 1. Experimental setup: (a) Annotated picture of the PAI system and schematic drawing of the experimental setup. The imaging plane of the array is perpendicular to the picture plane and perpendicular to the tubes. The laser beam was especially made visible for the picture with dust particles added in the water bath. (b) Experimental

and theoretical frequency spectra of the PA-generated ultrasound signal. The experimental ultrasound spectrum was acquired with a tube filled with the calibration solution at 710 nm. The theoretical spectrum corresponds to Equation (A1). The spectra are normalized to their maximum values. (c) Image of 4 tubes filled with the calibration solution.

2.1.1. Sample Compartment

The sample compartment consists of 50 cm long polytetrafluoroethylene (PTFE) tubes (inner diameter: 0.2 mm, wall thickness: 0.1 mm, Bola, Germany). PTFE (Teflon) is hydrophobic and chemically inert; therefore, PTFE tubes are well adapted to contain aqueous solution of PA contrast agents. Moreover, PTFE was shown to have a weak optical absorption in the near infrared (NIR) [25] to avoid strong background PA signals. The tubes were threaded through holes of two parallel perforated plates located 8 cm apart. The tubes were arranged to be parallel one to the other. Up to four tubes were positioned in the sample holder to perform simultaneous data acquisition (Figure 1c). The tubes were positioned in a staggered arrangement instead of an in-line arrangement to avoid both optical shadowing and interferences of the emitted ultrasound waves at the detector surface. To ensure a good spatio-temporal separation of the ultrasound signals from each tube and thereby independent measurements, a distance of at least 4 mm between the tubes was arbitrarily chosen here. This distance may be reduced for a higher number of tubes. The tubes were immersed in a water tank (ultrapure water, resistivity 18 M Ω -cm, Purelab Option Q, ELGA LabWater) at room temperature to ensure acoustic coupling between the samples and the ultrasound detector of the PAI system. The two ends of each tube were kept out of the water tank to inject and collect the measured samples, respectively. The inner volume of each tube was 15 μ L, and the tubes were filled using a 33-gauge needle and a 50 μ L gas-tight syringe (Hamilton). A thermometer (HI98509, Hanna instruments, Lingolsheim, France) was used to monitor the temperature of the water bath with a precision of ± 0.2 $^{\circ}$ C. The temperature of the bath had a maximum variation range of 1 $^{\circ}$ C for each series of measurement.

2.1.2. The Conventional PAI System

A tunable (680–980 nm) optical parametric oscillator laser (SpitLight 600 OPO, Innolas Laser GmbH, Krailling, Germany) delivering < 8 ns pulses with a pulse repetition frequency of 20 Hz was used to generate the optical excitation. The tuning range corresponds to the first optical window in biological tissue and to the near-infrared wavelength range typically used in PA tomography. Ultrasound was detected with a 128-element clinical linear array (L7-4, 5 MHz center frequency, bandwidth 4–7 MHz, ATL) driven by a programmable ultrasound machine used in receive-only mode (Vantage, Verasonics, WA, USA). A bifurcated fiber bundle (CeramOptec GmbH, Bonn, Germany) guided the light toward the fixed elevational focus of the ultrasound array (located at 25 mm from the surface of the detector) and delivered light over the entire length of the array. The tubes containing the samples were placed perpendicularly to the imaging plane of the ultrasound detector and near the elevational focus for higher sensitivity. Therefore, the intersection of the imaging plane with each tube was a disk. The illuminated length (perpendicular to the imaging plane) was around 1.5 cm. Figure 1b shows that the ultrasound frequency bandwidth of the detector (4–7 MHz) is fully included in the main peak of the ultrasound spectrum generated by one tube (Appendix A). Then, the detection sensitivity is high for this sample container.

The mean fluence at the elevational focus was estimated to be around 4 mJ.cm $^{-2}$ at 730 nm (wavelength at which the laser has the maximum pulse energy). This estimation was performed in air by dividing the laser energy per pulse (Pyroelectric Energy sensor ES245C, Thorlabs, Newton, NJ, USA) by the area covered by the excitation light in the elevational focal plane (at 25 mm of the detector surface). The fluence was lowered for some samples by reducing the laser energy before injection in the fiber bundle thanks to polarizing optics. Because of broken fibers, the finite length of the outputs of the fiber bundle, and the staggered arrangement of the tubes, the laser fluence was not uniform over the tubes. However, neither the precise knowledge of the laser fluence nor the uniformity of the illumination is required for our method since a calibration procedure is carried out per tube and for each series of PA spectrum measurements.

2.1.3. Measurement Process

For the PA acquisition, each laser pulse triggered (1) an ultrasound acquisition in parallel on all the 128 elements of the detector array and (2) a recording of the pulse energy using a pyrometer incorporated in the laser. The incorporated pyrometer was not calibrated, but it was verified, using an external calibrated pyroelectric energy meter (PE50BF-DIFH-C, Ophir Photonics), that the delivered electric signal was proportional to the pulse energy for each laser pulse at a given wavelength. For a spectroscopic acquisition, measurements were performed successively at different optical wavelengths (λ) over the entire tunable spectral range of the laser and at an acquisition rate of 20 Hz. The per-pulse tunability of the laser was used, and the wavelength sequence was programmed with the laser software interface. The acquisition sequence consisted in recording the ultrasound signals and the corresponding pyrometer values for 15 successive sweeps of 30 wavelengths between 680 nm and 970 nm with a step of 10 nm, for a total of $30 \times 15 = 450$ laser pulses. This swept sequence avoids consecutive excitations at a given wavelength that could induce photodegradation. Any potential changes in the PA spectra of the sample during the acquisition sequence can be detected as the entire spectral range is covered 15 times consecutively. For all samples reported in this paper, the spectra were found to be stable during the experimental sequences. Therefore, iterations at a given wavelength were averaged to increase the signal-to-noise ratio. Before averaging, ultrasound signal amplitudes were simply divided by the corresponding pyrometer value to correct for the pulse-to-pulse energy fluctuations of the laser.

For measurements with a spectrophotometer (SPP), a baseline correction is performed using a “blank” measurement obtained by filling the sample compartment with the solvent. In a similar manner, for our PA spectrometer, a blank dataset was acquired with the tubes filled with ultrapure water (or the solvent when available). For baseline correction and suppression of the background signal of the tubes, the blank dataset was coherently subtracted from the averaged signals of the tube filled with the sample (subtraction of the radio-frequency signals). Thereby, the effective signals from the contrast-agent sample were isolated. During a series of measurements, blank datasets were recorded on a regular basis (between two different samples) to ensure an accurate correction and, at the same time, to verify that the tube was not polluted by a sample (comparison with a previous blank dataset to check for sample-induced persistent absorption). Following the baseline correction, the Hilbert transform of the corrected signals was computed to obtain quadrature signals. The in-phase signals and quadrature signals were beamformed independently using a simple delay-and-sum image reconstruction algorithm to yield two images. The speed of sound in the water bath was estimated using the measured temperature [26]. Then, an envelope-detected image was computed from the root-mean square of the two images for each pixel. The envelope-detected image of a sample injected in four tubes is presented in Figure 1c. Each tube appeared as a Gaussian spot, and its amplitude $A^{PA}(\lambda)$ was determined using a 2D Gaussian fit. $A^{PA}(\lambda)$ depends on the tube, the sample, and the optical wavelength λ .

2.2. Calibrated Measurements with the PA Spectrometer

The calibration of the PA spectrometer aims at retrieving a PA spectrum $\theta^{PA}(\lambda)$ in the spectroscopic units of the absorption coefficient $\mu_a(\lambda)$, typically cm^{-1} , from $A^{PA}(\lambda)$, while avoiding any tedious calibration of the ultrasound detector, determination of the light fluence distribution, or any precise alignment. We base our calibration process on a calibration per sample container and per acquisition series using a calibration solution injected in the tube prior to the samples in the series of measurements.

2.2.1. The Photoacoustic Coefficient of a Sample $\theta^{PA}(\lambda)$

For the laser pulse width and the dimension of the tube used here, the thermal and stress confinement regimes are satisfied [27]. Therefore, the thermal expansion of the sample inside the tube is expected to cause a pressure rise p_0 proportional to the absorption coefficient $\mu_a(\lambda)$ of the sample:

$$p_0(\lambda) = \Phi(\lambda) \cdot \Gamma_{water} \cdot \eta_{sample}(\lambda) \cdot \mu_a(\lambda), \quad (1)$$

where $\Phi(\lambda)$ is the local light fluence at the tube location for the wavelength λ , and Γ_{water} is the Grüneisen coefficient of water. Water is the main constituent of the aqueous solutions used here. η_{sample} is the dimensionless photoacoustic generation efficiency (PGE) of the sample. It corresponds to the efficiency of the PA pressure generation compared to a sample for which the absorbed energy is fully converted into pressure in a medium with the Grüneisen coefficient of the water. According to the conventional photoacoustic theory [28], η_{sample} can be expressed as:

$$\eta_{sample}(\lambda) = E_{pt,sample}(\lambda) \cdot \Gamma_{sample} / \Gamma_{water}, \quad (2)$$

where $E_{pt,sample}$ and Γ_{sample} are the photothermal conversion efficiency and the Grüneisen coefficient of the sample solution, respectively. The photothermal conversion efficiency $E_{pt,sample}$ is the ratio of the energy effectively converted into a thermal increase of the solution (and subsequently to production of ultrasound waves) to the total absorbed optical energy. $E_{pt,sample}$ may be inferior to 1, due to various competitive pathways [18]. For molecular absorbers, fluorescence and other energy-transfer mechanisms [21] can attenuate the conversion efficiency. A realistic value for the Grüneisen coefficient of water taken from the literature is $\Gamma_{water} = 0.12$ at 22 °C [29], but the presence of solute and salts may increase the Grüneisen coefficient Γ_{sample} of the aqueous solution.

In our experimental setup, $\Phi(\lambda)$ and Γ_{water} are independent of the sample placed in the tube. Therefore, the sample-dependent factors of Equation (1) can be isolated in a quantity $\theta^{PA}(\lambda)$, named here the PA coefficient of the sample:

$$\theta^{PA}(\lambda) = \eta_{sample}(\lambda) \cdot \mu_a(\lambda), \quad (3)$$

The photoacoustic coefficient corresponds to the optical absorption coefficient of the sample, restricted to the absorption effectively transferred into heat to the surroundings of the absorbing agent and corrected for the potentially modified Grüneisen coefficient compared to the main solvent: water.

For non-scattering solutions, the absorption coefficient $\mu_a(\lambda)$ is equal to the attenuation coefficient $\mu^{SPP}(\lambda)$ and can be directly measured with spectrophotometry (SPP) in transmission mode. Using the measured absorbance $Abs^{SPP}(\lambda)$ of a solution, $\mu^{SPP}(\lambda)$ was obtained with the following formula:

$$Abs^{SPP}(\lambda) = \frac{\mu^{SPP}(\lambda)}{\ln(10)} \cdot L = \mu_{10}^{SPP}(\lambda) \cdot L, \quad (4)$$

where $L = 1$ cm is the length of the SPP cuvette, and \ln is the natural logarithm. $\mu_{10}^{SPP}(\lambda)$ is the decadic absorption coefficient.

2.2.2. Theoretical Relationship between A^{PA} and $\theta^{PA}(\lambda)$

The amplitude of the ultrasound signal recorded with the ultrasound system is proportional to the pressure rise p_0 generated in the illuminated tube. Moreover, the “delay and sum” image reconstruction process used here is linear. Therefore, the amplitude $A^{PA}(\lambda)$ computed from the image is proportional to p_0 . Furthermore, the ultrasound signals were corrected for the pulse-to-pulse energy fluctuations of the laser. Therefore, the theoretical relationship between A^{PA} and $\theta^{PA}(\lambda)$ can be expressed as:

$$A^{PA}(\lambda) = \nu_{US} \cdot \Phi_{avg}(\lambda) \cdot \nu_{py}(\lambda) \cdot \Gamma_{water} \cdot \theta^{PA}(\lambda) = \delta_{tube}(\lambda) \cdot \theta^{PA}(\lambda), \quad (5)$$

where ν_{US} is a coefficient that accounts for the global conversion of p_0 in the arbitrary units of the beamformed image, $\Phi_{avg}(\lambda)$ is the pulse-average spectral energy distribution of the laser, and $\nu_{py}(\lambda)$ is a coefficient that accounts for the pyrometer spectral sensitivity and the optical attenuation between the laser output and the tube. These factors can be gathered in a proportionality factor $\delta_{tube}(\lambda)$. $\delta_{tube}(\lambda)$ ensures the conversion between the arbitrary units of A^{PA} and the spectroscopic units of $\mu_a(\lambda)$. $\delta_{tube}(\lambda)$ is independent of the sample but dependent of the optical wavelength and of the tube location in the image.

The calibration process consists in assessing $\delta_{tube}(\lambda)$ using a reference solution for which $A^{PA,calibration}(\lambda)$, $\mu_a^{calibration}(\lambda)$, and $\eta_{calibration}(\lambda)$ have been predetermined:

$$\delta_{tube}(\lambda) = A_{calibration}^{PA}(\lambda) / \left(\eta_{calibration}(\lambda) \cdot \mu_a^{calibration}(\lambda) \right), \quad (6)$$

Each series of measurements started and ended with two acquisitions with the calibration solution per tube. $\tilde{A}^{PA,calibration}(\lambda)$ was computed as the median value over the four acquisitions.

The choice of the calibration solution is presented in Section 2.3.2. We chose a calibration solution for which $\eta_{calibration}$ is independent of the optical wavelength. However, the determination of $\eta_{calibration}$ was not straightforward. Without prior knowledge of $\eta_{calibration}$, the following quantities were computed:

$$\psi^{PA}(\lambda) = \frac{A^{PA}(\lambda)}{\tilde{A}_{calibration}^{PA}(\lambda)} \quad (7)$$

and

$$\xi^{PA}(\lambda) = \psi^{PA}(\lambda) \cdot \mu_a^{calibration}(\lambda) = \frac{\theta^{PA}(\lambda)}{\eta_{calibration}} \quad (8)$$

For the sake of clarity, the notations of the different computed quantities are summarized in Figure 2 and listed in Table 1.

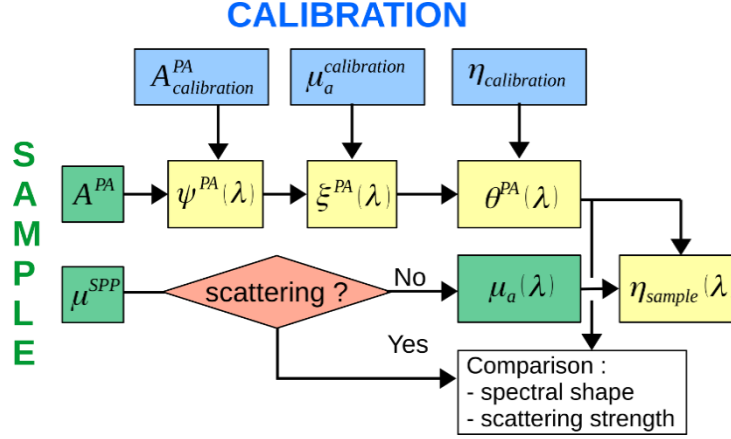


Figure 2. Diagram summarizing the computed quantities and their relationship to the measurements performed with the calibration solution and the sample solution. The symbols are listed in Table 1.

Table 1. List of symbols.

Symbol	Name	Corresponding Equation or Section
λ	Optical wavelength	
A^{PA}	Amplitude of one tube in the image	Section 2.1.3
μ^{SPP}	Attenuation coefficient	Section 2.2.1
μ_a	Absorption coefficient	
η	Photoacoustic generation efficiency	Equation (2)
θ^{PA}	Photoacoustic coefficient	Equation (3)
ψ^{PA}		Equation (7)
ξ^{PA}		Equation (8)
γ	Fitting coefficient between ψ^{PA} and 1	Section 3.1
α	Fitting coefficient between ξ^{PA} and μ_a	Equation (12)

2.2.3. Statistical Evaluation

Typically, 2 to 3 acquisitions in 4 tubes were performed to reach 8 to 12 measurements of the PA spectrum per sample. The median of the computed quantity was used as an estimate to avoid outliers due to possible injection errors. The median estimate was notated:

$$\tilde{X} = \text{median}(X) \quad (9)$$

For the evaluation of the measurement error, we used the median absolute deviation MAD, defined as:

$$\text{MAD}(X) = 1.4826 \cdot \text{median}(|X - \tilde{X}|) \quad (10)$$

The scale factor ensures that the value of MAD is comparable with the value of the standard deviation if the X values are normally distributed.

When expected values are known, the median relative error (MRE) was computed. For example, ξ^{PA} is expected to be equal to $\mu_a^{calibration}$ for an acquisition corresponding to the calibration solution. The MRE is defined as:

$$\text{MRE}(\xi^{PA}(\lambda), \mu_a(\lambda)) = \frac{1}{\mu_a(\lambda)} \cdot 1.4826 \cdot \text{median}(|\xi^{PA}(\lambda) - \mu_a(\lambda)|) \quad (11)$$

2.3. Preparation of the Absorbing Solutions

All solutions were prepared at room temperature. Two different groups of solutions were prepared: non-fluorescent and non-scattering molecular solutions and commonly used PA contrast agents, which are either fluorescent or scattering.

2.3.1. Non-Fluorescent and Non-Scattering Molecular Solutions

Three different water-soluble molecular absorbers with a photothermal conversion efficiency E_p that can be assumed to be equal to 1 were selected for the characterization of the PA spectrometer: cupric sulfate pentahydrate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, ACS reagent, $\geq 98.0\%$, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), nickel sulfate hexahydrate ($\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, ACS reagent, $\geq 98.0\%$, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), and nigrosin (Nigrosin, 198285, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). These compounds absorb in the investigated optical range 680–970 nm. The assumption of $E_{pt} = 1$ means that all the absorbed optical energy is transferred to the solution into heat. To the best of our knowledge, there is no other de-excitation pathway for these compounds. For $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ and $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, the assumption of $E_{pt} = 1$ has previously been reported for aqueous solutions of copper (II) chloride and nickel(II) chloride [18]. Nigrosin is non-fluorescent dye that was used to provide controlled optical absorption to tissue mimicking phantoms [30]. Nigrosin was excited away from its absorption peak, which is around 570 nm, and was found to be photostable.

Stock solutions were prepared to obtain a maximum absorption coefficient around $\mu_a = 7 \text{ cm}^{-1}$ in the wavelength range 680–970 nm. The stock solutions were prepared by adding crystals or powder in a 50.0 mL volumetric glass flask. The mass for each compound is given in Table 2. The flask was gradually filled with ultrapure water (resistivity 18 $\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$, Purelab Option Q, ELGA LabWater) to dissolve the crystals/powder and obtain an accurate concentration. We observed a volume contraction when dissolving the sulfate crystals. Dilutions of the stock solution were performed to prepare percent solutions (v/v %): 100%, 80%, 60%, 40%, and 20%. A mix solution, named mix- SO_4 , was also prepared, consisting of 30% (v/v) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ stock solution, 30% $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ stock solution, and 40% water. Mixtures of the sulfate solutions with the nigrosin solution were found to form a precipitate and were not used.

Table 2. Parameters for the stock solutions.

Compound	Mass of Solid for 50.0 mL of Solution	Molar Mass	Molar Concentration	Wavelength (λ_{max}) at the Absorption Maximum ¹	Molar Absorptivity at λ_{max}	Relative Range ² of μ_a
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	3.12 g (crystals)	249.69 g/mol	250 mM	810 nm	12 $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$	0.7
$\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	18.00 g (crystals)	262.85 g/mol	1.37 M	720 nm	2.2 $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$	1.9
Nigrosin	12 mg (powder)	202.21 g/mol	1.2 mM	680 nm	$\sim 2 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$	1.5

¹ The values are within the range of optical wavelengths 680–970 nm. ² The relative range is ratio of the variation range (absolute difference between the maximum and minimum values) to the mean value.

The compounds have similar low molar mass (Table 2) and are water soluble at the prepared concentrations. Therefore, the solutions were not optically scattering. The absorption coefficients of all the prepared solutions were obtained with Equation (4), and the optical absorbance spectra were measured with a UV-Vis-NIR spectrophotometer (Cary 6000i, Varian, Walnut Creek, CA, USA) in transmission mode. Figure 3 displays the absorption coefficients of the stock solutions.

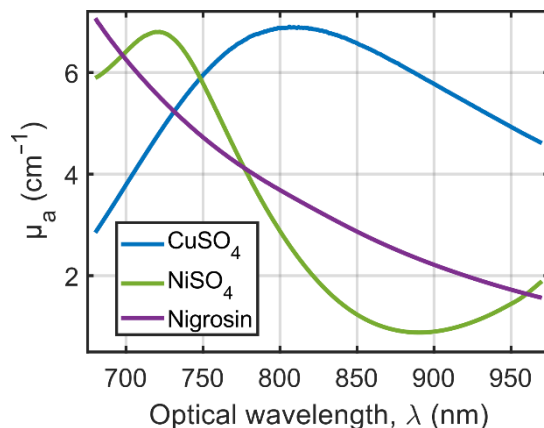


Figure 3. Optical absorption spectra of the stock solutions in the optical range 680–970 nm. The blank measurement was performed with ultrapure water.

2.3.2. Choice of the Calibration Solution

The calibration solution was chosen within the three non-fluorescent and non-scattering molecular solutions described in Section 2.3.1 so that $\delta_{tube}(\lambda)$ could be computed with Equation (6). Several key features were considered.

The first requirement for the calibration solution is the ability to determine its coefficient of absorption $\mu_a^{calibration}(\lambda)$ with SPP. All three solutions are non-scattering and hence meet this criterion. Second, the calibration solution should have a significant absorption coefficient over the entire investigated spectral range of 680–970 nm to ensure an accurate evaluation of $A^{PA,calibration}(\lambda)$. Figure 3 shows that none of the three compounds has a constant absorption coefficient over the considered range. However, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ can be considered to have the flattest spectrum because it has the lowest relative range of μ_a (ratio of the absolute difference between the maximum and minimum values to the mean value) (Table 2). Third, the calibration solution should be photostable and chemically stable so that the absorption spectrum does not change during the measurement process. Our investigations show that the three compounds meet those criteria. Moreover, inorganic compounds $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ and $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ were shown to have a long-term photostability (no photobleaching) even under exposure to high-power laser pulses [20]. For long-term use, the preparation of the calibration solution should be highly reproducible. The sulfate salts are available commercially with a high chemical purity, which ensures a good reproducibility. However, nigrosin is a mixture of organic dyes, so the variability from one batch to another should be considered. The last requirement is the determination of the PA generation efficiency (PGE) of the calibration solution $\eta_{calibration}$. The photothermal conversion efficiency E_{pt} of the three stock solutions is assumed to be equal to 1, but the Grüneisen coefficient relative to water Γ/Γ_{water} should also be known (Equation (2)). The molar absorptivity of nigrosin allows it to have a dye concentration around 1 mM for the stock solution. Therefore, the contribution of the dye to the Grüneisen coefficient can be neglected to assume that $\eta_{nigrosin} = 1$. For $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ and $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Fonseca et al. [20] reported that Γ/Γ_{water} is wavelength-independent in the range 740 to 1100 nm. However, the molar concentration for the stock solutions was several orders of magnitude larger than for nigrosin (Table 2) and, at these concentrations of sulfate salts, the Grüneisen coefficient significantly differs from Γ_{water} [20]. Fonseca et al. [20] proposed an empirical formula to determine Γ/Γ_{water} of the sulfate solutions. However, we were not able to confirm this empirical formula.

With all these criteria and because cupric sulfate pentahydrate solutions have already been used as a model medium in PAI [20,31], our choice was: (1) to use the stock solution of $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ as the

calibration solution and (2) to determine $\eta_{calibration}$ using measurements performed with solutions of nigrosin.

2.3.3. Commonly Used PA Contrast Agents

The PA spectrometer was tested on two different PA contrast agents based on nanoparticles and dyes, respectively. First, the nanoparticle solution was a commercial dispersion of citrate-capped gold nanorods (GNR) in water (10 ± 2 nm diameter, 42 ± 8 nm length, concentration $35 \mu\text{g}/\text{mol}$, Sigma-Aldrich) with a nominal maximum extinction at 808 nm. The attenuation coefficient $\mu^{SPP}(\lambda)$ was evaluated with SPP (V650, Jasco, Japan) in the wavelength range 680–900 nm. SPP baseline correction and PAI blank datasets were performed with ultrapure water. Due to scattering, μ^{SPP} is expected to differ from μ_a .

For the dye agent, solutions of indocyanine green (ICG, pharmaceutical primary standard, Sigma-Aldrich) at different concentrations were prepared. First, a stock solution was prepared by dissolving 7.4 mg of powder in 1.5 mL of dimethyl sulfoxide (DMSO) (concentration of 6.4 mM). This stock solution was diluted to obtain 5 concentrations of ICG: 5.5, 7, 9, 12, and 15 μM , each in 25.0 mL of solvent. The final solvent composition was 98.9% Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (concentrated $\times 1$ DPBS, Gibco), 1% DMSO, and 0.1% Tween 20 (Sigma-Aldrich). Tween 20 is a non-ionic surfactant that forms micelles and stabilizes the dye [32]. Additionally, a solution at 7 μM of ICG was prepared in a solvent without Tween 20. Since ICG is known to be unstable in aqueous solutions and photosensitive, the solutions were stored in amber glass vials, and PA spectra acquired within 1 h after their preparation. In parallel to the PAI measurements, the absorption coefficients of the solutions $\mu_a(\lambda)$ were measured by SPP (V650) in the wavelength range 680–900 nm. The scattering of the solution was negligible in the spectral range of interest. SPP baseline correction and PAI blank datasets were obtained with the solvent.

3. Results

3.1. Robustness of the Measurements with the Calibration Solution

Robust measurements with the calibration solution are crucial for the reliability of the calibration process. Therefore, the calibration solution itself was used to evaluate the measurement variability.

3.1.1. Measurement Repeatability

The measurement repeatability, under different injection conditions, was evaluated simultaneously in a series of 10 acquisitions. In tube 1 (Figure 1c), the calibration solution was injected before the first acquisition and left untouched for the whole series to assess the intrinsic measurement fluctuations of the system. For tube 2, 50 μL of the calibration solution was injected before each acquisition (without flushing with water and air) to measure the variations due to the injection process. Tube 3 was flushed with air only, and the calibration solution was injected between each acquisition. Flushing with air prevented the mixing of samples corresponding to two successive acquisitions. Finally, tube 4 was cleaned with water and air, and the calibration solution was injected between successive acquisitions.

For each tube, $\tilde{A}_{calibration}^{PA}(\lambda)$ was computed over the 10 acquisitions (Figure 4a). The values depend on the tube, and the variations can be attributed to the spatial heterogeneities of the light distribution and of the ultrasound detection. The wavelength dependency is caused by the spectrum of the calibration solution, the spectral sensitivity of the power meter, and the wavelength-dependent laser power at the fiber input and after propagation in the optical fibers and in water. Then, $\Psi^{PA_i}(\lambda)$ was computed from Equation (7) for each acquisition i . The expected value for $\Psi^{PA_i}(\lambda)$ is one. The median relative error $MRE(\Psi^{PA}(\lambda), 1)$ was calculated for each tube and each wavelength λ according to equation (11) and is displayed in Figure 4b. Additionally, each spectrum Ψ^{PA_i} was fitted to a flat spectrum (of amplitude one for all λ), assuming a direct proportionality. The fitting factor γ_i has an expected value of one. The MRE of γ_i for each tube is shown in Figure 4c.

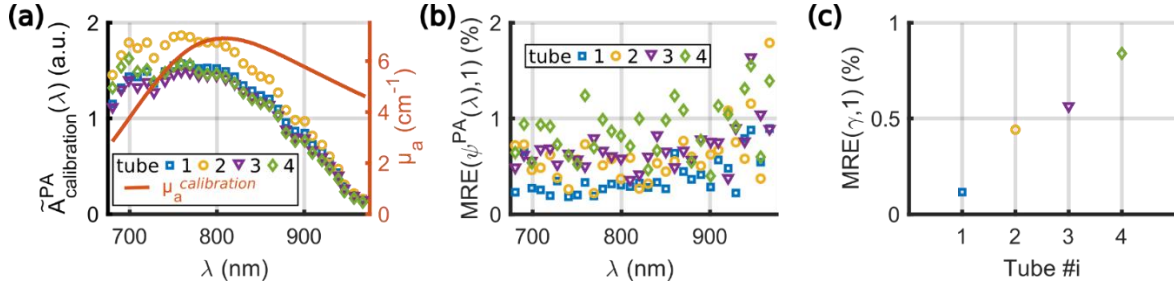


Figure 4. Repeatability of measurements with the calibration solution evaluated with 10 acquisitions. Different experimental conditions were applied for the 4 tubes. Tube 1: the solution was injected once. Tube 2: the solution was re-injected. Tube 3: the tube was flushed with air, and the solution was re-injected. Tube 4: the tube was flushed with air and water, and the solution was re-injected. (a) $\tilde{A}_{calibration}^{PA}(\lambda)$ used for the evaluation of Ψ^{PA} for each tube and the absorption spectrum of the calibration solution. (b) Median relative error (MRE) of Ψ^{PA} vs. the optical wavelength λ for each tube. (c) MRE for the fitting factor of Ψ^{PA} by a flat spectrum of amplitude unity.

The MRE for $\Psi^{PA_i}(\lambda)$ is below 2% for all the wavelengths and the tubes, while they are below 1% for the fitting factor γ . These low percentages demonstrate an excellent repeatability of the measurement. The main source of fluctuations is the injection of the solution. Flushing with air resulted in similar fluctuations as re-injecting without flushing. However, the injection with cleaning (tube 4) had the strongest variation. This variation could be attributed to droplets of the solvents, which may stay in the tube (or the needle) and could result in dilution of the injected solution. The global fluctuations in amplitude of the spectrum (Figure 4c) were found to be lower than for individual wavelengths (Figure 4b), which suggests additional sources of fluctuations at each wavelength. For all tubes, the MRE is stable over the wavelength range 680–920 nm and increases in the range 920–970 nm. This increase could be attributed to the lower laser fluence at the tube location above 920 nm. Indeed, the absorption of the laser radiation by water between the fiber output and the sample is stronger above 920 nm [33]. Consequently, $\tilde{A}_{calibration}^{PA}(\lambda)$ is smaller (Figure 4a), resulting in an amplification of the errors in the estimation of $\Psi^{PA_i}(\lambda)$ for $\lambda > 920$ nm.

3.1.2. Influence of the Number of Acquisitions for the Evaluation of $\tilde{A}_{calibration}^{PA}(\lambda)$

The evaluation of $\tilde{A}_{calibration}^{PA}(\lambda)$ is crucial for the calibration of the system and needs to be performed for each series of measurements, since no precise alignment is executed. Because of the measurement variability, the number of acquisitions with the calibration solution required to have a robust estimate of $\tilde{A}_{calibration}^{PA}(\lambda)$ needs to be evaluated.

The following experiment was carried out. Seven pairs of acquisitions with the calibration solution injected in the four tubes were performed (total of 14 acquisitions). Between two successive pairs, at least 10 acquisitions with other solutions were performed. Each pair was preceded with a blank acquisition of water, and the four tubes were flushed with air only between the two injections of the calibration solution.

First, $\tilde{A}_{calibration}^{PA}(\lambda)$ was computed per tube by taking the 14 acquisitions. $MRE(\Psi^{PA}(\lambda), 1)$ is displayed in Figure 5a and shows values below 2%, similarly to Figure 4b. $MRE(\gamma, 1)$ was equal to 1.2% when Ψ^{PA} was fitted with a flat spectrum of amplitude unity. It should be noted that the 56 evaluations (14 acquisitions in four tubes) of $\Psi^{PA}(\lambda)$ and γ were considered, adding the inter-tube variability compared to in Section 3.1.1.

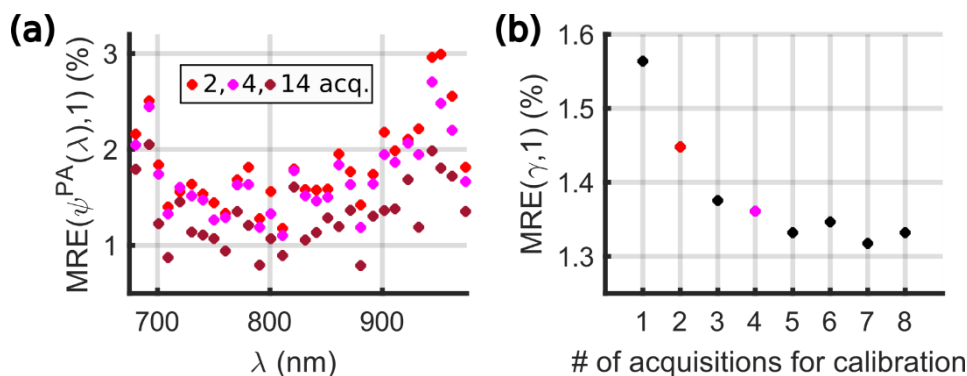


Figure 5. Evaluation of the influence of the number of acquisitions taken to compute the median of $A^{PA}_{calibration}(\lambda)$. (a) Median relative error (MRE) of Ψ^{PA} vs. the optical wavelength λ for combinations of 2, 4, and 14 acquisitions out of 14 to evaluate the median of $A^{PA}_{calibration}(\lambda)$ per tube. (b) MRE for the fitting factor for combinations from 1 to 8 acquisitions out of 14 to evaluate the median of $A^{PA}_{calibration}(\lambda)$ per tube.

Second, $\tilde{A}_{calibration}^{PA}(\lambda)$ was computed per tube by taking $m = 1$ to $m = 8$ acquisitions. Then, $\Psi^{PA}(\lambda)$ and γ were computed for the $(14 - m)$ other acquisitions. All the combinations of 14 acquisitions taken m at a time were used for the computation of the MRE, which corresponds to 4368 spectra for $m = 2$. Figure 5b shows the global decrease of the error with increasing m . The statistical evaluations with $m = 2$ and $m = 4$ are highlighted in Figure 5. The error is statically below 3% for the entire spectral range.

3.1.3. Measurement Protocol for a Series of Samples

In practice, we chose to start and to end each series of measurements with two consecutive acquisitions of the calibration solution to have at least four acquisitions (two before and two after) per tube to compute $\tilde{A}_{calibration}^{PA}(\lambda)$. For the samples, the spectra were computed using two consecutive acquisitions. Between the two acquisitions of the same sample, the tubes were flushed with air before being injected again with 15 μ L of the sample. Between two different samples, the tubes were flushed with air and the solvent to clean them and again with air to avoid dilution of the next sample. A blank dataset was acquired between two different samples when the tubes were filled with the solvent.

3.2. Characterization of the PA Spectrometer with Non-Fluorescent and Non-Scattering Molecular Solutions

3.2.1. Linearity of the PA Spectrometer

The linearity of the spectrometer was tested on the nigrosin solutions, as the PGE of nigrosin $\eta_{nigrosin}$ is expected to be independent of the concentration and the wavelength. Experiments were performed at $20.5 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0.2 \text{ }^\circ\text{C}$ (median \pm MAD). $\tilde{A}_{calibration}^{PA}(\lambda)$ was computed from six acquisitions per tube. ξ^{PA} was computed for the five percent solutions of nigrosin and for four acquisitions in four tubes for each solution. Figure 6a shows the proportionality of ξ^{PA} to the absorption coefficient for three wavelengths and the five solutions. The proportionality factor should be equal to $1/\eta_{calibration}$ and was found to be equal to 0.79, which indicates that the PGE of the calibration solution $\eta_{calibration}$ is, as expected, greater than one. Figure 6b presents the measured spectra for the 40% and the 60% solutions. Only two solutions were presented here for the sake of legibility. The spectra $\xi^{PA}(\lambda)$ were fit with a corresponding absorption spectra $\mu_a(\lambda)$ assuming a direct proportionality. The error between the fitted spectrum and $\xi^{PA}(\lambda)$ was found below 5% for $\lambda < 930$ nm (Figure 6c). These results demonstrate that the spectral shape of the nigrosin solution could be retrieved by computing $\xi^{PA}(\lambda)$ using the calibration solution of $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. The proportionality factor was assessed on the five solutions to be equal to 0.796 ± 0.015 (median \pm MAD), which corresponds to $\eta_{calibration} = 1.256 \pm 0.023$.

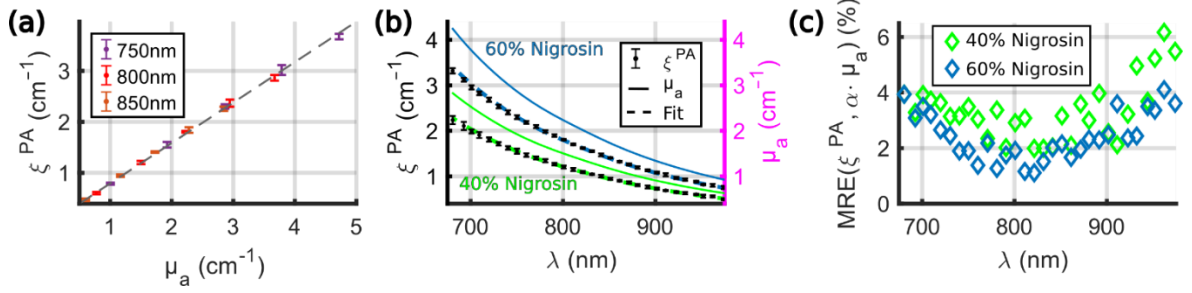


Figure 6. Linearity of the PA spectrometer with respect to the absorption coefficient μ_a and at different wavelengths. ξ^{PA} was computed for the 5 percent solutions of nigrosin and for 4 acquisitions in 4 tubes for each solution. (a) ξ^{PA} values (median \pm MAD) as a function of μ_a for 3 different wavelengths and the 5 solutions. The dashed line is a fit by a homogeneous linear function of slope 0.79. (b) The left axis corresponds to ξ^{PA} values (median \pm MAD) as a function of the optical wavelength for two solutions: 40% and 60% of the stock solution. The absorption spectra μ_a are displayed (right axis, solid line), as well as the fits. The proportionality factors were $\alpha_{40\%} = 0.81$ and $\alpha_{60\%} = 0.80$, respectively. (c) MRE of ξ^{PA} with $\alpha \cdot \mu_a$ as a reference for the 40% and 60% percent solutions.

3.2.2. Evolution of $\eta_{sample}/\eta_{calibration}$ with the Concentration and the Temperature for the Different Solutions

For the percent solutions of CuSO_4 and NiSO_4 , and for the solution mix- SO_4 , the PGE was shown to be wavelength-independent in the range 740 nm to 980 nm [20]. For the percent solutions of nigrosin, the PGE is expected to be wavelength-independent for the range 680–980 nm. Hence, the spectra $\xi^{PA}(\lambda)$ are expected to be directly proportional to the absorption spectra $\mu_a(\lambda)$, in the range where the PGE is constant.

$$\xi^{PA}(\lambda) = \frac{\eta_{sample}}{\eta_{calibration}} \cdot \mu_a^{sample}(\lambda) = \alpha_{sample} \cdot \mu_a^{sample}(\lambda) \quad (12)$$

According to Fonseca et al. [20], for the solutions of CuSO_4 and NiSO_4 , the coefficient α_{sample} depends on the concentration with the empirical law:

$$\alpha_{sample} = \alpha_0 \cdot (1 + \beta_{\text{CuSO}_4} \cdot c_{\text{CuSO}_4} + \beta_{\text{NiSO}_4} \cdot c_{\text{NiSO}_4}) \quad (13)$$

where c_{CuSO_4} and c_{NiSO_4} are the molar concentrations of $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ and $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, respectively, and theoretically, $\alpha_0 = 1/\eta_{calibration}$. The coefficients $\beta_{\text{CuSO}_4^F} = 0.708 \text{ M}^{-1}$ (at 23.0 °C) and $\beta_{\text{NiSO}_4^F} = 0.325 \text{ M}^{-1}$ (at 22.6 °C) were determined experimentally for wavelengths between 1400 and 1500 nm where the absorption was dominated by water and not by the solutes.

The PA spectra $\xi^{PA}(\lambda)$ of the solutions of CuSO_4 , NiSO_4 , and nigrosin, as well as the solution mix- SO_4 , were measured at two different temperatures of the water bath: 20.3 °C \pm 0.2 °C and 25.0 °C \pm 0.2 °C. Samples with similar absorption were grouped together, and the groups were measured by ascending order of absorption. Each of the 16 samples was injected and measured twice in four tubes. The calibration solution was measured twice before and after each group, resulting in 12 measurements per tube to compute $\tilde{A}_{calibration}^{PA}(\lambda)$. The proportionality factors α_{sample} were evaluated with a curve-fitting algorithm from $\tilde{\xi}^{PA}(\lambda)$. Figure 7a–e presents the spectra $\tilde{\xi}^{PA}(\lambda)$ for the different groups of solutions, together with the fits and the measured spectra $\mu_a(\lambda)$. Figure 7f presents α_{sample} as a function of the dilution percentage of the stock solution. The solution mix- SO_4 was placed in Figure 7c (intituled 60%) due to the absorption values, but it was placed at 30% in Figure 7f because of the percentage of the stock solution of NiSO_4 used.

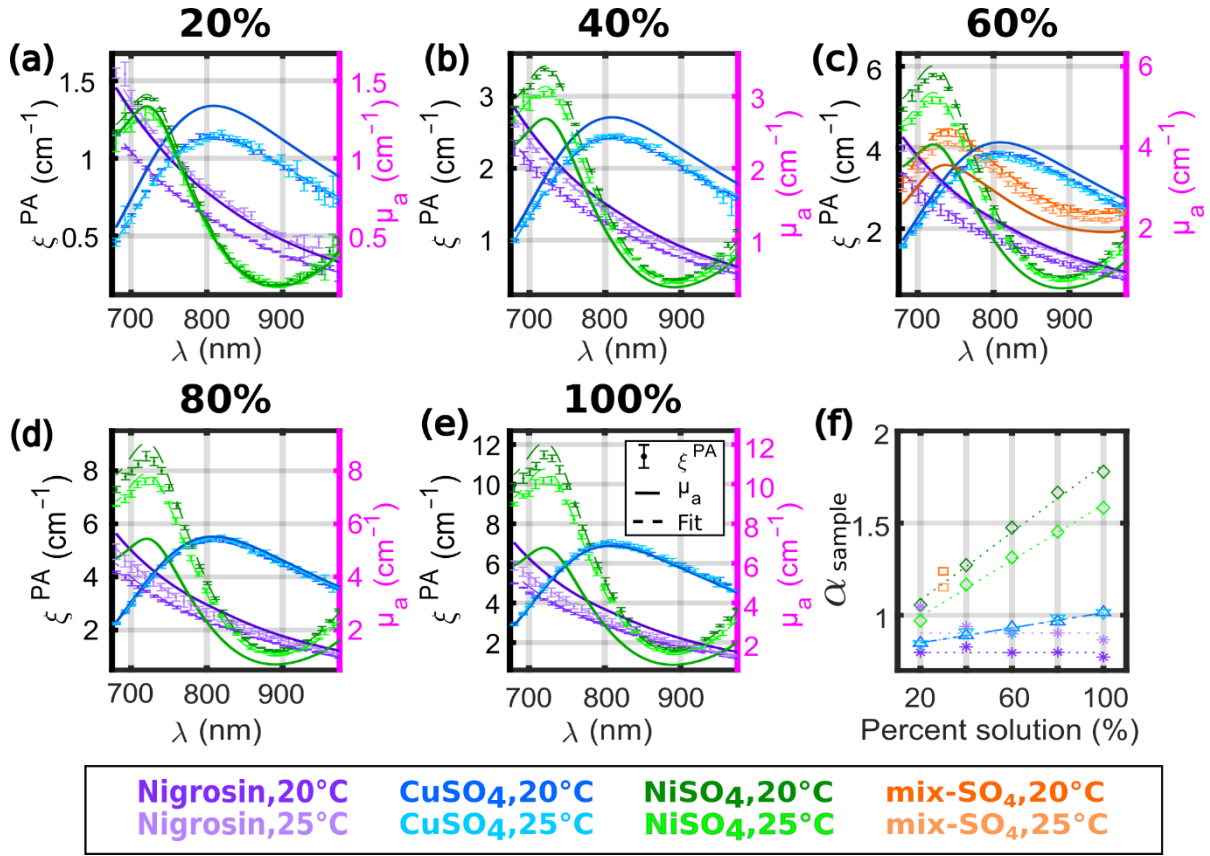


Figure 7. Influence of the concentration and the temperature on the spectra $\xi^{PA}(\lambda)$ for the nigrosin and the sulfate solutions. (a–e) Spectra for the different percent solutions and two different temperatures (20 °C and 25 °C). The absorption coefficient $\mu_a(\lambda)$ is displayed with a solid line. The spectra $\xi^{PA}(\lambda)$ were measured twice in four tubes (total of 8 evaluations) for each temperature, and the median \pm MAD values were displayed with dot markers and error bars. Two different tones of the same color were used for the different temperatures, and the lighter tone was used for 25 °C. The fits of $\mu_a(\lambda)$ to $\xi^{PA}(\lambda)$ (with an assumption of direct proportionality) are shown with a dashed line of the same color as for $\xi^{PA}(\lambda)$. The percent solutions are separated in 5 graphs for the sake of legibility: (a) 20%, (b) 40%, (c) 60%, (d) 80%, and (e) 100%. The mix-SO₄ is displayed in (c). (f) The proportionality factor between $\xi^{PA}(\lambda)$ and $\mu_a(\lambda)$ as a function of the percent of the stock solution. The mix-SO₄ is displayed at 30% because it is comprised of 30% of the stock solution of NiSO₄. The dotted lines are the linear regressions. The same colors as for $\xi^{PA}(\lambda)$ were used.

For the solutions of nigrosin, the different spectra $\xi^{PA}(\lambda)$ were fitted by the corresponding spectra $\mu_a(\lambda)$ over the entire spectral range for all the percent solutions. However, the values of α_{sample} were larger at 25 °C than at 20 °C for all the samples. The values of α_{sample} could be considered as independent of the concentration, and the constant value was evaluated by the median (Table 3). The corresponding PGEs of the calibration solution were $\eta_{calibration}(20\text{ }^\circ\text{C}) = 1.253 \pm 0.003$ (median \pm MAD) and $\eta_{calibration}(25\text{ }^\circ\text{C}) = 1.107 \pm 0.062$. The value at 20 °C is consistent with the value found with the experiment described in Section 3.2.1., while the two series of measurements were performed at different dates. With Equation (13) and the value $\beta_{CuSO_4^F}$, the computed PGE at 23 °C will be $\eta_{calibration}^F(23\text{ }^\circ\text{C}) = 1.177$. Therefore, the measured and computed evaluations of $\eta_{calibration}$ consistently decrease with increasing temperature. This result indicates that the temperature of the water bath is an important parameter to obtain an accurate quantification with our calibration method. The median value of $\eta_{calibration}$ determined with the nigrosin solutions was used for the computation of $\theta^{PA}(\lambda)$ with Equation (8).

For the solutions of CuSO₄, we can notice that the spectra $\xi^{PA}(\lambda)$ at 20 °C and at 25 °C are superimposed and are fitted by the corresponding spectra $\mu_a(\lambda)$ over the entire spectral range. As expected, $\alpha_{CuSO_4,100\%}$ is close to one and increases linearly with the increasing concentration of CuSO₄·5H₂O. β_{CuSO_4} was determined by linear regression to be of the order of 1.0 (Table 3), which is 41% higher than the value of $\beta_{CuSO_4^F}$ determined by Fonseca et al. For NiSO₄, $\xi^{PA}(\lambda)$ has higher values at 20 °C than at 25 °C. For the stock solution (100%), the coefficient α_{sample} was found to be larger than 1.5, and

the values of $\xi^{PA}(\lambda)$ were lower than $\alpha_{sample} \cdot \mu_a(\lambda)$ for $\lambda < 740$ nm. For the 20% and 40% solutions, the fit matches over the whole spectral range (even for $\lambda < 740$ nm). By fitting for $\lambda > 740$ nm, the coefficient α_{sample} was found to vary linearly with the concentration, but the coefficient β_{NiSO_4} was found to be equal to 0.74 M^{-1} at $20 \text{ }^\circ\text{C}$ and 0.65 M^{-1} at $25 \text{ }^\circ\text{C}$. These values of β_{NiSO_4} are at least two times larger than the values determined by Fonseca et al. The values of α_0 (Table 3) also differ from the empirical model proposed by Fonseca et al. Indeed, they were determined to be in the same order of magnitude as for the nigrosin, but they did not match the values or the variation with the temperature found for the nigrosin. α_0 was found to be constant for CuSO_4 and decreasing for NiSO_4 .

For the mix- SO_4 , we found $\alpha_{\text{mix-SO}_4}(20 \text{ }^\circ\text{C}) = 1.24$ and $\alpha_{\text{mix-SO}_4}(25 \text{ }^\circ\text{C}) = 1.15$, while the value from Fonseca et al. would be $\alpha_{\text{F-mix-SO}_4}(23 \text{ }^\circ\text{C}) = 1.01$. While each of the stock solutions contributes to 30% of the mix- SO_4 , the molar concentration of NiSO_4 in the solution is about five times larger than CuSO_4 . Thereby, the contribution of NiSO_4 dominates in $\alpha_{\text{mix-SO}_4}$, which explains the values above one and the decreasing value with the increasing temperature. However, because of the various values of α_0 for CuSO_4 and NiSO_4 , we were not able to verify an empirical law similar to Equation (13). The discrepancy between our results and the results of Fonseca et al. are further discussed in Section 4.

Table 3. Coefficients of Equation (13) obtained by linear regression of the curves α_{sample} as a function of the molar concentration of each compound. The coefficient of determination (R^2) was computed.

Sample	Temperature ($^\circ\text{C}$)	α_0	β (M^{-1})	R^2
CuSO ₄	20.3	0.81	1.00	0.99
	25.0	0.80	1.01	0.95
NiSO ₄	20.3	0.90	0.74	0.99
	25.0	0.84	0.65	0.99
Nigrosin *	20.3	0.80	-	-
	25.0	0.90	-	-

* The coefficient α_0 for the nigrosin is the median of the α_{sample} for the percent solutions.

3.3. Characterization of Conventional Contrast Agents

3.3.1. Gold Nanorods

The solution of gold nanorods (GNR) was measured in a series of acquisitions together with the 20% solutions of nigrosin and CuSO_4 . The experiments were performed at $20.7 \pm 0.2 \text{ }^\circ\text{C}$, and the $\eta_{\text{calibration}}$ determined in Section 3.2.1 was used to compute the PA coefficient $\theta^{PA}(\lambda)$. The laser fluence was lowered at $2 \text{ mJ}\cdot\text{cm}^{-2}$ at 730 nm with polarizing optics placed before the input of the fiber bundle. The lower fluence aimed at preserving the photostability of the gold nanorods. Figure 8a displays the spectra $\theta^{PA}(\lambda)$ for the solutions and the attenuation coefficient $\mu^{SPP}(\lambda)$ measured by SPP, and Figure 8b presents the ratio between the two quantities in the range 680–900 nm. For the non-scattering solutions, (nigrosin and CuSO_4), $\mu^{SPP}(\lambda)$ is equal to the absorption coefficient $\mu_a(\lambda)$, and the ratio $\tilde{\theta}^{PA}/\mu_a$ was found to be constant, as expected from Section 3.2.2. The median of the ratio was found to be equal to 0.99 for the nigrosin, which validates the capabilities of the system to operate at different laser fluences. For CuSO_4 , the PGE was estimated to 1.08, as in Section 3.2.2.

For the GNR, we first verified that the spectra of the sample were stable during the measurement by computing the spectra A^{PA} without averaging the ultrasound data over the 15 laser sweeps. Then, $\theta^{PA}(\lambda)$ was computed with the averaged US data. $\theta^{PA}(\lambda)$ and $\mu^{SPP}(\lambda)$ had a similar spectral shape: a broad peak centered around 800 nm and a full width at half the maximum of ~ 130 nm. However, the spectral shapes did not match with a direct proportionality factor (proportionality factor for the best fit estimated to 0.74). The ratio $\tilde{\theta}^{PA}/\mu^{SPP}$ was found to be approximately equal to one from 680 nm to 710 nm and then decreasing until 800 nm and quasi constant from 800 nm to 900 nm. This ratio is not the PGE because the attenuation coefficient of GNR comprises both the absorption and the scattering coefficients. The lower value of θ^{PA} compared to μ^{SPP} could be explained by the combination of two phenomena. First, the scattering for the solution of GNR cannot be neglected, which would result in an overestimation of μ^{SPP} as compared to μ_a . For the geometrical characteristics of the GNR used here, the shapes of the absorption and scattering spectra are expected to match (but could be slightly shifted), and the ratio between the scattering and the absorption coefficients could be on the order of 10% [34].

Another phenomenon must be accounted for to describe the discrepancy: the GNR is the photothermal converter (heat source) while water is the PA signal-generating medium. Interfacial thermal resistance to the heat transfer at the gold–water interface could lower the effective photothermal conversion efficiency [35,36] and then reduce the value of θ^{PA} . However, the influence of the interfacial thermal resistance on the PA signal is not well understood even at a single wavelength (peak absorption) [37], and by extension its spectral dependency is not yet established.

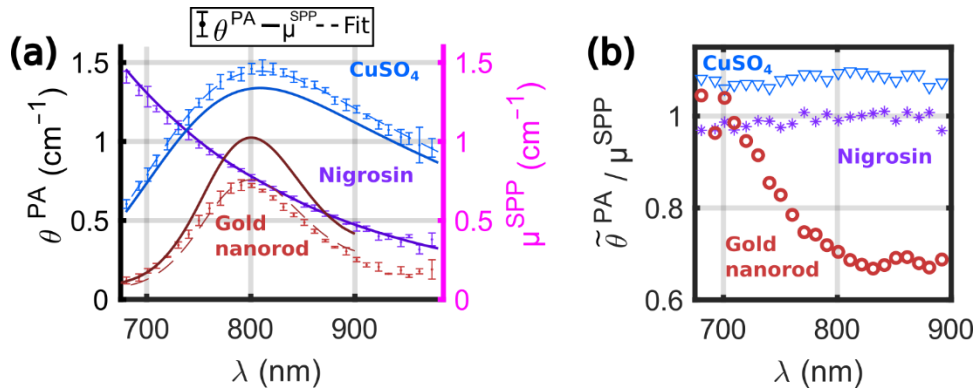


Figure 8. Experimental spectrum from a solution of gold nanorods (GNR). (a) PA coefficient $\theta^{PA}(\lambda)$ of the GNR solution (red curves), the 20% solutions of CuSO₄ (blue curves), and the 20% solutions of nigrosin (purple curves) were measured once in four tubes. The median \pm MAD values of $\theta^{PA}(\lambda)$ were displayed with dot markers and error bars. The attenuation coefficient $\mu^{SPP}(\lambda)$ is displayed with a solid line. For the GNR, the attenuation coefficient was only available in the range 680 nm–900 nm. The fits of μ^{SPP} to $\tilde{\theta}^{PA}$ are shown with a dashed line of the same color as for $\theta^{PA}(\lambda)$. (b) Ratios $\tilde{\theta}^{PA} / \mu^{SPP}$ for the different solutions as a function of the optical wavelength. The same colors as for $\theta^{PA}(\lambda)$ were used.

3.3.2. Indocyanine Green

Figure 9a displays images at $\lambda_2 = 790$ nm of a tube filled with (from left to right): the calibration solution, ICG in an aqueous solution without Tween, and ICG stabilized in micelles using 0.1% of Tween. For the calibration solution and the ICG with Tween, the images of the tube are similar: one spot with the same center and the same width. Therefore, we can assume that the calibration and the sample measurements match. However, for the ICG in an aqueous solution without Tween, the image of the tube has two spots along the depth dimension. The position of the dip between the two spots was found to correspond to the maximum of the single spot for the other solutions. Because of its affinity with hydrophobic surfaces, we can assume that ICG did not stay in the aqueous solution and stuck to the wall of the PTFE tube when Tween was not added. The two spots would then correspond to the interferences of the signals generated by the absorbing walls in the limited-view detection geometry. The calibration cannot be used for quantitative measurements when two spots appear because the amplitude A^{PA} does not correspond to the same experimental conditions. These results indicate that surfactants or other compounds are needed to keep hydrophobic absorbers in solution for quantitative accuracy of the measurements. All the other measurements with ICG were performed in a solution comprised of 0.1% of Tween 20 [38].

The solutions of ICG were measured at a temperature of $22.0 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0.7 \text{ }^\circ\text{C}$. $\eta_{\text{calibration}}$ was computed assuming a linear variation between $20 \text{ }^\circ\text{C}$ and $25 \text{ }^\circ\text{C}$. A total of 12 evaluations were performed per solution. Figure 9b,c displays the spectra $\theta^{PA}(\lambda)$ and $\mu_a(\lambda)$, respectively, for five concentrations of ICG and in the range 680–900 nm. The absorption of ICG above 900 nm is negligible because of the shape of the spectra and was not displayed for better legibility. The scattering could be neglected, and $\mu_a(\lambda)$ was measured with SPP for the solutions of ICG. The PA and optical spectra have a peak around $\lambda_2 = 790$ nm and a shoulder around $\lambda_1 = 742$ nm. The PGE η_{ICG} was assessed with Equation (3) and depends on both the wavelength and the concentration of ICG. Here, the solvent is composed of DPBS with 1% DMSO; therefore, the Grüneisen coefficient of the solvent is expected to be slightly larger than Γ_{water} . However, given its low concentration, ICG is not expected to influence the Grüneisen coefficient of the solution contrary to the sulfate salts. Yet, the optical properties of ICG can vary with the concentration [21]. At λ_1 and λ_2 , it can be seen that η_{ICG} increases with the concentration. The slope is larger at λ_2 , but

the η_{ICG} values are larger at λ_1 than at λ_2 (Figure 9d). In a similar solvent but without Tween, Fuenzalida Werner et al. [21] determined that $\eta_{ICG}(\lambda_1) \approx 0.80$ and $\eta_{ICG}(\lambda_2) \approx 0.62$ at concentrations below 10 μM . These results are consistent with our measurements at $c_{ICG} = 9 \mu\text{M}$.

Figure 9f displays the spectra $\mu_a(\lambda)$ normalized by the ICG concentration. The amplitude of the shoulder at λ_1 was found to be linear with the concentration with a slope of one, while $\mu_a(\lambda_2)/c_{ICG}$ decreased with the increasing concentration because of the aggregation of ICG at higher concentrations [21]. Therefore, the ratio $\mu_a(\lambda_1)/\mu_a(\lambda_2)$ increases with the increasing c_{ICG} (Figure 9g). Interestingly, the ratio $\theta^{PA}(\lambda_1)/\theta^{PA}(\lambda_2)$ was found to be constant, suggesting a stability of the heat transfer from the molecule to the solvent regardless of the concentration and, by extension, of the aggregation state. Figure 9e shows that the spectral shape of $\theta^{PA}(\lambda, c_{ICG})$ does not depend on the concentration of ICG. This stability of the spectral shape was not observed in water without Tween [21], probably because of a stronger aggregation of ICG molecules when they are not in micelles of Tween. The normalization factor used for $\theta^{PA}(\lambda, c_{ICG})$, however, is not directly $1/c_{ICG}$ as for $\mu_a(\lambda)$, but it is proportional to $1/(\eta_{ICG}(\lambda_1, c_{ICG}) \times c_{ICG})$. Therefore, the PA signal generation increases non-linearly with c_{ICG} . The aggregation of ICG is expected to decrease the fluorescence efficiency, a competitive process to PA, and therefore benefits PA generation at higher concentrations, which is seen by the increase of η_{ICG} (Figure 9d).

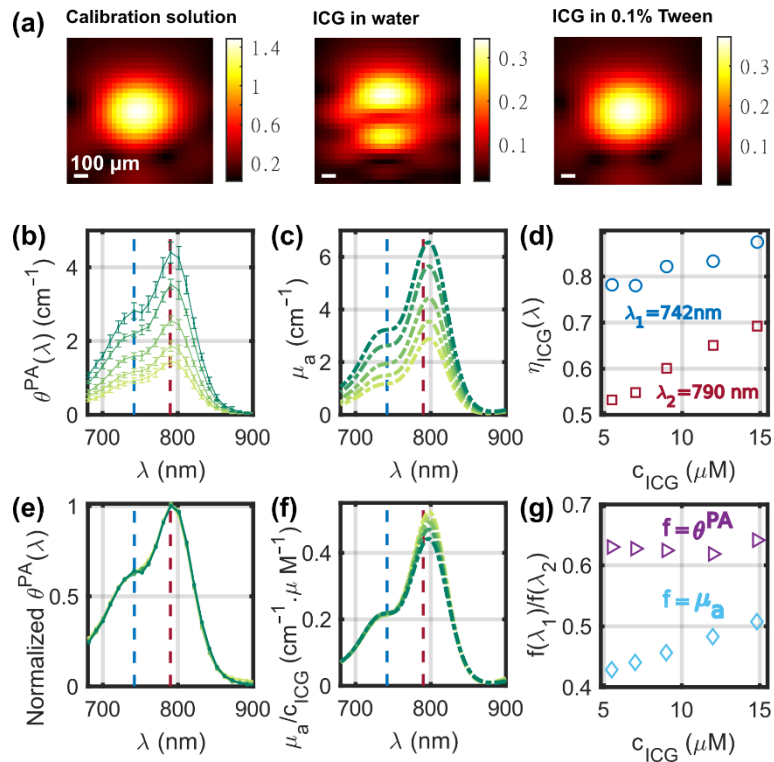


Figure 9. Experimental results for the solutions of indocyanine green (ICG). (a) PA images at 790 nm of a tube filled successively with: (left) the calibration solution, (middle) a solution of ICG in DPBS with 1% DMSO, and (right) a solution of ICG in DPBS with 1% DMSO and 0.1% Tween 20. The color scales are in arbitrary units. (b) PA coefficient θ^{PA} (median \pm MAD) and (c) the corresponding μ_a spectra for the different concentrations of ICG. (d) Photoacoustic generation efficiency evaluated at two wavelengths, $\lambda_1 = 742 \text{ nm}$ and $\lambda_2 = 790 \text{ nm}$, as a function of the concentration of ICG. (e) Median PA spectra of (b) normalized to their maximum value. (f) μ_a spectra of (c) normalized by concentration in ICG. For (b–f), the color of the curves changes from light green to dark green with increasing concentration. (g) Ratios $\theta^{PA}(\lambda_1)/\theta^{PA}(\lambda_2)$ and $\mu_a(\lambda_1)/\mu_a(\lambda_2)$ as a function of the concentration of ICG.

4. Discussion

We presented and validated a method to perform calibrated photoacoustic spectrometry in the wavelength range 680 to 970 nm with a commonly used PAI setup. The method requires successive injections in tubes that remain mechanically fixed and immersed in a water bath at a stable temperature. Three solutions need to be injected: water or a solvent as a background reference, a solution of $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ at 0.25 M as a calibration solution, and the sample of interest. The simple calibration process provides PA spectra in spectroscopic units that can be related to the optical attenuation spectra (SPP), both in terms of shape and amplitude. The ratio between the PA spectrum θ^{PA} and the optical absorption spectrum μ_a yields the photoacoustic generation efficiency of the sample. Even if the absorption spectrum is not available for some samples, for instance, because of strong scattering, the PA spectra expressed in SI units can be compared to other samples.

The developed method requires the sample containers, the illumination, and the ultrasound detector to be stable during a series of measurement, but their respective position does not require a precise alignment. The method can even operate with a steady but nonuniform fluence distribution and ultrasound sensitivity. We also showed that the method can operate when the tubes are embedded in a tissue phantom (Appendix B). The developed calibration method can be adapted to various PAI systems, as long as they provide access to the PA-generated ultrasound signals or the beamformed images prior to envelope detection (to allow coherent subtraction of the background) and the pulse-energy fluctuations of the excitation light at each wavelength. Although radio-frequency data may not be available on all ultrasound machines [39], they are usually accessible on current conventional PAI systems. We applied here the method to a PAI system based on a clinical ultrasound array and carefully adapted the sample size to the frequency bandwidth of the detector. For other systems, the tube radius may be adapted for optimal sensitivity using Equation (A2) in Appendix A. To ensure a good transmission of ultrasound waves, the wall thickness should be as small as possible compared to the acoustic wavelength in the material at the center frequency of the detector. Furthermore, the material of the tube should have an acoustic impedance close to water ($Z^{\text{water}} = 1.49 \text{ Mray}$), as in the case of PTFE ($Z^{\text{PTFE}} = 2.97 \text{ Mray}$ [40]). The wavelength at the center frequency is 0.3 mm in the material ($v_s^{\text{PTFE}} = 1390 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$). With a wall thickness of 0.1 mm, the transmission coefficient T in pressure through the three-layered system water–PTFE–water is [41]: $T = 75\%$ at 25 °C and at 5 MHz. For comparison, a glass tube with the same wall thickness would yield $T = 10\%$. Additional properties of the tube should be a weak optical absorption and scattering, and the material of the tube should be chosen to be chemically inert to avoid interaction with the sample. Our PTFE tubes had all the required properties, and they are commercially available in various diameters and wall thicknesses. For independent measurements using multiple tubes, the necessary spacing between them in the tube phantom should be at least superior to the spatial resolution of the system, and a margin should be taken to avoid artifacts caused by side lobes. For PAI systems with an array focused in the elevational direction, the tube may be placed in the acoustic elevational focus for higher sensitivity.

Using tubes as sample containers has several advantages over the containers used in other PA spectrometers: Beard et al. [18] used a homemade cuvette, Fuenzalida Werner et al. [21] used a single channel microscopy chip, and Pelivanov et al. [22] enclosed their sample within a diaphragm between two quartz plates. For these containers, only one sample can be measured at a time, and changing to another sample may require tedious preparation procedures. For our system, several tubes could be positioned in the imaged region. This allowed parallel measurements of different samples or for the evaluation of the variability of the measurement for one type of sample. Because tubes have two opened ends, they could also easily be flushed, and the same tube could be used for a series of successive measurements. As the PTFE tubes are cost-effective, they were replaced as soon as they were polluted (persistent and additional absorption compared to the first blank dataset) or degraded. The small volume of the tubes (15 μL) is an asset to test samples at very early stages of the development of new contrast agents and for screening when only small quantities have been synthesized. However, the injection challenges compared to large cuvettes induce a variability that was reduced here by performing statistical evaluations over several injections. An automated sample injector, as is used in high-performance liquid chromatography (HPLC), might be considered in future development.

The sensitivity of the spectrophotometer increases with the laser fluence and the detector sensitivity. The detection limit was not determined here, but Figures 7a and 8a show that the 20%

solution of nigrosin was measured with a high sensitivity even with a low absorption coefficient of $\mu_a = 0.3 \text{ cm}^{-1}$ at the two incident fluences $4 \text{ mJ}\cdot\text{cm}^{-2}$ and $2 \text{ mJ}\cdot\text{cm}^{-2}$ (evaluated at 730 nm). For comparison, other PA spectrometers reported a lower bound of calibrated detection corresponding to an absorption coefficient μ_a of 5 cm^{-1} for the system of Beard et al. [19], 0.4 cm^{-1} for the system of Fuenzalida Werner et al. [21], and 1 cm^{-1} for the system of Pelivanov et al. [22].

For the upper bound of calibrated detection, the absorption coefficient of the stock solution was limited to $\mu_{a \text{ stock}} \leq 7 \text{ cm}^{-1}$, which corresponds to an absorption length of $\ell_{\text{stock}} = 1/\mu_{a \text{ stock}} \approx 1.4 \text{ mm}$. As the tube radius is 14 times smaller than ℓ_{stock} , the tubes could be considered as optically thin. Thereby, the decay of the optical fluence inside the tube lumen caused by the sample absorption and its influence on the amplitude of the PA signal can be neglected. Indeed, while the absorption coefficient of the nigrosin solution varies significantly (relative range of 1.5, Table 2) over the covered spectral range, the PA spectra were found to have the same spectral shape as the absorption spectrum, without any reduction of the signal at larger absorption coefficients (Figure 6). Moreover, the proportionality factor between $\xi^{PA}(\lambda)$ and $\mu_a(\lambda)$ (Figure 7f) was found to be constant even when the percentage of the stock solution varied from 20% to 100%. This latter result also demonstrates that only one calibration solution can be used for an optical absorption coefficient below 7 cm^{-1} . Pelivanov et al. [22] reported the use of several calibration solutions of $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ to cover the absorption range $1\text{--}26 \text{ cm}^{-1}$, but the concentration of the calibration solution was not given. Fuenzalida Werner et al. [21] reported measurements with a maximum absorption coefficient of 5 cm^{-1} , while other PA spectrometers reported a much larger upper bound of detectability: 250 cm^{-1} for the system of Beard et al. [19] and 26 cm^{-1} to up to 300 cm^{-1} for the system of Pelivanov et al. [22]. As contrast agents for biomedical photoacoustic imaging can easily be diluted, the absorption coefficient of the tested solution can be lowered to fit below an upper limit of calibrated detection of our system.

Our calibration method relies on the injection in the sample container of an absorbing solution ($\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$) whose photoacoustic properties are known. Compared to India ink, used elsewhere as a reference solution [21], $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ is a molecular absorber of small molecular weight and not a particle-based absorber, so the heat transfer to the solvent is direct, resulting in a photothermal conversion efficiency of one. Moreover, the solution is homogeneous (no sedimentation), even for volumes as small as $15 \mu\text{L}$, and stable. Unfortunately, its Grüneisen coefficient relative to water depends on both the concentration and the temperature of the solution, and its values were previously reported in only one study, to our knowledge [20]. At the concentration used for the calibration solution, our estimation of the photoacoustic efficiency matches with the value reported by Fonseca et al. [20]. Pelivanov et al. [22] also used $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ as a calibration solution, but they assumed $\eta_{\text{CuSO}_4} = 1$ even at concentrations up to 1 M ; therefore, their calibration did not account for the increase in the Grüneisen coefficient with the concentration. This discrepancy was not detected probably because of their use of different concentrations of $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ as calibration solutions and a lack of validation with another reference solution such as nigrosin. Fuenzalida Werner et al. [21] separated the correction method used to obtain the shape of the PA spectrum from the calibration method to estimate the amplitude of the spectrum. They developed a complex correction method adapted to their measurement setup and validated its ability to retrieve the shape of the absorption spectrum in the range 400 nm to 900 nm with solutions of NiCl_2 . However, amplitude calibration was performed in the visible range at 570 nm with Brilliant Black BN (BBN), a dye that is photostable, non-fluorescent, and for which the photoacoustic efficiency is expected to be equal to $\eta_{\text{BBN}} = 1$. We identified nigrosin as a dye with similar properties in the NIR, and we used this highly absorbing dye to evaluate the Grüneisen coefficient of our calibration solution of CuSO_4 . With the determined Grüneisen coefficient, the spectral shape and the amplitude of unknown samples were simultaneously obtained.

The Grüneisen coefficients relative to water of solutions of $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ and $\text{NiSO}_4\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ were measured by Fonseca et al. [20] for five different concentrations from 0.125 M to 1 M for CuSO_4 and 0.275 M to 2.2 M for NiSO_4 . According to their study, the Grüneisen coefficients of our calibration solution (0.25 M of CuSO_4) and of the 40% solution of NiSO_4 (0.55 M of NiSO_4) should have the same value, while we found a Grüneisen coefficient at least 16% larger for the 40% solution of NiSO_4 . At a given temperature close to $23 \text{ }^\circ\text{C}$, they determined a linear variation of the Grüneisen coefficient with the concentration in each solute (Equation (13)). We also found a linear variation for concentrations from 0.05 M to 0.25 M for CuSO_4 and from 0.26 M to 1.3 M for NiSO_4 . However, the β factors (Equation (13))

had a large discrepancy (Table 3). For CuSO_4 , our evaluation of β_{CuSO_4} did not depend on the temperature and was 41% larger than the value reported by Fonseca et al. ($\beta_{\text{CuSO}_4}^{\text{F}}$). For NiSO_4 , β_{NiSO_4} was found to be larger at low temperature and at least 100% larger than $\beta_{\text{NiSO}_4}^{\text{F}}$. Additionally, we were not able to confirm the empirical formula for the mix- SO_4 . One possible explanation for the discrepancy of the β values could be the difference in the investigated concentration range and the simplistic linear assumption over the whole concentration range investigated by Fonseca et al. However, we could not investigate the same concentration range due to the difference in calibrated detection limits of the PA spectrometers. Another major difference between the measurement methods is the spectral range in which the Grüneisen coefficient was evaluated. Fonseca et al. measured the Grüneisen coefficient based on the absorption of water in a spectral range (1400–1500 nm) where the absorption coefficient of CuSO_4 and NiSO_4 can be considered negligible compared to water, whereas we measured the Grüneisen coefficient in a wavelength range where the solute has a strong absorption. We can hypothesize that the Grüneisen coefficient differs when the absorption coefficient of the solution is dominated by the solute instead of the solvent. Using the same measurement system as Fonseca et al., Stahl [19] evaluated the Grüneisen coefficient of an aqueous solution of CuCl_2 ($c_{\text{CuCl}_2} = 200 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) as a function of the wavelength from 750 nm to 1500 nm. At 20 °C, it was observed that the Grüneisen coefficient was stable up to 1150 nm when the absorption was dominated by the solute, while for wavelengths greater than 1380 nm, where the absorption was dominated by water, the Grüneisen coefficient increased by 14%. A possible, but not confirmed, explanation could be a Grüneisen coefficient specific to the hydration shells around the metallic ions of Cu^{2+} compared to the rest of the bulk solution. The bulk solution is mainly excited when the absorption is dominated by the solvent, as is the case for the experiments reported by Fonseca et al., while the hydration shells would have a stronger influence when the absorption is dominated by the solute. Unfortunately, no study was reported for different concentrations of Cu^{2+} and for Ni^{2+} . These results show that the Grüneisen coefficients of the sulfate solutions of CuSO_4 and NiSO_4 depend on the concentration, the temperature, and the wavelength range of excitation. Further studies would be needed to use these chromophores at different concentrations in phantoms for quantitative multiwavelength photoacoustic imaging. Such studies are beyond the scope of this paper.

Spectral measurements of commonly used contrast agents in PAI (gold nanorods and ICG) showed results compatible with previously reported studies and demonstrated the ability of the spectrometer to characterize different kinds of agents: metallic nanostructures and dyes. In particular, the wavelength and concentration-dependent photoacoustic generation efficiencies of ICG were verified. Variations of η_{ICG} with the concentration are linked to the changes in the photothermal efficiency, in particular due to the dye aggregation and reduced fluorescence. For scattering solutions of gold nanorods, as already shown by Pelivanov et al. [22], the PA spectrum enables removal of the influence of the light scattering to access to the absorption properties of the solution. Our PA spectral measurement can be used to quantitatively characterize the PA properties of plasmonic nanoparticles and is expected to capture the shape of the absorption spectrum. However, the photothermal conversion efficiency may be lower than one due to thermal resistance from the absorbers to the solvent [35]. Therefore, our calibrated measurement may not exactly match the amplitude of the optical absorption coefficient. Comparison with the attenuation coefficient measured with SPP in transmission mode could provide information about the strength of the scattering and its spectral dependency.

5. Conclusions

The design of photoacoustic contrast agents has been demonstrated to be challenging, in particular because the photoacoustic spectrum may differ from the optical attenuation spectrum due to scattering and other physical processes. Therefore, a calibrated measurement of the photoacoustic spectrum and the photoacoustic generation efficiency is highly desirable at all stages of the development of PA contrast agents. We demonstrated a novel method that can be adapted to most commonly used photoacoustic imaging systems to obtain calibrated photoacoustic measurements in the NIR range. Measurements were performed with small sample volumes of 15 μL , and the detection sensitivity is lower than 0.3 cm^{-1} . The system enables PA measurements at very early stages of the development of new contrast agents. This method can benefit the material science and biomedical communities and satisfy the growing need for the characterization of photoacoustic contrast agents.

Author Contributions: Conceptualization, J.G. and F.G.; methodology, J.G. and M.S.; software, T.L. and M.S.; validation, T.L., M.S. and J.G.; formal analysis, J.G. and T.L.; investigation, T.L., M.S., Y.A. and C.L.; resources, G.R., F.G. and J.G.; data curation, T.L.; writing—original draft preparation, J.G.; writing—review and editing, T.L., M.S., C.L., F.G. and G.R.; supervision, J.G.; project administration, J.G.; funding acquisition, J.G., F.G. and G.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work project has received financial support from the CNRS through the MITI interdisciplinary programs (Defi Imag'IN, 80 Prime), Gefluc Paris, Ile-de-France, Emergence Sorbonne Université 2019–2020, France Life Imaging (ANR-11-INBS-0006), and from the European Union's Horizon 2020 research and innovation program under grant agreements no. 801305 (NanoTBTech) and N°68335 (FOLSMART). M. Sarkar acknowledges support from the Paris Region (Ile-de-France) under the Blaise Pascal International Chairs of Excellence. Imaging was performed at the Life Imaging Facility of Paris Descartes University (Plateforme Imageries du Vivant—PIV).

Acknowledgments: The authors thank Lise Abiven at the Laboratoire de la Chimie de la Matière Condensée de Paris for the NIR spectrophotometric measurements. The authors also thank Alba Nicolás-Boluda, Jean-Baptiste Bodin, Rachel Méallet-Renault, Gilles Clavier, and Nicolas Tsapis for their fruitful discussions.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

Appendix A

Appendix A demonstrates the suitability of the ultrasound detector frequency for the sample container.

The sample containers are tubes with an inner diameter of 0.2 mm. For an optically thin and infinitely long cylinder of water surrounded by water, the PA-generated ultrasound waves captured in the far-field are expected to have an acoustic spectrum, which has a magnitude proportional to [42]:

$$p(f) \propto \frac{J_1\left(2\pi\frac{a}{v_s^{water}}f\right)}{\sqrt{f}}, \quad (A1)$$

where f is the ultrasound frequency, J_1 is the first order Bessel function, a is the radius of the cylinder, and v_s^{water} is the speed of sound in water. The first and highest peak of this acoustic spectrum is bounded by the first zero of Equation (A1):

$$f_{1st\ zero} \approx 3.83 \frac{v_s^{water}}{2\pi a}, \quad (A2)$$

For an optimal detector sensitivity, the first peak should cover the entire frequency bandwidth of the detector, and the first zero should slightly exceed the upper frequency of the ultrasound bandwidth of the detector. The upper frequency of our detector given by the clinical array manufacturer for pulse-echo ultrasound imaging is around 7 MHz. For $f_{1st\ zero} \geq 7$ MHz and $v_s^{water} = 1500$ m.s⁻¹, the maximal inner radius of the tube would be 130 μm. With $a = 100$ μm, the nominal radius of our tubes, the theoretical spectrum is displayed in Figure 1b with the dashed blue curve. The solid black curve presents the ultrasound spectrum for the baseline-corrected signal of one tube. The entire bandwidth of the detector was indeed adequately excited by the chosen sample container.

Appendix B

Appendix B demonstrates the *in vitro* capability of the calibration method to operate in a scattering and absorbing environment such as biological tissues. This configuration could be used to verify the detectability of a contrast agent with the PAI system in a tissue-mimicking phantom, for instance.

A tissue phantom was implemented: the four PTFE tubes, placed in the same tube holder as described in Section 2.1.1., were surrounded with raw turkey breast (Figure A1a). The turkey breast was purchased from the local grocery store. Three 0.5 cm thick slices of tissue were placed on top of tubes 1 and 3 (Figures 1 and A1c), in between the tubes 1/3 and 2/4, and below tubes 2 and 4, respectively. Thereby, the tubes were embedded in a 1.5 cm thick tissue block, and the laser light was scattered and partially absorbed before reaching the tubes. The *in vitro* tissue phantom was immersed in water with 0.9% NaCl (kitchen salt) at 21.7 °C ± 0.2 °C.

Acquisitions were performed in the same condition as for the clear medium: the samples were injected in the tubes, and blank acquisitions were recorded with ultrapure water inside the tubes. The same data processing was applied to obtain the PA coefficient $\theta^{PA}(\lambda)$ of the sample (see Sections 2.1 and 2.2). The 100% and the 60% solutions of nigrosin and the 80% solution of CuSO_4 were measured. As for the clear medium (see Section 3.1.3.), the calibration solution was injected twice before and twice after the samples for a total of four acquisitions per tube, and the samples were injected twice.

Figure A1b,c presents the images without and with subtraction of the blank acquisition. The photoacoustic signal of the tissue was mainly removed by the subtraction process, enabling extraction of A^{PA} . Figure A1d displays the PA coefficient $\theta^{PA}(\lambda)$ of the three solutions and the SPP spectra. For the nigrosin samples, we verified that the PA and SPP spectra are superimposed (PGE equal to one). A PGE coefficient of 1.16 was found for the CuSO_4 solution, which matches with Section 3.2.2.

These results demonstrate that the calibration method can be used in scattering and absorbing media such as an *in vitro* tissue phantom.

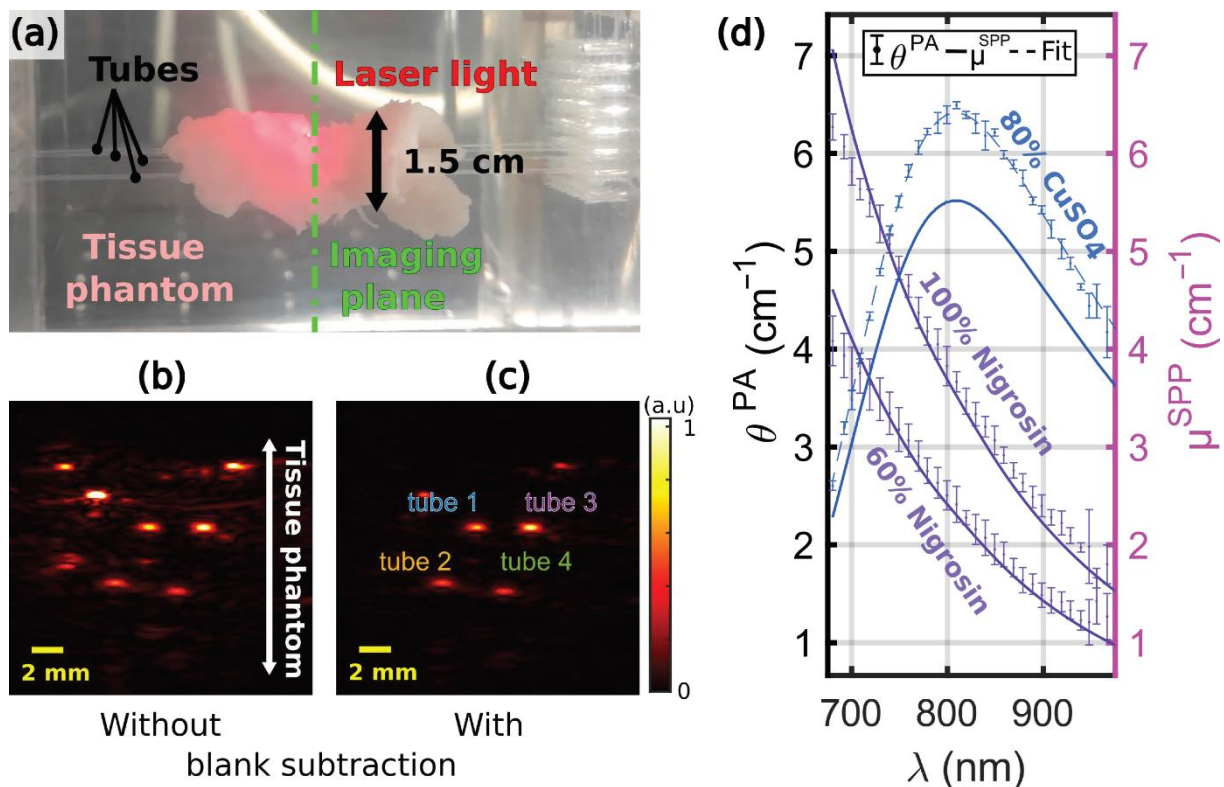


Figure A1. Performance of the calibration method with a tissue phantom. (a) Annotated picture of the tissue phantom. The tubes are surrounded by raw turkey breast. Three tissue layers (0.5 cm thick) form a tissue block with a total thickness of 1.5 cm: one layer above tubes 1/3, one layer between tubes 1/3 and tubes 2/4, and one layer below tubes 2/4. (b,c) PA images at 800 nm and with the tubes filled with the 100% solution of nigrosin. PA images (b) without and (c) with the subtraction of the blank acquisition (tubes filled with water) to the radio-frequency data before image reconstruction. (b,c) have the same color scale, which was set to correspond to the range of values in (c). (d) PA coefficients obtained for three solutions: the 100% and the 60% solutions of nigrosin (purple) and the 80% solution of CuSO_4 (blue). The solutions were measured twice in four tubes. The median \pm MAD values of $\theta^{PA}(\lambda)$ were displayed with dot markers and error bars. The absorption coefficient $\mu^{SPP}(\lambda)$ is displayed with a solid line. The fit of μ^{SPP} to $\tilde{\theta}^{PA}$ is shown with a dashed line for the 80% solution of CuSO_4 .

References

1. Beard, P. Biomedical photoacoustic imaging. *Interface Focus* **2011**, *1*, 602–631. <https://doi.org/10.1098/rsfs.2011.0028>.
2. Taruttis, A.; Ntziachristos, V. Advances in real-time multispectral optoacoustic imaging and its applications. *Nat. Phot.* **2015**, *9*, 219–227. <https://doi.org/10.1038/nphoton.2015.29>.
3. Weber, J.; Beard, P.C.; Bohndiek, S.E. Contrast agents for molecular photoacoustic imaging. *Nat. Methods* **2016**, *13*, 639–650. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3929>.

4. Liu, Y.; Bhattarai, P.; Dai, Z.; Chen, X. Photothermal therapy and photoacoustic imaging *via* nanotheranostics in fighting cancer. *Chem. Soc. Rev.* **2018**, *48*, 2053–2108. <https://doi.org/10.1039/C8CS00618K>.
5. Borg, R.E.; Rochford, J. Molecular Photoacoustic Contrast Agents: Design Principles & Applications. *Photochem. Photobiol.* **2018**, *94*, 1175–1209. <https://doi.org/10.1111/php.12967>.
6. Ho, C.J.H.; Balasundaram, G.; Driessen, W.; McLaren, R.; Wong, C.L.; Dinish, U.S.; Attia, A.B.E.; Ntziachristos, V.; Olivo, M. Multifunctional photosensitizer-based contrast agents for photoacoustic imaging. *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 5342. <https://doi.org/10.1038/srep05342>.
7. Armanetti, P.; Flori, A.; Avigo, C.; Conti, L.; Valtancoli, B.; Petroni, D.; Doumett, S.; Cappiello, L.; Ravagli, C.; Baldi, G.; et al. Spectroscopic and photoacoustic characterization of encapsulated iron oxide superparamagnetic nanoparticles as a new multiplatform contrast agent. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2018**, *199*, 248–253. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2018.03.025>.
8. Laufer, J.; Zhang, E.; Beard, P. Evaluation of absorbing chromophores used in tissue phantoms for quantitative photoacoustic spectroscopy and imaging. *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.* **2010**, *16*, 600–607. <https://doi.org/10.1109/JSTQE.2009.2032513>.
9. Stahl, T.; Allen, T.; Beard, P. Characterization of the thermalisation efficiency and photostability of photoacoustic contrast agents. In *Photons Plus Ultrasound: Imaging and Sensing 2014*; SPIE: Bellingham, WA, USA, 2014; Volume 8943, p. 89435H. <https://doi.org/10.1117/12.2039694>.
10. Stahl, T. *Characterisation of Contrast Agents for Photoacoustic Imaging*; University College London: London, UK, 2016.
11. Fonseca, M.; An, L.; Beard, P.; Cox, B. Sulfates as chromophores for multiwavelength photoacoustic imaging phantoms. *J. Biomed. Opt.* **2017**, *22*, 1. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.22.12.125007>.
12. Fuenzalida Werner, J.P.; Huang, Y.; Mishra, K.; Janowski, R.; Vetschera, P.; Heichler, C.; Chmyrov, A.; Neufert, C.; Niessing, D.; Ntziachristos, V.; et al. Challenging a Preconception: Photoacoustic Spectrum Differs from the Optical Absorption Spectrum of Proteins and Dyes for Molecular Imaging. *Anal. Chem.* **2020**, *92*, 10717–10724. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c01902>.
13. Pelivanov, I.; Petrova, E.; Yoon, S.J.; Qian, Z.; Guye, K.; O'Donnell, M. Molecular fingerprinting of nanoparticles in complex media with non-contact photoacoustics: Beyond the light scattering limit. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 14425. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32580-2>.
14. Schellenberg, M.W.; Hunt, H.K. Hand-held optoacoustic imaging: A review. *Photoacoustics* **2018**, *11*, 14–27. <https://doi.org/10.1016/j.pacs.2018.07.001>.
15. Kratkiewicz, K.; Manwar, R.; Zhou, Y.; Mozaffarzadeh, M.; Avanaki, K. Technical Considerations when using Verasonics Research Ultrasound Platform for Developing a Photoacoustic Imaging System. *Biomed. Opt. Express* **2021**, *12*, 1050–1084. <https://doi.org/10.1364/boe.415481>.
16. Arconada-Alvarez, S.J.; Lemaster, J.E.; Wang, J.; Jokerst, J.V. The development and characterization of a novel yet simple 3D printed tool to facilitate phantom imaging of photoacoustic contrast agents. *Photoacoustics* **2017**, *5*, 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.pacs.2017.02.001>.
17. Marczak, W. Water as a standard in the measurements of speed of sound in liquids. *J. Acoust. Soc. Am.* **1997**, *102*, 2776–2779. <https://doi.org/10.1121/1.420332>.
18. Xu, M.; Wang, L.V. Photoacoustic imaging in biomedicine. *Rev. Sci. Instrum.* **2006**, *77*, 041101. <https://doi.org/10.1063/1.2195024>.
19. Zhou, Y.; Yao, J.; Wang, L.V. Tutorial on photoacoustic tomography. *J. Biomed. Opt.* **2016**, *21*, 061007. <https://doi.org/10.1117/1.jbo.21.6.061007>.
20. Yao, D.-K.; Zhang, C.; Maslov, K.; Wang, L.V. Photoacoustic measurement of the Grüneisen parameter of tissue. *J. Biomed. Opt.* **2014**, *19*, 017007. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.19.1.017007>.
21. Gehrung, M.; Bohndiek, S.E.; Brunner, J. Development of a blood oxygenation phantom for photoacoustic tomography combined with online pO₂ detection and flow spectrometry. *J. Biomed. Opt.* **2019**, *24*, 1. <https://doi.org/10.1117/1.jbo.24.12.121908>.
22. Petrova, E.; Ermilov, S.; Su, R.; Nadvoretzkiy, V.; Conjusteau, A.; Oraevsky, A. Using optoacoustic imaging for measuring the temperature dependence of Grüneisen parameter in optically absorbing solutions. *Opt. Express* **2013**, *21*, 25077. <https://doi.org/10.1364/oe.21.025077>.
23. Kirchherr, A.K.; Briel, A.; Mäder, K. Stabilization of indocyanine green by encapsulation within micellar systems. *Mol. Pharm.* **2009**, *6*, 480–491. <https://doi.org/10.1021/mp8001649>.
24. Hale, G.M.; Querry, M.R. Optical Constants of Water in the 200-nm to 200- μ m Wavelength Region. *Appl. Opt.* **1973**, *12*, 555. <https://doi.org/10.1364/ao.12.000555>.
25. Jain, P.K.; Lee, K.S.; El-Sayed, I.H.; El-Sayed, M.A. Calculated absorption and scattering properties of gold nanoparticles of different size, shape, and composition: Applications in biological imaging and biomedicine. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 7238–7248. <https://doi.org/10.1021/jp057170o>.
26. Chen, Y.S.; Frey, W.; Aglyamov, S.; Emelianov, S. Environment-dependent generation of photoacoustic waves from plasmonic nanoparticles. *Small* **2012**, *8*, 47–52. <https://doi.org/10.1002/sml.201101140>.

27. Chen, Y.-S.; Zhao, Y.; Yoon, S.J.; Gambhir, S.S.; Emelianov, S. Miniature gold nanorods for photoacoustic molecular imaging in the second near-infrared optical window. *Nat. Nanotechnol.* **2019**, *14*, 465–472. <https://doi.org/10.1038/s41565-019-0392-3>.
28. Mantri, Y.; Jokerst, J.V. Engineering Plasmonic Nanoparticles for Enhanced Photoacoustic Imaging. *ACS Nano* **2020**, *14*, 9408–9422. <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c05215>.
29. Schwartz, A.; Joline, L.; Snow, E.; Francke, S.; Marques, C.; Bernardes, R. Stabilizing Indocyanin Green for Use as Quantitative Standards. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2008**, *49*, 2116.
30. Wu, Y.; Zhang, H.K.; Kang, J.; Boctor, E.M. An economic photoacoustic imaging platform using automatic laser synchronization and inverse beamforming. *Ultrasonics* **2020**, *103*, 106098. <https://doi.org/10.1016/j.ultras.2020.106098>.
31. Rathod, V.T. A review of acoustic impedance matching techniques for piezoelectric sensors and transducers. *Sensors* **2020**, *20*, 4051. <https://doi.org/10.3390/s20144051>.
32. Mabuza, B.R.; Netshidavhini, N. The effect of a middle layer on ultrasonic wave propagating in a three-layered structure. In Proceedings of the Meetings on Acoustics ICA2013, Montreal, QC, Canada, 2–7 June 2013; Volume 19, p. 030076. <https://doi.org/10.1121/1.4799683>.
33. Khan, M.I.; Sun, T.; Diebold, G.J. Photoacoustic waves generated by absorption of laser radiation in optically thin cylinders. *J. Acoust. Soc. Am.* **1993**, *94*, 931–940. <https://doi.org/10.1121/1.408195>.

Chapitre 3 : Mise en place et validation de l'instrument de caractérisation quantitative photothermique à l'aide d'un agent d'étalonnage.

Dans ce chapitre, nous proposons un dispositif pour mesurer l'élévation de température moyenne d'un échantillon d'un agent photothermique lors d'une excitation optique conduisant à une hyperthermie. Nous développerons les techniques de mesure utilisées avec ce dispositif *in vitro* ainsi qu'une méthode d'étalonnage originale pour corriger la mesure de température par rapport aux caractéristiques intrinsèques du montage expérimental (variation de la température ambiante, humidité, coefficient thermique de l'échantillon, sources de pertes thermiques...). Nous étudierons l'augmentation de température pour un agent de photothermie d'étalonnage : la nigrosine. Grâce aux propriétés thermiques et optiques spécifiques de cet agent, la mesure de sa réponse photothermique pourra être utilisée comme mesure de référence pour une comparaison avec les échauffements obtenus avec d'autres échantillons.

3.1. Hyperthermie par excitation optique des solutions *in vitro*

3.1.A. Dispositif expérimental de mesure de température globale : analyse du système initial

Un dispositif de mesure de la température globale d'un échantillon (de 100 μL à 1 mL) au cours de l'illumination optique a été mis en place, précédemment, au laboratoire MSC. Ce système a servi à des études de l'augmentation de température par la photothermie au cours de la thèse d'Alba Nicolas-Boluda [1]. À partir des discussions avec Florent Voisin et l'équipe de MSC, un cahier de charges a été mis au point afin d'améliorer ce système de mesure dans l'objectif de mesurer l'augmentation de température d'un échantillon de petit volume induite par l'illumination laser d'une façon étalonnée et reproductible. Cette caractérisation quantitative et robuste est, en effet, essentielle afin de pouvoir comparer la réponse photothermique de plusieurs échantillons différents. Les deux points clefs à améliorer sont :

La reproductibilité des mesures. Il a été nécessaire de fixer la géométrie d'illumination laser afin de pouvoir caractériser quantitativement la puissance de l'exposition laser et afin de pouvoir assurer des expositions dans les mêmes conditions pour différentes séries de manipulations. D'autre part, il a fallu fixer la distance échantillon-caméra afin de pouvoir comparer la réponse détectée de différents échantillons.

L'isolement du système. Dans le système en place précédemment, les rayonnements extérieurs pouvaient entraîner des artefacts de mesures et la sécurité laser n'était pas respectée. La conception d'un moyen d'isoler le système a été primordiale afin d'assurer la qualité des mesures et la sécurité des utilisateurs.

La suite traitera de la conception d'un montage répondant à ce cahier des charges et des résultats obtenus lors de l'évaluation des performances de ce dispositif évolué.

3.I.A.a. Le montage expérimental

J'ai conçu un montage fixe pour m'affranchir de toutes les variabilités liées à la géométrie telles que l'angle de caméra, la distance caméra-échantillon et la distance laser-échantillon. Ce montage permet d'avoir un contrôle et une stabilité sur la puissance laser incidente sur l'échantillon. Enfin, j'ai isolé le montage par rapport à l'extérieur afin d'assurer, d'une part, la sécurité laser et d'autre part, l'isolement de l'échantillon des rayonnements thermiques extérieurs.

Le dispositif expérimental mis en place pour ce travail peut être considéré en 3 blocs principaux :

- Le laser et la fibre optique utilisés pour l'illumination de l'échantillon
- Le système de support de l'échantillon
- La caméra infrarouge qui détecte la modification de la température de l'échantillon

Ce dispositif expérimental est représenté dans la photographie dans la Figure 3.1(A) et schématiquement en Figure 3.1(B).

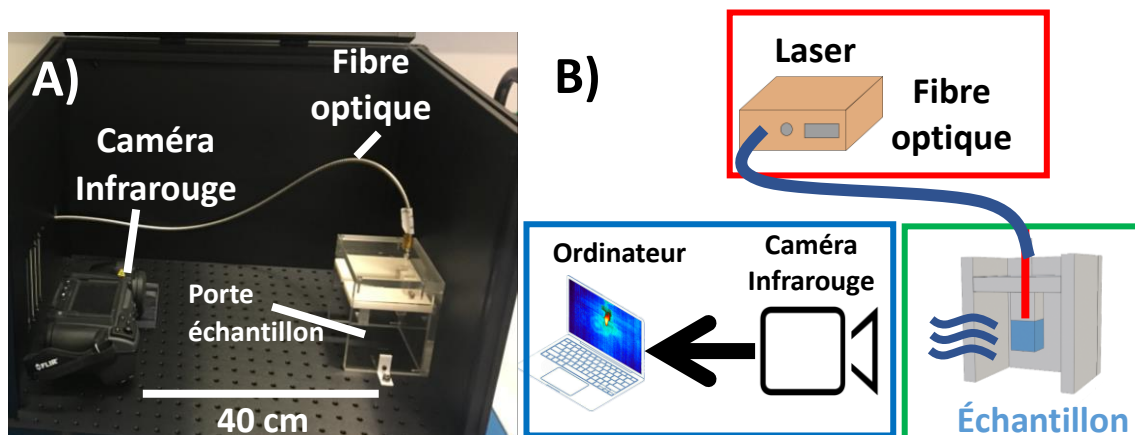


Figure 3.1. Montage expérimental : (A) une photographie du montage expérimental utilisée pour la mesure de température en photothermie. (B) Dessin schématisé du montage expérimental, décomposé en 3 parties principales : le laser (rouge), l'échantillon (vert) et la caméra infrarouge (bleu).

La lumière continue émise par le laser est guidée par une fibre optique afin d'illuminer la surface libre de l'échantillon contenu dans un microtube de 0.5 ml (Eppendorf SE, Hamburg, Germany). Ainsi, le faisceau optique est dirigé selon l'axe longitudinal du tube. J'ai fabriqué un support par impression 3D qui assure un placement reproductible du laser relativement à l'échantillon. Les rayonnements thermiques de l'échantillon sont mesurés perpendiculairement à l'axe du faisceau laser. Ces émissions sont converties en carte de température avec une caméra infrarouge (FLIR T430sc, FLIR Systems, Wilsonville, Oregon,

USA) située latéralement à une distance fixe de 40 cm de l'échantillon. L'image thermique détectée par la caméra est acquise avec une fréquence d'acquisition de 30 Hz à l'aide du logiciel de traitement constructeur, ResearchIR.

L'ensemble des éléments du dispositif est confiné dans une enceinte noire en aluminium (Thorlabs, Germany). L'utilisation de cette enceinte permet d'assurer la protection laser utilisateur en bloquant les réflexions laser potentielles, ainsi qu'une isolation des rayonnements thermiques extérieurs directs (tels que les rayons du soleil, par exemple).

3.I.A.b. L'échantillon

Afin d'optimiser le bloc « échantillon » dans notre système de mesure, deux études ont été effectuées. La première a permis d'évaluer l'impact du volume de l'échantillon sur la mesure de la température. La seconde a été effectuée afin de déterminer le meilleur contenant à utiliser pour l'échantillon. Pour un objectif de praticité, nous avons considéré seulement des contenants à usage unique. Cela permet d'étudier rapidement un lot de différents échantillons sans avoir à laver le contenant, et on évite aussi le risque de la contamination des échantillons en cas de lavage mal exécuté. D'autre part, la configuration de mesure a été conçue afin de permettre l'illumination de l'échantillon via sa surface libre (le côté supérieur qui n'est pas encapsulé). Ce choix permet d'éviter l'absorption de la lumière par les parois du contenant avant d'atteindre l'échantillon.

3.I.A.c. Volumes considérés

Le volume de l'échantillon utilisé est un paramètre important dans l'étude de l'augmentation de température par hyperthermie. En effet, l'utilisation d'un petit volume permet techniquement d'obtenir une stabilisation thermique plus rapide pendant la phase de chauffage. Cependant, un volume trop petit, et en particulier un rapport surface sur volume trop élevé, ne permet plus de négliger le phénomène d'évaporation et ceci va créer un biais sur la mesure de la température. C'est le cas pour l'utilisation de gouttes comme proposé par Richardson [2] où un système d'humidification du milieu est nécessaire afin de ralentir l'évaporation. A contrario, l'utilisation d'un volume plus grand de l'ordre du ml oblige la production de l'échantillon à étudier en grande quantité par les chimistes, ce qui peut engendrer des coûts non négligeables. De plus, un dispositif avec un tel volume d'échantillon va obliger à augmenter le temps d'illumination. Il faudra environ 45min afin de stabiliser la température d'un volume de 2 ml [3] alors qu'un volume de l'ordre des centaines de μL exige seulement environ 10 min, ce qui représente un facteur de 4.5 dans le temps de mesure.

Ainsi, la question s'est posée sur le volume à utiliser lors des expérimentations. Le coût de synthèse de particules innovantes en grande quantité nous oriente vers le choix d'un petit volume et nous avons donc considéré l'influence du volume de l'échantillon pour les volumes entre 100 et 500 μl avant d'aller plus loin dans cette analyse, il a été nécessaire de choisir les types de contenant à considérer. En effet, pour un petit volume, la nature et l'épaisseur des parois du contenant par rapport au petit volume de l'échantillon et sa géométrie peuvent avoir une influence sur la mesure de l'élévation de température.

3.I.A.d. Étude sur deux types de contenant

Nous avons comparé un microtube et une microcuvette plastique (cuvette semi-micro VWR) de spectromètre UV-Visible chaque contenant dispose d'avantages qui lui sont propres. La microcuvette en plastique dispose de meilleures propriétés de transparence optiques, mais dispose d'une géométrie rectangulaire 12.3×45×12.5mm (cf. dessin technique Annexe) ce qui n'est pas optimal au vu de la géométrie circulaire du faisceau laser. En effet, cette différence de géométrie peut rendre difficile une illumination uniforme de l'ensemble de la surface de l'échantillon.

Le microtube de diamètre intérieur de 0.6 mm quant à lui possède une géométrie cylindrique comme le faisceau ce qui permet d'avoir une illumination plus uniformément distribuée sur l'ensemble de l'échantillon. De plus, le microtube permet la centrifugation de l'échantillon. L'utilisation du microtube permettra ainsi, dans le futur, de pouvoir étudier le taux de chauffe de nanoparticules internalisées dans des cellules en culot sans changer les cellules de contenant après centrifugation. En contrepartie, le microtube, qui a la forme d'un cône, ne dispose pas d'une forme homogène (cf. dessin technique Annexe). L'utilisation de microtube peut créer des biais si la solution utilisée présente des dépôts, car la forme conique du contenant pourrait engendrer un pic de concentration localisé au niveau du culot.

3.I.A.e. Impact du volume de l'échantillon sur la mesure de la température

Considérons un milieu avec un coefficient d'atténuation de $\mu_{10}^{\text{att}}=1 \text{ cm}^{-1}$ qui signifie qu'après 1 cm parcouru par la lumière dans l'échantillon 90 % de l'énergie de la lumière incidente est absorbée soit 10% de l'énergie de la lumière incidente est transmise. On retrouve ce résultat en calculant le pourcentage de la transmission optique dans l'Equation (1.2) dans notre cas $T(\lambda)=10^{-1}=10 \%$.

Dans le cas d'un volume de 100 μL dans le microtube, la hauteur de liquide est d'environ 0.9 cm. La totalité de la solution chauffe, alors que pour 500 μL dans un microtube, la hauteur de colonne du liquide est de 2.4 cm et seulement une partie est chauffée comme illustré dans la Figure 3.2. Pour de plus grands volumes, la diffusion thermique sera encore moins uniforme, ce qui aurait tendance à diminuer la température détectée au point le plus chaud sur l'image thermique. D'autre part, nous avons constaté sur des cartes de température que le point chaud n'est pas localisé au même endroit sur le microtube ou cuvette en fonction du volume. Lorsque le volume est de 500 μL , le point chaud se situe plus au niveau de la surface.

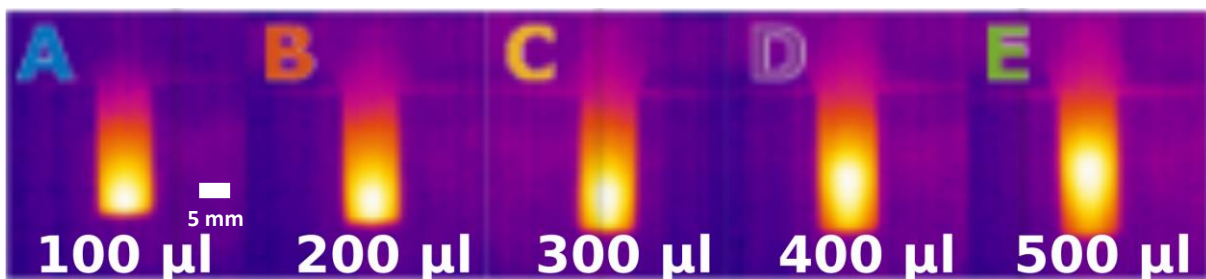


Figure 3.2. Cartes de température d'une solution de CuSO_4 (sulfate de cuivre) à $\mu_{10}^{\text{PA}}=1 \text{ cm}^{-1}$ pour des volumes différents à $t=600\text{s}$. On observe pour la carte (E) une plus grande hétérogénéité sur la carte de température avec la mise en évidence des zones plus froides en bas de la cuve.

Dans le cas d'un milieu avec une absorbance plus faible, l'élévation de température est spatialement beaucoup plus homogène, car la chaleur est diffusée dans toute la solution. Dans ces conditions, l'impact du volume sur l'élévation de température est très faible dans la gamme de volumes considérée ici.

Sur la base de l'homogénéité des cartes de température dans un milieu très absorbant, nous avons choisi d'utiliser pour la suite des mesures un volume de 200 μL (volume équivalent d'une sphère de rayon d'environ 3.6 mm) pour éviter une inhomogénéité de température et une sous-estimation de l'élévation de température causée par la diffusion thermique dans les zones non chauffées par le laser.

Nous avons également cherché à éviter un trop petit volume où l'échauffement du contenant ou les effets de l'évaporation peuvent être significatifs. Dans le travail de Richardson [4] et al ou Paściak et al [5], il est démontré que la perte de volume par évaporation n'est pas négligeable si le ratio surface/volume de l'échantillon est trop grand. Pour Paściak et al. qui mesure l'augmentation de la température pour une goutte de solution ayant un rayon de 1.5 mm, toute la surface de l'échantillon est une surface libre (i.e une surface exposée à l'atmosphère) on obtient donc une surface $S \approx 4 \cdot \pi \cdot 0.15^2 \approx 0.28 \text{ cm}^2$ avec un volume de 15 μL ce qui représente un rapport surface sur volume de 188.5 cm^{-1} . Pour notre montage $S \approx 0.3 \text{ cm}^2$ et le volume est de 200 μL . Le ratio de surface à volume est donc de 1.5 cm^{-1} seulement. Ainsi, pour notre montage, nous n'avons pas jugé nécessaire d'avoir un contrôle strict de l'humidité du milieu environnant pour compenser l'évaporation.

3.1.A.f. Comparaison des contenants à utiliser pour l'échantillon

La seconde étude (pour le choix du contenant) a été faite à partir de la détermination de l'élévation de température de 4 solutions de nigrosine à absorbance égale à $\mu_{a,10} = 1 \text{ cm}^{-1}$ pendant 10 min. Parmi les 4 solutions identiques, 2 volumes différents (200 μL et 400 μL) ont été étudiés. On obtient alors les résultats présentés sur la Figure 3.3.

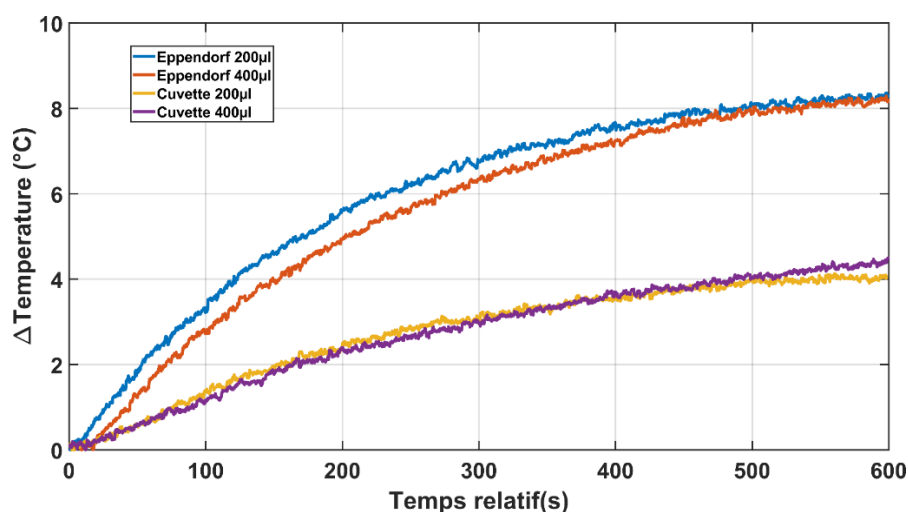


Figure 3.3. Graphique de la température enregistrée dans la nigrosine à $A=1 \text{ cm}^{-1}$ en fonction du temps d'exposition lumineuse.

On peut observer sur la Figure 3.3, que, d'une part, il y a peu de différence entre la variation temporelle de la température pour les deux volumes différents dans le même type de contenant. D'autre part, l'élévation de température obtenue entre les deux types de contenant est significativement différente et de l'ordre d'un facteur 2. Cela peut s'expliquer par la différence de géométrie de la microcuvette et du faisceau laser parce que la surface rectangulaire de l'échantillon dans la microcuvette n'est pas illuminée d'une façon uniforme par le faisceau laser de sections circulaires.

3.I.A.g. Le laser

Pour le montage de photothermie et pour activer l'effet photothermique des échantillons, une diode laser continue de 808 nm (CNI laser, FC-808nm-3W-19012032) à puissance réglable jusqu'à 3 W est utilisée avec une fibre optique de diamètre de cœur de 400 μm et d'ouverture numérique (ou NA numerical aperture) de 0.22 pour la redirection du faisceau. La diode laser a été choisie de façon à ce que la longueur d'onde se situe dans la « fenêtre optique » des tissus biologiques.

La distance entre l'échantillon contenu dans un microtube et le laser est de 2.35 cm, avec un faisceau laser de 0.5 cm de diamètre à la surface de l'échantillon. Ces valeurs ont été fixées et verrouillées grâce à un support mécanique que j'ai conçu et construit par impression 3D, qui contraint les degrés de liberté de la fibre ainsi que de l'échantillon et assure ainsi une illumination reproductible des échantillons.

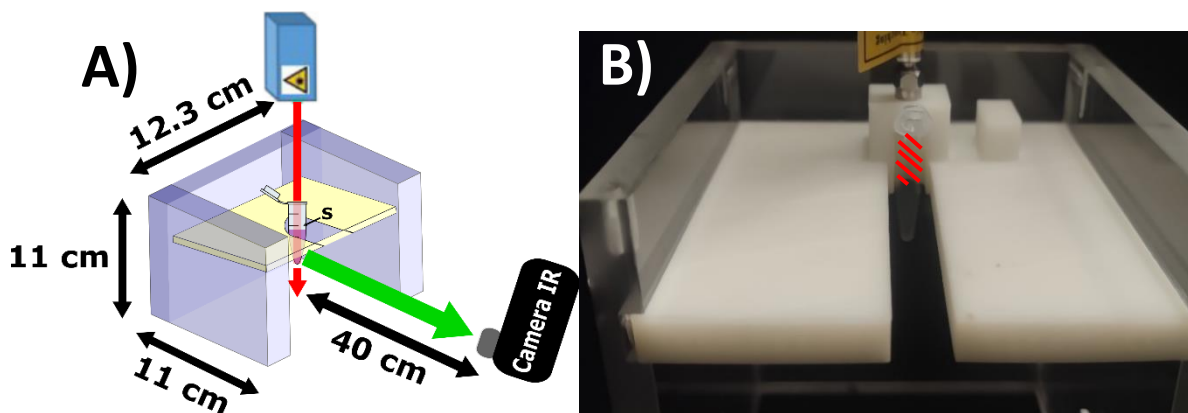


Figure 3.4. Schéma général du support utilisé et de la géométrie utilisée dans le montage expérimental. (A) Présentation schématique des éléments et de la configuration expérimentale. La caméra thermographique enregistre la température de la paroi latérale du microtube. (B) Photographie du support avec microtube.

Le contrôle de la puissance laser a été un point très important pour pouvoir comparer quantitativement les augmentations de température. En effet, comme le montrent les équations théoriques du Chapitre 1 Partie III.2, l'élévation de température obtenue est directement proportionnelle à la fluence du laser. Ainsi, pour des caractérisations et des comparaisons fiables, il est nécessaire d'effectuer les mesures de température avec les mêmes conditions d'illumination. Pour ce faire, la puissance laser a été mesurée préalablement grâce à un puissance-mètre (Optical Power Meter PM400K5 Thorlabs) juste après la fibre. Le puissance-mètre permet d'évaluer la fluence avec une précision de 100 μW . La puissance par

unité de surface est calculée en divisant la valeur obtenue avec le puissance-mètre par le diamètre du faisceau du laser tel que :

$$P\left(\frac{W}{cm^2}\right) = \frac{P(W)}{\pi R^2} \quad (3.1)$$

La puissance du laser a été fixée à 1 W.cm^{-2} pour toute la suite des expérimentations présentée dans cette thèse. La puissance laser va influencer la hausse de température obtenue. Plus la puissance sera haute, plus l'augmentation de température sera grande en amplitude. De plus, il est important de trouver un équilibre entre l'efficacité de l'activation des agents thérapeutiques et la sécurité pour les tissus sains. Une augmentation excessive de la puissance pourrait entraîner des effets indésirables sur les tissus biologiques par un chauffage non spécifique.

3.I.A.h. La caméra infrarouge

La caméra infrarouge fournit une séquence de cartes de température comme illustrée dans la Figure 3.5. L'extraction de la température a été faite avec le logiciel constructeur, *ResearchIR*. Une température est associée à chaque pixel de l'image. Pour obtenir une température moyenne, il est possible grâce à ce logiciel de construire une région d'intérêt (Region of Interest ROI). Cette dernière permet de calculer la température moyenne dans la zone sélectionnée sur chaque image de la séquence. Avec l'analyse des différentes cartes obtenues en fonction de temps, on obtient la courbe de température en fonction du temps. Le ROI a été placé autour du point chaud de façon à englober un disque d'environ 3.6 mm de diamètre (10 pixels de diamètre). Son ajustement spatial est réalisé manuellement et est basé sur la distribution de la température autour du point chaud visualisée avec l'échelle de couleurs d'affichage. La région d'intérêt reste fixe sur l'image durant toute la procédure de post-traitement. La température obtenue est la moyenne des températures de chaque pixel à l'intérieur de cette région d'intérêt. Pour toutes les études par caméra infrarouge dans ce manuscrit, la température sera associée à cette moyenne de température sur le ROI.

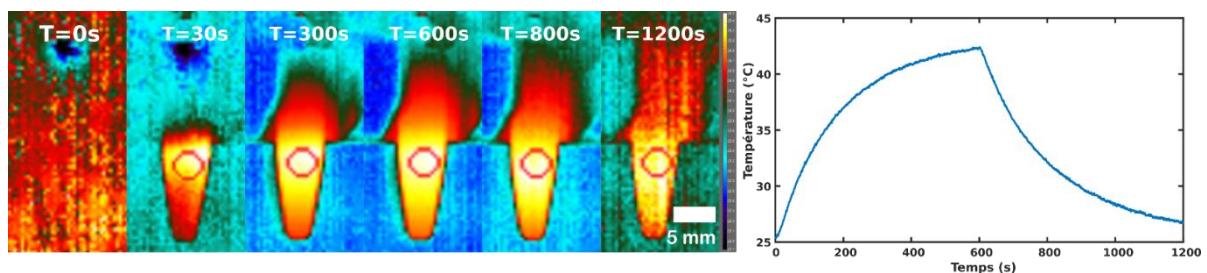


Figure 3.5. Carte de température obtenue par la caméra thermique à différent moment de l'acquisition. Ici, un exemple de chauffe d'une solution de nigrosine à $A=1\text{cm}^{-1}$.

L'élévation de la température a été enregistrée à la fréquence de 30 Hz (30 images par seconde) ce qui nous permet de nous affranchir des quelques pertes d'images qui peuvent subvenir lors de l'enregistrement des données tout en maintenant un bon échantillonnage temporel. La caméra infrarouge est située à 40 cm de la solution. Cela correspond à la distance minimale à laquelle la caméra peut effectuer une mise au point. La résolution de la caméra

est de 320x240 pixels. Donc le contenant se trouve sur une région de 68 pixels. Les températures mesurées attendues sont [30 ; 90] °C, qui correspond à la plage spectrale [7.98 ;9.56] μm déterminée par la loi de Wien (Equation 1.7), et se situe bien dans la gamme mesurable ([7.5 ;13] μm) par la caméra infrarouge. L'émissivité de la caméra thermique (cf. Chapitre 1 partie III.1) est paramétrée en fonction du solvant utilisé (solution aqueuse). Elle est donc fixée à 0.95, ce qui correspond à l'émissivité de l'eau.

3.IA.i. Mesure de température

La mesure de température est faite sur le microtube contenant une solution d'absorbeur optique de volume fixé à 200 μL et illuminé par le dessus. Le microtube est inséré dans le support. Le support est en contact uniquement avec la partie supérieure du microtube indiquée par la zone rouge dans la Figure 3.4.b, afin de réduire le transfert de chaleur vers d'autres éléments du système. Le système est isolé de la lumière et des sources de chaleur extérieure par l'enceinte noire en aluminium. Les mesures ont été effectuées dans une pièce à température et des conditions d'humidité ambiante.

Après avoir enregistré les séquences des cartographies thermiques avec la caméra, la température de l'échantillon est calculée en fonction du temps, c'est-à-dire le temps à partir du début de l'enregistrement. Cela signifie que chaque image du film est associée à un temps et une température. On obtient alors un tableau de valeurs que l'on peut présenter sur un graphique de température en fonction du temps (Figure 3.6).

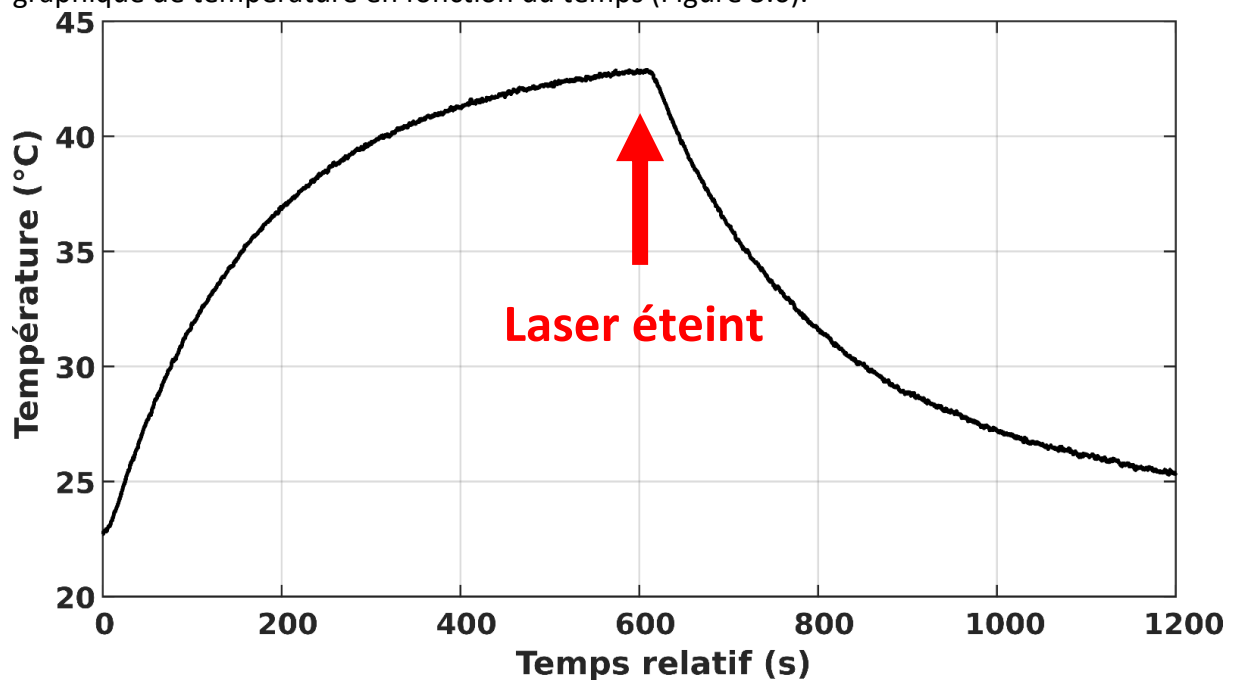


Figure 3.6. Graphique de la température en fonction du temps enregistrée pour un échantillon de nigrosine à $A=1 \text{ cm}^{-1}$. Le laser est allumé (heating), puis éteint au bout de 10 min. On laisse ensuite refroidir la solution pendant 10 min (cooling).

Sur le graphique de la Figure 3.6, nous pouvons observer une augmentation de température jusqu'à ce que celle-ci atteigne un palier.

Pour la comparaison d'absorbeurs optiques et afin d'estimer la capacité de chauffe d'un échantillon, il est plus commode de s'affranchir de la température initiale de l'échantillon. Ainsi, nous étudions l'incrément de température, soit la différence entre la température initiale mesurée au temps relatif égal à zéro (ou le minimum de la température lors de la mesure). Nous obtenons ainsi la grandeur ΔT en fonction du temps comme illustrée sur la Figure 3.7.

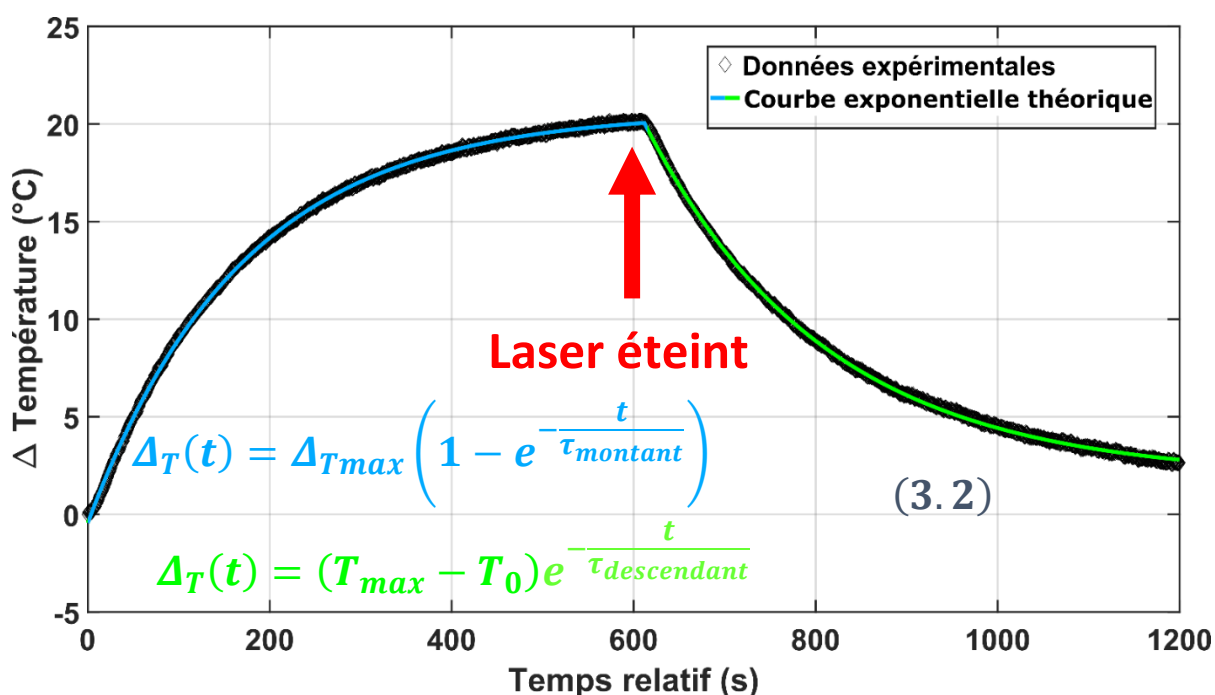


Figure 3.7. Graphique de la différence de température en fonction du temps enregistrée pour un échantillon de nigrosine à $\mu_{10}^{PA}=1\text{cm}^{-1}$. On observe que les Équations 3.2 théoriques de la photothermie modélisent bien les données expérimentales obtenues et cela pour les deux phases de la courbe.

Grâce aux valeurs expérimentales mesurées, il a été possible de vérifier que nos mesures peuvent être ajustées par des fonctions exponentielles compatibles avec le modèle théorique énoncé par Wang [6]. Un ajustement obtenu avec la fonction « lsqcurvefit » (MATLAB et Optimization Toolbox Release 2019b, The MathWorks, Inc., Natick, Massachusetts, United States.) et l'expression analytique nous a permis d'extraire différents paramètres de la loi exponentielle. Les lois exponentielles rappelées à la Figure 3.7 permettent de caractériser et d'étudier les phénomènes de photothermie dans les solutions d'absorbeurs optique. Ainsi, il est possible de décrire l'élévation de température (heating), mais aussi le refroidissement (cooling) de la solution en fonction du temps. On peut extraire (ΔT_{\max}) qui correspond à la différence de température maximale pouvant être obtenue et équivalant à une valeur seuil pour le temps relatif tendant vers l'infini dans la phase de chauffe. Ce paramètre est dépendant d'après l'Equation 1.26, notamment, de l'absorbance du milieu qui peut être déterminé par la photoacoustique $E_{pt} \cdot \mu_a$, l'extinction μ_{10}^{att} et par le η qui est l'efficacité

photothermique qui est intrinsèque à l'absorbeur (la particule) utilisé. Le coefficient τ , quant à lui, désigne la constante de temps de croissance τ_{montant} ou de décroissance $\tau_{\text{descendant}}$ des fonctions exponentielles décrites dans les Équations 1.22 et 1.23, respectivement. Le coefficient τ_{montant} traduit la cinétique de l'élévation de chaleur et correspond au temps nécessaire pour que la solution atteigne un ΔT égal à 63% de ΔT_{max} . Ce dernier paramètre est essentiellement dépendant de h , le coefficient de transfert de chaleur ($\text{W.m}^{-2}.\text{K}^{-1}$). Contrairement à ce que prédit la théorie, les τ obtenus à partir des données expérimentales lors de l'élévation de température et lors du refroidissement sont différents comme présentés dans la Figure 3.8.

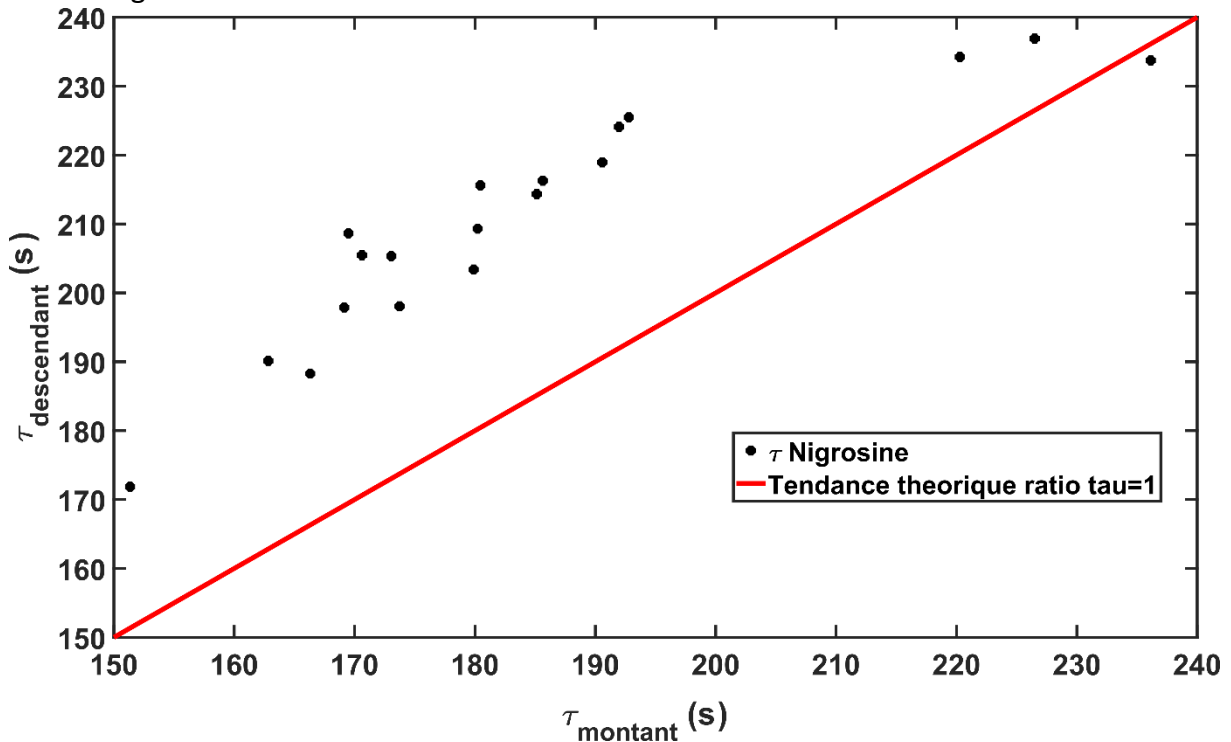


Figure 3.8. Comparaison des $\tau_{\text{descendant}}$ en fonction τ_{montant} des τ obtenus sur les mesures de nigrosine. La courbe rouge $y=x$ représente la tendance théorique décrite dans la littérature telle que $\tau_{\text{montant}}/\tau_{\text{descendant}}=1$.

Il apparaît dans la Figure 3.8 que les τ_{montant} sont inférieurs aux $\tau_{\text{descendant}}$. Cela signifie que le cooling (refroidissement) est plus lent que la chauffe induite par le laser. Pour rappel :

$$\tau = \frac{m_{\text{eau}} C_{p,\text{eau}}}{hS_i} \quad (3.3)$$

$m_{\text{eau}} C_{p,\text{eau}}$ La masse (en g) du solvant (ici on considère de l'eau) et la capacité thermique massique ($\text{W.m}^{-2}.\text{K}^{-1}$), respectivement. h est le coefficient de transfert thermique qui est un coefficient quantifiant le flux d'énergie traversant un milieu, par unité de surface et S_i la surface d'échange thermique entre le système et l'extérieur (m^2).

Pour l'étude des propriétés thermiques des échantillons, un temps d'exposition suffisant est nécessaire. En effet, l'élévation de température atteint un maximum au bout d'un temps donné, du fait de l'établissement d'un équilibre thermique. Pour estimer les paramètres des lois exponentielles de manière fiable, l'ajustement des courbes doit être proche de ΔT_{max} , ce

qui signifie que l'équilibre thermique doit être atteint pour obtenir une estimation précise de ΔT_{\max} et des autres paramètres. En nous basant sur la dynamique de chauffe pour la solution de calibration (la nigrosine), nous avons choisi un temps d'exposition au laser de 10 min, ce qui correspond à 96% du maximum de la température pouvant être atteinte pour cette solution.

Pour s'assurer de la robustesse de l'estimation de la température de nos échantillons à l'aide de notre dispositif expérimental, une étude de répétabilité a été effectuée. Nous avons calculé la moyenne et l'écart type sur 10 mesures réalisées avec une solution de nigrosine d'absorbance égale à $A=1\text{cm}^{-1}$ à une même puissance laser de 1 W.cm^{-1} . Nous avons effectué la mesure d'élévation de température pendant 10 min et répété 10 fois de suite cette mesure sur 10 échantillons de $200\ \mu\text{L}$ d'une même solution de nigrosine. On calcule alors la moyenne et l'écart type comme illustré sur la Figure 3.9.

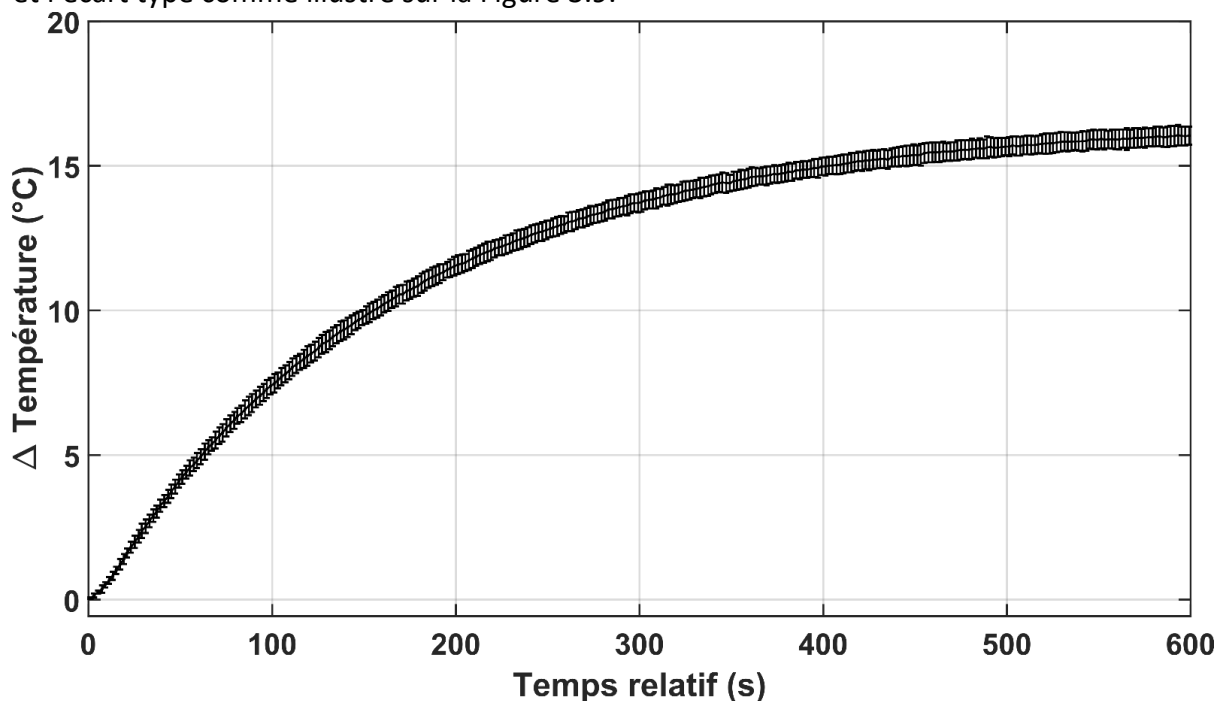


Figure 3.9. Graphique de la moyenne et écart type de la modification de la température d'une solution de nigrosine à $A=1\text{ cm}^{-1}$ en fonction du temps (calculs faits sur 10 acquisitions de nigrosine).

L'écart type sur la moyenne ou l'écart type relatif est très faible, de l'ordre de 2%. Celui-ci reste négligeable par rapport aux différences de températures mesurées. Ces résultats nous permettent d'affirmer la répétabilité de la mesure pour une série de 10 expériences d'affilée.

Comme nous avons pu le voir précédemment, l'absorption joue un rôle majeur dans l'augmentation de température. Les mesures de ΔT_{\max} ont été effectuées par la méthode précédente pour différentes valeurs d'absorption PA de l'échantillon mesuré par spectroscopie PA. Ainsi, nous avons obtenu l'élévation de température maximum d'un ensemble d'échantillons de nigrosine d'absorption PA de $[0.15 ; 0.2 ; 0.4 ; 0.6 ; 0.8 ; 1]\text{ cm}^{-1}$.

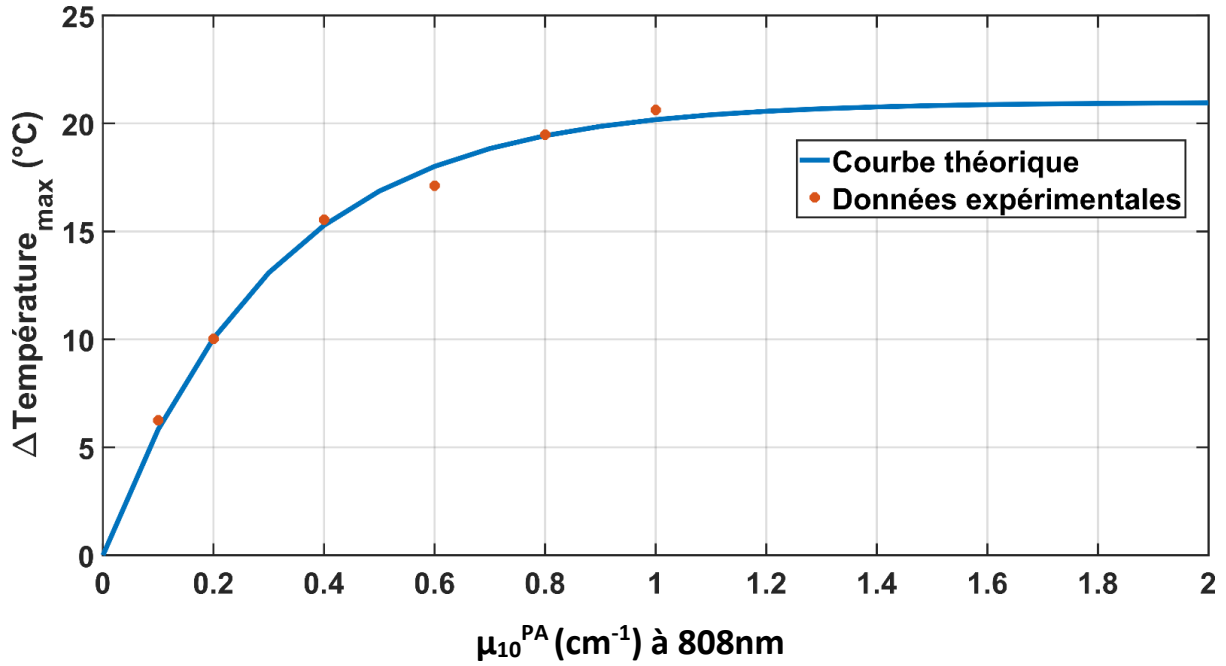


Figure 3.10. Graphique de la différence de température ΔT_{max} en fonction de l'absorption μ_{10}^{PA} d'une solution de nigrosine. L'ajustement (courbe bleue) aux données expérimentales est obtenu grâce à l'Equation 1.26 détaillée dans le Chapitre 1.

Le régime de chauffe est décrit par l'Equation (1.25). On atteint le régime permanent dans la phase de chauffe en faisant tendre $t \rightarrow \infty$ ce qui signifie que l'on considère un temps d'illumination infinie, la différence de température s'écrit alors ΔT_{max} qui représente l'augmentation de température maximum atteinte par l'échantillon.

On obtient alors une température d'équilibre telle que :

$$\Delta T_{max} = \lim_{t \rightarrow \infty} \Delta T(t) = \frac{Ept \cdot \mu_a}{\mu_{10}^{att} \cdot \ln(10) \cdot h \cdot S_i} \cdot I(0) \cdot S \cdot \left(1 - 10^{-\mu_{10}^{att} \cdot L}\right) \quad (3.4)$$

Que l'on peut simplifier :

$$\Delta T_{max} = \lim_{t \rightarrow \infty} \Delta T(t) = \frac{\eta \cdot I(0) \cdot \left(1 - 10^{-L \cdot \mu_{10}^{att}}\right) \cdot S}{h \cdot S_i} \quad (3.5)$$

Si l'on veut exprimer l'équation en fonction du coefficient d'absorption photoacoustique égal à μ_{10}^{PA} , alors on remplace :

$$\mu_{10}^{att} = \frac{\mu_{10}^{PA}}{\eta} \quad (3.6)$$

$$\Delta T_{max} = \lim_{t \rightarrow \infty} \Delta T(t) = \frac{\eta \cdot I(0) \cdot \left(1 - 10^{-\frac{L}{\eta} \mu_{10}^{PA}}\right) \cdot S}{h \cdot S_i} \quad (3.7)$$

Cette température d'équilibre peut donc être exprimée en fonction de l'absorption μ_{10}^{PA} uniquement. La courbe théorique est obtenue par l'algorithme d'ajustement de courbe

« Isqcurvefit » (MATLAB et Optimization Toolbox Release 2019b, The MathWorks, Inc., Natick, Massachusetts, United States). On obtient donc deux paramètres que sont le chemin optique L qui est une composante liée au système (ou à l'atténuation si la profondeur de pénétration optique est plus faible que la hauteur de liquide) et le paramètre $P = \frac{I(0) \cdot S \cdot \eta}{h \cdot S_i}$ qui correspond au ΔT_{\max} pouvant théoriquement être atteint pour une solution d'absorbance infinie. Ces deux paramètres nous permettent de construire la courbe théorique (en bleu sur la Figure 3.10).

Cette équation nous renseigne sur le fait que, de par sa forme mathématique, il existe une absorption ou extinction pour laquelle on atteint une différence de température maximale. Cela signifie deux choses : premièrement, qu'il existe une notion de rendement maximum en fonction de la concentration de l'absorbeur optique si on relie l'absorption et la concentration via la loi de Beer-Lambert. Deuxièmement, si on mesure l'absorption d'une solution par une caractérisation photoacoustique ou extinction en UV-Visible, il est possible de déterminer théoriquement l'augmentation de température pour cette solution pour d'autres valeurs d'absorption ou d'extinction du même échantillon à partir de la caractérisation initiale.

3.1.A.j. L'étalonnage

Le système n'étant pas isolé thermiquement du milieu ambiant, il existe des échanges de température avec ce milieu. Cela signifie que la température extérieure a une influence sur la mesure de l'élévation de température. En effet, comme on peut le voir dans la Figure 3.11 pour une même solution à absorption équivalente, l'élévation de température ΔT_{\max} dépend de la journée d'expérimentation. En effet, les conditions d'expérimentation sont fortement influencées par les paramètres de la salle de manipulation : à savoir, la température de la pièce et l'humidité de la pièce qui sont deux paramètres difficilement contrôlables. Dans cette hypothèse, une solution étalon a été proposée dans le but d'éliminer tout biais venant du milieu extérieur pour la comparaison de différents échantillons.

Une autre solution possible aurait été de confectionner une enceinte avec une température contrôlée. Un système basé sur l'effet Peltier[7] pour asservir la température du milieu englobant la totalité du système aurait pu être imaginé. Cette solution est adoptée dans plusieurs systèmes de PTT. Elle n'a pas été retenue dans notre montage en raison des coûts associés, de la complexité de la mise en œuvre, et l'investissement en temps que représente la mise en place technique d'une enceinte régulée en température. Ainsi, pour remédier au problème, j'ai proposé une solution de calibration. En posant les hypothèses que pour une même solution le coefficient η , le coefficient d'atténuation μ^{att} , le volume de la solution et la longueur de pénétration de la lumière L sont constant quelles que soit les conditions expérimentales, il existe un coefficient uniquement multiplicatif entre les ΔT_{\max} obtenus entre deux jours différents. En reprenant l'Equation (3.5), le coefficient ne va dépendre que de $I(0)$, de h et du rapport des aires. Comme on se place dans les mêmes conditions d'expérimentations pour $I(0)$ et les aires, la variabilité des mesures est due aux différences de coefficient de transfert thermique h , seulement.

Une solution de calibration (la nigrosine) dite « étalon » a été choisie arbitrairement le 25/03/22. On distinguera alors la solution de calibration qui est la solution mesurée à chaque nouvelle session d'expérimentation et la solution « étalon » qui est la solution sur laquelle je base toutes mes comparaisons. Il suffit alors d'appliquer à chaque échantillon le ratio de la mesure de température de la solution de calibration du batch considéré ΔT_{calib} avec la mesure

de la solution de calibration étalon $\Delta T_{\text{étalon}}$ pour obtenir des mesures relatives et comparables sur une même référence :

$$\text{Coeff}_{\text{calib}} = \frac{\Delta T_{\text{calib}}}{\Delta T_{\text{étalon}}} \quad (3.8)$$

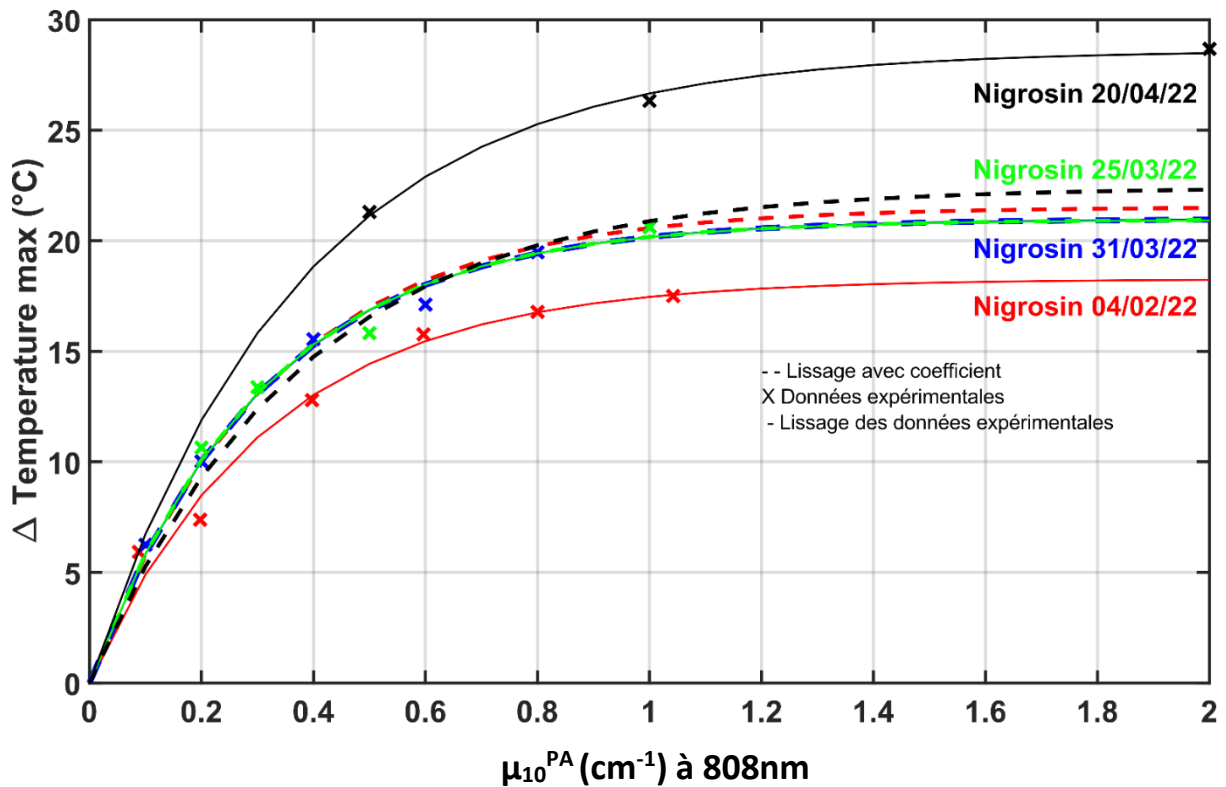


Figure 3.11. Comparaison de ΔT_{max} en fonction de différentes absorbances de nigrosine. Le jour de mesure et les paramètres de la salle (température, humidité) sont différents. Après application du coefficient, tous les échantillons à même absorption photoacoustique sont comparables.

D'après la Figure 3.11, après l'application du $\text{Coeff}_{\text{calib}}$ les différentes solutions de calibration sont comparables entre elles de manière relative, car nous retrouvons la même élévation de température pour la même solution de nigrosine prise à différentes journées à 1.3°C près. Cette calibration, à effectuer avant chaque expérimentation, nous assure que notre mesure est indépendante de l'humidité et de la température du milieu ambiant. Cet outil nous permet donc de pouvoir comparer des solutions plus complexes entre elles et provenant de différents lots à des jours différents.

3.II. Étude du coefficient de conversion lumière-chaueur

3.II.A. *Théorie de l'efficacité thermique*

La génération de chaleur à partir des nanoparticules chauffantes implique non seulement l'absorption des photons incidents, mais également la conversion de l'énergie des photons en énergie thermique ainsi que le transfert de chaleur à partir de ces nanoparticules. On rappelle que l'Equation (1.29) qui indique que le coefficient de conversion de la lumière en chaleur se détermine grâce à une mesure de photoacoustique (μ_{10}^{PA}) et une mesure de spectroscopie UV-Vis (μ_{10}^{att}). L'utilisation d'une solution de référence permet de déterminer ce coefficient de conversion lumière en chaleur en s'affranchissant de la contrainte des différents coefficients thermodynamiques (h le coefficient de transfert thermique) et géométriques (S et S_i qui sont les surfaces d'illumination et d'échange thermodynamique définies dans le Chapitre 1, Partie V.B).

D'après l'Equation (3.5), on peut comparer le coefficient de conversion lumière-chaueur η de notre échantillon (que l'on notera η) avec celui de notre milieu de référence (que l'on notera $\eta_{référence}$). On sait que le coefficient de conversion lumière-chaueur de la nigrosine est de 100%, car c'est une solution moléculaire non diffusante et non fluorescente (cf. chapitre 1 Partie III.C). De plus, ce coefficient de 1 a été vérifié expérimentalement par l'équipe d'Agnieszka Paściak et du Professeur Artur Bednarkiewicz par leur système de photothermie [4,7]. On obtient directement une estimation du coefficient de conversion lumière-chaueur relative à notre référence en faisant le ratio des Δ_{Tmax} :

$$\frac{\Delta_{Tmax \text{ échantillon}}}{\Delta_{Tmax \text{ référence}}} = \frac{\frac{I(0) \left(1 - 10^{-\mu_{10}^{att \text{ échantillon}} \cdot L}\right) \cdot S \cdot \eta}{h \cdot S_i}}{\frac{I(0) \left(1 - 10^{-\mu_{10}^{att \text{ référence}} \cdot L}\right) \cdot S \cdot \eta_{référence}}{h \cdot S_i}} \quad (3.10)$$

On suppose que le h , $I(0)$ sont égaux et le même ratio de surface, car on utilise le même solvant, on a la même illumination et on utilise le même volume. $\eta_{référence}$ est égale à 1, car la solution de nigrosine transforme toute l'énergie optique absorbée en chaleur et elle est non diffusante donc $\mu_{10}^{PA} = \mu_{10}^{att}$. Il nous reste alors :

$$\frac{\Delta_{Tmax \text{ échantillon}}}{\Delta_{Tmax \text{ référence}}} = \frac{\left(1 - 10^{-\mu_{10}^{att \text{ échantillon}} \cdot L}\right) \cdot \eta}{\left(1 - 10^{-\mu_{10}^{att \text{ référence}} \cdot L}\right)} \quad (3.11)$$

Et

$$\eta_{\text{échantillon}} = \frac{\Delta T_{\text{max échantillon}}}{\Delta T_{\text{max référence}}} \cdot \frac{(1 - 10^{-\mu_{10}^{\text{att référence}} \cdot L})}{(1 - 10^{-\mu_{10}^{\text{att échantillon}} \cdot L})} \quad (3.12)$$

On peut donc trouver le coefficient de conversion lumière-chaueur par rapport à la référence. Ici, cette détermination du coefficient de conversion lumière-chaueur nous permet de nous affranchir de la mesure d'absorption effectuée avec la photoacoustique développée dans le chapitre 2, de la détermination du coefficient de transfert de chaueur h et du rapport des aires (S_i). En contrepartie, des mesures de photothermie sont nécessaires pour obtenir le ratio des différences de température ainsi que des mesures de spectrométrie UV-visible.

Si on reprend l'Equation (3.12) et qu'on regarde le régime asymptotique des fortes atténuations où $L \cdot \mu_{10}^{\text{att}} \rightarrow \infty$, on peut obtenir directement le coefficient η tel que :

$$\eta_{\text{échantillon}} = \lim_{\mu_{10}^{\text{att}} \rightarrow \infty} \eta(\mu_{10}^{\text{att}}) = \frac{\Delta T_{\text{max échantillon}}}{\Delta T_{\text{max référence}}} \quad (3.13)$$

On obtient une méthode simple pour définir le coefficient de conversion lumière-chaueur en traçant ΔT_{max} mesuré pour le même échantillon à des coefficients d'atténuation μ_{10}^{att} croissants en augmentant la concentration. En se plaçant dans le régime où l'on atteint le palier des ΔT_{max} , c-à-d quand les atténuations sont suffisamment grandes, on peut déduire le coefficient η de l'échantillon. Cette méthode est, cependant, purement mathématique et nécessite quelques précautions. En effet, la longueur de pénétration de la lumière ne doit pas être modifiée, ce qui est néanmoins possible avec de grandes atténuations. Cette longueur de pénétration est soit directement limitée par la dimension physique de la cuvette, soit par $1/\mu_{10}^{\text{att}}$. Il est donc préférable d'utiliser les ajustements mathématiques plutôt que directement des mesures expérimentales en régime de forte atténuation.

3.II.B. Étude de nanoparticules « simples » et connues avec le montage

Afin de valider le montage proposé, nous avons mené une étude comparative de l'efficacité thermique de ce montage avec celle mesurée par le montage de Paściak et son équipe [3]. Pour cela, nous avons testé trois types de nanoparticules à quatre concentrations différentes ainsi que la nigrosine qui servira de référence de notre étude. Toutes les dilutions sont dans de l'eau distillée. Les mesures sur le montage de Paściak [8] ont été effectuées avec de la nigrosine à deux concentrations différentes, tandis que pour le montage proposé dans cette thèse, nous avons réalisé une étude complète avec des mesures d'absorption UV-Visible, de photoacoustique et de photothermie sur toutes les nanoparticules.

Les échantillons choisis pour cette étude comprenaient :

- La nigrosine en tant que référence décrite dans le Chapitre 1 Partie III.C.
- Des nanoparticules d'Ag₂S qui sont des nanocristaux de sulfure d'argent synthétisés par l'équipe du Professeur Corinne Chaneac à Sorbonne Université et revêtue d'acide 11-mercaptoundécanoïque (11-MUA) qui modifie la surface des nanoparticules pour faciliter leur dispersion dans l'eau. Ces Ag₂S de 5 nm de diamètre environ sont intéressantes pour leur utilisation dans la technique de nanothermométrie, car leurs propriétés de luminescence dans la seconde fenêtre de transparence des tissus biologiques (NIR2, autour de 1200 nm) dépendent de la température. Ces nanoparticules sont également intéressantes pour leur effet photothermique dans le proche infrarouge. Elles présentent également une bonne résistance au photoblanchiment et une bonne internalisation cellulaire, et sont étudiées comme nanothermomètres intracellulaires aux laboratoires MSC et Laboratoire de Chimie de la Matière Condensée de Paris (LCMCP) [9].
- Des Iron Oxide NanoFlower (IONF), une nanoparticule multicœur monocristalline en forme de fleur de maghémite (γ -Fe₂O₃), ont été initialement conçues par l'équipe des Stéphane Roux et Rana Bazzi à Besançon (Utinam, Université de Franche-Comté) pour une hyperthermie activée par champ magnétique alternatif. Ces nanofleurs d'une vingtaine de nanomètres de diamètre présentent aussi un coefficient d'absorption élevé dans le proche infrarouge (NIR) qui peut être très intéressant pour la thérapie photothermique (PTT) de tumeurs solides comme l'a montré Alba Nicolas Boluda dans sa thèse réalisée au MSC [10,11].
- Des Gold Iron Oxide NanoFlower (GIONF) une nanofleur de maghémite (γ -Fe₂O₃-Au) comme précédemment, mais cette fois-ci décorées de nanoparticules d'or ultrafines. L'ajout d'or a pour but d'augmenter l'efficacité de conversion thermique par rapport aux IONF [10,11]. Alba Nicolas Boluda dans sa thèse au laboratoire MSC a montré que ces agents photothermiques ciblaient préférentiellement les fibroblastes des tumeurs et permettait de ramollir les tumeurs, ce qui les rend plus permissives aux chimiothérapies.


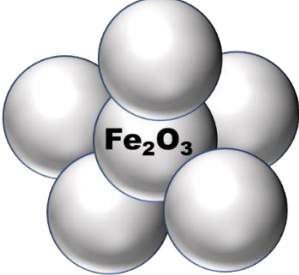
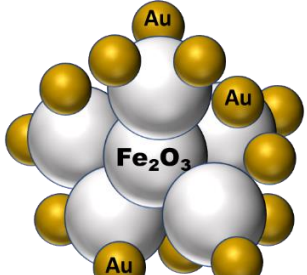
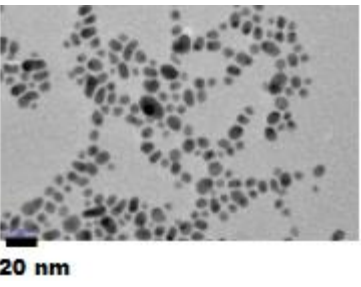
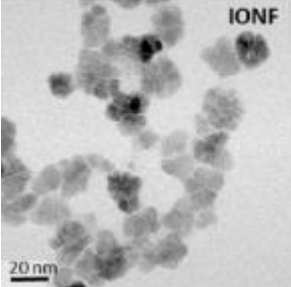
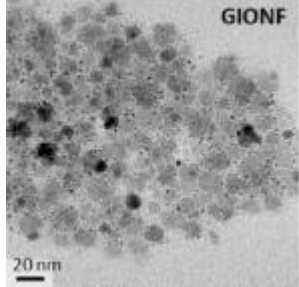
Ag₂S	γ-Fe₂O₃ (IONF)	γ-Fe₂O₃- Au(GIONF)
		
		

Figure 3.12. Représentation schématique et image en microscopie électronique en transmission (TEM) des différentes nanoparticules utilisées.

Les nanoparticules utilisées dans cette étude sont actuellement en cours d'étude dans le laboratoire MSC. Elles ont été étudiées par l'équipe de Paściak en Pologne pour déterminer leur taux de conversion lumière-chaaleur[3].

En parallèle, nous avons effectué des mesures d'absorption photoacoustique pour déterminer le spectre d'absorption des solutions mères, des mesures de coefficients d'extinction par spectroscopie UV-Vis et enfin des mesures de chauffage sous laser pour quantifier les propriétés photothermiques d'échantillons d'absorption photoacoustique et de coefficient d'extinction connue. Le Tableau 3.1 résume les différentes concentrations en nanoparticules, l'absorption photoacoustique et le coefficient d'extinction obtenus pour chaque concentration. Ces valeurs d'absorption ont été sélectionnées en tenant compte de la sensibilité des différents montages de mesure d'absorption et de la quantité d'échantillons disponible.

La première étude consiste en une mesure de spectroscopie UV-Visible effectuée sur un intervalle de longueur d'onde compris entre 600 et 1000 nm à température ambiante. Cette mesure a été réalisée à l'aide d'un spectromètre (VWR Spectrophotomètre visible, PV4 Allemagne) en utilisant des semi-micro cuvettes (VWR Cuvettes PS semi-micro Allemagne). Cette mesure permet de déterminer le spectre d'atténuation. Ce spectre permet de s'assurer que le comportement spectral à la forme attendue. Par ailleurs, la comparaison au spectre d'absorption, déterminé en utilisant la mesure photoacoustique, permet d'estimer la part de diffusion optique dans l'atténuation.

La seconde étude concerne la mesure de photoacoustique décrite dans le chapitre 2. Pour rappel, quatre tubes différents ont été utilisés et ont été illuminés simultanément. Un volume de 65 μL d'échantillon a été injecté dans chaque tube. Après chaque mesure, les tubes ont été nettoyés en chassant les échantillons avec de l'air puis de l'eau. Une mesure de l'eau avant et après l'introduction des échantillons a été effectuée pour s'assurer qu'il n'y avait pas eu une éventuelle contamination des tubes après rinçage. Un laser pulsé de fréquence 20 Hz est utilisé pour nous assurer des conditions de confinement développé dans le Chapitre 1 Partie IV.1. Une fluence de $2.5\text{mJ}\cdot\text{cm}^{-2}$ (en sortie du laser) a été utilisée afin de s'assurer qu'il n'y avait pas de dégradation de l'échantillon due à la puissance lumineuse. Les tubes ont été illuminés dans un intervalle de longueur d'onde de 680 à 970 nm par pas de 10 nm. La calibration a été effectuée avec une solution de sulfate de cuivre et réalisée au début, au milieu et à la fin de l'expérience. La température de mesure a été fixée à 25°C et contrôlée grâce à un bain thermostaté (*Grant Instrument T100-P5 Cambridge*). Le spectre d'absorption obtenu a été calculé à partir de la médiane des données des quatre tubes. Pour l'évaluation de l'erreur de mesure, nous avons utilisé l'écart absolu médian MAD, défini comme suit :

$$MAD(X) = 1.4826 \cdot \text{médiane}(|X - \text{médiane}(X)|) \quad (3.14)$$

Le facteur d'échelle garantit que la valeur de MAD est comparable à la valeur de l'écart type si les valeurs X sont normalement distribuées. Cette mesure va permettre, en relation avec la mesure UV-visible, de déterminer l'efficacité thermique en photothermie.

La troisième étude concerne la mesure photothermique. Le montage utilisé est celui décrit dans la partie II. La mesure a été réalisée pendant 20 minutes, soit 10 minutes de chauffe et 10 minutes de refroidissement. Un volume de 200 μL a été utilisé dans un Eppendorf de 0.5 ml. La puissance d'exposition du laser a été de $1\text{W}\cdot\text{cm}^{-1}$. Les données sont enregistrées par la caméra IR à 30 Hz et d'émissivité 0.95. Tout le lot a été mesuré sur la même journée pour garder une même temporalité et garder le plus possible les mêmes conditions expérimentales (notamment l'humidité ambiante de l'air). Nous avons comparé nos résultats avec ceux présentés dans l'article de Paściak [3] dans le but de valider l'évaluation du coefficient de conversion lumière-chaaleur présenté dans le chapitre 1 Partie V.B. Dans l'étude polonaise ce coefficient est nommé internal light-to-heat conversion efficiency (iHCE). La détermination de l'iHCE s'effectue selon le modèle de Wang [6] et est déterminée en utilisant le profil de chauffe en utilisant cette équation :

$$iHCE = \frac{\Delta T_{max} \cdot m_{eau} \cdot C_{p,eau}}{\tau \cdot I \cdot (1 - 10^{-\mu_{10}^{att} \cdot L})} \quad (3.15)$$

	Concentration (g/ml)	Extinction à 809 nm (cm^{-1})	Absorption PA à 809 nm (cm^{-1})
Nigrosine (1)*	0.0346		
	0.0173		
Nigrosine (2)*	0.0866	0.993	0.9261
	0.0693	0.744	0.6823
	0.0433	0.494	
	0.0216	0.243	
Ag2S	0.2058	0.297	0.2437
	0.4117	0.536	0.5012
	0.8234	1.139	0.9625
	1.235	1.7213	1.41
IONF	0.7290	0.254	0.2268
	1.4550	0.568	0.4822
	2.3280	0.913	0.7877
	2.91	1.144	0.9669
GIONF	0.618	0.314	0.2228
	1.239	0.598	0.4421
	1.98	1.012	0.7418
	2.475	1.256	0.9167

Tableau 2.1 Tableau récapitulatif des concentrations et mesures optiques à 809 nm des différents échantillons étudiés

* La nigrosine 1 et 2 provient de deux séries de mesure différente.

3.III. Résultats

3.III.A. Mesure du coefficient de conversion lumière chaleur par des expériences couplées de spectroscopies photoacoustiques et UV-Vis.

Les mesures d'absorption effectuée avec la technique photoacoustique et les mesures de l'extinction avec le spectromètre UV-Visible ont été comparées entre elles, notamment en étudiant dans un premier temps le spectre optique sur toute la gamme. Dans la Figure 3.13, le spectre photoacoustique est mesuré avec une seule injection à une fluence de 2.5 mJ.cm^{-2} en sortie de laser et calculé grâce à la médiane et l'écart absolu médian sur les 4 tubes. En traçant sur la même figure les mesures photoacoustiques et UV-Visible, on obtient deux spectres pouvant être comparés comme dans la figure suivante :

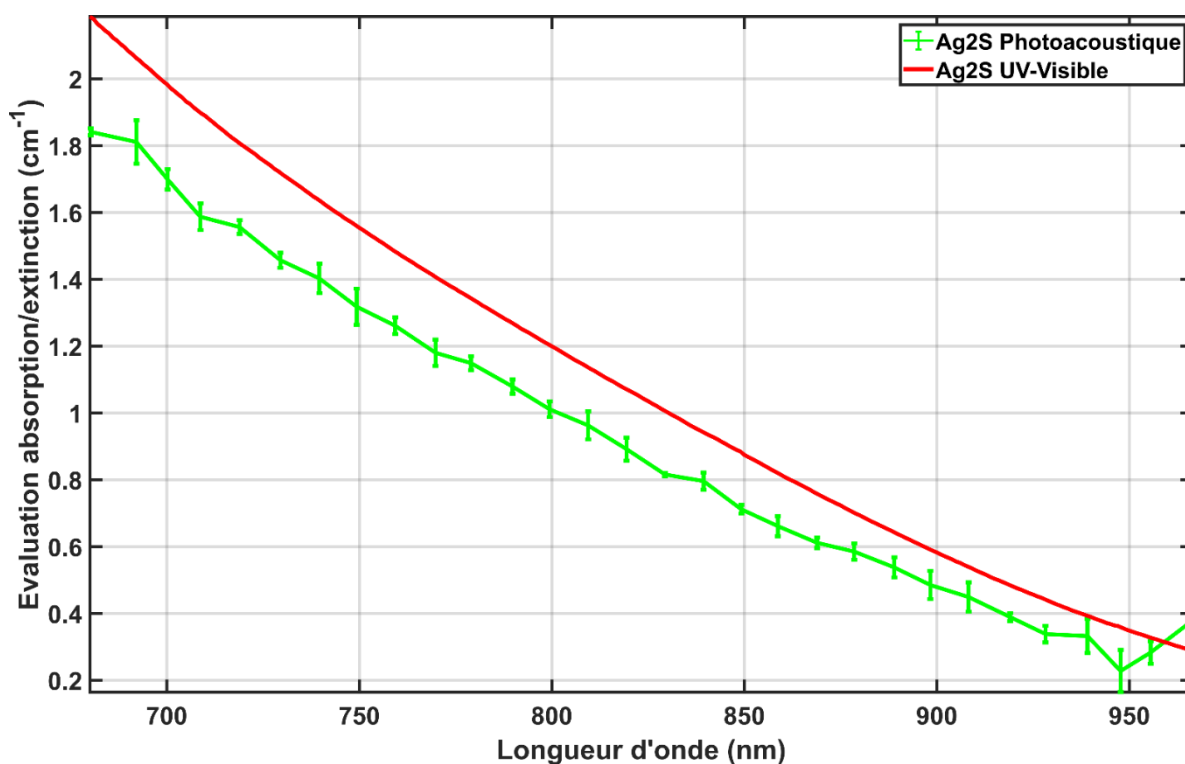


Figure 3.13. Spectre UV-visible et photoacoustique des Ag_2S en suspension dans l'eau à $[\text{Ag}_2\text{S}] = 1.235 \text{ g.ml}^{-1}$.

On observe une différence d'amplitude entre les deux spectres que l'on peut attribuer à la diffusion optique et à la fluorescence des particules (qui rentre en compétition avec la conversion de l'énergie absorbée en chaleur). La forme générale des spectres PA de tous les échantillons considérés est comme pour le cas des Ag_2S très similaire à ceux de l'UV visible. Pour les mesures PA effectuées au-delà de 950nm, on commence à observer une différence de forme du spectre. Cela peut s'expliquer par la limite de détection de notre montage expérimental PA.

Pour caractériser les différents échantillons, on réalise les mesures à longueur d'onde fixe. Pour notre caractérisation, nous étudions le rapport à 808nm, la longueur d'onde d'émission du laser utilisé en photothermie. L'étude du spectre complet peut être intéressante pour étudier le comportement d'un échantillon suivant plusieurs longueurs d'onde, particulièrement quand l'échantillon présente un pic d'absorption. Comme vu dans l'Equation (1.29), le coefficient de conversion lumière-chaueur peut être défini par le rapport entre l'extinction UV-visible, l'absorption que l'on mesure avec notre spectromètre PA. On rappelle l'Equation (1.29) ci-dessous :

$$\eta = E_{pt} \cdot \frac{\mu_{a,10}}{\mu_{10}^{att} \cdot \ln(10)} \quad (3.16)$$

Pour la détermination de η on fixera notre longueur d'onde à 808nm. Pour l'UV-Visible, la longueur d'onde de mesure expérimentale la plus proche est 810nm et pour la PA la longueur d'onde le plus proche est de 809 nm. Ces deux mesures seront utilisées pour calculer η . On résumera les efficacités obtenues ainsi que les efficacités par l'équipe polonaise dans le tableau 3.2.

Nous avons déterminé avec seulement les mesures PA/UV-visible des différentes nanoparticules un coefficient de conversion lumière-chaueur du même ordre de grandeur que les iHCE obtenus par l'équipe polonaise exceptés pour les IONF qui s'avère être légèrement en dessous. Cela montre une alternative à la détermination du coefficient de conversion lumière-chaueur. Cette méthode nécessite un montage spectrométrique photoacoustique à la place d'un montage photothermique. La détermination du coefficient passe d'une étude thermique et optique à une étude purement optique. Il convient cependant à noter que l'illumination photoacoustique est de nature impulsionnelle et que des phénomènes photophysiques transitoires peuvent être en jeu alors que l'illumination pour la PTT peut être considérée comme stationnaire. Les différences sont à prendre en compte dans l'analyse des résultats.

3.III.B. Mesure du coefficient de conversion lumière chaueur à partir de l'expérience de photothermie et du spectre UV-Vis

Pour la méthode utilisant la photothermie et le spectre UV-Visible. On mesure, tout d'abord, l'évolution de température en fonction du temps comme décrit dans le Chapitre 3 Partie I.A.i. La Figure 3.14 illustre cette mesure. Après ajustement exponentiel, on extrait la température maximum ΔT_{max} qui permet de calculer η pour chaque concentration ou absorption avec l'Equation (3.12) que l'on rappelle ci-dessous :

$$\eta_{\text{échantillon}} = \frac{\Delta T_{max \text{ échantillon}}}{\Delta T_{max \text{ référence}}} \cdot \frac{\left(1 - 10^{-\mu_{10}^{att \text{ référence}} \cdot L}\right)}{\left(1 - 10^{-\mu_{10}^{att \text{ échantillon}} \cdot L}\right)} \quad (3.12)$$

L'idée est d'utiliser la nigrosine en tant que référence pour pouvoir comparer le coefficient de conversion lumière-chaueur de cette dernière avec les échantillons étudiés et de nous affranchir des différentes surfaces (S et S_i) et du coefficient de transfert thermique

(h) comme illustré dans l'Equation (3.10). Après avoir mesuré les μ_{10}^{att} avec la spectrométrie UV-visible et les ΔT_{max} avec le montage photothermique en mesurant l'évolution de la température en fonction du temps, il reste à déterminer les longueurs L et à vérifier que l'Equation 3.12 peut être utilisée, c'est-à-dire s'assurer expérimentalement que l'efficacité photothermique de notre référence est de 1.

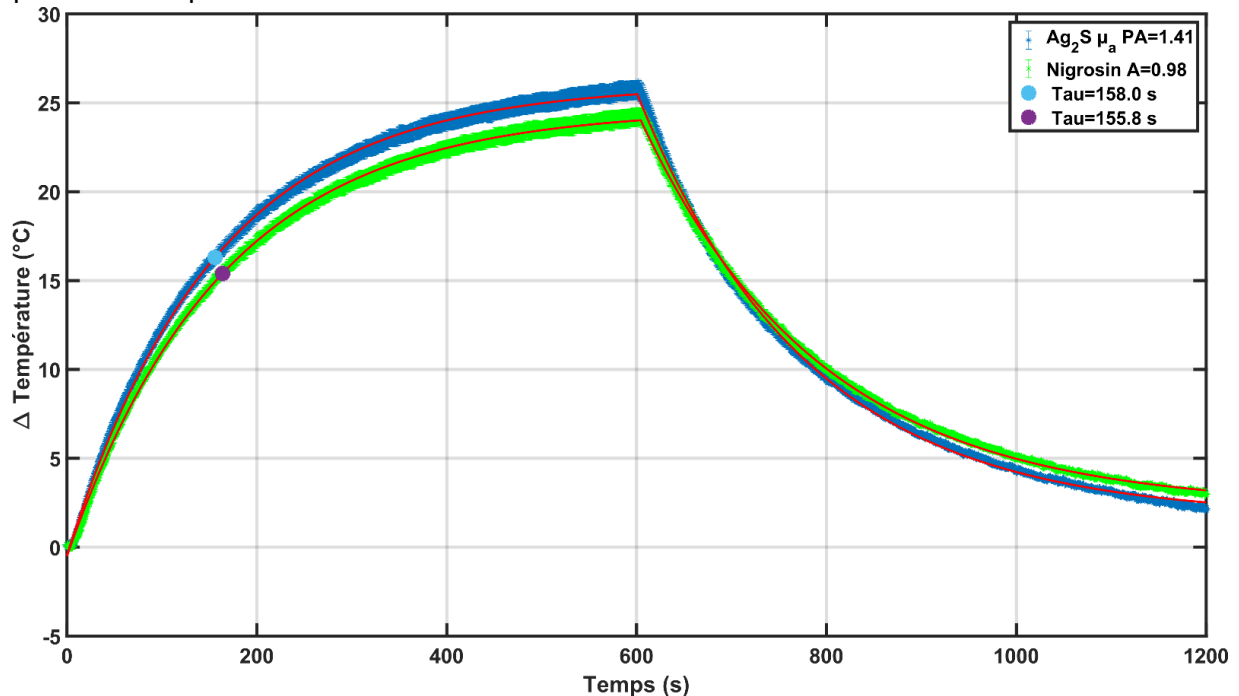


Figure 3.14. Mesures de la température pour la solution aqueuse Ag₂S à [Ag₂S] = 1.235 g.ml⁻¹ et la solution de référence à [nigrosine] = 0.0866 g. ml⁻¹ exposé à une illumination laser à longueur d'onde 808nm et avec une densité surfacique de 1 W.cm⁻¹. Les courbes rouges sont les ajustements exponentiels en accord avec les équations théoriques et calculées en fonction des données expérimentales. Les « points » représentent le temps caractéristique de chauffes pour les Ag₂S (bleu clair) et la nigrosine (violet). Les barres d'erreur représentent 2% de l'erreur relative calculée à partir de la nigrosine cf. étude nigrosine Chapitre 3 Partie III.C.

Dans un premier temps, avec l'aide d'Agnieska Paściak le coefficient de conversion lumière-chaleur de la nigrosine a été calculé. L'étude montre qu'à différentes concentrations que la nigrosine présente bien une efficacité photothermique d'environ 100% (cf. Tableau 2.2). Il est donc possible d'utiliser la nigrosine comme référence pour déterminer l'efficacité thermique des autres échantillons.

Dans un second temps, on effectue un autre ajustement exponentiel sur les températures maximales ΔT_{\max} en fonction de l'absorption. On observe alors un palier de température au bout d'une certaine absorption. La longueur L est extraite des paramètres de l'ajustement exponentiel de l'Equation 3.12. et illustré dans la Figure 3.15.

On observe que la longueur L extraite varie suivant la nature des particules et leur pouvoir diffusant (cf. tableau de l'annexe) et n'est pas conforme avec l'équation théorique qui suggère un L représentant la dimension du contenant suivant la direction de l'illumination. On déterminera donc les $L_{\text{échantillon}}$ de chaque particule que l'on distinguera du $L_{\text{référence}}$.

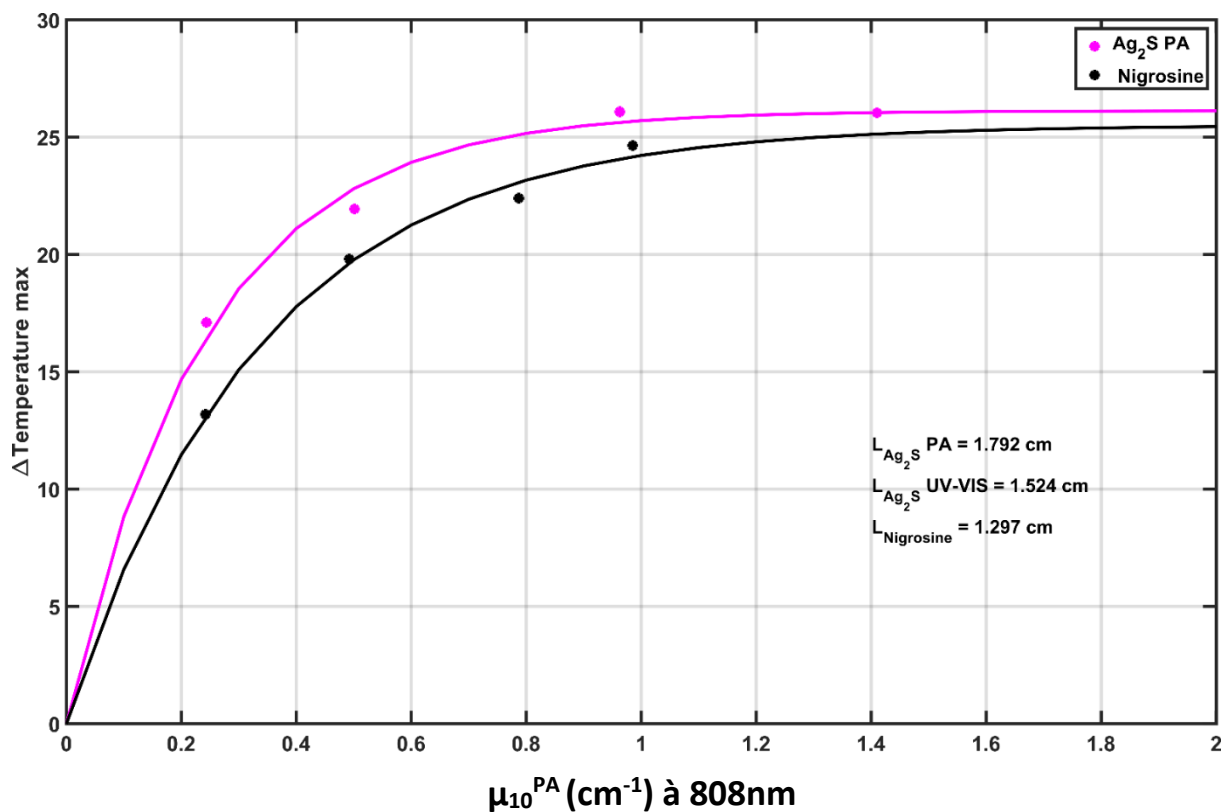


Figure 3.15. Comparaison de l'augmentation de la température en fonction du μ_{10}^{PA} photoacoustique des solutions de Ag₂S et de la nigrosine (soluté de référence pour cette étude). Les courbes représentent les ajustements en accord avec les équations théoriques et calculées en fonction des données expérimentales. Les L représentent le chemin parcouru par la lumière calculé grâce à ces ajustements.

3.III.C. Mesure du coefficient de conversion lumière chaleur à partir de l'expérience de photothermie.

La méthode utilisant la limite quand μ_{10}^{att} tend vers l'infini, donne des résultats avoisinant les 100% qui ne correspondent pas aux résultats obtenus par l'étude effectuée par Paściak. Cette méthode est malheureusement très dépendante des méthodes d'ajustements des courbes ainsi que du nombre de points de mesure et de leur distribution (concentrations différentes). En raison de la nécessité de répéter la mesure à différentes concentrations, cette méthode est évidemment très couteuse en produit. De plus, cette méthode n'est pas valable expérimentalement, car on doit se placer à des coefficients d'atténuations très grands, ce qui pose un problème de pénétration de la lumière dans la solution. Cependant, elle peut être utilisée pour une estimation grossière et/ou préliminaire du coefficient pour une comparaison entre deux particules dont les efficacités sont très disparates.

	Concentration (g/ml)	η optique (%)	Moyenne η optique (%)	IHCE 794nm (%)	η méthode exponentielle	Moyenne η méthode exponentielle	η PTT méthode de la limite
Nigrosine	0.0346		94%	104.9			
	0.0173			108.1			
	0.0866	94%					
	0.0693						
	0.0433						
	0.0216						
Ag2S@MUA	0.2058	82.1	85.6 %	83 %*	102.4 %	101.6 %	103.14 %
	0.4117	93.5			100.8 %		
	0.8234	84.5			102.2 %		
	1.235	82.4			101 %		
IONF	0.7290	89.3	86.2 %	82 %*	90.5 %	93.2%	96.75 %
	1.4550	84.9			93.1 %		
	2.3280	86.3			97.2 %		
	2.91	84.5			92.1 %		
GIONF	0.618	70.9	72.8 %	86 %*	102.9 %	98.2%	98.75%
	1.239	73.9			94.2 %		
	1.98	73.3			97.3 %		
	2.475	73			98.5 %		

Tableau 2.2 Tableau récapitulatif des coefficients de conversion lumière-chaueur suivant les différentes techniques utilisées.

3.IV. Conclusion

La validation et la caractérisation de nanoparticules comme agents photothermiques sont très complexes compte tenu des propriétés optiques et thermiques que doivent valider ces agents pour prétendre être des agents efficaces. Il n'existe pas de méthode simple et/ou universelle pour évaluer ces propriétés ni de solution étalon permettant de comparer n'importe quel type de nanoparticules. Il a été montré ici, la possibilité d'un montage expérimental simple permettant d'étudier les propriétés thermiques de potentiel agent photothermique. Comme mentionné auparavant, ce montage est améliorable sur l'aspect quantitatif. De plus la solution de nigrosine a été présentée comme un bon candidat à un « gold standard » pour comparer différentes particules susceptibles d'être des agents pour la photothermie par ses propriétés optiques. Le coefficient de conversion lumière-chaaleur a été estimé par un certain nombre de chercheurs par des études thermiques. Nous avons proposé une nouvelle méthode pour déterminer ce coefficient basé sur l'imagerie photoacoustique. L'avantage de cette méthode est de pouvoir nous affranchir de coefficients intrinsèques à la thermodynamique complexes à déterminer.

Bibliographie :

- [1] Xiao Y, Pandey K, Nicolás-Boluda A, Onidas D, Nizard P, Carn F, et al. Synergic Thermo-and pH-Sensitive Hybrid Microgels Loaded with Fluorescent Dyes and Ultrasmall Gold Nanoparticles for Photoacoustic Imaging and Photothermal Therapy. *ACS Appl Mater Interfaces* 2022.
- [2] Richardson HH, Carlson MT, Tandler PJ, Hernandez P, Govorov AO. Experimental and Theoretical Studies of Light-to-Heat Conversion and Collective Heating Effects in Metal Nanoparticle Solutions. *Nano Lett* 2009;9:1139–46. <https://doi.org/10.1021/nl8036905>.
- [3] Paściak A, Pilch-Wróbel A, Marciniak Ł, Schuck PJ, Bednarkiewicz A. Standardization of Methodology of Light-to-Heat Conversion Efficiency Determination for Colloidal Nanoheaters. *ACS Appl Mater Interfaces* 2021;13:44556–67. <https://doi.org/10.1021/acsami.1c12409>.
- [4] Richardson HH, Carlson MT, Tandler PJ, Hernandez P, Govorov AO. Experimental and Theoretical Studies of Light-to-Heat Conversion and Collective Heating Effects in Metal Nanoparticle Solutions. *Nano Lett* 2009;9:1139–46. <https://doi.org/10.1021/nl8036905>.
- [5] Paściak A, Pilch-Wróbel A, Marciniak Ł, Schuck PJ, Bednarkiewicz A. Standardization of Methodology of Light-to-Heat Conversion Efficiency Determination for Colloidal Nanoheaters. *ACS Appl Mater Interfaces* 2021;13:44556–67. <https://doi.org/10.1021/acsami.1c12409>.
- [6] Wang X, Li G, Ding Y, Sun S. Understanding the photothermal effect of gold nanostars and nanorods for biomedical applications. *RSC Adv* 2014;4:30375–83.
- [7] A Review on use of Peltier Effects - PDF Free Download n.d. <https://docplayer.net/31780106-A-review-on-use-of-peltier-effects.html> (accessed August 16, 2022).
- [8] Paściak A, Marin R, Abiven L, Pilch-Wróbel A, Misiak M, Xu W, et al. Quantitative Comparison of the Light-to-Heat Conversion Efficiency in Nanomaterials Suitable for Photothermal Therapy. *ACS Appl Mater Interfaces* 2022;14:33555–66. <https://doi.org/10.1021/acsami.2c08013>.
- [9] Abiven L. Mesure de température sans contact, en temps réel et à l'échelle cellulaire, par photoluminescence de nanoparticules de sulfure d'argent. PhD Thesis. Sorbonne université, 2022.
- [10] Nicolas-Boluda A, Laurent G, Bazzi R, Roux S, Donnadiu E, Gazeau F. Two step promotion of a hot tumor immune environment by gold decorated iron oxide nanoflowers and light-triggered mild hyperthermia. *Nanoscale* 2021;13:18483–97.
- [11] Nicolás-Boluda A, Vaquero J, Laurent G, Renault G, Bazzi R, Donnadiu E, et al. Photothermal depletion of cancer-associated fibroblasts normalizes tumor stiffness in desmoplastic cholangiocarcinoma. *ACS Nano* 2020;14:5738–53.

Chapitre 4 : Caractérisation des agents nanoparticulaire

Dans le chapitre 4, nous présentons la caractérisation de plusieurs agents nanoparticulaires sélectionnés pour leurs propriétés optiques entre autres comme des déplacements de la bande plasmon vers l'infrarouge ou des couplages plasmonique et leur potentielle pertinence pour les applications de thérapie photothermique et/ou imagerie photoacoustique. Les échantillons présentés dans ce chapitre réunissent des nano-objets de composition chimique, de morphologie, d'architecture et de taille différente, synthétisés par plusieurs équipes de recherche avec lesquelles nous sommes en collaboration. Ces échantillons de par leur structure et leurs propriétés optique et thermique correspondent à des stratégies différentes sur le plan thérapeutique. De plus, les particules présentées dans le tableau 4.1 sont pour la plupart issues de recherche en cours, ce qui signifie que leur production reste difficile et/ou coûteuse à réaliser. Or pour une caractérisation complète en utilisant toutes les méthodes proposées dans le chapitre qui précède il est nécessaire d'avoir un certain volume d'échantillon (typiquement de l'ordre de 4 ml d'une solution mère à un coefficient d'absorption $\mu_{a,10} = 1 \text{ cm}^{-1}$). Ainsi, suivant le but et la temporalité de l'étude, certaines méthodes ne seront pas présentes sur certains échantillons présentés ci-après, faute de disponibilité des particules. Il est à noter que les études sur ces agents ont été menées pour la plupart alors que les méthodes de mesures PA et PTT étaient en cours de développement. Aussi les résultats présentés peuvent être partiels et ne permettent pas une caractérisation aussi fine que nous pourrions le souhaiter a posteriori. En particulier les spectres d'atténuation sont souvent manquants alors que les spectres PA ont été mesurés.

Par ailleurs, des comportements photothermiques non attendus par la théorie présentée dans les chapitres 1 et 2 ont été constatés. Ils sont décrits ici même si nous n'avons actuellement pas d'explications physiques claires.

Les différentes particules sont présentées dans le tableau 4.1 par ordre de complexité architecturale croissante et dans l'ordre de présentation dans ce chapitre.

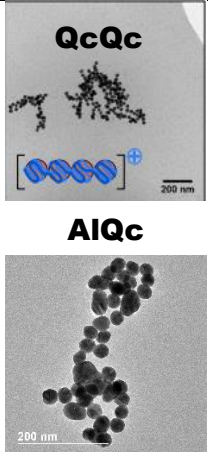
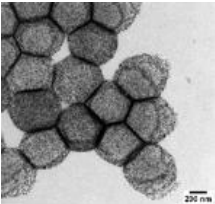
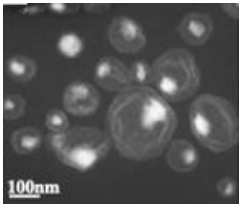
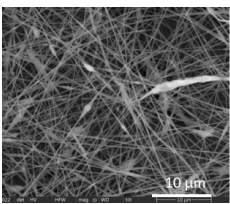
<i>Nano bâtonnet d'or</i>	<i>préagrégat d'or</i>	<i>Smart gel</i>	<i>Suprastructures complexes</i>	<i>Armatures organométalliques (MoFs)</i>
<i>Au (GNR)</i>	<i>Au-QcQc // Au-AIQc</i>	<i>Gel@Dye@Au</i>	<i>Au@ Fe₃O₄ NCs</i>	<i>MIL-100(Fe)@IR775</i>
	F.Voisin & F.Carn Équipe MSC	Y.Xiao & C.Mangeny Équipe MSC	MP. Pileni	Z.Yu & C.Serre Institut des Matériaux Poreux de Paris, Ecole Normale Supérieure
				

Tableau 4.1. Tableau récapitulatif des différents échantillons étudiés dans ce chapitre

4.1. Étude d'un nanobâtonnet d'or

4.1.A. Introduction de l'étude

Pour la première étude, des nanobâtonnets d'or ont été analysés. Ces nanoparticules ont été largement étudiées par la communauté scientifique. L'étude des nanobâtonnets d'or en imagerie photoacoustique est justifiée par leur intérêt reconnu pour des applications biomédicales [1,2]. De plus, l'or s'avère être un matériau biocompatible [3]. Les nanobâtonnets d'or représentent un type de nanoparticules dont le mécanisme d'absorption est basé sur la résonance plasmonique de surface (SPR)[4]. Les nanobâtonnets présentent une symétrie cylindrique. En comparaison à d'autres types de nanoparticules d'or, comme des nanosphères d'or, de simples changements dans la longueur ou le rapport d'aspect (longueur/diamètre) des nanobâtonnets d'or peuvent modifier de manière significative les caractéristiques d'absorption et d'extinction et déplacer la longueur d'onde de résonance et donc le pic d'absorption dans les régions spectrales du proche infrarouge[5,6]. Pour des nanosphères d'or dans la gamme de taille couramment employée (4 à 40 nm), l'ordre de grandeur de la longueur d'onde du pic d'absorption est de ~520 à 550 nm ce qui est en dehors de la fenêtre optique des tissus biologiques et ne correspond donc pas aux critères optiques nécessaires pour être considérés comme des agents efficaces. En comparaison, pour de

nanobâtonnet de 10 nm de diamètre et de longueur 40 nm, le pic est déplacé autour de 800 nm. Cet ajustement par la taille est donc une propriété très attrayante pour des applications en PA et PTT.

4.1.B. Étude spectroscopique

Les résultats optiques ont été effectués pour l'article « *Calibrated Photoacoustic Spectrometer Based on a Conventional Imaging System for In Vitro Characterization of Contrast Agents* » présenté dans le chapitre 2. Pour rappel, l'échantillon utilisé est une solution commerciale qui est composée de nanobâtonnets d'or (GNR) citratés en dispersion dans l'eau (10 ± 2 nm de diamètre, 42 ± 8 nm de longueur, concentration $35 \mu\text{g}/\text{mol}$, Sigma-Aldrich) avec une extinction maximale nominale à 808 nm. Le coefficient d'atténuation a été évalué avec le spectromètre (V650, Jasco, Japon) dans la gamme de longueurs d'onde 680-900 nm. La correction de la ligne de base (baseline) du spectromètre a été réalisée avec de l'eau ultrapure. Pour la mesure photoacoustique, les mesures ont été réalisées à $20,7 \pm 0,2$ °C et la fluence laser a été fixée à $2.5 \text{ mJ}\cdot\text{cm}^{-2}$ pour une longueur d'onde de 730 nm. La fluence plus faible que pour les autres composés visait à préserver la photostabilité des nanobâtonnets d'or. Nous utilisons ces résultats pour calculer l'efficacité photothermique avec la méthode optique présentée dans le chapitre précédent.

La Figure 4.1 présente les spectres photoacoustiques $\mu^{\text{PA}}(\lambda)$ pour la solution de nigrosine et pour les nanobâtonnets d'or et le coefficient d'atténuation $\mu^{\text{att}}(\lambda)$ de l'échantillon mesuré par le spectromètre UV-visible. Pour la solution de nanobâtonnet d'or, on peut observer une grande différence entre le spectre photoacoustique et le spectre d'atténuation ce qui peut s'expliquer par le fait que la diffusion optique est non négligeable pour ces nanobâtonnets et par une potentielle résistance thermique interfaciale au transfert de chaleur à l'interface or-eau. Pour calculer le coefficient de conversion lumière-chaleur, nous utilisons les valeurs d'absorption photoacoustique et d'extinction à la longueur d'onde 811nm et 812nm respectivement.

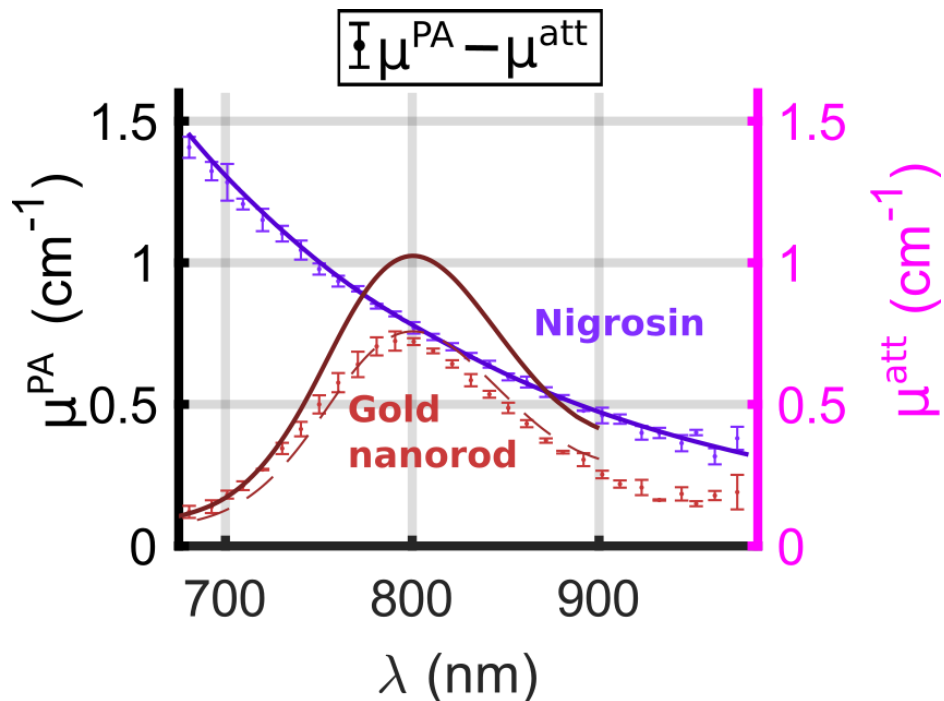


Figure 4.1. Spectres expérimentaux d'une solution de nanobâtonnets d'or (GNR). Le coefficient d'absorption $\mu^{PA}(\lambda)$ de la solution de GNR (courbes rouges) et des solutions de nigrosine (courbes violettes) a été mesuré une fois dans quatre tubes. Les valeurs médianes de $\mu^{PA}(\lambda)$ ont été affichées avec des marqueurs en forme de points et les barres d'erreur correspondent au \pm MAD. Le coefficient d'atténuation $\mu^{att}(\lambda)$ est représenté par une ligne continue. Pour le GNR, le coefficient d'atténuation n'était disponible que dans la plage 680 nm-900 nm. Il convient de noter que contrairement aux autres graphiques de spectre présentés dans ce chapitre, les coefficients ici ne sont pas les coefficients décadiques.

On obtient un coefficient de conversion lumière-chaaleur de 68,9 % en utilisant la méthode du rapport de l'absorption et l'extinction décrite dans le Chapitre 3 Partie III.A. Selon Cole et al. [7], une efficacité photothermique de 60 % est obtenue pour des AuNR de 44 nm x 13 nm. Cette efficacité est similaire à celle observée dans cette étude en tenant compte de la différence de dimension. En effet, il existe une tendance générale selon laquelle une taille croissante produit une efficacité photothermique plus faible [8]. Cependant, il faut être vigilant, car de nombreuses études se sont penchées sur l'efficacité photothermique dans le but de déterminer quel type de particule présente la "meilleure" performance [9–15]. Or, il existe plusieurs mesures d'efficacité photothermique, dont les résultats divergents dans la communauté scientifique pour des particules similaires (de même taille et matériau) en fonction du montage utilisé et des longueurs d'onde d'illumination [16].

4.I.C. Étude Photothermique

Les nanoparticules d'or sont étudiées aussi dans le domaine de la recherche en thérapie photothermique [17–19]. Pour la thérapie, elles sont utilisées pour induire une mort cellulaire ou une déstructuration de la matrice extracellulaire par augmentation de température, mais peuvent être utilisées aussi pour la délivrance de principes actifs. Dans toutes ces applications,

une optimisation des propriétés optiques et thermiques des agents de contrastes permet une maximisation des effets thérapeutiques. De plus, il est essentiel de travailler dans la « fenêtre optique » des tissus biologiques afin de traiter uniquement la zone ciblée et ne pas affecter de manière irréversible les tissus sains sur le trajet optique. Les nanobâtonnets correspondent bien à tous ces critères d'Agents photothermiques (APT).

Toutes les études en hyperthermie optique présentées dans ce chapitre seront effectuées sur le même montage expérimental avec le protocole décrit dans le chapitre 2. La mesure a donc été réalisée pendant 20 minutes, soit 10 minutes de chauffe et 10 minutes de refroidissement. Un volume de 200 μL a été utilisé dans un Eppendorf de 0.5 ml. La puissance d'exposition du laser était de $1\text{W}\cdot\text{cm}^{-1}$. Les données sont enregistrées par la caméra IR à 30 Hz et d'émissivité 0.95. Toute l'étude se déroule sur la même journée pour favoriser la comparaison des mesures entre elles.

On mesure et on compare l'élévation de température de la solution de nanobâtonnets d'or avec une solution de nigrosine au même coefficient d'absorption à 808 nm. Nous avons, pour l'étude photothermique présentée Figure 4.2, un coefficient d'absorption décadique de $\mu_{10}^{\text{PA}} = 0.5 \text{ cm}^{-1}$ pour la solution de nigrosine. Pour des coefficients d'absorption μ_{10}^{PA} équivalents, on observe que la température atteinte par la solution de nanobâtonnets d'or est légèrement inférieure à celle de la nigrosine. Grâce aux ajustements de courbes, il est possible de calculer la température maximum théorique ΔT_{max} pouvant être atteinte par l'échantillon. On obtient un $\Delta T_{\text{max}}=16.68^\circ\text{C}$ pour la nigrosine et $\Delta T_{\text{max}}=15.45^\circ\text{C}$ pour les nanobâtonnets d'or.

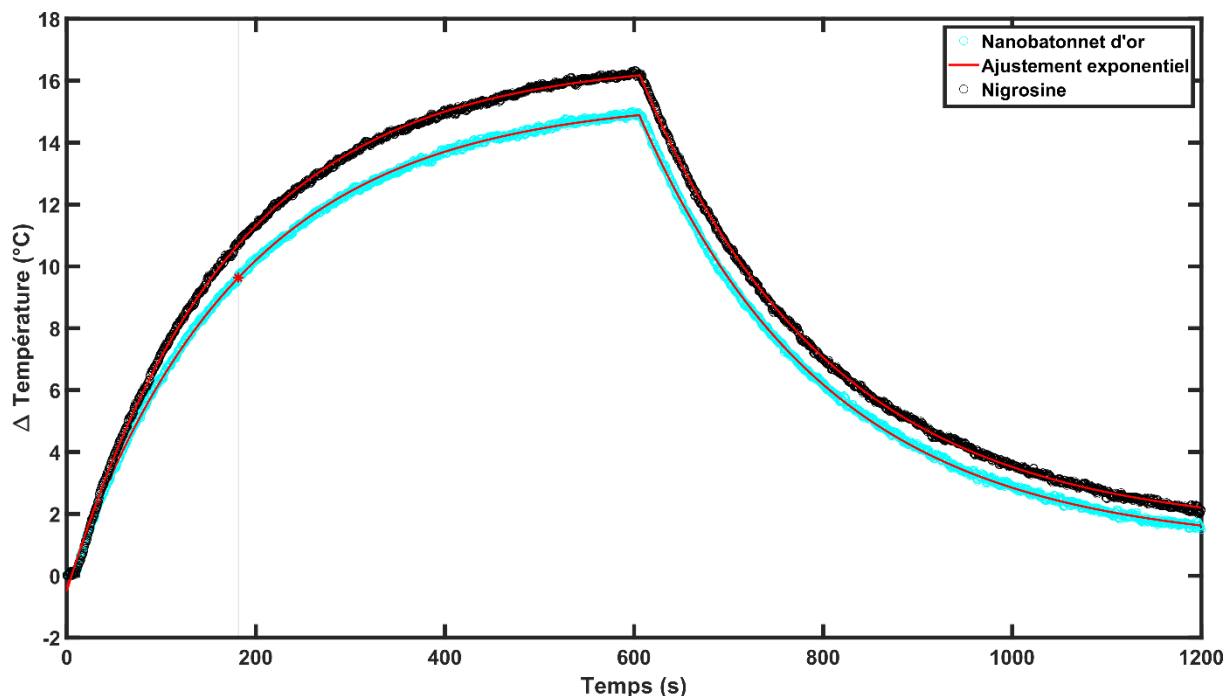


Figure 4.2. Comparaison de l'évolution de la température des nanobâtonnets d'or et de la nigrosine (solution de référence). Un ajustement exponentiel est effectué systématiquement sur les données expérimentales pour extraire les différents paramètres comme le ΔT_{max} ou les τ qui sont présentés dans le chapitre 1 Partie VI.D.

On obtient une température atteinte inférieure à notre référence. Cependant, les nanobâtonnets d'or ont une réponse hyperthermique optique non négligeable qui est très intéressante pour la PTT comme vu précédemment avec l'étude PA.

Une étude approfondie utilisant plusieurs absorptions (ou d'extinction) pourrait être intéressante pour calculer l'efficacité thermique via les autres méthodes présentées au Chapitre 3 Partie II.A et pour déterminer la concentration à laquelle le palier de température maximum est atteint. Cependant, étant donné que seulement un petit volume était disponible et que l'étude se concentrait sur la solution mère disponible, elle ne pouvait pas s'étendre pour une absorption plus importante.

Si l'on suppose que la longueur de pénétration L est la même pour la solution de nigrosine et la solution de nanobâtonnet du fait de leur atténuation modérée, on peut appliquer l'Equation (3.12). On obtient : $\eta = \Delta T_{\max}^{\text{GNR}} / \Delta T_{\max}^{\text{nigrosine}} = 92\%$.

Ce résultat ne correspond pas aux résultats issus de la mesure photoacoustique (68,9%). Cette différence peut s'expliquer par le manque de précision de la méthode exponentielle et les sur estimations obtenues au chapitre 3.

4.II. Étude d'un préagrégat d'or

4.II.A. Introduction de l'étude

Nous avons discuté précédemment des avantages et des limites des nanosphères d'or pour les applications en PAI ou en photothermie et en particulier du pic d'absorption se situant dans le domaine de la lumière visible. Pour travailler dans la « fenêtre optique » afin de traiter des tissus en profondeur et uniquement la zone ciblée par les agents, une grande partie des recherches se concentrent sur des nanoparticules à formes complexes [20–23] comme les nanobâtonnets, mais qui peuvent être difficile à synthétiser et avec une faible photostabilité. L'utilisation de formes sphériques est une alternative qui suscite de l'intérêt par la rapidité et la simplicité de la synthèse et son rendement de production à grande échelle. Une stratégie pour déplacer le maximum d'absorption vers la première fenêtre de transparence des tissus biologiques est d'exploiter le phénomène de couplage plasmonique entre les nanoparticules sphériques qui requiert une très faible distance entre nanoparticules.

L'équipe du MSC a montré que l'internalisation cellulaire de nanoparticules d'or dans les lysosomes conduit à un phénomène d'agrégation spontanée entre nanoparticules qui va induire une modification des propriétés optiques des nanosphères d'or par couplage plasmonique [24,25]. Toutefois, pour des particules de formes plus complexes, l'augmentation de l'échauffement photo-induit par agrégation peut être moins effective voir supprimée [26]. L'étude d'Alice Balfourier et Vladimir Mulens Arias montre qu'après internalisation cellulaire, les agrégats de nanosphères obtenus dans les lysosomes sont caractérisés par une dimension fractale très élevée (D_f de l'ordre de 2.9).

Les fractales sont des structures géométriques complexes qui peuvent être observées dans les agrégats de nanoparticules, c'est-à-dire des groupes de nanoparticules qui sont liées entre elles par des forces de Van der Waals ou des forces de Coulomb. Les agrégats de nanoparticules fractales peuvent être formés de manière naturelle, par exemple lorsque des nanoparticules se déposent sur un substrat ou lorsqu'elles sont dispersées dans un milieu liquide, ou bien de manière artificielle, par exemple lorsqu'elles sont synthétisées de manière

contrôlée en laboratoire. Les agrégats de nanoparticules fractales se caractérisent par une symétrie self-similaire, c'est-à-dire que la forme de l'agrégat est similaire à elle-même à différentes échelles. Cette propriété est liée à la dimension fractale de l'agrégat, qui est un indice de la complexité de sa forme. Les agrégats de nanoparticules fractales ont généralement une dimension fractale supérieure à leur dimension géométrique, ce qui signifie qu'ils ont une forme plus complexe que celle des agrégats de nanoparticules classiques tels que des sphères ou des ellipsoïdes.

Les agrégats de nanoparticules fractales peuvent être observés à différentes échelles, allant de quelques nanomètres à quelques micromètres. Ils peuvent être formés à partir de différents types de nanoparticules, comme des nanoparticules métalliques, des nanoparticules de semiconducteurs ou des nanoparticules organiques.

Il est important de comprendre comment ces structures se forment, en particulier si l'on souhaite les utiliser dans des applications pratiques. Les agrégats de nanoparticules fractales peuvent être formés de différentes manières, par exemple par dépôt sur un substrat, par autoassemblage, par co-assemblage avec d'autres nanoparticules, ou encore par synthèse chimique contrôlée.

Les agrégats de nanoparticules fractales peuvent avoir des propriétés optiques uniques, comme une absorption ou une émission de lumière qui dépendent de la dimension fractale de l'agrégat et de la nature des nanoparticules qui le constituent. Dans le cas des agrégats de nanoparticules, les fractales peuvent être utilisées pour modéliser leur pic d'absorption en fonction de leur composition chimique, de leur taille et de leur forme. Les agrégats de nanoparticules à base de métaux présentant une structure fractale haute ont une tendance à un pic d'absorption plus large. Cela signifie qu'elles peuvent absorber efficacement une gamme de longueurs d'onde de lumière plus large, ce qui peut être avantageux dans certains cas : par exemple en photothermie. En utilisant des agrégats de nanoparticules à structure fractale haute, on peut ainsi ajuster le pic d'absorption des nanoparticules et optimiser leur utilisation en fonction de l'application visée[27,28].

La dimension fractale est un paramètre définissant la morphologie d'un agrégat. Ainsi, une dimension fractale $D_f = 3$ se traduit par un agrégat très compact comparable à une particule sphérique, contrairement à une dimension fractale $D_f = 1$ qui correspond à des structures plus linéaires se rapprochant d'un bâtonnet [29]. Il apparaît donc que l'internalisation de nanosphères individuelles ne produit pas forcément des propriétés optimales intracellulaires. L'objectif a été d'étudier le cas, moins considéré dans la littérature, de nanoparticules préagrégées par synthèse chimique. L'idée a donc été de caractériser des solutions de préagrégats de nanoparticules d'or, dans lesquels les particules sont agrégées dans une structure optimale. Les travaux portant sur la caractérisation de préagrégats d'or en photoacoustique et en photothermie, et qui sont décrits dans cette partie, ont été réalisés en collaboration avec Florent Carn et Florent Voisin du laboratoire Matière et Systèmes Complexes (MSC).

Dans cette étude, deux préagrégats vont être considérés. Ces préagrégats sont obtenus par la succession de deux étapes de synthèse pour réaliser un assemblage contrôlé de nanosphères d'or.

Dans la première étape dite de « couplage », un complexe globalement neutre est formé par l'association de chaînes de chitosane quaternisé (un polycation linéaire, noté QC) et de nanoparticules d'or d'un diamètre d'environ 35 nm (notées AuNP) revêtus de citrate (c'est-

à-dire un polyanion sphérique). Ce couplage par le chitosane est une complexation de nature électrostatique. Les forces permettant à l'agrégat d'être stable sont en majorité dues aux interactions attractives de Van der Waals. La seconde étape, dite de « trempe », consiste à injecter une solution de QC pour arrêter la croissance des agrégats. La synthèse décrite est celle des agrégats appelés QcQc.

La seconde étape, dite de « trempe », consiste à injecter une solution de QC pour arrêter la croissance des agrégats. La synthèse décrite est celle des agrégats appelés QcQc. Pour les seconds préagrégats, la partie « couplage » sera assurée par du sel d'aluminium. On nommera ce préagrégat AlQc. Cette complexation par le sel permet l'augmentation de la force ionique par rapport aux interactions de Van der Waals et va conduire à l'écrantage des charges et faire prendre à l'agrégat une forme en pelote [30].

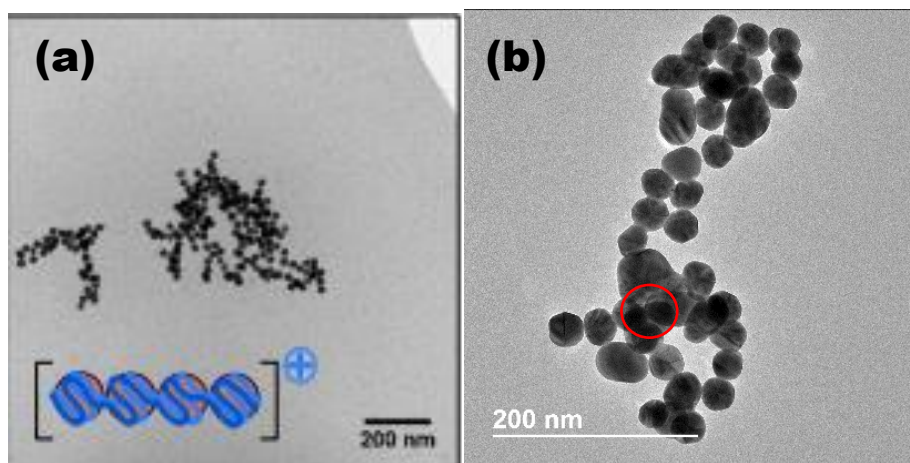


Figure 4.3. Image cryoMET (cryomicroscopie électronique par transmission) des préagrégats de nanoparticules d'or avec Chitosan QcQc (a) et avec du sel d'aluminium AlQc (b). On peut voir au niveau du cercle rouge des fusions potentielles dues au sel d'aluminium. Ces images ont été effectuées par Florent Voisin.

4.II.B. Étude spectroscopique UV-visible

La Figure 4.4 présente les spectres d'absorption UV-Visible des AuNP seules d'un diamètre d'environ 35 nm qui sont utilisés dans les préagrégats (a) et des deux préagrégats QcQc et AlQc (b). Les mesures ont été effectuées sur un spectrophotomètre Perkin Elmer Lambda 1050. Les cellules Hellma (quartz) de 5 mm d'épaisseur ont été remplies par les AuNP dilués ou le QC. La transmission diffuse a été mesurée en recueillant la lumière sortant de l'échantillon à l'aide d'une sphère d'intégration (accessoire Perkin Elmer). Les spectres ont été corrigés à partir de la cellule de quartz remplie d'eau.

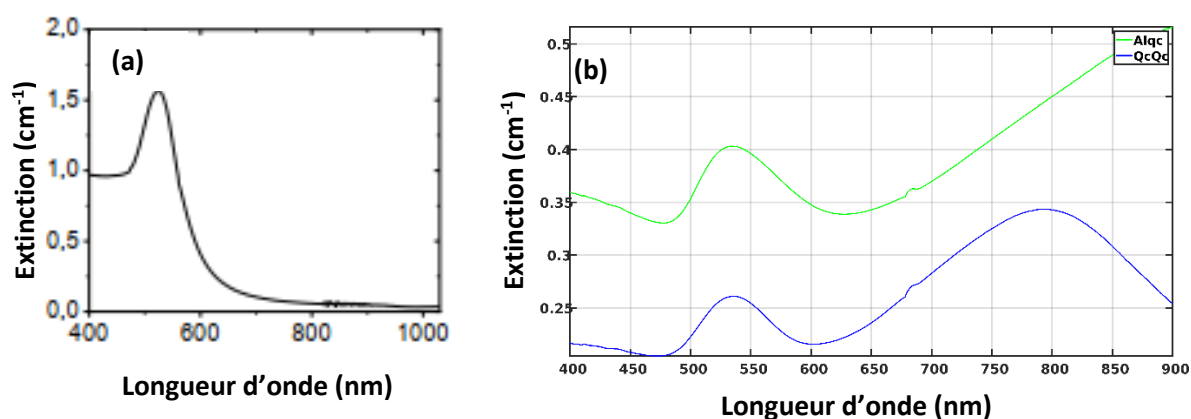


Figure 4.4. Spectre UV-visible. (a) Spectre des nanoparticules d'or stabilisées au citrate seul synthétisées en milieu aqueux par un processus de croissanceensemencé. Les nanoparticules, notées AuNPs ont une concentration finale de $5,8.10^{10}$ NP.m⁻¹. (b). Spectre UV-Visible des préagrégats d'or AlQc (en vert) et QcQc (en bleu).

Les particules d'or sphériques (Figure 4.4.a) ne présentent qu'une seule bande plasmonique (530 nm) et ce à cause de leur géométrie isotrope [31–33]. On observe pour les spectres des deux préagrégats AlQc et QcQc (Figure 4.4.b) deux bandes plasmoniques, correspondant à la bande plasmonique typique des nanoparticules d'or seules (530 nm) et à une bande plasmonique étendue à ~800 nm et >900nm, respectivement. On obtient une bande d'absorption dans le domaine du proche infrarouge pour les deux types de préagrégats. Ce signal s'explique par la formation d'un couplage plasmonique entre nanosphères dans l'agrégat. On obtient deux bandes différentes selon la méthode de complexation. En effet, on observe un décalage plus important vers l'infrarouge avec la méthode de complexation utilisant l'aluminium (>900nm contre 800nm pour la méthode de complexation avec le Chitosan). L'avantage de cette technique est de pouvoir déplacer dans le domaine du proche infrarouge l'absorption de petites nanosphères d'or, qui ont initialement des propriétés optiques situées dans le domaine du visible.

De plus, en changeant la méthode de couplage (Aluminium ou Chitosan), il est possible de déplacer sensiblement le maximum de la bande plasmonique. Trois paramètres principaux affectent la position de cette bande: la taille de l'agrégat, sa forme et la taille des particules individuelles [34]. La modification de l'un de ces facteurs ou de leurs combinaisons entraînera des changements radicaux dans l'intensité et la position du pic. En règle générale, plus les agrégats sont gros, plus le pic d'absorption se déplace vers le rouge. Cependant, la forme de

l'agrégat et la dimension fractale joue également un rôle important dans la position de la bande [35]. La concentration du réactif affecte sans aucun doute non seulement la forme, mais aussi la taille des agrégats, ce qui rend difficile une distinction expérimentale entre la taille et la forme. La largeur de la bande plasmonique dépend également de la distribution des tailles des particules et de la forme des agrégats [36–39]. La taille des deux préagrégats étudiée et celle des particules individuelles sont similaires ($\sim 250/300\text{nm}$) seul la forme des préagrégats et la force ionique change. En effet, la forme des préagrégats AIQc a une forme plus allongée comparée à QcQc (Figure 4.3). Il semble que cette différence amène à un « shift » le plus important de la bande de plasmons vers l'infrarouge.

4.II.C. Étude spectroscopique photoacoustique

Les AuNPs seules n'ayant pas de réponse optique dans le proche infrarouge, l'étude en photoacoustique s'est concentrée uniquement sur les deux complexes cités précédemment. Pour la mesure photoacoustique, les mesures ont été réalisées à $25 \pm 0,1$ °C et la fluence laser a été fixée à 4.8 mJ.cm^{-2} pour une longueur d'onde de 730 nm. Lors de cette étude, le but a été d'obtenir la forme spectrale en photoacoustique pour les deux agrégats et de comparer au spectre d'atténuation pour évaluer la part de diffusion optique. La Figure 4.5 présente des spectres normalisés par leur maximum en photoacoustique et en UV-visible. Au regard de la forme des spectres, on peut émettre l'hypothèse qu'une part non négligeable de diffusion optique participe à ce maximum d'atténuation dans le domaine du proche infrarouge observé dans l'étude UV-Visible. Bien que l'on n'observe pas de pic d'absorption similaire en photoacoustique, nous obtenons tout de même une réponse photoacoustique des préagrégats. Malheureusement, nous n'avons pas pour ces composés les spectres UV visibles et PA pour les mêmes échantillons ou avec une simple dilution. Il ne nous a donc pas été possible de faire une étude quantitative de la part relative de la diffusion optique par rapport à l'absorption dans le pic attribué au plasmon sur le spectre d'atténuation.

On peut également penser à une photodégradation des agrégats par l'illumination laser lors de la mesure du spectre PA. Cependant, nos mesures ont montré que les spectres sont stables sur les 15 répétitions successives du balayage en longueur d'onde. Pour rappel, les spectres présentés résultent de la moyenne des signaux photoacoustiques sur 15 balayages successifs des 30 longueurs d'onde d'excitation, on peut également calculer le spectre pour chaque balayage. Les 15 spectres obtenus sont plus bruités, mais permettent de détecter des changements au cours de l'acquisition. Nous n'en avons pas détecté pour les agrégats.

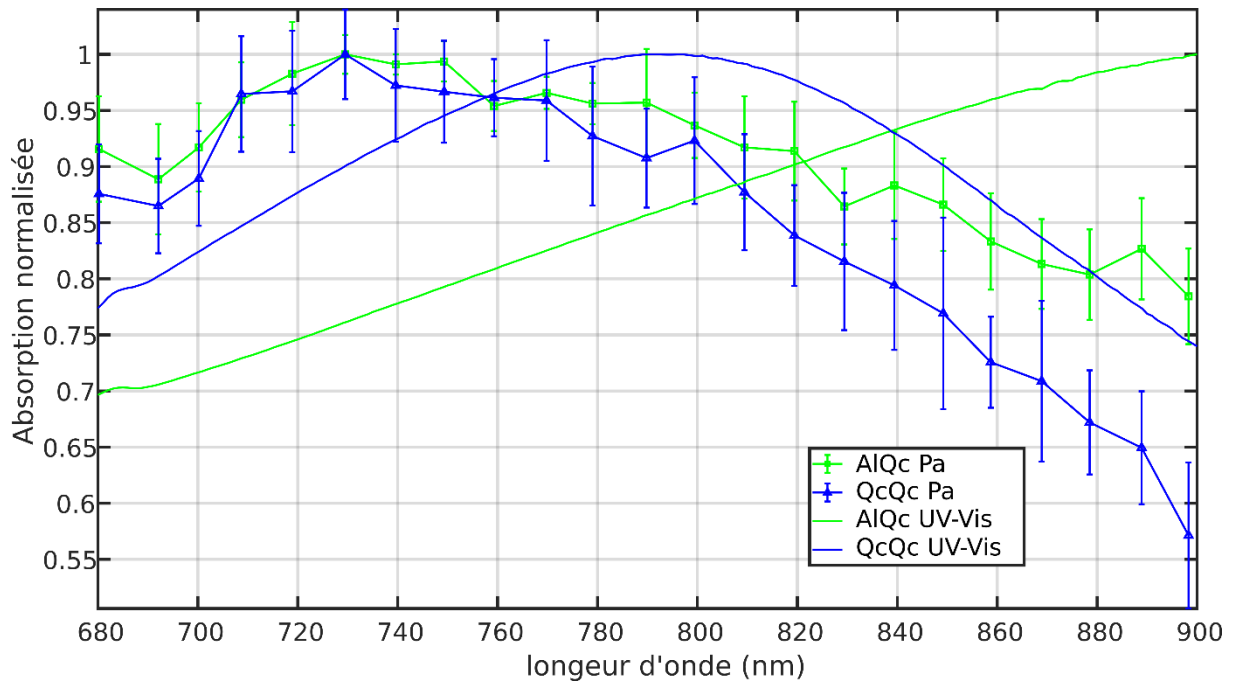


Figure 4.5. Spectres UV-visible et photoacoustique normalisés par rapport au maximum d'amplitude.

4.II.D. Étude Photothermique

Pour évaluer les performances photothermiques des préagrégats, l'évolution de température des QcQc et AlQc à différentes concentrations a été enregistrée à l'aide du montage expérimental. On illumine pendant 10 min un volume d'échantillon de 200 μ L à une densité de puissance de 1W.cm⁻¹ à la longueur d'onde de 808nm. On mesure au début l'évolution de température de la nigrosine comme référence. On enregistre la chauffe et le refroidissement pour une durée totale de 20 min par concentration. On utilise les mesures de PA pour harmoniser les absorption PA afin d'obtenir un lot tel que les coefficients d'absorption de chaque échantillon soient égaux à $\mu_{10}^{PA} = [0,2 ; 0,3 ; 0,5 ; 1] \text{ cm}^{-1}$. Pour le QcQc, l'absorption PA de la solution mère n'atteignait pas les μ_{10}^{PA} voulus et le volume disponible était limité. Nous n'avons donc pas pu nous situer dans la plage d'absorption souhaitée, mais dans une autre plage qui nous a permis de faire l'étude et les ajustements exponentiels.

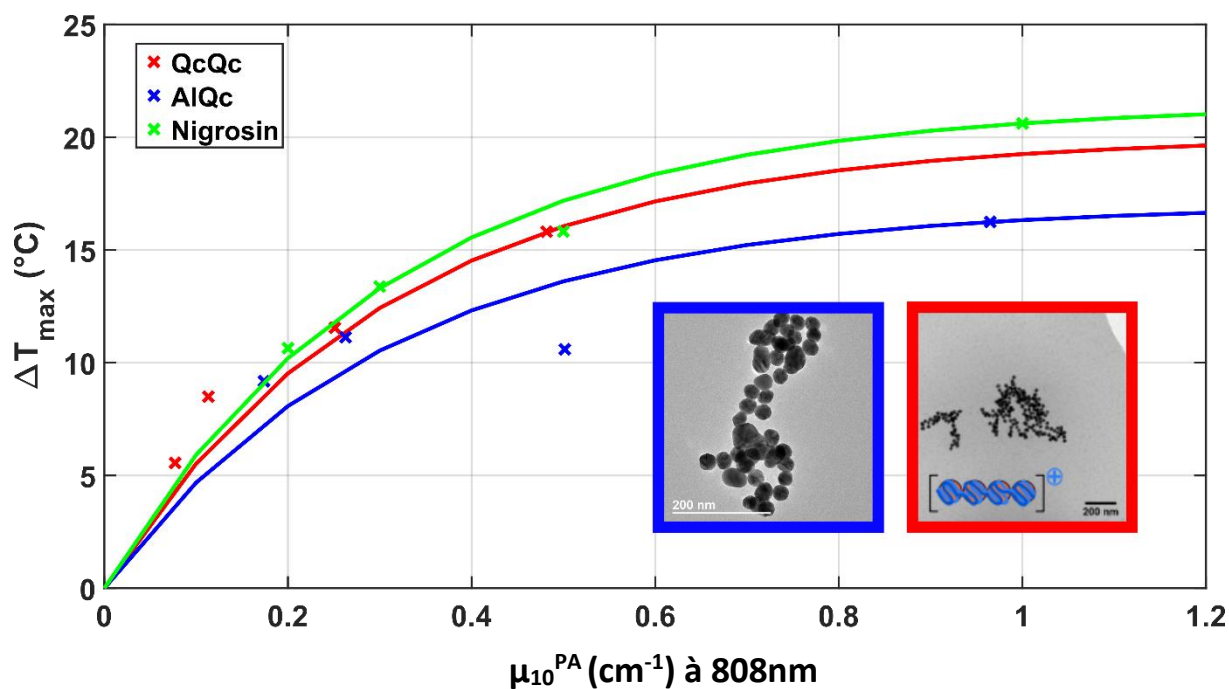


Figure 4.6. Comparaison des deux types de préagrégat avec sel d'aluminium (bleue) et avec Chitosan (vert). Les courbes d'ajustement sont tracées de la même manière que dans le chapitre 3.1.E. Image cryoMET (cryomicroscopie électronique par transmission) de préagrégats de nanoparticules d'or avec sel d'aluminium (bleu) et Chitosan (rouge).

On obtient une réponse thermique distincte pour les deux échantillons. Globalement, QcQc a un pouvoir de chauffe plus élevé que le préagrégat avec de l'aluminium pour un même coefficient d'absorption PA. Malheureusement, dû à une accessibilité limitée de quantité d'échantillons, il est difficile d'exploiter beaucoup plus ces courbes. En effet, il serait idéal d'obtenir plus de données à différentes absorptions (donc plus de points) pour avoir un ajustement exponentiel plus réaliste. Ce manque de données contraint un ajustement moins précis, bien qu'il soit cohérent et correspond avec les données expérimentales, et entraîne une difficulté d'interprétation fiable. Cependant, il est aussi intéressant de prendre en compte la concentration de particules dans chaque échantillon pour pouvoir évaluer la chauffe. Seules les concentrations des solutions mères ont été mesurées par Nanoparticles Tracking Analysis (NTA) [40] qui est une méthode basée sur une technique de microscopie à illumination laser et les propriétés de diffusion optique, le mouvement brownien des nanoparticules est alors analysé en temps réel pour estimer la taille des particules, la distribution de taille des particules et le nombre de nanoparticules. Les mesures sont donc résumées dans la Figure 4.7.

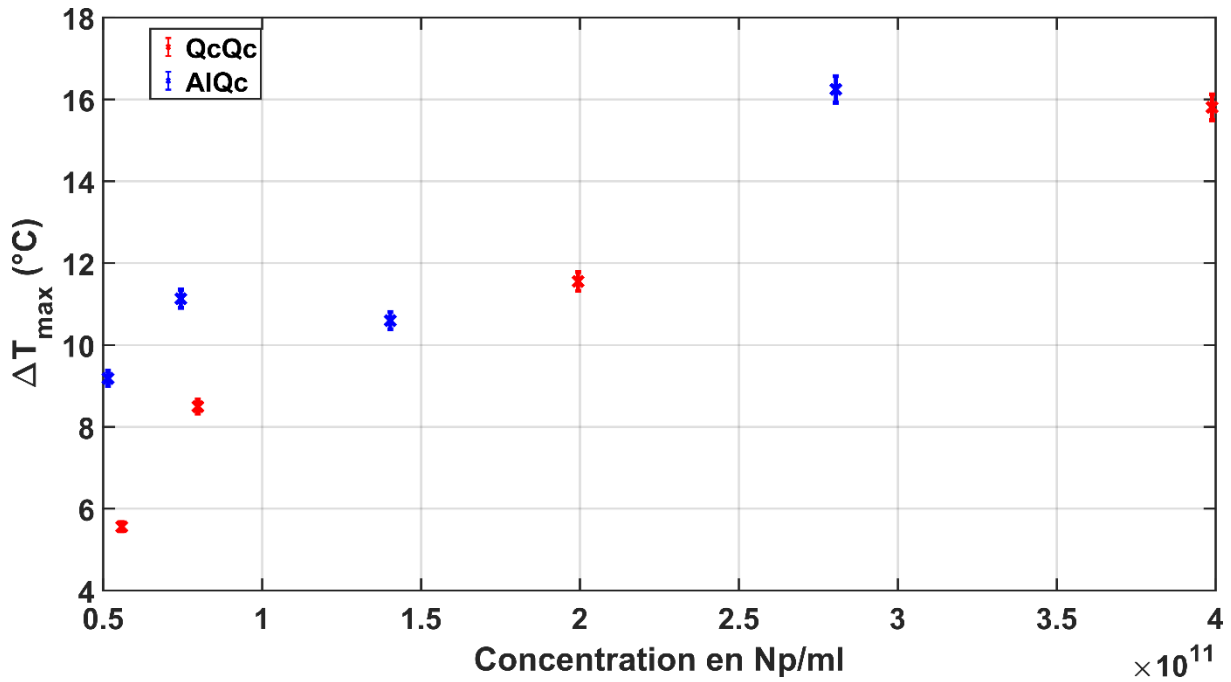


Figure 4.7. Évolution des ΔT_{max} en fonction des concentrations en nanoparticules. On compare QcQc (en vert) et AIQc (en bleue).

En se basant sur les mesures effectuées, il est observé une tendance intéressante. Pour obtenir une réponse thermique équivalente, il est nécessaire d'utiliser une concentration plus élevée de nanoparticules de QcQc par rapport à celles d'AIQc. En comparaison avec l'étude photoacoustique de la Figure 4.6, cela signifie qu'il faut plus de particules pour atteindre une absorption équivalente. Ce phénomène peut être expliqué par une augmentation de la force ionique par le sel d'aluminium qui va conduire à l'écrantage des charges et à des fusions entre nanoparticules d'or observable en cryoTEM voir Figure 4.3. Cette caractéristique des particules d'AIQc est très avantageuse pour les applications in vivo, car elle permet de minimiser la quantité de nanoparticules injectées et de réduire ainsi les risques de cytotoxicité liés à l'utilisation de grandes quantités de nanoparticules. D'un point de vue différent, à nombre d'agrégats injectés fixes et s'accumulant dans les tissus cibles, cela permet d'améliorer l'efficacité globale de la photothérapie tout en réduisant les coûts liés au traitement.

4.III. Étude d'un « smart » gel

4.III.A. *Introduction de l'étude*

Dans la continuité de l'étude du phénomène de couplage plasmonique où la distance interparticule joue un rôle dans les propriétés optiques, une étude photoacoustique et photothermique d'un microgel hybride « intelligent » sensible au pH et à la température a été effectuée en collaboration avec Yu Xiao, Kartikey Pandey et Claire Mangeney du Laboratoire de Chimie et de Biochimie Pharmacologiques et Toxicologiques de l'Université Paris Cité. Les travaux présentés ont été publiés pour partie dans un article dont je suis co-auteur : « *Synergic Thermo- and pH-Sensitive Hybrid Microgels Loaded with Fluorescent Dyes and Ultrasmall Gold Nanoparticles for Photoacoustic Imaging and Photothermal Therapy* » [41].

Les nano-objets dits « hybrides », composés de composants organiques et inorganiques, ont émergé récemment dans le domaine de la nanomédecine comme des matériaux polyvalents prometteur en raison de leurs propriétés physico-chimiques intéressantes et de leur capacité à répondre à leur micro-environnement (par exemple au pH). En effet, l'hybridation de deux entités différentes permet de conserver les propriétés individuelles des parties organique et inorganique tout en présentant des propriétés coopératives. En règle générale, la partie inorganique, comme les nanoparticules d'or par exemple, est retenue pour leurs propriétés de diagnostic efficace ou des applications thérapeutiques. Cependant, lors de la synthèse, des propriétés telles qu'une augmentation de la cytotoxicité ou l'apparition d'hydrophobicité peuvent apparaître. L'hybridation avec une partie organique est attractive, car les molécules biologiques ont plus de souplesse pour ajuster les fonctionnalités, améliorer la dispersion, la stabilité et la biocompatibilité.

La première étape a été de synthétiser ce type d'hybride, ce qui représente un vrai défi. Cette tâche a été accomplie par l'équipe de Claire Mangeney, qui a donc réussi à synthétiser un autoassemblage composé d'une matrice de polymère, de différents colorants organiques, comme le colorant la Cyanine Cy7.5 (partie organique) et de nanosphères d'or (partie inorganique) [41]. Du fait des propriétés de la matrice polymérique, cet assemblage a la capacité de se contracter en réponse à une augmentation de température ou une diminution du pH. Cela permet, notamment, de modifier l'état d'agrégation des nanoparticules d'or à l'intérieur de la matrice et ainsi d'induire un couplage plasmonique entre particules d'or, ce qui a un effet de décalage vers l'infrarouge de la bande d'absorption. Il existe aussi un couplage entre les nanoparticules et le colorant Cy7.5.

La seconde partie a été de quantifier les propriétés optiques et thermiques de ces gels. L'idée a été de caractériser l'absorption du gel par spectroscopie UV-Vis et par spectroscopie photoacoustique, puis d'étudier la réponse photothermique pour déterminer la capacité de chauffe de notre objet dans différentes conditions de température et de pH. C'est à ces mesures que j'ai directement participé.

4.III.B. Description du « smart gel »

Les μ gels ont été synthétisés par Yu Xiao, doctorante de l'équipe de Claire Mangeney et son composé de trois éléments principaux :

La partie gel qui est synthétisée à partir de monomères de méthacrylate d'éther méthylique d'oligo(éthylène glycol) (OEGMA, $M_n = 300 \text{ g.mol}^{-1}$) et d'acide méthacrylique (MAA, $M_n = 86.09 \text{ g.mol}^{-1}$) par polymérisation par précipitation sans tensioactif dans un solvant aqueux. Les réactifs ont été achetés chez Sigma-Aldrich. On rajoute ensuite, après lavage et redispersions à l'eau ultrapure, du NaOH qui va fixer le pH du gel aux alentours de $\text{pH} = 6.8-7.2$. Les μ gels ont un diamètre d'environ $627 \pm 2 \text{ nm}$ de diamètre hydrodynamique à 20°C et à $\text{pH} 7$ pour $[\text{Cyanine}] = 50 \mu\text{M}$ et après un seul cycle d'incubation.

La partie des nanosphères d'or synthétisées en utilisant du tétrahydroborate de sodium (NaBH_4) comme agent réducteur et permettant d'imposer un diamètre moyen de l'ordre de $3,8 \pm 0,9 \text{ nm}$ aux nanosphères et une faible polydispersité en taille.

Enfin la partie assemblage, où l'on ajoute à la partie μ gel une quantité de colorant comme de la Cyanine puis on va piéger les Nps d'or dans notre assemblage. Yu et son équipe applique une stratégie modulaire innovante pour ajuster la densité des nanoparticules à l'intérieur de la matrice de polymère par incubation successive avec les nanoparticules.

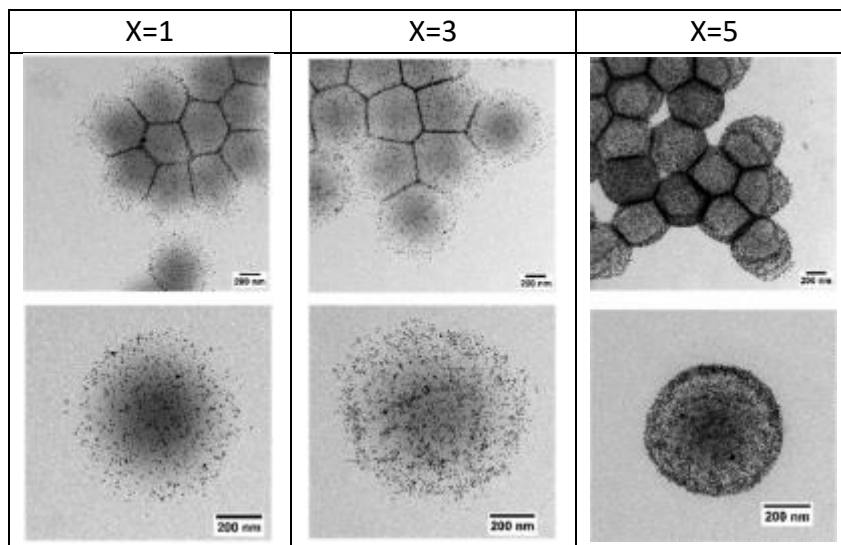


Figure 4.8. Images TEM des μ Gels hybrides avec cyanine obtenus après incubation de NPs d'Or. Le nombre d'étapes d'incubation entre les μ Gels et les Au NPs est spécifié par les valeurs de x , variant de 1 à 5. Toutes les particules de Gel@cyanine ont été préparées à partir de $[\text{cyanine}]_0 = 50 \mu\text{M}$ à $\text{pH} 7,5$ tandis que la concentration des au NPs était $[\text{AuNPs}] = 0,27 \mu\text{mol L}^{-1}$. Ces images ont été effectuées par Yu Xiao.

Toutes les caractéristiques techniques et la méthode de synthèse sont détaillées par Yu Xiao dans l'article [41].

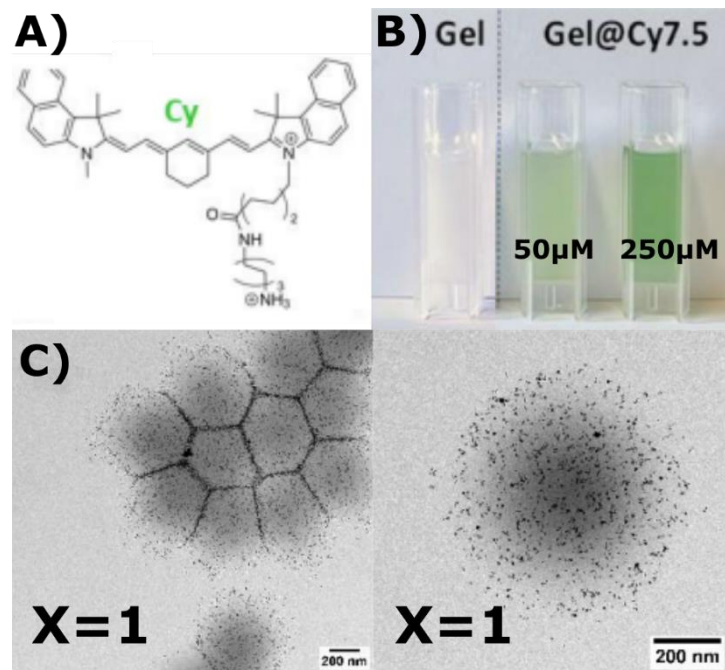


Figure 4.9. (A) Structure chimique de la Cyanine 7.5. (B) Images optiques des solutions de Gel@Cyanine, préparées avec des concentrations initiales de colorant $[Cyanine]_0 = 50 \text{ M}$ ou $[Cyanine]_0 = 250 \text{ M}$. Le pic d'absorption est situé vers 790 nm (C) Image MET (Microscopie Électronique en Transmission) de μ gel avec colorant gel@Cyanine et avec une concentration de nanoparticules $[AuNPs] = 0.27 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Ces images ont été effectuées par Yu Xiao.

Dans notre étude, nous avons étudié plusieurs μ gels chargés de Cyanine avec deux concentrations initiales différentes $[Cyanine]_0 = 250 \mu\text{M}$ et $[Cyanine]_0 = 50 \mu\text{M}$ et avec un ou plusieurs cycles d'incubation avec les nanosphères d'or et donc avec des taux d'incorporation croissants de ces nanosphères d'or dans la matrice organique. Le choix de la cyanine est dû au fait que l'absorption de cette dernière qui se situe dans le proche infrarouge (pic d'absorption à 790 nm), alors que celui des nanosphères d'or de l'ordre de 4 nm est situé dans le visible vers 530 nm. Cela se situe dans la gamme de longueurs d'onde des techniques de caractérisation présentée dans cette thèse en photoacoustique et photothermie. Plusieurs colorants ont été étudiés de manière comparative dans l'article, mais ils n'ont pas été examinés plus en détail dans cette étude [41]. L'absorption des Nps d'or est située dans le visible vers 530 nm.

Les propriétés optiques du Gel@Cy@Au ont été analysées par spectroscopie UV-vis et en spectrométrie PA. La caractérisation en PA s'est effectuée à 25°C avec un spectromètre photoacoustique.

Cette étude vise à fournir une comparaison entre l'absorption optique des μ Gels hybrides obtenue en PA et l'atténuation optique ou extinction, qui est la contribution additionnée de l'absorption et de la diffusion, obtenue avec les spectres UV-Vis. Malheureusement, une fois encore, les mesures UV-Visible et PA n'ont pas été effectuées sur les mêmes échantillons, ce

qui limite nos capacités d'analyse et ne permet pas de déduire le coefficient η des mesures photoacoustiques.

Les μgels par leur composition ont la capacité de changer la distance entre particules à l'intérieur du gel lors de leur contraction. L'agrégation des nanoparticules d'or piégées dans la matrice polymère entraîne un couplage plasmonique qui va élargir la bande plasmonique et déplacer le pic d'absorption dans le proche infrarouge.

4.III.C. Étude spectroscopique UV-visible

Les propriétés optiques du Gel@Cy@Au(x), avec x le nombre d'incubations par les nanosphères, ont été analysées par spectroscopie UV-vis (Figure 4.10). L'étude nous permet de séparer les différentes bandes d'absorption. Ainsi, nous obtenons la bande plasmon des Au NPs dans la plage spectrale 510-560 nm tandis que la présence de la cyanine a été révélée par une bande d'absorption à 790 nm. L'absorption des Au NPs pendant les étapes successives d'incubation avec les gels a pu être suivie en suivant l'intensité de la bande plasmonique, qui a fortement augmenté après 1, 3 et 5 cycles d'incubation avec la densité de nanosphères d'or encapsulées dans le μgel illustré dans la Figure 4.10. En fonction de la quantité de colorants et d'Au NPs absorbés par les microgels, les intensités relatives des bandes de chaque composant varie fortement, révélant principalement soit les bandes d'absorption des colorants (pour une charge élevée de colorants et une faible absorption de NPs Au), soit le pic plasmonique (pour une absorption élevée d'Au Nps). On peut aussi noter la forte composante de diffusion marquée par une pente décroissante entre 300 nm et 500 nm.

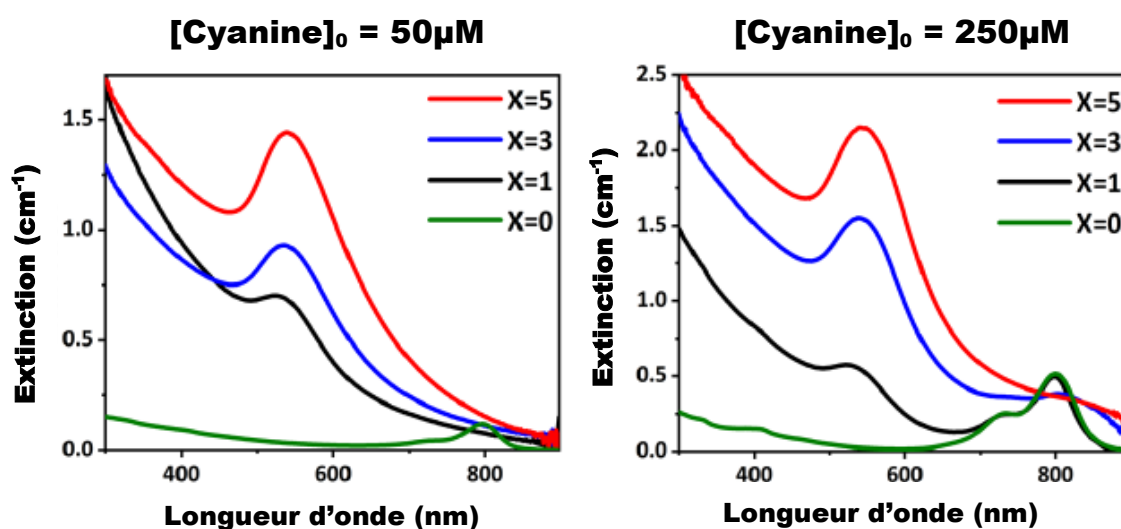


Figure 4.10. Spectre UV-Visible des solutions Gel@cyanine and Gel@Cy@Au(x) à 0.01 nM à pH 7.5 et avec x le nombre d'incubations par les nanosphères. Mesures obtenues par Yu Xiao.

Pour tous les spectres avec au moins une incubation de nanoparticules d'or dans la matrice de polymère, une similitude est observée dans la forme du spectre, notamment un pic distinct à environ 550 nm qui représente la bande plasmonique des nanoparticules d'or. Avec une forte quantité de colorant et une faible quantité de nanoparticules d'or, le pic d'absorption associé à la cyanine et au gel est visible. Cependant, ce pic s'atténue à mesure que la densité

de nanoparticules augmente. À pH 7,5, l'influence des incubations se manifeste surtout par une variation de l'amplitude de l'extinction.

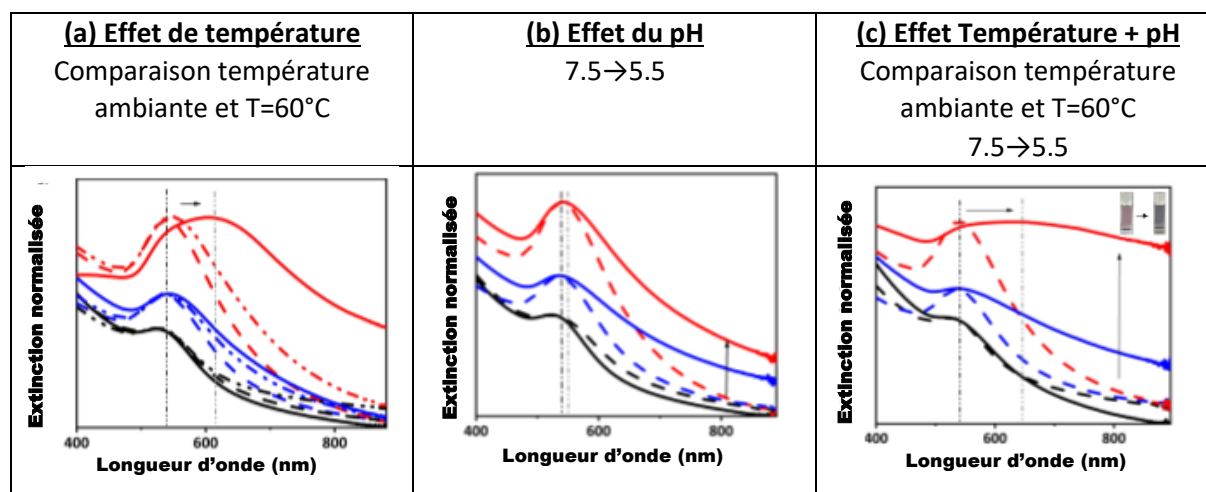


Figure 4.11. Effet des stimuli de température et de pH sur les spectres UV-vis des échantillons de Gel@Cy@Au(x) à 0,01 nM, avec [Cyanine]₀ = 50 μM. Le nombre d'étapes d'incubation entre les μGels et les Au NPs a varié de x = 1 (courbes noires), à x = 3 (courbes bleues) et x = 5 (courbes rouges). Pour chaque valeur de x (1-5), les spectres ont été normalisés par rapport à ceux enregistrés à température ambiante et à pH 7,5 (lignes pointillées). (a) Spectres UV-vis en fonction de la température : les lignes pleines correspondent aux spectres enregistrés à 60 °C et les lignes en pointillés sont les spectres après refroidissement. (b) Spectre UV-vis en fonction du pH : les lignes pleines correspondent aux spectres enregistrés à pH 5.5. (c) Influence des deux stimuli, c'est-à-dire la température et le pH : les lignes pleines correspondent aux spectres enregistrés à pH 5,5 à 60 °C. Mesures obtenues par Yu Xiao.

Les spectres UV-vis des échantillons de Gel@Cy@Au(x) ont été enregistrés à deux températures différentes (25 et 60 °C) pour révéler l'influence de ce stimulus sur les propriétés optiques des particules hybrides (Figure 4.11). Comme on peut l'observer sur la Figure 4.11, une augmentation de la température, de 25 à 60 °C, n'a pratiquement aucun effet sur la forme de la bande plasmonique pour les échantillons Gel@Cy@Au(1), ce qui reflète l'absence de couplage plasmonique entre les AuNPs au sein de la matrice μGels. Cela peut s'expliquer par la faible densité des AuNPs qui sont individuellement dispersés et isolés au sein de la matrice hydrogel, et ce même après le rétrécissement du μGel induit par la température. En revanche, lorsque l'absorption des AuNPs augmente au sein des Gel@dye@Au(3) et Gel@dye@Au(5), leur chauffage entraîne un élargissement et un déplacement vers le rouge de la bande plasmonique, qui est beaucoup plus prononcé pour les μGels contenant une charge élevée de AuNPs. Dans ce cas, l'énorme densité de AuNPs piégés à l'intérieur des μGels entraîne probablement une distance interparticulaire faible, qui l'est encore plus lorsque les μGels ont rétréci lors du chauffage, ce qui conduit à un couplage plasmonique. Ces changements optiques induits par la température ne semblent être que partiellement réversibles, ce qui peut s'expliquer par le caractère irréversible de l'agrégation des AuNPs, en raison de la forte attraction de Van der Waals entre elles. L'effet du pH a également été étudié en enregistrant les spectres UV-vis des particules hybrides à pH 5,5 et 7,5. Ces valeurs de pH ont été choisies pour imiter à la fois le pH physiologique (7,4) et le pH lysosomal intracellulaire (environ 5,5). Comme observé sur la Figure 4.11, la diminution du pH de 7,5 à 5,5 a produit un élargissement

de la bande plasmonique, qui peut être expliqué par la présence d'un couplage plasmonique entre les NPs au sein des μ Gels. Cet effet était beaucoup moins prononcé que pour le stimulus de la température, probablement en raison du choix de la gamme de pH qui se situe au début du changement de volume du μ Gel induit par le pH (voir Étude de l'article [41]). Néanmoins, une augmentation significative de l'extinction dans la région NIR a pu être observée à pH 5,5 pour les échantillons Gel@dye@Au(3-5), ce qui est un point clé pour les applications biomédicales potentielles. Il est intéressant de noter que la combinaison des deux stimuli (changements de température et de pH) semble renforcer les modifications de la forme de la bande plasmonique et de la longueur d'onde, comme le montre la Figure 4.11. Ces résultats montrent donc que la présence de colorants et de NPs d'Au piégés dans les microgels n'empêche pas les changements de conformation du réseau copolymère, qui conserve ses propriétés de réponse aux stimuli.

4.III.D. Étude en spectroscopie photoacoustique

Dans notre étude photoacoustique, nous avons étudié un μ gel chargé de Cyanine avec une concentration initiale $[\text{Cyanine}]_0$ de $250\mu\text{M}$ ou de $50\mu\text{M}$ pour 1 et 5 cycles d'incubation. Toutes les caractérisations ont été effectuées à 25°C avec le spectromètre photoacoustique présenté dans le Chapitre 2. La fluence laser utilisée est estimée à $3.8\text{ mJ}\cdot\text{cm}^{-2}$.

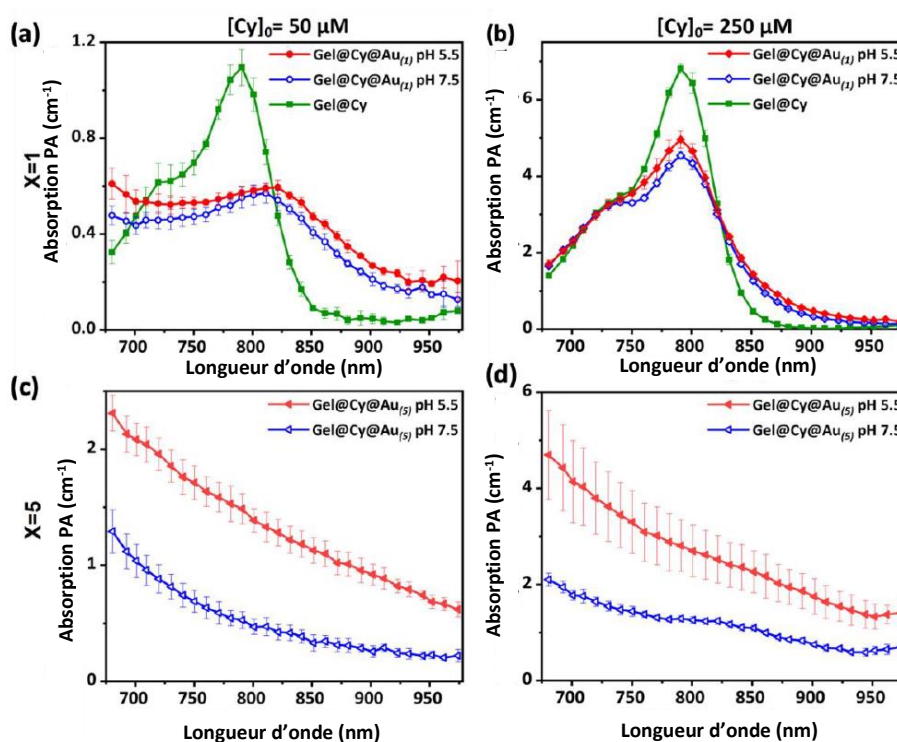


Figure 4.12. Spectre photoacoustique des différents gels à différentes concentrations de cyanine et à pH différent.

Les spectres photoacoustiques des gels sont présentés sur la Figure 4.12.

4.III.D.a. *Effet de la concentration en cyanine dans les μ gels*

L'analyse des résultats de la PA révèle plusieurs tendances, détaillées ci-dessous :

- Pour les échantillons de Gel@Cy, sans aucune charge de NPs d'Or :

La forme générale des spectres PA du Gel@Cy enregistrés à pH= 7,5 est très similaire à celle des spectres UV-vis (présentés sur la Figure 4.10) avec un pic d'absorption situé autour de 790 nm (voir la courbe verte sur la Figure 4.11.a,b). Le rapport entre l'amplitude maximale pour les concentrations initiales de colorant $[Cyanine]_0 = 50 \mu M$ et $[Cyanine]_0 = 250 \mu M$ est d'environ d'un facteur 6.

4.III.D.b. *Effet de l'encapsulation des nanoparticules d'Or*

- Pour les échantillons Gel@Cy@Au(1) :

Les spectres PA du Gel@Cy@Au(1) (obtenus après une incubation du Gel@Cy avec des NPs d'Or) ont été significativement modifiés. En effet, pour $[Cyanine]_0 = 50 \mu M$, le spectre PA du Gel@dye@Au(1) (Figure 4.12.a) présente un pic dans la gamme 750-850 nm qui pourrait être attribué à la cyanine, mais il apparaît plus large, avec une amplitude plus faible et décalé d'environ 790 nm à environ 810 nm, par rapport au Gel@Cy. Il est intéressant de noter que ce pic est révélé dans le spectre PA alors qu'il est caché dans le spectre UV-vis (Figure 4.10). De plus, une amplitude du signal PA sous illumination successive est observée dans le Gel@dye@Au(1) préparé à partir de $[Cyanine]_0 = 50 \mu M$ (Figure 4.13). Ces modifications des spectres d'absorption et une augmentation de l'intensité normalisée du signal PA suite à des illuminations successives suggèrent un couplage entre le colorant et les nanoparticules plasmoniques à l'intérieur des μ Gels. En revanche, pour $[Cyanine]_0 = 250 \mu M$, le pic d'absorption est toujours à 790 nm (Figure 4.11.b) et l'échantillon n'est pas photostable, comme pour le Gel@Cy, ce qui suggère un couplage partiel entre les colorants et les NPs Au. La différence entre les échantillons Gel@Cy@Au(1) préparés avec une charge de colorant faible ou élevée peut être expliquée par la contribution dominante du colorant aux spectres d'absorption à une charge élevée.

- Pour les échantillons de Gel@Cy@Au(5) :

Avec un ajout supplémentaire de nanoparticules d'Or (après 5 incubations avec des Au NPs), l'absorption associée au colorant disparaît pour $[Cyanine]_0 = 50 \mu M$ alors qu'elle est très faible et à peine détectable pour $[Cyanine]_0 = 250 \mu M$, en accord avec les spectres UV-Vis. Cependant, le coefficient de PA à 790 nm est environ 2,4 fois plus important pour $[Cyanine]_0 = 250 \mu M$ que pour $[Cyanine]_0 = 50 \mu M$, ce qui montre indirectement que l'augmentation de la charge de colorant a un effet sur le signal PA.

4.III.D.c. Étude de la photostabilité

Pour compléter l'étude de la caractérisation des gels avec la photoacoustique, nous nous sommes intéressés à la stabilité optique de l'objet. Pour ce faire, nous avons soumis les échantillons à 900 pulses laser successifs au pic d'absorption de la Cyanine (environ 790nm). Nous utilisons la même fluence (3.8 mJ.cm^{-2}) que précédemment. Nous enregistrons alors l'amplitude du signal photoacoustique à chaque pulse laser et nous étudions l'évolution de ce signal au fur et à mesure de l'illumination.

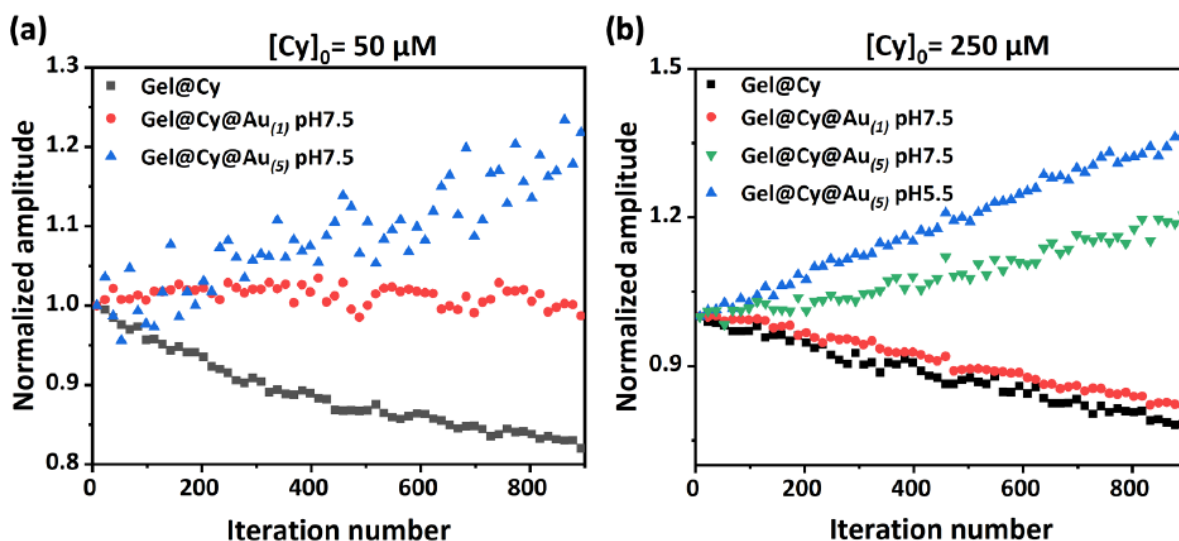


Figure 4.13. Étude de photostabilité sous illumination successive des échantillons de Gel@Cy et de Gel@Cy@Au_(1,5) préparés à partir de (a) $[Cy]_0 = 50 \mu\text{M}$ et (b) $[Cy]_0 = 250 \mu\text{M}$. Chaque échantillon a été éclairé 900 fois à 780 nm à $3,5 \text{ mJ.cm}^{-2}$. Les coefficients PA ont été moyennés sur 15 impulsions laser successives et ont été normalisés à la première valeur.

Les deux échantillons de Gel@Cy (préparés à partir de $[Cyanine]_0 = 50 \text{ M}$ ou $[Cyanine]_0 = 250 \text{ M}$) se sont révélés instables sous les impulsions d'illumination (Figure 4.13) avec une diminution progressive de l'amplitude du signal PA, qui peut être expliquée par la photodégradation du colorant sous excitation laser.

Une augmentation de l'intensité normalisée du signal PA suite à des illuminations successives est observée dans Gel@Cy@Au(1) préparés à partir de $[Cy]_0 = 50 \mu\text{M}$ (Figure 4.13.a) par rapport à Gel@Cy. Les modifications des spectres photoacoustiques et l'augmentation de l'intensité du signal PA sous illumination successive de Gel@Cy@Au(1) suggèrent un couplage entre le colorant et les nanoparticules plasmoniques à l'intérieur des μGels . En revanche, pour $[Cyanine]_0 = 250 \mu\text{M}$, le pic d'absorption est toujours à 790 nm (Figure 4.12) et l'échantillon n'est pas photostable, ce qui suggère seulement un couplage partiel entre les colorants et les NP Au à plus forte concentration de cyanine. La différence entre les échantillons de Gel@Cy@Au(1) préparés avec une charge de colorant faible ou élevée peut s'expliquer par la contribution dominante du colorant aux spectres d'absorption à charge élevée.

Lorsque le nombre d'incubations est augmenté, ce qui entraîne une densité accrue des nanoparticules d'or dans la matrice de polymère, on observe une photostabilité des Gel@Cy@Au(5) avec même une augmentation du signal PA. Cela peut être attribué à un échauffement local et progressif de l'environnement des NPs plasmoniques du aux éclairages successifs. Cet échauffement conduirait à une augmentation du coefficient de Grüneisen par rapport aux conditions initiales et donc de l'amplitude du signal photoacoustique. De plus, la courbe du signal PA du Gel@Cy@Au(5) à pH 5,5 (Figure 4.13.b) révèle une forte amélioration du signal après illuminations successives, supérieures à celle observée à pH 7,5, suggérant que la contraction induite par le pH du microgel et le couplage plasmonique qui en résulte stimulent une augmentation locale de la température.

4.III.D.d. Effet du pH

Pour le cas avec 1 seul cycle d'incubation Gel@Cy@Au(1), la forme du spectre d'absorption est très peu influé par un changement de pH. En contradiction, avec le Gel@Cy@Au(5), où nous pouvons observer un changement de la forme du spectre d'absorption par rapport au spectre UV-Visible, d'une part et d'autre part, une augmentation du coefficient d'absorption à la longueur d'onde 808nm d'un facteur 3 et d'un facteur 2 pour $[Cyanine]_0 = 50\mu M$ et $[Cyanine]_0 = 250\mu M$ respectivement. Notre hypothèse est que ces observations résultent d'une modification du plasmon. La contraction du gel déclenchée par un pH acide (pH=5.5) induit un rapprochement des particules et un couplage plasmonique.

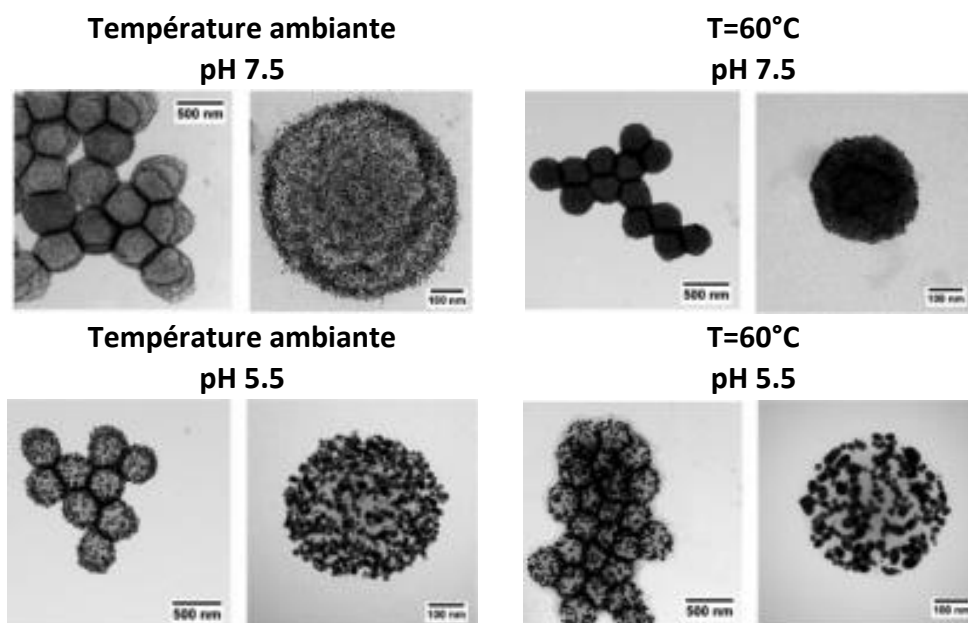


Figure 4.14. Images TEM à différents grossissements d'échantillons du Gel@Cy@Au(5) préparés à partir de $[Cyanine]_0 = 50\mu M$, enregistrés initialement à température ambiante et à pH 7,5, puis soumis à différents stimuli. L'effet de la température (T) correspond au chauffage des dispersions colloïdales à 60 °C, l'effet du pH correspond à la diminution du pH à 5,5, tandis que l'effet de la température et du pH indique que les particules hybrides ont été soumises aux deux stimuli simultanément.

Cette caractéristique est très intéressante pour détecter un changement d'acidité comme le passage dans les lysosomes cellulaires par exemple. Cependant, le changement de la forme du spectre pourrait ne pas être suffisant pour la détection du passage du gel dans un environnement acide avec une acquisition photoacoustique multispectrale. L'augmentation du coefficient d'absorption pourrait ainsi contribuer à la détection du passage en milieu acide, à condition de pouvoir distinguer l'augmentation de l'absorption liée à l'acidité de celle liée à l'accumulation de microgels. Cette caractéristique est particulièrement intéressante dans la mesure où on peut considérer que des micro-environnements légèrement acides sont observés dans les tissus cancéreux ou les zones enflammées en raison d'un état métabolique altéré [42].

4.III.E. *Étude photothermique*

Pour évaluer les performances photothermiques de Gel@Cy@Au₍₁₎ avec [Cy]₀ = 250 μM, les changements de température des gels à différentes concentrations ont été enregistrés à l'aide du montage expérimental. On illumine pendant 10 min un volume d'échantillon de 200 μL à une densité de puissance de 1 W.cm⁻¹ à la longueur d'onde de 808 nm. En début de mesure, on évalue la capacité photothermique de notre référence, la nigrosine à un coefficient d'absorption décadique $\mu_{10}^{PA} = 1 \text{ cm}^{-1}$. On enregistre la chauffe et le refroidissement pour une durée totale de 20 min d'expérience par échantillon. Ainsi, des solutions de microgels à quatre coefficients d'absorptions différents ont été mesurées en photothermie. L'absorption de la solution mère a été mesurée en PA et prise en référence pour les différentes dilutions. Ainsi, nous avons mesuré une série de gel@Cy@Au₍₁₎ dont les coefficients d'absorption ont été évalués à $\mu_{10}^{PA} = [0.25 ; 0.5 ; 1 ; 1.5] \text{ cm}^{-1}$. On mesure alors la chauffe puis le refroidissement de chaque échantillon et on les ajuste par le modèle pour extraire les paramètres intrinsèques à chaque absorption.

On obtient alors une courbe de ΔT_{max} en fonction du temps que l'on va comparer à notre solution de référence.

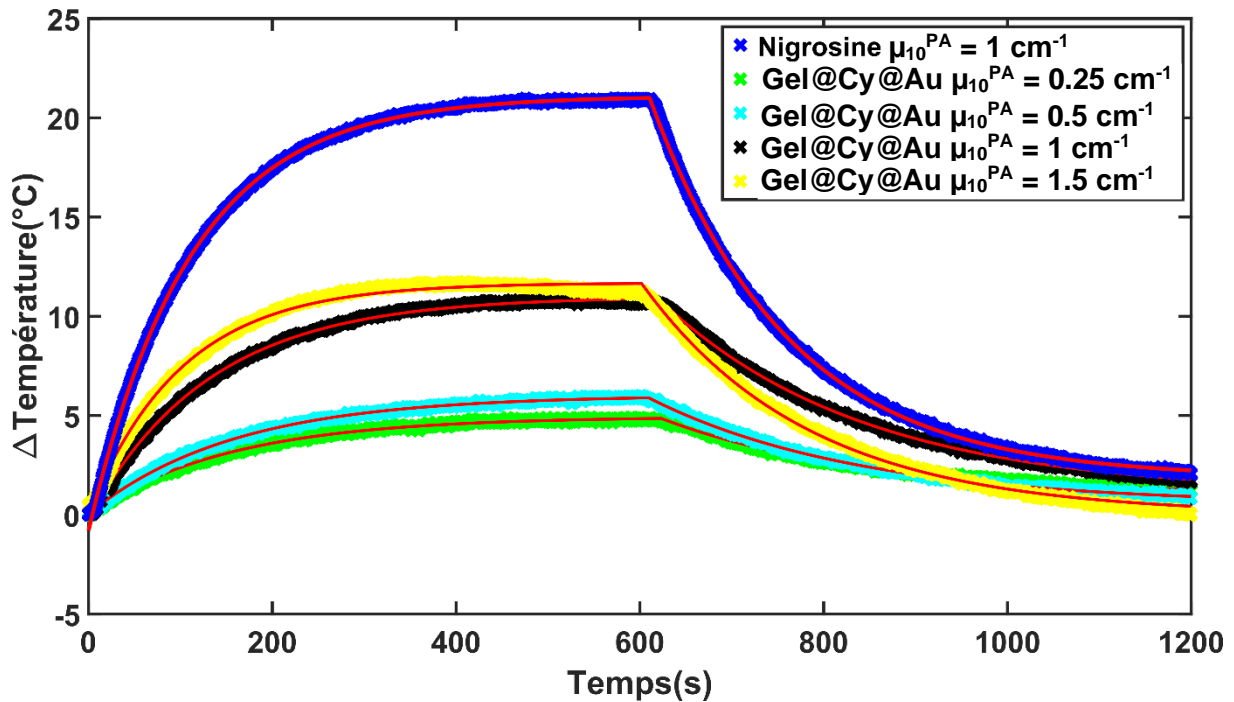


Figure 4.15. Comparaison de l'élévation de température de la Nigrosine à absorption $\mu_{10}^{PA}=1 \text{ cm}^{-1}$ (bleu) et celle des Gel@Cy@Au à différents μ_{10}^{PA} . Les courbes rouges représentent l'ajustement des données expérimentales avec les équations théoriques de la forme exponentielle.

On observe que le gel@Cy@Au n'a pas la même élévation de température que notre solution de référence pour un même coefficient d'absorption. Cependant, il est possible d'ajuster la courbe au même un modèle exponentiel, montrant une similitude de comportement thermodynamique entre les gels@Cy et une solution moléculaire. De plus, suivant les absorptions l'élévation n'atteint pas le même palier de température.

On utilise ensuite les paramètres des ajustements des données pour extraire les ΔT_{\max} pour chaque absorption PA. Cela permet de tracer l'évolution des ΔT_{\max} en fonction des différentes absorptions qui est représentée en Figure 4.16.

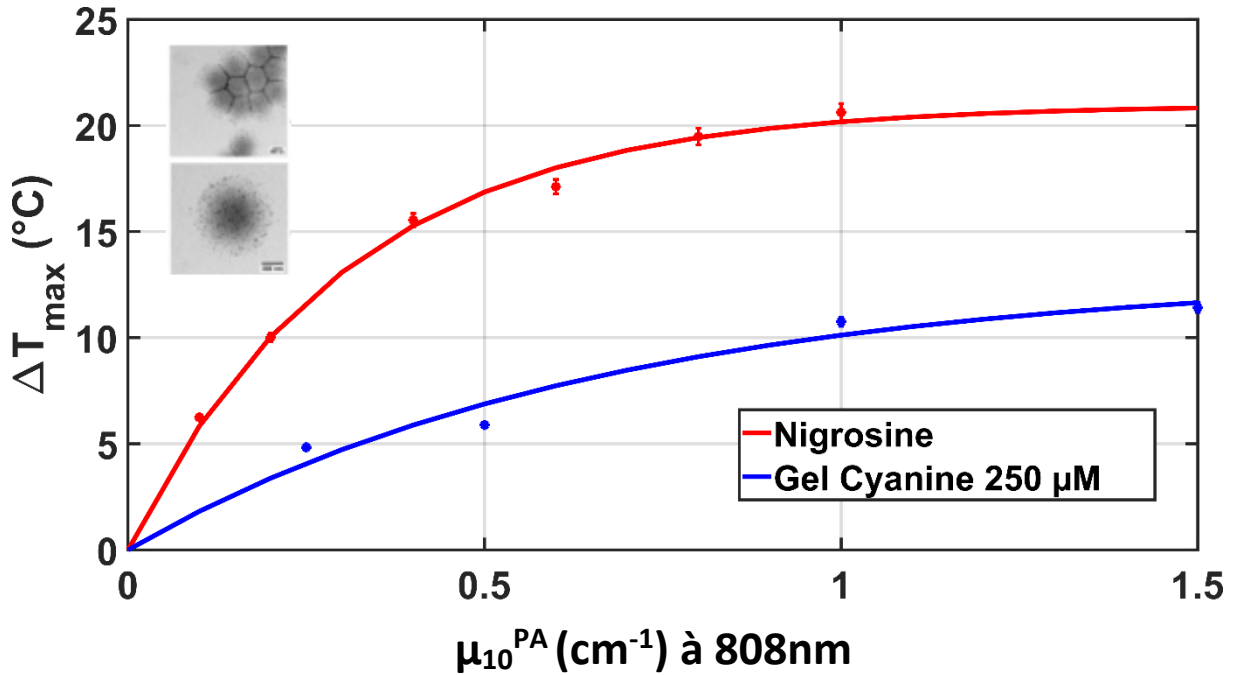


Figure 4.16. Comparaison de l'évolution du ΔT_{max} du gel avec la solution de calibration.

Nous observons une augmentation de température moins importante pour les gels@Cy@Au par rapport à la nigrosine. En moyenne, les températures atteintes pour les gels@Cy@Au sont inférieures d'un facteur allant de 1.8 à 2 par rapport à la nigrosine aux mêmes niveaux d'absorption mesurés en PA, c'est-à-dire en première approximation d'un μ_{10}^{PA} donné.

Pour rappel, théoriquement :

$$\Delta T_{max} = \frac{\eta \cdot I(0) \cdot \left(1 - 10^{-\frac{L}{\eta} \mu_{10}^{PA}}\right) \cdot S}{h \cdot S_i} \quad (4.1)$$

Avec un η inférieur à 1 pour les microgels du fait de la diffusion optique. Le calcul de la pente à $\mu_{10}^{PA} = 0$ donne :

$$\left(\frac{\partial \Delta T_{max}}{\partial \mu_{10}^{PA}}\right)_{\mu_{10}^{PA}=0} = \frac{L \cdot \ln(10) \cdot I(0) \cdot S}{h \cdot S_i} \quad (4.2)$$

Donc on pourrait donc s'attendre à ce que les pentes à l'origine soient les mêmes pour la nigrosine et les gels, car tous les facteurs sont constants. Or, les ajustements réalisés ne montrent pas ce phénomène. Par ailleurs, l'ajustement avec l'Equation (3.7) des courbes de la Figure 4.16 donne un facteur $\frac{L}{\eta} = 0.33 \text{ cm}$ avec les microgels et $L = 1.3 \text{ cm}$ avec la nigrosine. Là où l'on pouvait s'attendre à un facteur $\frac{L}{\eta} > 1.3 \text{ cm}$, on trouve un facteur plus petit.

Il semble donc que, bien que les ajustements de courbes puissent être réalisés avec les lois théoriques, ces lois théoriques simplifiées ne permettent pas de décrire le comportement PTT

des microgels. Nous n'avons pas été en mesure d'identifier les phénomènes physiques qui pourraient expliquer de tels écarts.

Ces résultats suggèrent que les gels@Cy@Au ont un pouvoir de chauffage considérablement inférieur à celui de la solution de nigrosine (absorbeur moléculaire) utilisée comme référence. Cela peut être dû à des différences de composition chimique, de structure ou à une potentielle résistance à la diffusion de chaleur causée par le gel. La chaleur produite est directement diffusée dans le gel/colorant et non directement dans l'environnement. Par conséquent, les résistances thermiques peuvent être légèrement différentes et peuvent influencer la température mesurée. L'efficacité photothermique η moins élevée peut aussi être expliquée par une diffusion optique présente lors de l'hybridation. Cette observation est intéressante, car elle montre que les propriétés thermiques des nano ou microstructures peuvent varier de manière considérable en fonction de leurs structures et de leurs composants.

4.IV. Étude d'une Suprastructure « complexe »

Nous avons étudié les propriétés photoacoustique et photothermique d'un autre type de structure « complexe ». Cet objet est un autoassemblage hybride organique/inorganique appelée colloisodome de taille de l'ordre de 200 nm [43] qui consiste en une coquille flexible composée d'un assemblage de nanocristaux de ferrite (Fe_3O_4 NCs) de 10nm dans laquelle on place un assemblage de nanocristaux d'or de 5nm à l'intérieur. Il est possible de modifier la quantité d'or à l'intérieur de cette suprastructure « en œuf » pour faire varier les propriétés optiques de l'objet. La particularité de la suprastructure est d'avoir un double effet en réponse à une illumination laser. Premièrement, il a été observé lors d'une précédente étude [43] qu'il existait un effet cytotoxique du colloisodome seul après internalisation par différents types cellulaires, sous effet de la radiation laser. Deuxièmement, il était attendu que l'on puisse obtenir une plus grande absorption optique et une plus grande efficacité thermique quand le colloidosome inclut un cœur de nanoparticules d'or. La synthèse de ces objets a été conçue et réalisée par Marie Paule Pileni et son équipe. Nous avons étudié différents lots de ces autoassemblages pour la caractérisation optique et thermique. Comme ces assemblages présentent une composition bimétallique très distincte, il est important de comprendre les propriétés de chaque partie du colloidosome, c'est-à-dire la partie ferrite (coquille flexible) et la partie cœur d'or. L'étude se concentrera sur l'analyse des propriétés de chacune de ces parties. En comprenant ces propriétés, il sera possible d'optimiser l'utilisation de ces nanoparticules dans diverses applications. Ainsi, le lot étudié se compose de 5 solutions à différentes concentrations. La première solution est celle nommée « supraballs » qui est un assemblage plein et uniquement composé de nanoparticules de ferrite[44]. Les solutions suivantes sont des solutions de colloidosomes composés d'une coque de ferrite et d'un cœur d'or comme décrit ci-dessus et illustré sur la Figure 4.17 où le rapport en concentration ferrite/or va différer. Ainsi, pour chaque échantillon présenté, la concentration de la solution mère en ferrite est égale à $[\text{Fe}_3\text{O}_4] = 15 \text{ mg.ml}^{-1}$ auxquelles ont été rajoutés une concentration en $[\text{Au}] = [1 ; 3 ; 5 ; 10] \text{ mg.ml}^{-1}$. On obtient donc un ratio Au/Ferrite de [1:15 ; 3:15 ; 5:15 ; 10:15] respectivement. Le fait de modifier le rapport Au/Fe permet d'étudier l'influence de l'assemblage central des nanocristaux d'or sur les propriétés optiques et thermiques des colloidosomes de ferrites. Pour l'étude de l'influence de la concentration en ferrite, une

gamme de plusieurs concentrations a été étudiée. Les concentrations ont été sélectionnées de manière à avoir une gamme d'absorption $\mu_{10}^{PA} = [0.25 \ 0.5 \ 1 \ 2] \text{ cm}^{-1}$ pour chaque microstructure.

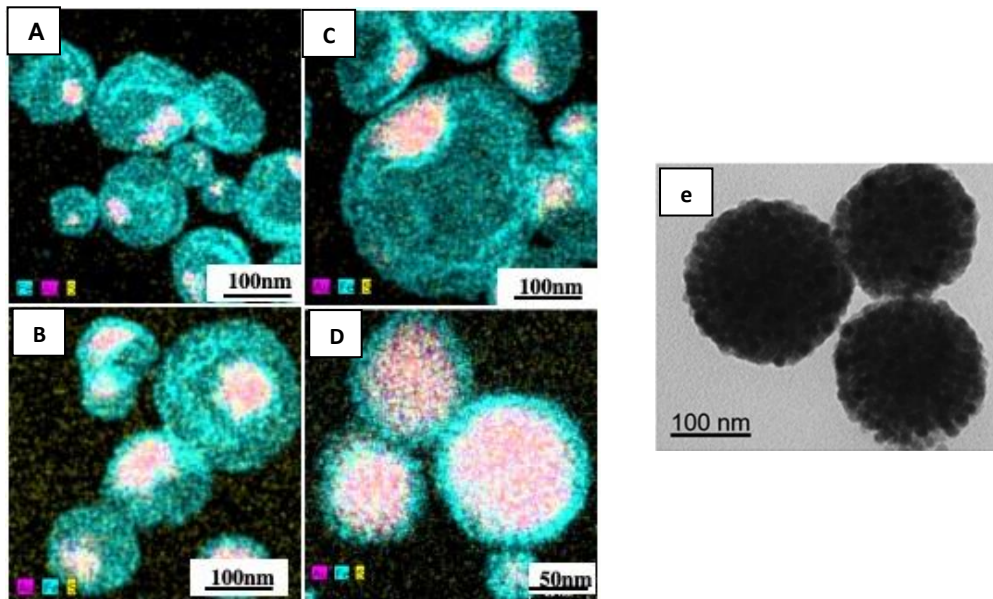


Figure 4.17. Vue d'ensemble STEM-EDS des suprastructures "œufs" de 10nm de Fe_3O_4 ((2mg/ml) et de 5nm d'Or différent par leurs quantités telles que 0,2mg/ml (A), 0,6mg/ml (B), 2mg/ml (C) et 6mg/ml (D) et une image de supraballs (e). Ces images ont été effectuées par Marie-Paule Pileni et son équipe.

4.IV.A. Étude en spectroscopie photoacoustique

La première étude consiste à étudier la réponse optique, et particulièrement l'absorption optique. Les quantités de produits obtenus ne nous ont pas permis d'obtenir les coefficients d'atténuation avec les appareils de spectroscopie UV-Vis disponibles au laboratoire. Comme précédemment, nous utilisons le montage photoacoustique et étudions le spectre PA. Pour cette mesure, une dilution d'un facteur 5 de la solution mère a été effectuée sur chaque échantillon. La température de mesure a été fixée à $25 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$ et l'énergie de l'illumination laser a été fixée à $7.3 \text{ mJ}\cdot\text{cm}^{-2}$ pour une longueur d'onde de 730 nm. La Figure 4.18 montre les différents spectres PA obtenus.

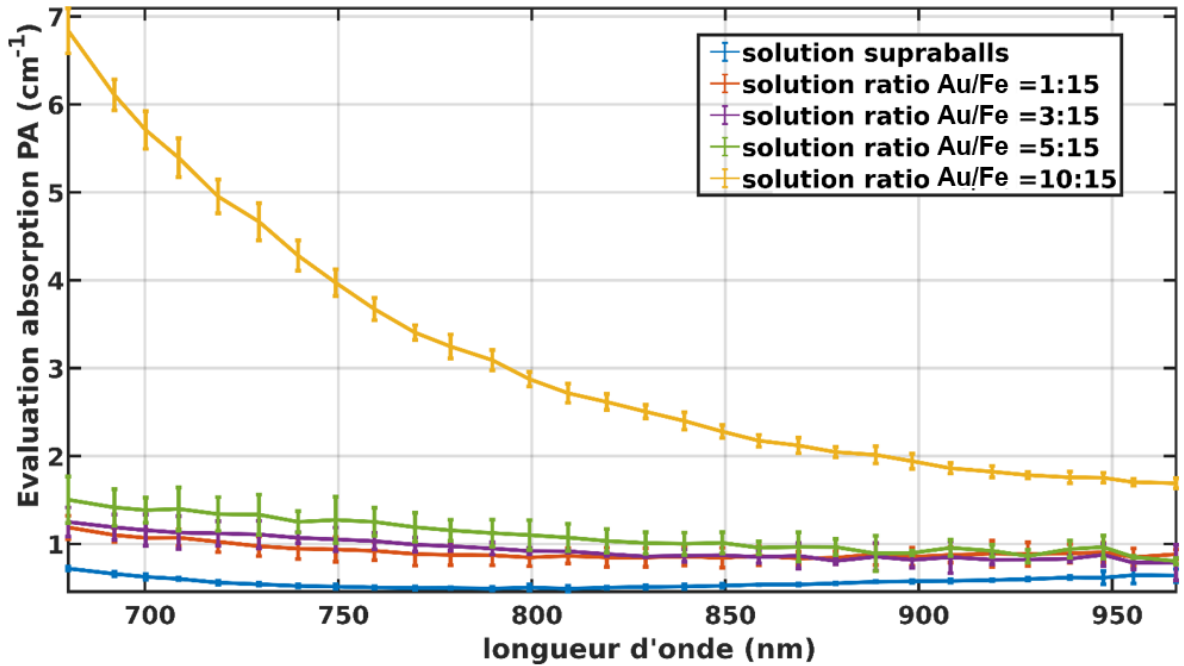


Figure 4.18. Spectre PA des différentes solutions. Pour rester dans la gamme de sensibilité du montage, les solutions mères ont toutes été diluées 5 fois dans de l'eau distillée.

On rappelle que les solutions mesurées ont toutes une concentration en Fe_3O_4 constante. La solution avec un ratio 10 :15 présente un spectre d'absorption très différent des autres échantillons et montre une absorption beaucoup plus importante. Le reste des échantillons présentent des spectres plus similaires entre eux. On remarque cependant l'influence de l'or sur les propriétés optiques. En effet, l'absorption PA des supraballs (sans or) est très largement inférieure à l'absorption PA des suprastructures contenant de l'or. La différence entre l'absorption PA des supraballs et de la solution ratio 1 :15 à 808nm est d'un facteur 1.75. Ces mesures montrent que les noyaux d'or ont une forte influence et renforcent l'absorption optique des suprastructures.

Les spectres sont utilisés pour déterminer les dilutions nécessaires pour obtenir un lot dont les absorptions PA sont homogènes entre elles, c'est-à-dire que l'on sélectionne les concentrations pour que les absorptions PA soient égales à $\mu_{10}^{\text{PA}} = [0,25 \ 0,5 \ 1 \ 2] \text{ cm}^{-1}$.

4.IV.B. Étude Photothermique

L'objectif pour ce type de particules est principalement de les utiliser en tant qu'agents photothermiques, et ce dans le but d'améliorer les réponses thérapeutiques des colloïdes déjà étudiés. Pour cela, nous étudions les solutions à température ambiante des différents échantillons aux concentrations calculés à l'aide de la photoacoustique. Ces mesures sont obtenues avec le montage présenté dans le chapitre précédent en utilisant une puissance laser de 1 W.cm^{-2} , un volume d'échantillon de $200 \ \mu\text{L}$. Elles nous permettent d'étudier l'ensemble des effets thermiques de chaque type d'assemblages de nanoparticules. Dans la même série de mesure, la solution de référence (nigrosine) a été mesurée pour pouvoir comparer l'efficacité photothermique de chaque échantillon. La Figure 4.19 résume les différents résultats obtenus en photothermie, ce qui permet de comparer chaque échantillon

et d'évaluer l'effet de chaque partie de la suprastructure sur la température générée par hyperthermie laser.

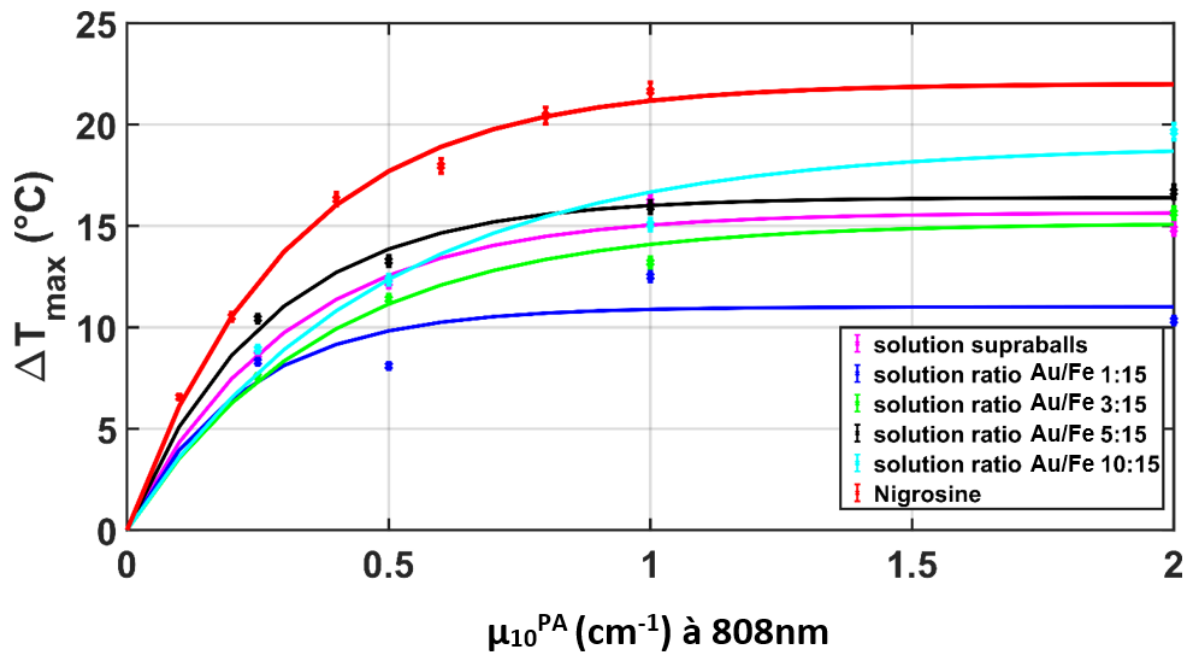


Figure 4.19. Comparaison de l'augmentation de température des différentes structures « en œuf » à différentes concentrations d'assemblage d'or et à plusieurs concentrations de particules avec la solution de calibration.

4.IV.B.a. Influence de la partie ferrite

En observant la forme de l'évolution de la température maximum ΔT_{\max} en fonction de l'absorption PA, on peut constater que l'élévation du ΔT_{\max} suivant le μ_{10}^{PA} suit les lois exponentielles décrites dans le chapitre 1.V.B De plus, on constate que la suprastructure ne produit pas d'échauffement macroscopique particulièrement élevé par rapport à la solution moléculaire de nigrosine (l'élévation de température est même inférieure). Cependant, on remarque que chaque particule présente une réponse thermique et atteint leur température maximale autour d'un coefficient d'absorption PA d'environ 1 cm^{-1} .

4.IV.B.b. Influence de la partie nanocristal d'or

Il est intéressant de constater que pour le ratio 10 :15, l'évolution de la température maximale est légèrement différente de celle des autres suprastructures. La taille du cœur d'or va augmenter suivant la quantité d'or utilisé. Comme pour les préagrégats, cela va influencer sur l'absorption optique et ainsi sur l'élévation de température. En revanche, on remarque que les supraballs obtiennent une réponse thermique équivalente à celle des suprastructures

contenant de l'or. Cependant, la comparaison obtenue Figure 4.19 est en fonction des absorptions PA. La Figure 4.20 montre les mêmes élévations de température maximum mais en fonction de la concentration en ferrite des solutions.

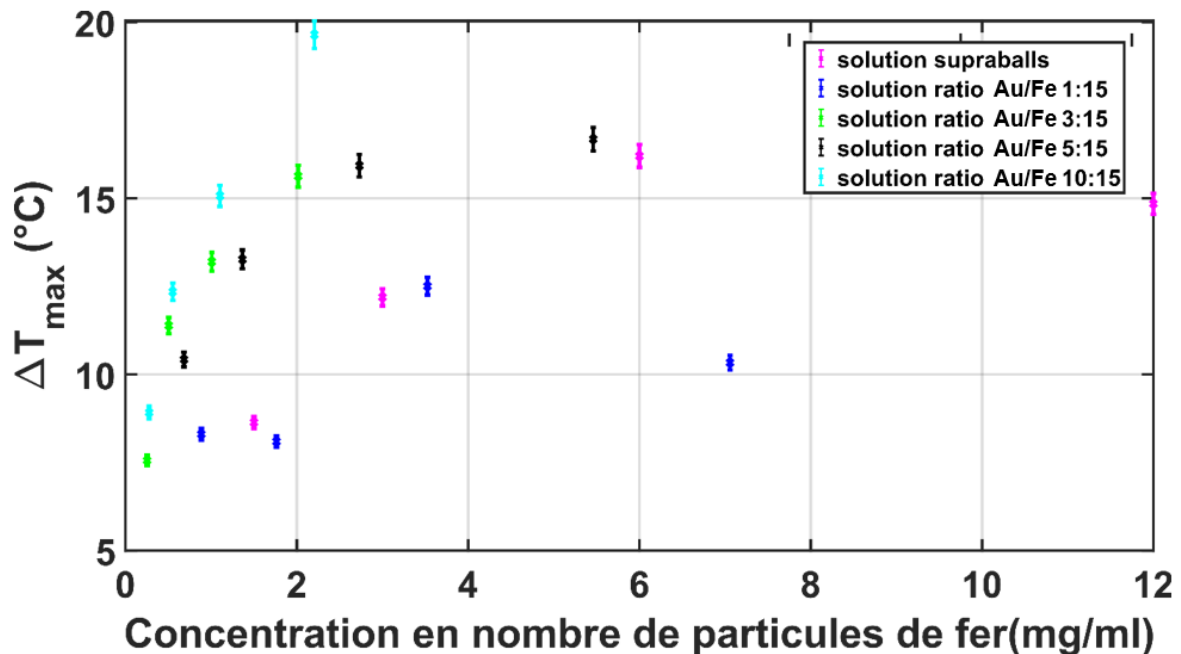


Figure 4.20. ΔT_{max} en fonction de la concentration de fer. Les barres d'erreurs sont calculées suivant les valeurs de l'erreur relative calculée dans le chapitre 3.1.1.E. (équivalent à 2% de la valeur de température)

On remarque que pour la même quantité de chaleur délivrée la concentration de ferrite, hormis pour le rapport 1 :15, est considérablement différente par rapport aux supraballs. Cela montre tout l'intérêt de la partie noyau en nanocristaux d'or.

L'intérêt de l'or permet de diminuer la concentration de particules pour obtenir le même résultat thermique. Comme pour les préagrégats d'or, cela devient très intéressant pour une application *In vivo* car la réduction de la quantité de nanoparticules à injecter pour atteindre le même résultat thermique permet de réduire les effets indésirables liés à une injection de grandes quantités de particules. Les effets indésirables peuvent inclure des réactions immunitaires, des dommages sur des tissus sains, des difficultés à l'élimination des nanoparticules dans le corps et des coûts supplémentaires. En réduisant la quantité de particules injectées, on peut réduire ces effets indésirables.

Dans un second temps, Agnieszka Paściak, une doctorante de l'Institute of Low Temperature and Structure Research, Polish Academy of Sciences, a utilisé son montage qui utilise une gouttelette et présenté dans le Chapitre 1, Partie IV.C. pour mesurer l'efficacité thermique des échantillons à des rapports Au/Fe [3 :15 ; 10 :15]. Cette mesure a permis de calculer le coefficient de conversion de la lumière en chaleur des échantillons. Les caractéristiques du montage incluent une longueur d'onde d'irradiation de 808 nm, générée par une diode laser Changhun New Industries, une puissance d'irradiation de 90 mW, un diamètre de faisceau de 0.23 mm, une longueur optique dans la gouttelette de 2.75 mm, un volume de gouttelette de 13 μ L et l'utilisation de l'eau distillée comme référence. Ces

caractéristiques ont permis une analyse des propriétés thermiques des échantillons et ont contribué à une meilleure compréhension de l'utilisation de ces nanocristaux en tant qu'agents photothermiques. On obtient des iHCE (internal Heat Conversion Efficiency) qui correspondent au coefficient de conversion de la lumière en chaleur de 20.1% et 25.3% pour les échantillons [3 :15 ; 10 :15] respectivement. Malheureusement, cela n'est pas une très bonne efficacité thermique par rapport à d'autres agents photothermiques. En raison d'un manque de quantité de solutions, il n'a pas été possible d'effectuer des spectres UV-visible sur la même série d'échantillons. Par conséquent, les efficacités photothermiques ont été déterminées uniquement à l'aide de la méthode des rapports des ΔT_{max} . De cette méthode découle, un $\eta = 65\%$ et $\eta = 74\%$ pour les échantillons [3 :15 ; 10 :15] respectivement. Malheureusement, cela ne concorde pas avec les résultats d'iHCE.

En conclusion, cette étude a montré l'intérêt de l'utilisation de suprastructures comprenant des nanocristaux de ferrite et des nanocristaux d'or pour les applications en photothermie. Les résultats ont montré que la variation de la quantité d'or à l'intérieur de ces suprastructures permet de modifier les propriétés optiques et thermiques de l'objet, augmentant ainsi l'efficacité thérapeutique. Ainsi, les résultats obtenus montrent qu'une augmentation de la quantité d'or a une forte influence sur les propriétés optiques des suprastructures, augmentant l'absorption optique et la réponse thermique. Bien que les iHCE obtenus (internal Heat Conversion Efficiency) pour les échantillons [3 :15 ; 10 :15] soient de 20.1% et 25.3% respectivement, ce qui n'est pas considéré comme une efficacité thermique élevée par rapport à d'autres agents photothermiques, la possibilité de réduire les effets indésirables liés à une injection de grandes quantités de particules en utilisant des concentrations optimales de particules de ferrite est un avantage important pour une utilisation *in vivo*. Il est important de noter que ces résultats ont été obtenus en utilisant une puissance laser de $1W/cm^2$ et un volume d'échantillon de $200\mu L$ pour chaque échantillon, et il est possible que les résultats puissent varier en utilisant des puissances laser ou des volumes d'échantillon différents. Bien que les effets thermiques macroscopiques des suprastructures ne sont pas remarquables par rapport à d'autres nanoparticules, des effets locaux dans les cellules ont été observés dans une étude précédente avec des particules sans or [43]. L'idée d'ajouter de l'or est d'amplifier la réponse thérapeutique par des effets thermiques. Il serait donc intéressant d'étudier ces objets sur des cellules. Une étude photothermique sur les suprastructures internalisées dans des cellules en monocouche a été initiée. Néanmoins, le réarrangement des nanoparticules à l'intérieur des cellules a été observé. Il y avait une tendance pour la structure de ferrite à se localiser sur les parois des lysosomes, tandis que le cœur d'or tendait à rester groupé. Malheureusement, les conclusions sur la cytotoxicité ne sont pas encore concluantes. En considérant ces résultats, une étude supplémentaire des suprastructures contenant de l'or sur les cellules est nécessaire pour déterminer les conditions optimales pour améliorer leur réponse thérapeutique.

4.V. Étude d'armatures organométalliques (MoFs)

Dans le cadre des microbes multirésistants devenus résistants au traitement en raison de l'utilisation abusive d'agents antibactériens, la thérapie photodynamique (PDT) [45] et la thérapie photothermique (PTT) ont été considérées comme des approches alternatives prometteuses pour remplacer les traitements antimicrobiens traditionnels ou les combiner [46]. Cependant, de nombreux photosensibilisateurs pouvant être utilisés pour ces méthodes montrent une faible efficacité de la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS)[47] ou de la conversion de lumière en chaleur, une faible biodisponibilité c'est-à-dire une vitesse et un passage du principe actif (médicament ou métabolite) trop rapide dans la circulation générale, une faible photostabilité ou une cytotoxicité élevée. Les structures organométalliques (Metal-organic frameworks ou MOFs) sont un groupe de matériaux de coordination cristalline basés sur des cations connectés par des liants organiques terminés par des groupes complexant, qui présentent un potentiel élevé dans le développement de nouveaux agents antimicrobiens, en raison de leurs propriétés uniques telles que la surface ultra-élevée, la taille des pores ajustée, mais constante, la forte stabilité thermique et la synthèse facile. L'équipe de Zhihao Yu et Christian Serre de l'institut des Matériaux poreux de Paris a choisi d'étudier le MOF MIL-100(Fe) à base de fer en raison de sa grande biocompatibilité et d'un espace de stockage important pour encapsuler des médicaments.

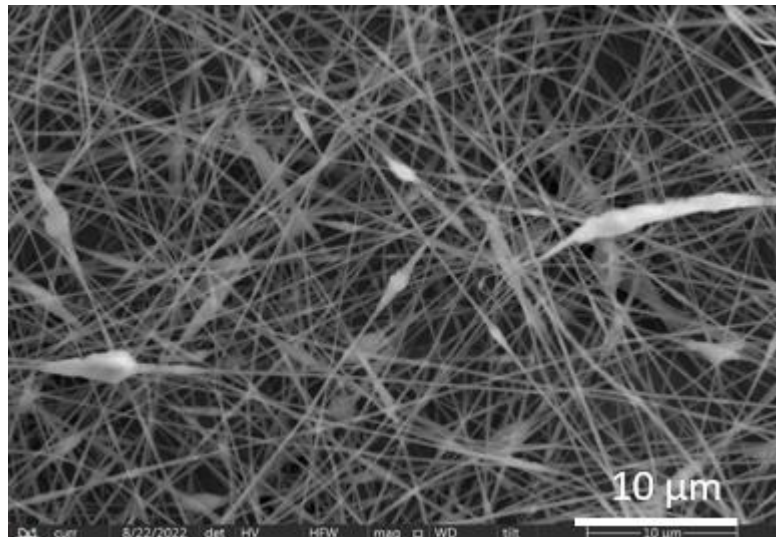


Figure 4.21. Image de Microscopie électronique des MOFs à la concentration de masse d'IR775 en pourcentage 1.95% (taux d'encapsulation du colorant). Ces images ont été effectuées par Zhihao Yu.

Zhihao a synthétisé des nanoparticules MIL-100(Fe) par une procédure verte et simple. Puis chargé d'un colorant IR775 dans MIL-100(Fe) par des voies d'encapsulation post-synthétique pour obtenir une plateforme phototherapeutique, MIL-100(Fe)@IR775. L'évaluation de la capacité de conversion photothermique en solution a montré que MIL-100(Fe)@IR775 permet d'obtenir un effet PTT réutilisable, sans photoblanchiment

contrairement à l'IR775 seul. L'étude PA (Figure 4.22) en solution a également montré que ces composites peuvent devenir des agents de contraste efficaces pour l'imagerie PA, ce qui permettrait le traitement photodynamique ou photothermique par imagerie PA.

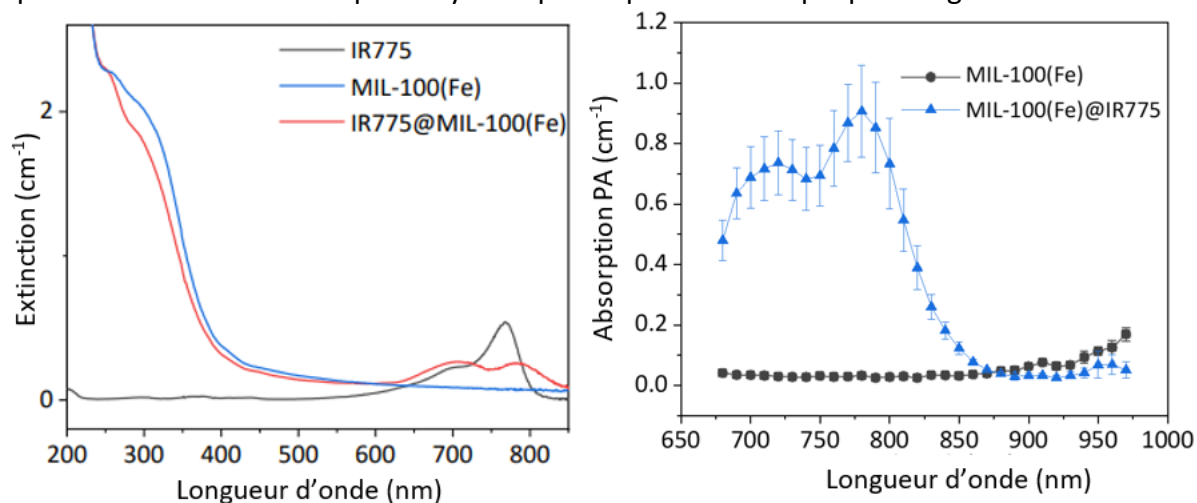


Figure 4.22. Comparaison entre le spectre UV-Visible et les spectres photoacoustiques du MIL-100(Fe) et IR775 seul et de la combinaison MIL-100(Fe)@IR775 : $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$ MIL-100(Fe) + $3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ IR775. Ces mesures ont été effectuées par Zhihao Yu

On observe l'influence du colorant IR775 au niveau du spectre d'atténuation des MOFs. En effet, un pic d'atténuation apparaît à $\sim 760\text{nm}$ pour les MOFs et correspond au pic d'absorption du colorant IR775. Le phénomène est visible sur le spectre d'absorption PA. Le MIL-100(Fe) seul a peu de signaux photoacoustiques de [680 à 960] nm, mais l'ajout de l'autre composant montre un pic d'absorption à 760 nm. Cependant, un spectre similaire à celui du IR775 seul est observé, ce qui indique que la combinaison des deux éléments entraîne une diffusion optique. L'association des deux éléments (IR775 et MIL-100(Fe)) permet de coupler les propriétés optiques du colorant IR775 et les propriétés thermiques et chimiques de nanoparticules (MIL-100(Fe)).

Pour caractériser les propriétés thermiques et évaluer la photostabilité des nanoparticules, une étude photothermique a été réalisée en utilisant les mêmes conditions expérimentales que les études précédentes. Cependant, cette étude a été effectuée en réalisant une succession de cycles de chauffe et de refroidissement (5 cycles) pour s'assurer à la fois de la photostabilité et de la stabilité thermique des particules. Cela permet de déterminer s'il y a une dégradation des nanoparticules sous effet thermique ou optique. Si les nanoparticules sont photostables, cela signifie qu'elles peuvent être utilisées à plusieurs reprises pour des traitements de la thérapie photothermique, augmentant ainsi l'efficacité globale du traitement. Les résultats de cette étude sont présentés dans la Figure 4.23.

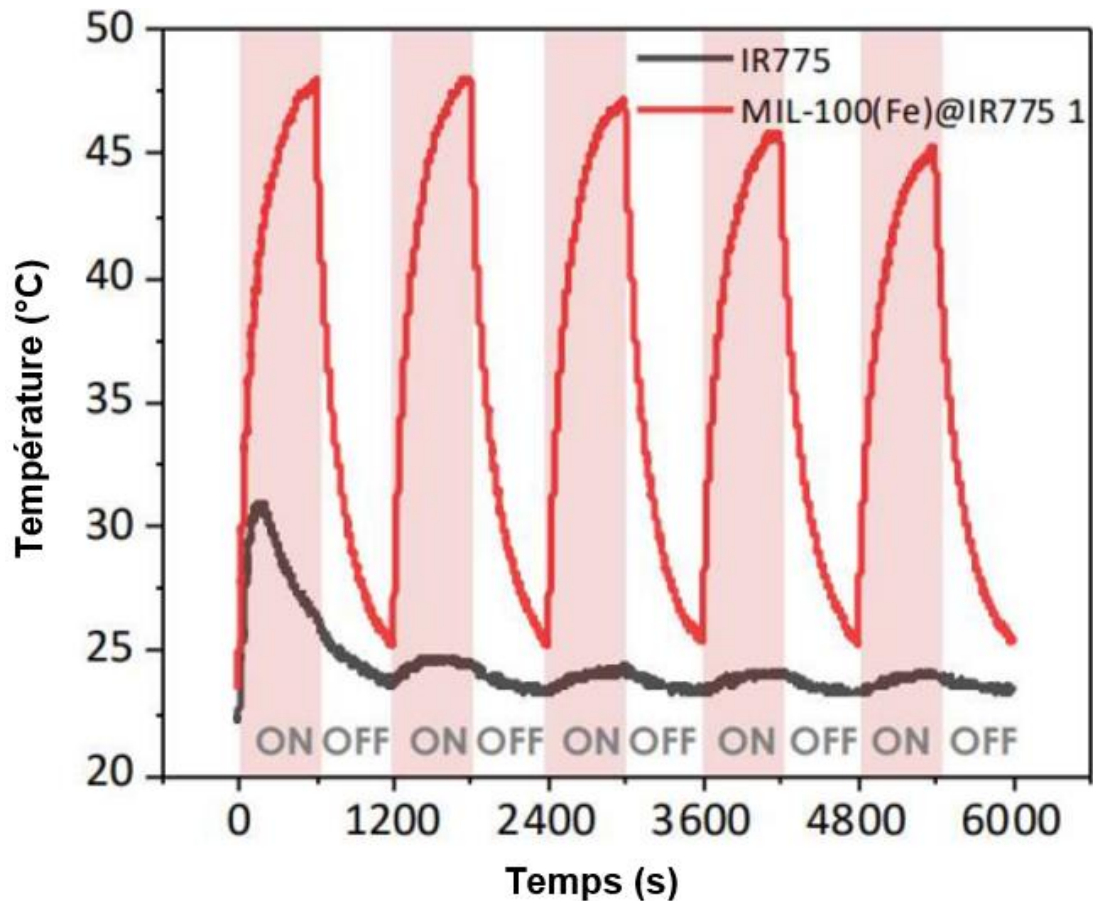


Figure 4.23. Augmentation de température suivant 5 cycles successifs de chauffe et refroidissement.

Les résultats de cette étude montrent que le MIL-100(Fe) @IR775 est plus photostable et plus stable thermiquement que le colorant l'IR775. En effet, alors que l'IR775 a subi une dégradation de sa réponse thermique après le premier cycle, le MIL-100(Fe)@IR775 a quant à lui maintenu des températures similaires sur les 5 cycles. Cela montre l'effet du MIL-100(Fe) qui offre une protection exceptionnelle contre le blanchiment de l'IR775. Ces résultats sont présentés dans la Figure 4.23, où l'on peut voir clairement la différence de température atteinte par les deux échantillons au cours des différents cycles. Ces résultats montrent que le MIL-100(Fe)@ IR775 est une meilleure option que IR775 pour les applications de photothérapie en raison de sa photostabilité, de sa stabilité thermique et de l'amplitude de sa réponse thermique.

4.VI. Conclusion

La photothermie est une technique thérapeutique utilisant généralement des agents photothermiques pour traiter les tumeurs. Le principe est de convertir l'absorption de la lumière par les agents en chaleur. Il apparaît donc que l'absorption optique de la lumière a un lien fort avec la génération de température et ainsi de l'efficacité thérapeutique. Il est donc intéressant d'étudier l'absorption de la lumière pour caractériser des agents potentiels. Pour cette raison, l'imagerie photoacoustique (PA) est un outil précieux pour la caractérisation de ces agents. Les nanoparticules métalliques sont souvent utilisées en tant qu'agents

photothermiques et photoacoustiques en raison de leur forte absorption optique. Dans cette étude, nous avons comparé l'efficacité thermique de nanoparticules ayant des propriétés physico-chimiques variées et des structures différentes.

Nous avons utilisé le montage photoacoustique pour mesurer l'absorption optique des échantillons, déterminer la réponse optique et dans le cas où la mesure d'extinction UV visibles était possible de déterminer l'efficacité photothermique. Nous avons ensuite utilisé le montage photothermique pour mesurer l'élévation de température en fonction du temps, ce qui nous permet de calculer les paramètres intrinsèques et d'estimer les ΔT_{\max} en fonction des absorptions PA et des concentrations. Ces mesures expérimentales sont effectuées avec une puissance laser de $1\text{W}/\text{cm}^2$ et un volume d'échantillon de $200\mu\text{L}$. Les résultats obtenus montrent que les matériaux utilisés ont une forte influence sur les propriétés optiques des nanoparticules, comme le montrent l'étude des suprastructures et la comparaison des coefficients de conversion de lumière en chaleur. De plus, nous avons vu par l'étude des préagregats que la forme ainsi que la structure permettent de changer drastiquement les propriétés thermiques et optiques d'un objet.

La caractérisation d'un agent photothermique est complexe dans la mesure où il est important de noter que les résultats obtenus dépendent des paramètres utilisés dans l'expérience, tels que la puissance laser et le volume d'échantillon. De plus, dans plusieurs cas développés dans ce chapitre, il apparaît que des nanoparticules répondent thermiquement de manière équivalente à une même absorption PA mais la concentration de ces agents pour obtenir cette absorption est un paramètre à prendre en compte pour éviter les effets indésirables liés à une injection de grandes quantités de particules. La possibilité d'obtenir une réponse thermique équivalente avec une concentration de nanoparticules réduite est une caractéristique importante dans la conception d'un nouvel agent. Enfin, nous avons démontré qu'il est complexe d'évaluer le pouvoir thermique d'une nanoparticule et de pouvoir la comparer à une autre en utilisant uniquement les propriétés thermiques. Cela est dû au fait que ces propriétés dépendent fortement des configurations expérimentales, des paramètres et des montages utilisés. Il apparaît donc que la spectroscopie photoacoustique combinée à la spectroscopie UV-Visible est un complément de caractérisation utile pour ce domaine et dont les conditions expérimentales sont plus faciles à contrôler. La mesure PA est cependant une mesure indirecte qui se déroule dans des conditions d'illumination transitoire et dont les mesures peuvent dépendre d'autres paramètres comme le coefficient de Grüneisen.

Bibliographie :

- [1] Conjusteau A, Ermilov SA, Lapotko D, Liao H, Hafner J, Eghtedari M, et al. Metallic nanoparticles as optoacoustic contrast agents for medical imaging. *Photons Plus Ultrasound Imaging Sens. 2006 Seventh Conf. Biomed. Thermoacoustics Optoacoust. Acousto-Opt.*, vol. 6086, SPIE; 2006, p. 155–63.
- [2] Agarwal A, Huang SW, O'donnell M, Day KC, Day M, Kotov N, et al. Targeted gold nanorod contrast agent for prostate cancer detection by photoacoustic imaging. *J Appl Phys* 2007;102:064701.
- [3] Kang MS, Lee SY, Kim KS, Han D-W. State of the art biocompatible gold nanoparticles for cancer theragnosis. *Pharmaceutics* 2020;12:701.
- [4] Myroshnychenko V, Rodríguez-Fernández J, Pastoriza-Santos I, Funston AM, Novo C, Mulvaney P, et al. Modelling the optical response of gold nanoparticles. *Chem Soc Rev* 2008;37:1792–805.
- [5] Jain PK, Lee KS, El-Sayed IH, El-Sayed MA. Calculated absorption and scattering properties of gold nanoparticles of different size, shape, and composition: applications in biological imaging and biomedicine. *J Phys Chem B* 2006;110:7238–48.
- [6] Hua Y, Chandra K, Dam DHM, Wiederrecht GP, Odom TW. Shape-dependent nonlinear optical properties of anisotropic gold nanoparticles. *J Phys Chem Lett* 2015;6:4904–8.
- [7] Cole JR, Mirin NA, Knight MW, Goodrich GP, Halas NJ. Photothermal efficiencies of nanoshells and nanorods for clinical therapeutic applications. *J Phys Chem C* 2009;113:12090–4.
- [8] Meyer SM, Pettine J, Nesbitt DJ, Murphy CJ. Size Effects in Gold Nanorod Light-to-Heat Conversion under Femtosecond Illumination. *J Phys Chem C* 2021;125:16268–78.
- [9] Richardson HH, Carlson MT, Tandler PJ, Hernandez P, Govorov AO. Experimental and theoretical studies of light-to-heat conversion and collective heating effects in metal nanoparticle solutions. *Nano Lett* 2009;9:1139–46.
- [10] Liu B-J, Lin K-Q, Hu S, Wang X, Lei Z-C, Lin H-X, et al. Extraction of absorption and scattering contribution of metallic nanoparticles toward rational synthesis and application. *Anal Chem* 2015;87:1058–65.
- [11] Roper DK, Ahn W, Hoepfner M. Microscale heat transfer transduced by surface plasmon resonant gold nanoparticles. *J Phys Chem C* 2007;111:3636–41.
- [12] Almada M, Leal-Martínez BH, Hassan N, Kogan MJ, Burboa MG, Topete A, et al. Photothermal conversion efficiency and cytotoxic effect of gold nanorods stabilized with chitosan, alginate and poly (vinyl alcohol). *Mater Sci Eng C* 2017;77:583–93.
- [13] Cole JR, Mirin NA, Knight MW, Goodrich GP, Halas NJ. Photothermal efficiencies of nanoshells and nanorods for clinical therapeutic applications. *J Phys Chem C* 2009;113:12090–4.
- [14] Qin Z, Wang Y, Randrianalisoa J, Raeesi V, Chan WC, Lipiński W, et al. Quantitative comparison of photothermal heat generation between gold nanospheres and nanorods. *Sci Rep* 2016;6:1–13.
- [15] Jiang K, Smith DA, Pinchuk A. Size-dependent photothermal conversion efficiencies of plasmonically heated gold nanoparticles. *J Phys Chem C* 2013;117:27073–80.
- [16] Meyer SM, Pettine J, Nesbitt DJ, Murphy CJ. Size Effects in Gold Nanorod Light-to-Heat Conversion under Femtosecond Illumination. *J Phys Chem C* 2021;125:16268–78.
- [17] Riley RS, Day ES. Gold nanoparticle-mediated photothermal therapy: applications and opportunities for multimodal cancer treatment. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* 2017;9:e1449.

- [18] Hwang S, Nam J, Jung S, Song J, Doh H, Kim S. Gold nanoparticle-mediated photothermal therapy: current status and future perspective. *Nanomed* 2014;9:2003–22.
- [19] Norouzi H, Khoshgard K, Akbarzadeh F. In vitro outlook of gold nanoparticles in photothermal therapy: a literature review. *Lasers Med Sci* 2018;33:917–26.
- [20] Pakravan A, Salehi R, Mahkam M. Comparison study on the effect of gold nanoparticles shape in the forms of star, hallow, cage, rods, and Si-Au and Fe-Au core-shell on photothermal cancer treatment. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2021;33:102144.
- [21] Zhang Y, Li P, Su R, Wen F, Jia Z, Lv Y, et al. Curcumin-loaded multifunctional chitosan gold nanoparticles: An enhanced PDT/PTT dual-modal phototherapeutic and pH-responsive antimicrobial agent. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2022;39:103011.
- [22] Jang B, Park J-Y, Tung C-H, Kim I-H, Choi Y. Gold nanorod- photosensitizer complex for near-infrared fluorescence imaging and photodynamic/photothermal therapy in vivo. *ACS Nano* 2011;5:1086–94.
- [23] Riley RS, Day ES. Gold nanoparticle-mediated photothermal therapy: applications and opportunities for multimodal cancer treatment. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* 2017;9:e1449.
- [24] Chen J, Ma Y, Du W, Dai T, Wang Y, Jiang W, et al. Furin-instructed intracellular gold nanoparticle aggregation for tumor photothermal therapy. *Adv Funct Mater* 2020;30:2001566.
- [25] Espinosa A, Kolosnjaj-Tabi J, Abou-Hassan A, Plan Sangnier A, Curcio A, Silva AK, et al. Magnetic (hyper) thermia or photothermia? Progressive comparison of iron oxide and gold nanoparticles heating in water, in cells, and in vivo. *Adv Funct Mater* 2018;28:1803660.
- [26] Espinosa A, Silva AK, Sánchez-Iglesias A, Grzelczak M, Péchoux C, Desboeufs K, et al. Cancer cell internalization of gold nanostars impacts their photothermal efficiency in vitro and in vivo: toward a plasmonic thermal fingerprint in tumoral environment. *Adv Healthc Mater* 2016;5:1040–8.
- [27] Li N, Zhao P, Astruc D. Anisotropic gold nanoparticles: synthesis, properties, applications, and toxicity. *Angew Chem Int Ed* 2014;53:1756–89.
- [28] Chen X, Li T, Shen J, Hu Z. Fractal design of microfluidics and nanofluidics—A review. *Chemom Intell Lab Syst* 2016;155:19–25.
- [29] Caumont-Prim C. Détermination de la distribution de taille des nanoparticules de suie par analyse du spectre d’extinction et de diffusion angulaire de la lumière. PhD Thesis. INSA de Rouen, 2013.
- [30] Kiriy A, Gorodyska G, Minko S, Jaeger W, Štěpánek P, Stamm M. Cascade of coil-globule conformational transitions of single flexible polyelectrolyte molecules in poor solvent. *J Am Chem Soc* 2002;124:13454–62.
- [31] Sun L, Zhao D, Ding M, Xu Z, Zhang Z, Li B, et al. Controllable synthesis of silver nanoparticle aggregates for surface-enhanced Raman scattering studies. *J Phys Chem C* 2011;115:16295–304.
- [32] Fraire JC, Pérez LA, Coronado EA. Rational design of plasmonic nanostructures for biomolecular detection: interplay between theory and experiments. *ACS Nano* 2012;6:3441–52.
- [33] Kim K, Lee HB, Lee JW, Park HK, Shin KS. Self-assembly of poly (ethylenimine)-capped Au nanoparticles at a toluene- water interface for efficient surface-enhanced Raman scattering. *Langmuir* 2008;24:7178–83.

- [34] Sun L, Zhao D, Ding M, Xu Z, Zhang Z, Li B, et al. Controllable synthesis of silver nanoparticle aggregates for surface-enhanced Raman scattering studies. *J Phys Chem C* 2011;115:16295–304.
- [35] Park JS, Yoon JH, Yoon S. Spatially Controlled SERS Patterning Using Photoinduced Disassembly of Gelated Gold Nanoparticle Aggregates. *Langmuir* 2010;26:17808–11.
- [36] Yun S, Park Y-K, Kim SK, Park S. Linker-molecule-free gold nanorod layer-by-layer films for surface-enhanced Raman scattering. *Anal Chem* 2007;79:8584–9.
- [37] Taylor RW, Lee T-C, Scherman OA, Esteban R, Aizpurua J, Huang FM, et al. Precise subnanometer plasmonic junctions for SERS within gold nanoparticle assemblies using cucurbit [n] uril “glue.” *ACS Nano* 2011;5:3878–87.
- [38] Lin Z-H, Chang H-T. Preparation of gold- tellurium hybrid nanomaterials for surface-enhanced raman spectroscopy. *Langmuir* 2008;24:365–7.
- [39] Wang D-Y, Teng T-S, Wu Y-C, Lee Y-C, Chen K-H, Chen C-H, et al. Silver-nanoparticle-conjugated polypeptide brushes for surface-enhanced raman scattering. *J Phys Chem C* 2009;113:13498–504.
- [40] Dragovic RA, Gardiner C, Brooks AS, Tannetta DS, Ferguson DJ, Hole P, et al. Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med* 2011;7:780–8.
- [41] Xiao Y, Pandey K, Nicolás-Boluda A, Onidas D, Nizard P, Carn F, et al. Synergic Thermo- and pH-Sensitive Hybrid Microgels Loaded with Fluorescent Dyes and Ultrasmall Gold Nanoparticles for Photoacoustic Imaging and Photothermal Therapy. *ACS Appl Mater Interfaces* 2022.
- [42] Chen Q, Liu X, Chen J, Zeng J, Cheng Z, Liu Z. A Self-Assembled Albumin-Based Nanoprobe for In Vivo Ratiometric Photoacoustic pH Imaging. *Adv Mater* 2015;27:6820–7. <https://doi.org/10.1002/adma.201503194>.
- [43] Nicolas-Boluda A, Yang Z, Guilbert T, Fouassier L, Carn F, Gazeau F, et al. Self-Assemblies of Fe₃O₄ Nanocrystals: Toward Nanoscale Precision of Photothermal Effects in the Tumor Microenvironment. *Adv Funct Mater* 2021;31:2006824.
- [44] Dobryden I, Yang Z, Claesson PM, Pileni MP. Water Dispersive Suprastructures: An Organizational Impact on Nanomechanical Properties. *Adv Mater Interfaces* 2021;8:2001687.
- [45] Allison RR, Moghissi K. Photodynamic therapy (PDT): PDT mechanisms. *Clin Endosc* 2013;46:24–9.
- [46] Liu W, Gu H, Liu W, Lv C, Du J, Fan J, et al. NIR-emitting carbon dots for discriminative imaging and photo-inactivation of pathogenic bacteria. *Chem Eng J* 2022:137384.
- [47] Zhou Z, Song J, Nie L, Chen X. Reactive oxygen species generating systems meeting challenges of photodynamic cancer therapy. *Chem Soc Rev* 2016;45:6597–626.

Chapitre 5 : Vers l'In Vivo

Dans les chapitres précédents, nous avons examiné les moyens de caractériser les agents de photothérapie in vitro par spectroscopie photoacoustique et étudié l'échauffement de nanoparticules en solution. Pour utiliser efficacement la PTT in vivo, plusieurs étapes doivent être prises en considération. La première consiste à vérifier l'efficacité des APT choisis en culture cellulaire illuminée. Ce travail a été initié et un montage d'illumination de cellule en monocouche a été conçu. Ce montage a pour but d'étudier les effets de températures sur la cytotoxicité sur des cellules cancéreuses. L'utilisation de monocouche permet d'avoir une illumination homogène. En utilisant l'illumination monocouche des nanoparticules internalisées dans des cellules cancéreuses, nous sommes en mesure d'étudier la mort cellulaire par apoptose et nécrose en réponse à l'augmentation de température causée par l'illumination laser. Cela nous permet de faire le lien entre l'augmentation de température et les effets thérapeutiques de la photothérapie. Nous pouvons également étudier les effets de différentes intensités d'illumination laser et de différents temps d'exposition pour optimiser les conditions d'utilisation. Cette étape de caractérisation nous permettra de comprendre les mécanismes de la photothérapie et de déterminer les agents les plus prometteurs pour une utilisation clinique. Cette partie a été travaillée en collaboration avec d'autres membres du MSC et est en cours de développement. Étant donné que les résultats ne sont pas suffisamment avancés, elle ne sera pas développée davantage dans cette thèse.

L'autre défi est d'évaluer la distribution spatiale des APT dans les tissus pour évaluer le potentiel de réussite d'un traitement PTT. C'est dans ce contexte que l'on a développé un montage tomographique 3D d'imagerie ultrasonore utilisant une sonde linéaire clinique et développé pour un ajout de l'imagerie 3D photoacoustique ce qui en ferait un montage bimodal.

L'imagerie 2D est la forme la plus courante d'imagerie médicale ultrasonore et photoacoustique, elle permet de visualiser les organes internes et les tumeurs sous forme de coupes bidimensionnelles. Cependant, cette visualisation bidimensionnelle peut être limitante pour évaluer la propagation de la maladie et l'efficacité d'un traitement. En effet, l'absence de la 3^{ème} dimension a pour conséquence une perte d'information sur les positions spatiales entre les structures anatomiques, la profondeur et la distance par rapport à l'observateur, ce qui peut entraîner des erreurs d'évaluation. L'imagerie 3D offre donc un avantage supplémentaire en permettant une visualisation complète de la structure anatomique des organes et des tumeurs dans les trois dimensions, facilitant ainsi l'évaluation de la propagation de la maladie, l'efficacité d'un traitement ou un suivi de nanoparticules. Elle permet également de visualiser les organes internes et les tumeurs sous différents angles, de créer des coupes fines et des reconstructions en 3D, ainsi que de visualiser les dimensions et les volumes des organes et des tumeurs de manière plus précise.

L'imagerie ultrasonore (US) est une technique d'imagerie médicale non invasive qui utilise les ondes ultrasonores pour produire des images des structures internes du corps. Elle présente des avantages tels que l'absence de rayonnement ionisant, un faible coût, une portabilité et une flexibilité dans les applications[1]. Cependant, elle présente également des limites, comme la difficulté à visualiser les structures profondes ou le contraste de l'image. En utilisant des techniques d'échographie 3D[2], il est possible de surmonter certaines des limites

de la 2D en obtenant une visualisation tridimensionnelle des structures internes, une cartographie plus précise des tissus hétérogènes et un meilleur suivi des changements dans le temps. Cela permet une meilleure évaluation de la morphologie et de la fonction des organes, ainsi qu'une amélioration de la précision du diagnostic car moins dépendant de l'utilisateur par rapport à la 2D par le choix de la prise de vue.

L'utilisation de la bimodalité de l'imagerie photoacoustique (PA) et ultrasonore (US) pourrait permettre d'obtenir une visualisation détaillée de la répartition spatiale des nanoparticules dans les tissus biologiques, ainsi qu'une évaluation de leur absorption optique. Les agents PA peuvent être utilisés conjointement avec la PTT pour améliorer l'efficacité de la thérapie. La combinaison de l'US pour la visualisation anatomique et de la PA pour la répartition spatiale des nanoparticules et leurs efficacité photothermique. En utilisant une imagerie 3D pour les deux techniques, il serait possible de suivre temporellement l'accumulation de nanoparticules dans les tumeurs. Il serait également possible de mieux comprendre la distribution spatiale des nanoparticules dans les tissus biologiques tout en suivant leurs caractéristiques optiques, ce qui est crucial pour une utilisation optimale en PTT. Sachant que les stratégies d'instrumentation étudiées pour imager les volumes comprennent des matrices de transducteurs qui offrent des taux d'acquisition de données élevés, mais qui, en raison de leurs petits éléments, ont une ouverture et une sensibilité limitées. L'empilement d'images obtenus par balayages avec un réseau 1D permet d'utiliser une technologie de transducteur plus mature et plus sensible que pour les matrices 3D, bien que dans la direction de l'élévation de la translation du transducteur, la résolution soit faible. Afin d'améliorer la qualité et la résolution des images pour le balayage volumétrique, nous avons développé une approche d'ouverture synthétique basée sur un schéma tomographique innovant : le balayage rapide en translation-rotation d'un réseau linéaire ultrasonore dans la direction de l'élévation.

Ce montage composé de deux platines motorisées de haute précision (Physik Instrumente) combine un mouvement de translation (plage = 30 mm) pour couvrir la région imagée et un mouvement de rotation pour capturer des vues multiples. Un réseau linéaire de 5 MHz (L7-4) piloté par un système Vantage à 64 canaux (Verasonics) a été utilisé pour réaliser les acquisitions par ondes planes. La reconstruction de l'image a été effectuée à partir de tous les signaux en utilisant un algorithme de retard et de somme. Une plage de rotation de 90° permet d'accéder à l'échantillon d'un seul côté. Cette approche d'ouverture synthétique permet d'imager un volume de 30x19x30 mm³ (xyz) correspondant à 552 positions tomographiques en 20 s (limité par la vitesse du moteur). Une résolution 3D de 371x756x401 μm³ avec une déviation <10% a été mesurée à l'aide de billes de 200 μm. L'étude montre que par rapport à un balayage en translation uniquement, l'approche par ouverture synthétique a amélioré la résolution le long de l'axe x par un facteur de 3,6.

La haute qualité de l'image et la rapidité des acquisitions ouvrent des perspectives pour les études longitudinales précliniques et cliniques. Comme notre méthode est adaptable à une large gamme de réseaux 1D, y compris ceux à haute fréquence, et qu'elle est transposable à la tomographie photoacoustique. Un montage bimodale échographique et PA a été développé au laboratoire suite à ce montage ultrasonore [3]. Ce montage peut offrir de nombreux avantages pour l'évaluation des nanoparticules utilisées en photothérapie ou en photoacoustique. Il permet une visualisation détaillée de la répartition spatiale des nanoparticules dans les tissus biologiques, ainsi qu'une évaluation de leur absorption optique. L'apport de l'imagerie 3D permet également de suivre temporellement l'accumulation de

nanoparticules et de mieux comprendre leur distribution spatiale dans les tissus biologiques ou dans des tumeurs tout en suivant les caractéristiques optiques de ces dernières. Il pourra donc être utilisé pour améliorer l'efficacité de la thérapie en permettant un meilleur ciblage des tumeurs et une adaptation de la dose de la thérapie en fonction de l'accumulation des nanoparticules.

Bibliographie :

- [1] Cootney RW. Ultrasound imaging: principles and applications in rodent research. *Ilar J* 2001;42:233–47.
- [2] Huang Q, Zeng Z. A review on real-time 3D ultrasound imaging technology. *BioMed Res Int* 2017;2017.
- [3] Linger C, Atlas Y, Winter R, Vandebrouck M, Faure M, Lucas T, et al. Volumetric and Simultaneous Photoacoustic and Ultrasound Imaging with a Conventional Linear Array in a Multiview Scanning Scheme. *ArXiv Prepr ArXiv230100706* 2023.

High contrast and resolution 3-D ultrasonography with a clinical linear transducer array scanned in a rotate-translate geometry.

Théotim Lucas¹, Isabelle Quidu^{2,3}, S. Lori Bridal¹ and Jerome Gateau^{1,*}

¹ Sorbonne Université, CNRS, INSERM, Laboratoire d'Imagerie biomédicale, LIB, F-75006, Paris, France; theotim.lucas@sorbonne-universite.fr (T.L.); lori.bridal@sorbonne-universite.fr (S.L.B.)

² CNRS, Lab STICC, ENSTA Bretagne, F-29806 Brest, France; isabelle.quidu@ensta-bretagne.fr

³ Université de Bretagne Occidentale, F-29238 Brest, France

* Correspondence: jerome.gateau@sorbonne-universite.fr; Tel.: +33-144272265

Received: date; Accepted: date; Published: date

Featured Application: This single-side access 3-D synthetic-aperture scanning method can be readily applied with existing 1-D transducer arrays to more reliably monitor response of lesions over the course of therapy.

Abstract: We propose a novel solution for volumetric ultrasound imaging using single-side access 3-D synthetic-aperture scanning of a clinical linear array. This solution is based on an advanced scanning geometry and a software-based ultrasound platform. The rotate-translate scanning scheme increases the elevation angular aperture by pivoting the array $[-45^\circ$ to $45^\circ]$ around its array axis (axis along the row of its elements) and then, scans the imaged object for each pivoted angle by translating the array perpendicularly to the rotation axis. A theoretical basis is presented so that the angular and translational scan sampling periods can be best adjusted for any linear transducer array. We experimentally implemented scanning with a 5-MHz array. *In vitro* characterization was performed with phantoms designed to test resolution and contrast. Spatial resolution assessed based on the full-width half-maximum of images from isolated microspheres was increased by a factor 3 along the translational direction from a simple translation scan of the array. Moreover, the resolution is uniform over a cross-sectional area of 4.5 cm^2 . Angular sampling periods were optimized and tapered to decrease the scan duration while maintaining image contrast (contrast at the center of a 5 mm cyst on the order of -26 dB for 4° angular period and a scan duration of 10 s for a 9 cm^3 volume). We demonstrate that superior 3-D US imaging can be obtained with a clinical array using our scanning strategy. This technique offers a promising and flexible alternative to development of costly matrix arrays toward the development of sensitive volumetric ultrasonography.

Keywords: volumetric imaging; ultrasonography; synthetic aperture; tomographic scan; linear array; spatial sampling

1. Introduction

Three-dimensional (3-D) ultrasound (US) imaging is increasingly prevalent in biomedical imaging [1]. Compared to conventional 2-D images, volumetric US display provides a detailed view of

anatomical structures at various orientations. Thereby, visualisation of structures and the associated measurements are less dependent on the skill and experience of the sonographer and measurements can be more readily and independently repeated on the same data-set by other radiologists [2]. Additionally, volumetric US imaging facilitates fusion with images from other modalities for improved diagnosis or therapy planning. Furthermore, for longitudinal studies or for the monitoring of the progression or regression of pathology in response to therapy, 3-D US display facilitates the comparison of structures examined at different time points or by different practitioners.

Most current approaches developed to produce 3-D US images are based on volumetric reconstruction after acquiring successive 2-D images with an ultrasound 1-D array at different spatial positions and/or orientations [2]. For example, a 3-D ultrasound image of a fetus can be obtained using a mechanically-wobbled linear array [3]. After acquisition of a series of 2-D images, the volume is reconstructed from the 2-D envelope-detected images positioned in a 3-D volume using specific spatial transformations [4]. These transformations can be retrieved during free-hand scanning with position sensing [5,6], free-hand scanning without position sensing or mechanical scanning with a predefined motion [2]. Since these approaches use 2-D, envelope-detected images to produce a volumetric display, they can be implemented as external post-acquisition processes using images acquired with a conventional ultrasound machine. When a voxel has been viewed with different orientations of the array, incoherent spatial compounding can be applied to improve image quality [7]. However, the use of envelope-detected images limits the gain in terms of contrast or spatial resolution compared to what could be expected from coherent compounding [8]. To obtain the greater advantages provided by coherent compounding, ultrasound signals or images must be accessed prior to envelope detection.

At the cutting edge of ultrasound technology, planar arrays combined with programmable and fast acquisition electronics are emerging to achieve volumetric imaging rates in the kHz range. A variety of transducer spatial arrangements are proposed including row-column arrays [9], matrix [10,11] and sunflower [12] arrays. The ultrasound beam is electronically controlled and received signals are combined with coherent compounding. Synthetic aperture imaging [13,14], which consists in sequentially emitting and/or receiving with different array-element subsets, can be used when the number of array elements is larger than the number of transmit/receive channels. Planar array technology has attracted a lot of attention because it enables high-rate imaging of whole volumes and thereby enables advanced imaging modes throughout the volumes such as elastography [11], ultrafast Doppler [15] and super-resolution ultrasound imaging [16]. However, the technology is expensive since transducer planar arrays are still prototyping and a large channel count may be needed to probe the array aperture at a high rate. Additionally, the development of small but highly sensitive transducer elements that can be arranged in an array to cover a significant planar aperture with good spatial sampling is a complex technological challenge. Currently, planar arrays providing small elements and good spatial sampling sacrifice sensitivity and an overall aperture extent. Planar arrays with better sensitivity typically use larger elements at the expense of an element directivity (limiting the effective aperture) and degraded spatial sampling. Therefore, volumetric image quality with this technology has yet to rival that provided with 2-D array transducers.

Three-dimensional synthetic-aperture scanning provides an intermediate solution between the incoherent compounding of 2-D single-plane images and volumetric imaging with planar arrays. It consists in a mechanical scan of a transducer using a system providing access to the data prior to envelope detection, followed by coherent compounding of the signals acquired at different scan positions to synthesize a larger aperture during the volumetric image reconstruction process. The method has been developed for simple scanning geometries of clinical ultrasound arrays designed for 2-D imaging using: translation in the out-of-plane dimension [17], rotation around the median axis of the image [18] and a rocking motion [19]. The method advantageously uses already-developed transducer arrays that are technologically mature and highly sensitive, and facilitate the extension of methods to the clinical setting. The time required for mechanical displacements prohibits high-rate scanning of the volume, but the method provides higher image quality than the previously mentioned approaches because coherent compounding can be coupled with a high number of ultrasound signals recorded with very sensitive transducer elements. To date, 3-D synthetic aperture scanning has only been investigated in proof-of concept studies [17–19]. It has not yet been developed within a 3-D ultrasound scanner. One reason may be the relatively limited enhancement in spatial resolution that has

been obtained with the simple scanning geometries that have been investigated thus far. Furthermore, ultrasound platforms that provide access to the raw channel or radiofrequency ultrasound data that is required for synthetic aperture scanning have only recently become widely available. Now is the time to reconsider 3-D synthetic aperture scanning with more advanced scanning geometries for applications that require high image quality but modest volume-scanning rates such as monitoring of a lesion's progression therapeutic response.

In this paper, we investigate the performance of a 3-D synthetic-aperture scanning scheme with a complex scanning geometry based on a rotate-translate scan with a linear ultrasound array. With the combined and predefined motions, a planar surface above the imaged volume is sequentially and efficiently populated with transducers having different spatial positions (array element and translated position) and orientations (angle of rotation about the normal to the surface). This combination of orientations provides a larger synthetic angular aperture in the elevation direction of the array, and thereby improves the resolution and contrast along the elevational axis. The proposed rotate-translate scanning approach was inspired from a scheme previously developed for photoacoustic (PA) tomography [20]. PA tomography is a hybrid imaging modality in which the ultrasound wavefield generated by laser excitation of optical absorbers is captured by transducer elements used only as detectors. The experimental implementation of the scanning scheme in this ultrasonic reception-only configuration resulted in high quality 3-D PA images. In the present study, we demonstrate for the first time the applicability of a rotate-translate scanning scheme for pulse-echo US volumetric imaging and we show experimentally that higher and more uniform 3-D resolution can be obtained than for existing synthetic aperture approaches. The original scheme proposed for photoacoustic imaging was limited due to the long scan duration. Herein, the scanning parameters have been optimized through theoretical considerations and experimental implementation to dramatically reduce the number of scanning positions and thereby the acquisition time while maintaining high contrast and uniform spatial resolution. In particular, we studied the influence of the rotation step on the spatial resolution and image contrast. The system was characterized *in vitro* with imaging phantoms and the performance was compared to synthetic aperture scanning with a translation-only scan to highlight the superior image quality of this new, more complex scanning scheme.

2. Materials and Methods

2.1. Presentation of the scanning scheme

The rotate-translate scanning scheme is diagrammed in 2-D (in the axial-elevation plane) for one element of the linear US array (**Figure 1**). The extension to 3-D is direct when the lateral dimension of the array (i.e. axis along the row of active array elements) is taken into account. We consider here a linear array with a cylindrical lens, which is typical of clinical linear US arrays for 2-D ultrasonography. The focusing power of the lens is usually weak which ensures a large depth-of-field but a relatively poor elevation resolution. These depth-of-field and resolution performances are directly linked to the small angular aperture 2β of the element or large f-number $= F/D$ (**Figure 1** (a)) in the elevation direction. F and D are the focal distance and the width of the array element, respectively. To benefit from the large depth-of-field but with a significant improvement in the elevation spatial resolution, we developed a synthetic aperture approach. The synthesis of the aperture increases the angular aperture for each array element over an extended imaged area thanks to a rotate-translate scanning scheme. The rotation increases the angular aperture and the 1-D translation ensures coverage of the imaged zone.

To obtain a single-side access, the rotation axis was set to pass through the center of the transducer face O_a (**Figure 1** (a)) and to be perpendicular to the axial direction of the transducer (w -axis) [20]. This axial direction is named transducer axis. The translation axis is perpendicular to both the rotation axis and the transducer axis when the rotation angle α_{rot} equals zero (**Figure 1** (b)). Translation across the imaged area is performed at a constant angle α_{rot} , and then repeated for different angles of rotation (**Figure 1** (c)). All the translation scans have the same length L . To benefit from the full depth-of-field around the focus, the imaged area is centered on the focal distance F in the e_z -direction (**Figure 1** (c)). As a consequence, the translational scan at each angle, α_{rot} , is centered on the point $l_{trans\ center}(\alpha_{rot}) = -F \tan(\alpha_{rot})$ in the e_x -direction (**Figure 1** (c)). To have a constant step Δl between successive translational positions of the transducer axis, the translational scan at α_{rot} is divided into tomographic positions separated by $\Delta l / \cos(\alpha_{rot})$.

The ultrasound pulse-echo signals are recorded for each tomographic position of the transducer element. In this configuration and with an adapted Δl (see section 2.2), each point of the imaged area is probed with all the different orientations of the transducer. Therefore, for each pixel of the sampled area, the ultrasound signals from the different positions can be combined coherently during the reconstruction process to build a larger synthetic aperture. This process also corresponds to spatial coherent compound imaging in the elevation direction.

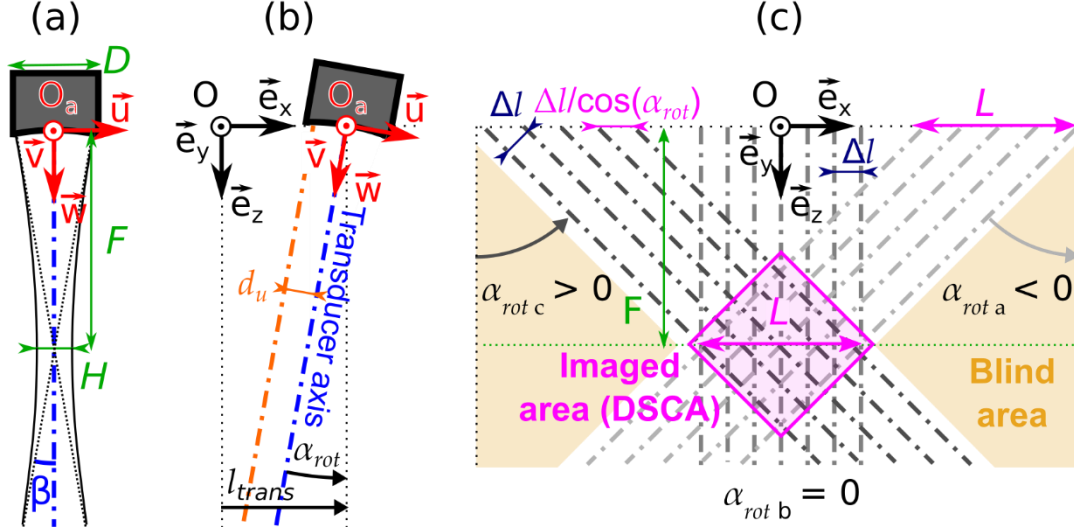


Figure 1. Schematic diagram of the scanning scheme in 2-D. (a) One weakly focused transducer array element of width D and focal distance F . H is the pulse-echo full width half maximum (FWHM) of the ultrasound beam. The angular full aperture is 2β . The angle bisector is named transducer axis. A Cartesian coordinate system is attached to the transducer element face: \mathbf{u} corresponds to the elevation direction and \mathbf{w} to the axial direction. For a linear array, the long axis along the row of its active array elements (lateral direction) is the \mathbf{v} -axis. The origin O_a is the center of the transducer element face; (b) The transducer element at one tomographic position. For the fixed Cartesian coordinate system, the vectors \mathbf{e}_y and \mathbf{e}_z correspond to the rotation axis and the radial direction, respectively, when $\alpha_{rot} = 0$. The translational axis of the scan is \mathbf{e}_x . For the diagrammed position, the rotation angle is α_{rot} (here $\alpha_{rot} < 0$) and the translation position relative to the origin O is l_{trans} . d_u is a distance to the transducer axis in the elevation direction used during the reconstruction process; (c) The transducer axis is shown for several positions of the scanning process. The translation positions are illustrated for three different rotation angles: $\alpha_{rot a}$, $\alpha_{rot b}$ and $\alpha_{rot c}$. For each angle α_{rot} , the translation ranges from $l_{trans_center}(\alpha_{rot}) - L/2$ to $l_{trans_center}(\alpha_{rot}) + L/2$. For two successive positions at a constant α_{rot} , the spacing between the transducer axes is Δl and the transition step is $\Delta l / \cos(\alpha_{rot})$ along the translation axis. The magenta square indicates the imaged area, i.e. the region probed with all the different orientations of the transducer axis. This area is named DSCA for Diamond-Shaped Cross-sectional Area.

2.2. Spatial sampling of the scan

Our scanning scheme combines motion of the US transducer in translation and in rotation. Therefore, both the linear and the angular spatial sampling periods need to be set. To improve upon the approach proposed for PA tomography in [20], we sought to determine the sampling periods offering the best compromise between image quality and acquisition speed. Indeed, increasing the number of tomographic positions usually leads to higher image quality (contrast, homogeneity) but will result in longer acquisition time.

The minimal sampling periods required to avoid grating lobes and other aliasing artifacts on the image depend both on the transducer geometrical parameters (**Figure 1** (a)) and the reconstruction method. The reconstruction algorithm for 3-D imaging is detailed in Appendix A. Our reconstruction algorithm is based on a basic delay-and-sum process. In the 2-D configuration, the transducer is assumed to be a point transducer located at O_a (**Figure 1** (a)), which emits circular waves (cylindrical in 3D) and has an isotropic detection pattern. The spatial impulse response of the transducer is not modeled, but its directivity is taken into account with an amplitude mask. For a given position of the transducer, the pulse-echo signal only contributes to the image in a slice of width $2 \cdot d_u$ (**Figure 1** (b))

around the transducer axis. In this slice, an apodization window (20% cosine taper) was used to avoid discontinuities. The pulse-echo (two-way) -12dB full width of the ultrasound beam is $1.2 * H$ [21] where $H = \lambda_c * f\text{-number}$, with λ_c the wavelength at the center frequency f_c of the transducer. So, to account for the focusing of the transducer, we set $d_u = 0.6 * H$.

The linear sampling period Δl is defined as the distance between the transducer axis for two successive translation positions at a constant angle α_{rot} (**Figure 1** (c)). The angular sampling period, $\Delta\alpha$, corresponds to the angular change between two successive translations across the imaged area. Performing Nyquist–Shannon sampling in translation and in rotation [22], when considering point detectors in the reconstruction, would require a large number of positions and would lead to a prohibitive scan duration. To obtain more efficient scanning, we reduce the synthetic array to a rotation array: for each pixel in the imaged area, we coherently add signals corresponding a single position in translation for each rotation angle α_{rot} . Thereby, we avoid generating a synthetic array with the successive translation positions at a given α_{rot} . The selection of the translation positions is made based on the amplitude mask. We should have $\Delta l \geq 2*d_u$ so that $\Delta l \geq 1.2 * H$. On the other hand, an effective coverage of the imaged area would require $\Delta l \leq H$, because H is the two-way full width half maximum (FWHM) of the ultrasound beam [23]. We chose to set $\Delta l = H$, as a compromise justified by the 20% cosine-taper of the apodization mask. One can note that Δl and d_u are strongly linked because of the reduction of the synthetic array to a rotation array. For the translation-only scan used for comparison, a synthetic translation array is formed. Therefore, the volumes probed by successive translation positions should overlap and then $\Delta l_{translation\text{-only}} \leq 2*d_u$. We set $\Delta l_{translation\text{-only}} = H/8$ [24] (see also Appendix B) while d_u was still defined by $d_u = 0.6 * H$ to account for the transducer directivity.

Angular sampling in our scanning geometry has not yet been studied to the best of our knowledge. From studies performed for other geometries, we have found (Appendix B) that the minimal angular sampling period is $\Delta\alpha = \beta$. Herein, we study the influence of the spatial sampling on the imaged quality for 3 different nominal angular sampling periods:

$$\Delta\alpha_1 = \beta, \Delta\alpha_2 = \beta/2 \text{ and } \Delta\alpha_3 = \beta/4 \quad (1)$$

$$\text{with } \beta = \text{atan}(D/(2*F)) \quad (2)$$

We chose to perform our study with an angular range $\alpha_{rot} \in [-45^\circ, 45^\circ]$ which provides a large angular aperture for ultrasound imaging and will strongly showcase the potential of our approach. However, side lobes are expected from a finite and uniformly sampled angular aperture. They can be reduced with amplitude apodization whose amplitude value depends on α_{rot} , but this solution leads to signal damping on the edge of the scanned interval and we consider this to be a sub-efficient use of the recorded signals. Therefore, we implemented spatial density tapering as a means to reduce both side lobes and the number of rotation positions. Because of its simplicity, we use the Doyle-Skolnik approach, as described in [25]. The angular positions of the synthetic array were determined considering a Hamming window function over the entire angular range $[-45^\circ, 45^\circ]$ and the nominal angular sampling period $\Delta\alpha$. The relative reduction in the number of rotation positions compared to a uniformly sampled array is approximately - 46 % (*i.e.* the area ratio between the Hamming and the rectangular windows). The translation endpoints for the different rotation positions are shown in **Figure 3** for a translation range $L = 30$ mm and the angular sampling period $\Delta\alpha_2$. Due to the spatial density taper, the effective angular sampling step is $\Delta\alpha_2$ around $\alpha_{rot} = 0$ and increases with the value of $|\alpha_{rot}|$. Therefore, the bounds of the angular range $[-45^\circ, 45^\circ]$ are not reached during the scan process. The effective bounds depend on the value of $\Delta\alpha$. With an amplitude apodization and the Hamming window function, the recorded signals at $\alpha_{rot} = \pm 45^\circ$ would have had a weight of 0.08 compared to a weight of 1 around $\alpha_{rot} = 0$.

2.3. Experimental implementation

We experimentally implemented the scanning scheme presented above with a clinical linear ultrasound array. This section presents the tomographic ultrasound scanner, the practical implementation of the scan and the imaged samples.

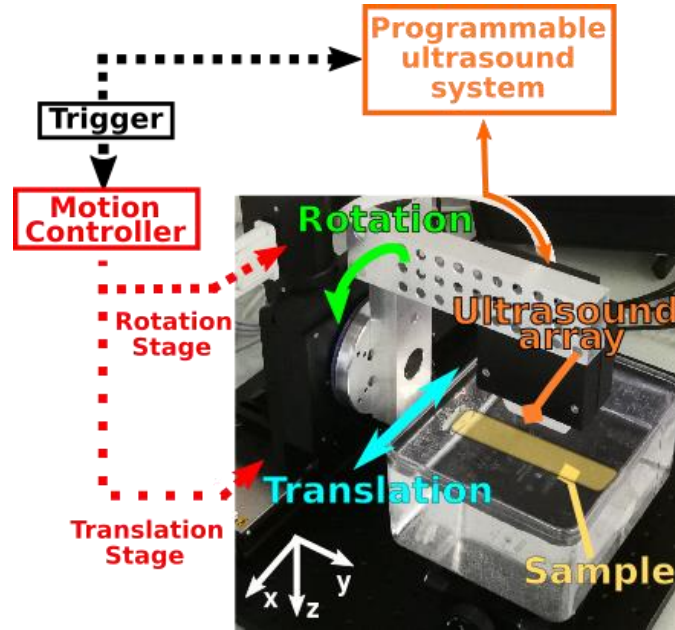


Figure 2. Annotated picture of the experimental setup. The rotate-translate scanner is comprised of two motorized stages that scan an ultrasound (US) array. The rotation stage is mounted on the translate stage. The US array is fixed on the rotation stage with custom-built holder. The array axis (axis along the row of its elements) was manually aligned to correspond to the rotation axis. Triggers synchronize 1) recording the motion-controlled stage positions and 2) the US acquisition with the programmable US system. The imaged sample is placed in the water tank below the array. The axes of the fixed coordinate system (O , \mathbf{e}_x , \mathbf{e}_y , \mathbf{e}_z) are represented. For the sake of readability, only the subscripts x , y and z are reported in the diagram. The y -axis and the z -axis correspond to the rotation axis and the radial direction when $\alpha_{rot} = 0$, respectively. Due to possible experimental misalignment, the translation axis is assumed to be close to the x -axis but may not exactly match. The scanner in action is shown in Video S1.

2.3.1. Experimental set-up

The experimental setup presented in **Figure 2** can be divided in three main parts: 1) the US acquisition system consisting of an US linear array driven by a programmable US platform, 2) the scanning system comprising two motorized stages and their motion controller and 3) the synchronization system piloted with a programmable trigger generator. The acquisition process was fully automated.

The ultrasound transducer array was a 128-element linear array (L7-4, Linear Array, Philips Medical Systems, Seattle, WA, USA) with a 5-MHz center frequency and 298- μm inter-element spacing. In the elevation direction, the elements of the array had an aperture of $D = 7.5$ mm and were cylindrically focused to a focal distance of $F = 25$ mm, resulting in a f -number of 3.3. Therefore, as described in equations (1) and (2), $\Delta\alpha_1 \approx 8^\circ$, $\Delta\alpha_2 \approx 4^\circ$ and $\Delta\alpha_3 \approx 2^\circ$. Additionally, for this array, $\lambda_c = 0.3$ mm and $H = 1$ mm with a speed of sound of 1500 $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$. This linear array was chosen because it is widely used in the ultrasound community. Acoustic coupling between the sample and the ultrasound array was obtained by immersion in a water tank.

The array was driven by a programmable, 64-channel Vantage ultrasound system (Verasonics, Kirkland, WA, USA). For all the transmit events and all the receive events, only the 64 central elements of the array were used. Upon the arrival of each external trigger event, all these 64 array-elements were fired to produce a "plane wave" emission (beam that is unfocused in the lateral direction of the array or the v -direction shown in **Figure 1**) [26]. Transmitted pulses were one cycle long at 5.2 MHz. For most acquisitions, all the elements in the transducer array were fired at the same time to produce an untilted plane wave ($\gamma_{st}=0$) referred to as "straight transmit". We also implemented an emission mode in which tilted plane waves were generated with a different angles γ_{st} for successive trigger events. The steering angles were controlled electronically by introducing a small delay between the firing of adjacent elements according to the desired inclination angle. In this mode named "steered transmit", a cyclic

emission sequence was used and, for each cycle, the tilted plane waves were emitted with increasing angular steering (**Table 1**). The steered angles were chosen to ensure uncorrelated transmitted wave-vectors. Given the active aperture of the array and the wavelength λ_c at its center frequency, the steered angles must theoretically be spaced by at least $\sim 0.9^\circ$ to have independent transmitted wave-vectors [8]. We chose here an angular spacing of 2° . Moreover, the steered angles were chosen centered around zero to match the directionality of the array elements.

Pulse-echo signals were recorded at a sampling frequency of 20 MS/s, with a constant gain (no time gain compensation was applied) and for a time interval adapted to the distance range between 5 mm and 60 mm in front of the array. The transmitted pulse amplitude and the reception gains were adjusted to ensure a good amplitude digitalization of received signals without saturation. Ultrasound signals were stored in internal memories of the acquisition system.

Table 1. Parameters of the different acquisition modes for a translation range of $L=30$ mm.

Scanning mode	Rotate-translate scan			Translate-only scan	
		Straight transmit		Steered transmit	Straight transmit
Mode #		1		2	3
Angular sampling period $\Delta\alpha$ ($^\circ$)	$\Delta\alpha_1 = \beta$	$\Delta\alpha_2 = \beta/2$	$\Delta\alpha_3 = \beta/4$	$\Delta\alpha_2 = \beta/2$	0
Number of angular positions ¹	8	4	2	4	0
Steering angles γ_{st} ($^\circ$)	6	12	23	12	1
Acquisition rate (Hz) ²	0	0	0	-4; -2; 0; 2; 4	0
Number of tomographic positions ²	50	50	50	250	50
Acquisition duration (s)	267	508	947	2533	244
Reconstruction duration (s) ³	5.3	10.2	19	10.1	4.9
	11.2	20.9	39.7	95.2	14.2

¹ The number of angular positions results from the angular sampling period $\Delta\alpha$ and the density taper

² The acquisition rate corresponds to the pulse repetition rate (PRF) of the trigger generator, and the number of tomographic positions to the number of generated trigger pulses.

³ The reconstruction durations were measured for the largest imaged volume $\Delta x * \Delta y * \Delta z = 30 * 19 * 30$ mm³ and a pixel size of $p_x * p_y * p_z = 72 * 144 * 72$ μ m³, resulting in total of $417 * 133 * 417 \approx 23$ million voxels. The volumetric image reconstruction was performed using a GPU unit NVIDIA GeForce RTX 2060 SUPER. For the modes 1 and 2, some tomographic positions were discarded for the reconstruction (see Appendix A).

We used two high precision motorized stages. The rotation stage (M-061.PD, Physik instrumente, Karlsruhe, Germany) was mounted on the translation stage (L-511.44AD00, Physik instrumente, Karlsruhe, Germany). The two stages were controlled with a C-884 DC Motor Controller (Physik instrumente, Karlsruhe, Germany). Using integrated encoders, the positions of the stages were recorded with an accuracy of 0.001 degrees and 50 nm, respectively, at the time of arrival of an external trigger pulse to the controller. The positions were stored in an internal memory of the controller.

To synchronize the US plane wave emission and the recording of the stage positions, a trigger generator (BNC Model 577, Berkeley Nucleonics, San Rafael, CA, USA) was used to send external triggers simultaneously to both the programmable US system and the motion controller (**Figure 2**). The number of pulses and the pulse repetition frequency (PRF) depend on the acquisition parameters (**Table 1**), and were programmed in the pulse generator prior to each acquisition.

For each tomographic acquisition, the following sequence of events was used. First, the motors were positioned at the first tomographic position and the ultrasound system was initialized. Then, the ultrasound system and the motion controller were set to wait for a trigger pulse. The first trigger pulse started the motion of the stages following programmed trajectories (see 2.3.2.). This trigger pulse and the next ones triggered the simultaneous recording of the stage positions and of the pulse-echo ultrasound signals. At the end of the scan, all the data from the ultrasound system and the motor controller were transferred to a computer.

2.3.2. Practical implementation of the scanning

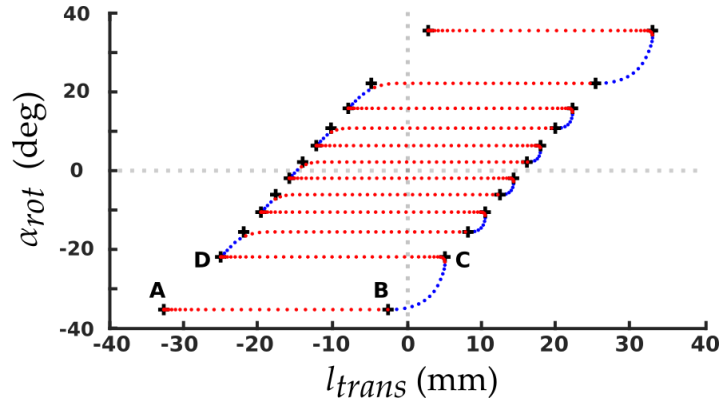


Figure 3. Successive motor positions for a rotate-translate scan with the angular sampling period $\Delta\alpha_2 \approx 4^\circ$. Positions used for reconstruction are shown with red markers. Blue markers designate positions that are necessary for the continuous mechanical scan but are discarded prior to volume reconstruction. The black crosses represent targeted endpoints for the motor trajectories. Because of the density taper, the effective angular step is 4° around $\alpha_{rot} = 0$ and increases with the value of $|\alpha_{rot}|$. The bounds of the angular range $[-45^\circ, 45^\circ]$ are also not reached. The first four endpoints are notated A, B, C and D. The corresponding video of the scanner in action is displayed in Video S1.

Three different acquisition modes were employed. The first mode is a 3-D rotate-translate tomographic scan with straight transmit events ($\gamma_{st}=0$). The targeted endpoints of the motion are at $l_{trans \text{ endpoints}}(\alpha_{rot}) = l_{trans \text{ center}}(\alpha_{rot}) \pm L/2$ and are illustrated in **Figure 3** (black crosses). For a time-efficient scanning, we implemented continuous scanning rather than step-by-step scanning [27]. We chose to perform translation scans repetitively with a back and forth oscillatory motion. The rotation motion was performed in a single direction (increasing α_{rot}). To illustrate the stage motion, we notated A, B, C and D the first four endpoints of the scan in **Figure 3**. For two successive rotation angles $\alpha_{rot 1}$ and $\alpha_{rot 2}$, the translation endpoints are scanned in one translation direction for $\alpha_{rot 1}$ (from A to B for instance) and in the reverse direction for $\alpha_{rot 2}$ (from C to D). Thereby, we minimized the scanning time. The rotation motion starts from the second translation endpoint at $\alpha_{rot 1}$ (B in the example) and we aimed at reaching the second rotational position $\alpha_{rot 2}$ when the targeted first translational endpoint at $\alpha_{rot 2}$ is reached (C here). A translation motion is additionally needed between the two endpoint positions (B and C in the example). In the example, the first, positive-direction translation occurs from A to C. The rotational motion starts when the translation stage reaches B. When C is reached, the rotation motion and the positive-direction translation end, and the translation direction is reversed.

The trajectories of positioning stages have trapezoidal or triangular velocity profiles. Therefore, for each movement, the following parameters had to be set: the endpoints, the targeted velocity and the acceleration. The deceleration was set equal to the acceleration. For the rotation stage, the endpoints $\alpha_{rot i}$ were defined by $\Delta\alpha$ and the spatial density taper. The rotation velocity and acceleration were set to their maxima: 90 deg.s^{-1} and 500 deg.s^{-2} , respectively. Most rotation moves had a triangular velocity profile. Their duration was then limited by the maximum rotation acceleration.

The translation velocity was set constant for each one-way translation at α_{rot} and equal to:

$$v(\alpha_{rot}) = \frac{PRF}{N_{st}} \frac{\Delta l}{\cos(\alpha_{rot})}, \quad (3)$$

where PRF corresponds to the trigger generator of the synchronization part, and N_{st} is the number of electronic steering angles. $N_{st} = 1$ in this acquisition mode as only straight transmits are performed. Δl is equal to $H = 1 \text{ mm}$.

The translation acceleration and the PRF were determined empirically with the following criteria. We want that the rotation duration and the translation time between two successive endpoints at different $\alpha_{rot i}$ (such as B and C in **Figure 3**) are similar. The rotation duration is already reduced to its minimum, therefore we had to adapt the translation parameters. We decided to adjust the translation acceleration. We calculated the maximum translation acceleration so that the translation part is covered

only when at least 80% of the corresponding rotation distance is traveled. With this acceleration, we determined the maximum translation velocity so that, for a translation travel equal to $L = 30$ mm, 50% of the translation distance is traveled at a constant velocity (*i.e.* not in the acceleration or deceleration phase). The PRF was then deduced from equation (3) by taking the maximum possible angle $\alpha_{rot} = 45^\circ$. With these criteria, we found the following set of parameters: a PRF of $N_{st} * 50$ Hz and, for the translation stage, an acceleration of 235 mm.s^{-2} and a maximum velocity of 60 mm.s^{-1} (maximum velocity from the manufacturer specifications: 90 mm.s^{-1}). With these parameters for $L=30$ mm and $\Delta\alpha_2$, 64% of the desired tomographic positions were acquired with an inter-position translation distance greater than 90% of $\Delta l / \cos(\alpha_{rot})$, the targeted translation sampling period.

The motion parameters (endpoints, direction and velocity) of both stages are coded in a macro, stored in the controller memory. Motion parameters are automatically modified each time an endpoint is reached. In particular, the controller starts the rotation motion when the translation coordinate of the corresponding endpoint is exceeded. This mode was implemented for the three angular sampling periods (**Table 1**).

The second acquisition mode is a 3-D rotate-translate tomographic scan with steered transmit events. The parameters for the stages are the same as for the first acquisition mode. However, we used $N_{st} = 5$ steering angles and the PRF was thus increased to 250 Hz (**Table 1**). We can note that the translation velocities stay the same but the targeted inter-position translation distance is now $\Delta l / (\cos(\alpha_{rot}) * N_{st})$. Consequently, the number of tomographic positions is around five times higher for the same $\Delta\alpha$. In this second acquisition mode, coherent compounding is performed both in the elevation direction of the array with the mechanical scanning and, additionally, in the lateral direction with electronic beam steering. We study the effect of the additional compounding on the contrast and resolution of the 3-D image. This mode was implemented only for the median angular sampling period $\Delta\alpha_2$.

The third acquisition mode is a translate-only scan with straight transmit events. The rotation stage was kept fixed at $\alpha_{rot} = 0$, and a one-way translation scan was performed over the translation range L . The nominal translation sampling period $\Delta l_{translation-only}$ was set to $H/8 = 125 \mu\text{m}$ [24] (see also Appendix B). In continuous motion with a PRF of 50 Hz, the corresponding translation speed was set to $v_0 = 6.25 \text{ mm.s}^{-1}$. This third mode was implemented to provide a benchmark for comparison with the proposed rotate-translate scan.

2.3.3. Imaging phantoms

Four imaging phantoms were used to characterize our 3D scanner. The phantoms were totally submerged (**Figure 2**), maintained fixed compared to the water tank and centered in the imaged volume (**Figure 1 (c)**).

The first phantom (Ph1) contains 200- μm diameter polyethylene microspheres (BKPMS 180-212 μm , Cospheric, Santa, Barbara, CA) embedded in agar gel. The agar gel was prepared with agar powder 2% w/v (A1296, Sigma Aldrich) in water, and it was molded in 26.5-mm diameter cylindrical mold. The microspheres have a significant acoustic contrast relative to the embedding medium (on the order of 40 dB). They were randomly, but sparsely, distributed over the entire cross section of the cylinder, and could thus be identified individually. Ph1 was placed so that all microspheres had approximately the same y-coordinate, *i.e.* they all lie within a plane perpendicular to the rotation axis. Ph1 was used to validate that the field of view can be adjusted by setting the translation range L (**Figure 1 (c)**). Moreover, Ph1 enabled us to study the 3-D spatial resolution and its spatial homogeneity.

The second phantom (Ph2) was prepared with agar powder (2% w/v) and 1% w/v cellulose powder (Sigmacell cellulose Type 20) in water. Cellulose particles (20 μm) act as ultrasound scatterers to mimic the scattering properties of biological tissues for US imaging. The gel was molded in the cylindrical mold with 3 cylindrical solid inclusions of 5 mm in diameter and of the same length as the mold. The inclusions were removed when the gel was solidified. Thereby, Ph2 contained 3 cylindrical holes arranged along the vertices of an equilateral triangle centered on the phantom axis. The center-to-center distance between adjacent holes was about 9 mm. The holes were filled with water and Ph2 was placed with the axes of the cylinders aligned with the rotation axis (y-axis). The holes are far enough from each other to be considered as isolated anechoic regions embedded in a speckle-generating medium. They were used to measure the image contrast and its spatial homogeneity.

Two other phantoms were made of 0.36 mm diameter polyester threads. The threads were verified to be acoustically scattering, however the contrast with agar gel was found to be poor. To obtain a higher contrast, the threads were simply placed in water: a non-scattering medium for 5 MHz ultrasound waves.

The third phantom (Ph3) is composed of four threads parallel to each other and oriented along the rotation axis (y-axis). Three of the threads are arranged along the vertices of an equilateral triangle of 9 mm side length. The fourth thread was at the center of the triangle. Ph3 allowed us to obtain an estimate of line spread function at four positions with a large dynamic range, and to derive a contrast metric named the cystic resolution. The similar spatial arrangement between Ph2 and Ph3 allow comparison of contrast measurements made with two suitable metrics (see section 2.5).

For the last phantom (Ph4), a 3-D net was formed with knots between twelve threads. The net is a complex structure comprised of a thin homogeneous scattering material. Because the threads are dyed in black, the ultrasound image of Ph4 can be easily compared with optical pictures. Ph4 allows us to study the ability to image a complex shape with multiple orientations.

2.4. Image reconstruction algorithm

Image reconstruction was performed with a simple delay-and-sum beamforming algorithm. The two-way travel times between the US transducer element positions and each imaged voxel were computed. Then, the value of each voxel was computed by summing, over all the elements of the array and all the different tomographic positions, the signal values assessed at the voxel-associated travel times. Tomographic positions outside of the translation limits of the theoretical scanning scheme (such as from B to C in **Figure 3**) were, however, discarded. A weighted sum was performed to implement several apodization windows and avoid side lobes and grating lobes, as detailed in Appendix A. Three-dimensional, envelope-detected images were obtained.

The 3-D display voxel grid is defined in the fixed coordinate system (O, \mathbf{e}_x , \mathbf{e}_y , \mathbf{e}_z) presented in **Figure 1(b)**. Voxel dimensions were chosen equal to $px*py*pz = 72*144*72 \mu\text{m}^3$, with an anisotropy reflecting the best-expected resolutions. The 3D images were displayed using maximum amplitude projection (MAP) images along the axes of the coordinate system. For instance, the MAP image along the x-axis was obtained by projecting the voxels with the maximum amplitude along the x-axis in the yz-plane. For each (y,z) coordinate, the pixel value of the MAP image corresponds to the highest voxel value along the x-axis of the full volume. When the MAP images are displayed with a logarithmic gray scale, the logarithmic compression is performed after the maximum amplitude projection.

2.5. Characterization of the imaging performance

We assessed the image quality in terms of resolution, contrast and spatial homogeneity using the phantoms presented in section 2.3.3. The full-width at half-maximum (FWHM) criterion is used to assess the 3-D resolution of individual point-like objects. For the contrast, two criteria were evaluated and compared: a variant of the cystic resolution (CyR) and the simple contrast between an anechoic region and a speckle region. We studied the influence of both the angular sampling parameter $\Delta\alpha$ and the transmit mode (straight or electronically steered).

2.5.1. FWHM resolutions

The 3-D resolution was assessed with phantom Ph1. To determine the FWHM resolution, the image of each microsphere was fit with a 3-D Gaussian blob using a nonlinear least-squares minimization. The three main axes of the blob were the axes of the Cartesian coordinate system, and the following equation was used:

$$g = A. \exp \left\{ - \left[\frac{(x-x_0)^2}{2.\sigma_x^2} + \frac{(y-y_0)^2}{2.\sigma_y^2} + \frac{(z-z_0)^2}{2.\sigma_z^2} \right] \right\}, \quad (4)$$

where x_0 , y_0 , and z_0 are the coordinates of the center of the blob, A is the amplitude, and σ_x , σ_y , and σ_z are the Gaussian root mean square widths along the x, y, and z axes, respectively. The FWHM resolutions were computed using the equation: $FWHM_i = 2\sqrt{2\ln(2)}\sigma_i$ with $i=x, y$ or z .

The expected FWHM resolution along the x-axis is on the order of λ_c , because of the large synthetic angular aperture. $\lambda_c = 0.3$ mm is the wavelength at the center frequency of the array. Given the apodization along the y-axis (Appendix A), we expect a resolution on the order of $2*\lambda_c$. The resolution along the z-axis is limited by the ultrasound pulse width and is expected to be on the order of λ_c .

Accordingly, the fits with the Gaussian blob were performed in-volumes of $1.5 \lambda_c * 4 \lambda_c * 1.5 \lambda_c$, each centered on an individual microsphere.

To compare the spatial resolution for different angular sampling periods, we used statistical quantifiers, such as the median and interquartile range (IQR), because of their robustness to outliers and reliability for various data distributions. The resolution comparisons are presented in boxplot displays.

2.5.2. The cystic resolution (CyR)

The CyR was introduced by Vilkomerson *et al* [28] to evaluate the effects of side lobes and grating lobes of the point-spread function (PSF) on the contrast of ultrasound images. The CyR is expressed as the minimum detectable size of anechoic structures embedded in a speckle-generating background. Instead of evaluating the detection of anechoic cysts of various sizes, Ranganathan *et al* [29] suggested using the image of the concentric PSF with a spherical void c . The CyR is then defined as the size of the spherical void that produces a contrast above a given threshold. In 2-D, the cyst contrast C_c is computed [29] from the ratio of PSF energy outside the void relative to the total PSF energy:

$$C_{dB} = 10 \log_{10} \left(\frac{\iint_{(x,z) \notin c} h^2(x,z,x_0,z_0) dx dz}{\iint h^2(x,z,x_0,z_0) dx dz} \right), \quad (5)$$

where $h(x,z,x_0,z_0)$ is the image of a pointlike object centered at (x_0,z_0) , which stands for the PSF function.

For 3-D imaging, Rasmussen *et al.* [13] suggested to use the line spread function (LSF) instead of the PSF to access the CyR because the LSF is easier to measure experimentally and has a larger dynamic range. In our case, we are interested in measuring the effect of the scan parameters on the image quality. Therefore, we want to evaluate the CyR in xz -planes (perpendicularly to the rotation axis), using the LSF in the y -direction (along the rotation axis). Phantom Ph3 allows us to compute a robust estimate of the LSF with little background noise. The C_c contrast was computed using the slice at $y = 0$ (center of the array) and the two closest uncorrelated xz -slices located at $y = \pm 0.86 \text{ mm}$. Each slice is a disc of $25 * \lambda_c$ diameter which is a compromise between the need to encompass the entire spatial extent of the LSF and the need to avoid overlap between neighboring LSFs. To obtain a smooth C_c curve, the images were oversampled by a factor 2 in the xz -plane ($p_x = p_z = 36 \mu\text{m}$). Because we expect anisotropy of the LSF, we extended the definition of the C_c and we proposed a sectorial cyst contrast.

We can then introduce a general definition of C_c as:

$$C_{dB}^T = 10 \log_{10} \left(\frac{E_T^{out}}{E_T^{tot}} \right), \quad (6)$$

$$E_T^{out} = \sum_{ny=-1}^1 \iint_{(x,z) \in \{T \setminus c\}} h^2(x,y,z,x_0^y,z_0^y) dx dz, \quad (7)$$

$$E_T^{tot} = \sum_{ny=-1}^1 \iint_{(x,z) \in T} h^2(x,y,z,x_0^y,z_0^y) dx dz, \quad (8)$$

where T is either the entire slice (equation (6) is equivalent to (5) but for the LSF) or an angular sector of the slice (leading to sectorial contrast), c is the disk-shaped void, and $T \setminus c$ is the set of elements of T but not in c . The sectorial contrast was computed in angular sectors of $\pi/10$. $h(x,y,z,x_0^y,z_0^y)$ is the image of the LSF, at a given y , and centered at (x_0^y,z_0^y) , the coordinates of maximum amplitude of this LSF image.

Similarly to Rasmussen *et al.* [29], we define CyR as the cyst radius that produces a contrast C_{dB} of -20 dB. For the entire disk-shaped slice, this definition of CyR is called isotropic cystic resolution, iCyR, in the following. For a sector, the sectorial cyst resolution is called anisotropic cystic resolution, aCyR.

2.5.3. Image contrast

Phantom Ph2 contains three anechoic structures in a speckle-generating medium that consist of cylindrical 5-mm diameter holes, invariant along the y -axis. To assess the detectability of this cyst size, we chose the simplest and most general contrast estimator used in ultrasound imaging [30]:

$$C_{dB} = 10 \log_{10} \frac{\mu_c}{\mu_s} = 10 \log_{10} \frac{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N c_i^2}{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N s_i^2}, \quad (9)$$

where μ_c is the mean signal power in the cyst area and μ_s is the mean signal power in the speckled background area. The cyst statistics and the background statistics are assessed on the same number of pixels $N = 1000$, equivalent to about thirty resolution cells to guarantee reliable statistics. The variables c_i and s_i denote the value of i^{th} pixel of the cyst area and of the background area, respectively. The background area was chosen distant from the three holes. As previously, the contrast is computed using the slice at $y = 0$ and the two closest uncorrelated slices (xz images). Each slice is a disc with a diameter limited to $25 \cdot \lambda_c$.

As for estimation of the LSF based on C_c , a contrast curve was plotted by considering different and non-overlapping cyst areas of size N , all centered on the longitudinal axis of the cylindrical hole. The center-most area is a disk and the areas beyond this disk are concentric rings.

3. Results

3.1. Influence of the translation range on the imaged volume

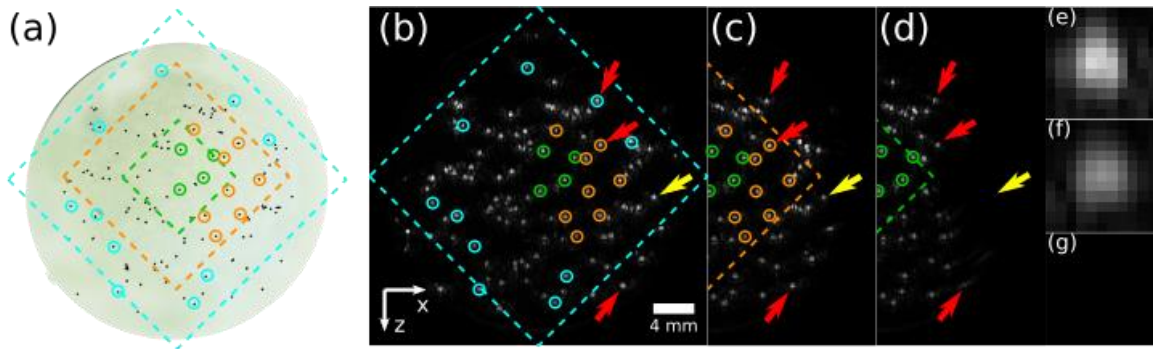


Figure 4. US images of Ph 1 performed with different translation ranges L . (a) Optical picture showing the spatial distribution of microspheres. (b) to (d) Maximum-amplitude projection (MAP) images along the y -axis for $L = 30, 20$ and 10 mm, respectively. The dotted diamond indicates the area probed with all the different orientations of the array, named diamond-shaped cross-sectional area (DSCA) (Figure 1 (c)). The MAP images are in linear grey scale. The same grey scale was used for (b)-(d). For a better readability, the grey scale was fixed. White pixels correspond to the maxima of the MAP image for $L=30$ mm. Black pixels correspond to an amplitude equal to zero. The islets (e)-(g) show a zoom of the microsphere indicated with the yellow arrow for $L = 30, 20$ and 10 mm, respectively. The pixels displayed in white correspond to the maximum for $L = 30$ mm. The red arrows show microspheres located outside of the DSCA in (d). The yellow arrow points to a microsphere inside the blind area in (d). Full-size images corresponding to (c) and (d) are displayed in Figure S1.

The cross section of the volume probed at all orientations α_{rot} of the array and perpendicular to the rotation axis is presented in Figure 1(c). This cross-sectional area is expected to have a diamond shape and its area should depend on the translation range L . We name DSCA this diamond-shaped cross-sectional area. The cross section of the volume probed by none of the tomographic positions is named the blind area (Figure 1 (c)). The regions outside of the DSCA (and the blind area) are probed with fewer orientations of the array. Therefore, we expect a degraded resolution and a lower amplitude for this part of the image.

To experimentally study the influence of L on the cross section of the imaged volume perpendicular to the rotation axis, we performed several tomographic acquisitions of Ph1 for three different translation ranges. The angular sampling was kept constant and equal to $\Delta\alpha_2$. Ph1 contains $200\mu\text{m}$ -diameter microspheres that are sparsely distributed over the cross section of its 26.5-mm diameter cylindrical form (Figure 4(a)). We chose L values equal to 30 mm, 20 mm and 10 mm, corresponding to $508, 396, 280$ tomographic positions and scanning durations of $10.2, 7.9$ and 5.6 s, respectively. The ratio of the scanning duration relative to L becomes lower as L increases, while the sampling parameters and in particular the translation velocities computed from equation (3) were identical for all scans. This is due to fact that the acceleration and deceleration phases of the translation motions have the same duration for all three scans, but these phases, during which the translation velocity is lower, are proportionally shorter as L increases. The plane of microspheres was placed around $y = 0$ mm. Each microsphere could be identified individually allowing a qualitative evaluation of the effective imaged area and a

comparison of the image quality inside and outside the DSCA. We reconstructed images of dimensions $\Delta x * \Delta y * \Delta z = 30 * 2 * 30 \text{ mm}^3$. **Figure 4** (b)-(d) presents the maximum amplitude projection (MAP) of the 3-D US image along the y-axis.

Figure 4(b) presents the US image for the largest translation range $L = 30 \text{ mm}$. As illustrated by the circular markers which are landmarks, the spatial distributions of the microspheres in the US image and in the optical pictures match (**Figure 4** (a)). This result demonstrates the ability of our system to perform US images in the xz-plane and to localize small scatterers.

For $L = 30 \text{ mm}$, almost all microspheres are included in the DSCA. However, when the translation range is reduced, some microspheres enter the blind area on the side of the DSCA (along the x-direction), as illustrated by the microsphere marked with the yellow arrow in **Figure 4** which is no longer visible for $L = 10 \text{ mm}$. Red arrows in **Figure 4**(d) illustrate that microspheres are indeed reconstructed with better resolution and amplitude when they are in the vicinity or inside the DSCA, compared to when they are located in the vicinity of the blind area. The islets (**Figure 4**(e-g)) further show the image amplitude degradation with a zoom on one microsphere.

With the developed scanner, the operator can adjust the translation range to fit the region-of-interest within the DSCA. Thus, the scan duration can be reduced when the object to image is smaller and the translation range can be more strongly limited.

3.2. The FWHM resolution

The resolution of isolated microspheres and their amplitude in the DSCA were evaluated for $L = 30 \text{ mm}$ according to the method detailed in section 2.5.1. Ph1 is comprised of about a hundred microspheres (**Figure 4**(a)). The final dataset excluded any pairs of microspheres positioned within $900 \mu\text{m}$ of each other and contains 52 microspheres distributed across the DSCA (**Figure 5**(a)). Ph1 was also imaged using the translate only scanning mode ($L = 30 \text{ mm}$). For this mode, the resolution along the x-axis is degraded. The fits with the Gaussian blobs were performed in volumes of $6\lambda_c * 4\lambda_c * 1.5\lambda_c$ around each microsphere. Due to the small distance along x between neighboring microspheres, only 16 of them could be isolated in such volumes and included in the dataset. The microspheres have a finite diameter of about $200 \mu\text{m}$ in diameter. Therefore, they cannot exactly be considered as point-like, and the measured FWHM values are expected to be slightly larger than the actual resolution of the system. However, this diameter of microspheres ensured an efficient scattering of the ultrasound waves and a sufficient contrast to the supporting medium (agar gel).

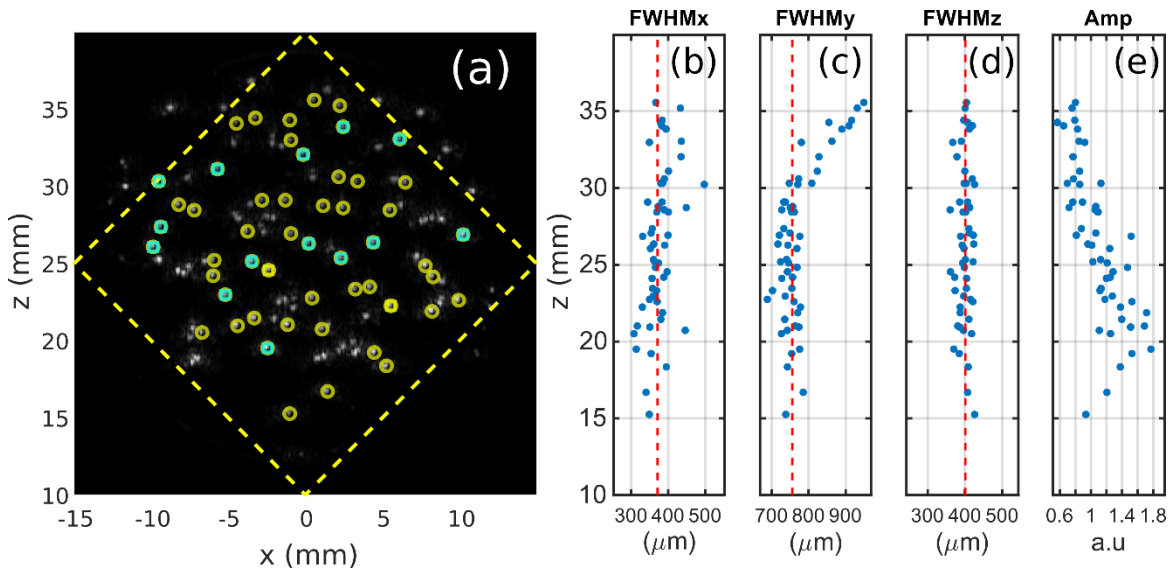


Figure 5. (a) MAP image along the y-axis of Ph1 for $\Delta\alpha_2$ in straight transmit. A linear gray scale was used. The 52 microspheres selected for the analysis are emphasized with yellow circular markers and the 16 microspheres kept for resolution estimations in translation-only mode are additionally emphasized with square cyan markers. (b)-(e): Resolution and amplitude of the 52 microspheres in the image are shown as a function of the z-coordinate. The red-dotted lines indicate the median values. For each FWHM graph, the range of abscissa is equal to $300 \mu\text{m}$.

Table 2 compares the median \pm IQR values of the FWHM along the three directions of the coordinate system for the rotate-translate scan at $\Delta\alpha_2$ and the translate-only scan. We note that FWHMy and FWHMz are barely influenced by the rotation scan. Indeed, the resolution along the y-axis is mainly limited by the finite length of the active aperture of the linear array, and the resolution along the z-axis is mostly influenced by the duration of the pulsed echo. **Figure 5** (c) shows that FWHMy has a small deviation for $z < 30$ mm due to the fixed lateral f-number used in the reconstruction method (Appendix A). For $z > 30$ mm, the effective lateral f-number could no longer be maintained fixed by adjusting the apodized reception aperture of the array as the full length of the array is used. Therefore, the effective lateral f-number increases and the resolution degrades with the increasing depth z . The FWHMy values reported in **Table 2** were computed for the full range of depths. **Figure 5** (c) illustrates that the estimated median value of FWHMy is robust to the outliers for $z > 30$ mm. The reported IQR values, which measure the statistical dispersion are, however, larger than they would have been if the microspheres at $z > 30$ mm had been discarded. **Figure 5** (d) shows the homogeneity of FWHMz with z . Unlike FWHMy and FWHMz, FWHMx was found to be 3.1 times smaller with the rotate-translate scan. The resolution along the x-axis is linked to the angular aperture along the elevation direction of the array. This angular aperture was increased from $2\beta = 16^\circ$ in the translation-only mode, to almost 90° (with a Hamming apodization) in the rotate-translate mode. Both FWHMy and FWHMx are limited by diffraction. However, **Figure 5** (b) demonstrates that FWHMx is noticeably more homogeneous even for $z > 30$ mm, as opposed to FWHMy. Thus, our scanning scheme provides a homogeneous synthetic aperture in the DSCA. **Figure 5** (e) shows that the amplitude from scattering structures in the image decreases with depth for $z > 20$ mm. This result can be attributed to the attenuation of ultrasound waves in the medium. For $z < 20$ mm, the increase in the amplitude with z may be attributed to the spatial response of the array before the focal distance that was not modeled in the reconstruction algorithm.

Table 2. Full width at half maximum (FWHM) along the three directions of the coordinate system for microspheres of Ph1. Values are median \pm IQR. Two acquisition modes are compared: a rotate-translate scan at $\Delta\alpha_2$ (dataset of 52 microspheres) and a translation-only scan (dataset of 16 microspheres). The translation range was $L=30$ mm for both acquisition modes.

FWHM	Axis of interest	Rotate-translate scan	Translate-only scan
FWHMx	x-axis	$371\mu\text{m} \pm 36\mu\text{m}$	$1140\mu\text{m} \pm 222\mu\text{m}$
FWHMy	y-axis	$756\mu\text{m} \pm 40\mu\text{m}$	$709\mu\text{m} \pm 45\mu\text{m}$
FWHMz	z-axis	$401\mu\text{m} \pm 23\mu\text{m}$	$373\mu\text{m} \pm 26\mu\text{m}$

The FWHM values were assessed for the four rotate-translate scans presented in **Table 1**. **Figure 6** shows that the FWHMy and the FWHMz are stable for all the angular sampling periods $\Delta\alpha$. The FWHMx is significantly larger for $\Delta\alpha_1$, and is on the order of $360\mu\text{m}$ (median) for the other angular samplings, with a similar IQR. This result indicates that the angular sampling period $\Delta\alpha_1$ may be too loose to avoid strong side lobes in the vicinity of the main lobe. The steered transmit induced fewer outliers (red crosses), but did not have a significant influence on the median value of the FWHM.

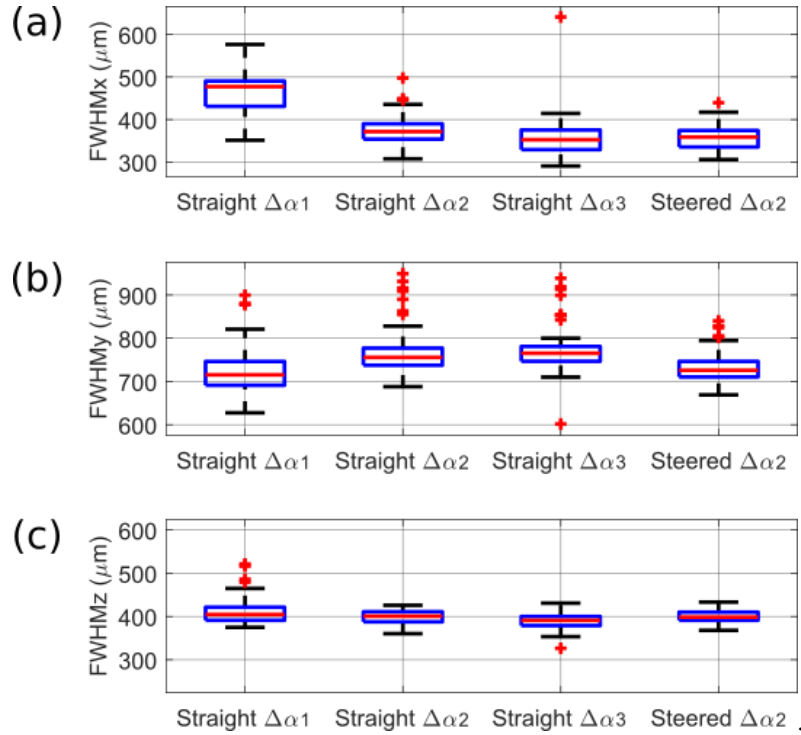


Figure 6. Boxplots of the FWHM along the three axes of the coordinate system: (a) FWHM_x, (b) FWHM_y, (c) FWHM_z. The median value is shown with the red line. The box indicates the IQR values and the outliers are shown with red crosses. In abscissa, the scanning name corresponds to the type of transmit and the angular period. The angular periods are $\Delta\alpha_1 \approx 8^\circ$, $\Delta\alpha_2 \approx 4^\circ$ and $\Delta\alpha_3 \approx 2^\circ$.

3.3. The cystic resolution (CyR)

The cystic resolution further characterizes the influence of the angular sampling on the image quality by quantifying the effect of the side lobes of the PSF on the image contrast. **Figure 7(a)** presents an image of Ph3 for the plane $y = 0$ with a logarithmic gray scale ($\Delta\alpha_2$ and $L = 30$ mm). The side lobes of the LSF are visually similar for the four threads that are all included in the DSCA.

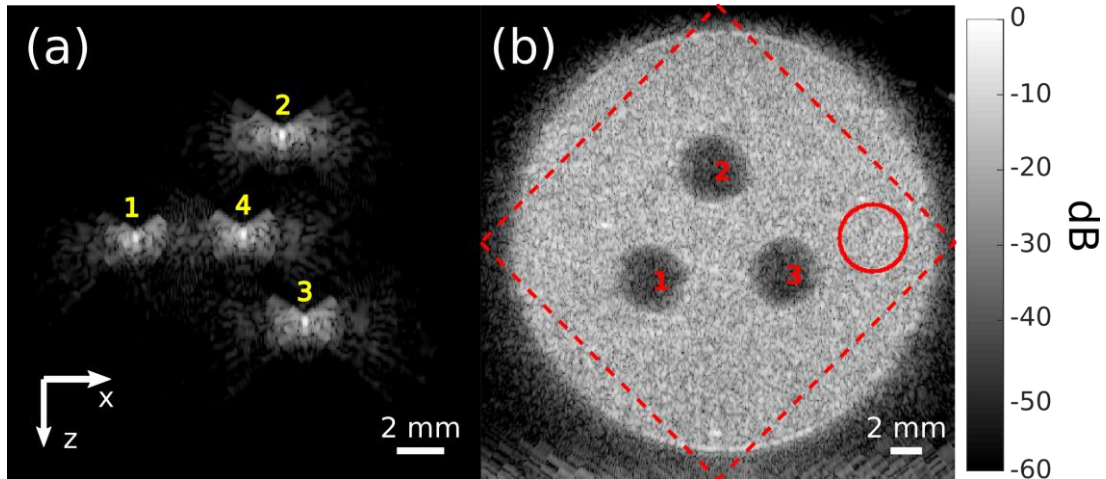


Figure 7. (a) xz-image of Ph3 (20 mm x 20 mm); (b) xz-image of Ph2 (30 mm x 30 mm). Both xz-images are at $y = 0$ and centered on $x = 0$ et $z = 25$ mm. They correspond to acquisitions performed in straight transmit at $\Delta\alpha_2$ with $L = 30$ mm. Numbers identify the threads (a) and holes (b), respectively. The speckle zone considered to calculate the image contrast is designated with a red circle in (b). The images are displayed with -60dB dynamic range.

Figure 8 (a) displays the cyst contrast C_{cAB} of the image of Thread 2 for the four rotate-translate scans presented in **Table 1**. The iCyR corresponds to a radius that produces a contrast of -20 dB. **Table 3** presents the iCyR values obtained for each thread. The spatial homogeneity of the iCyR can be noticed for a given angular sampling. One exception is observed for Thread 1 and $\Delta\alpha_1$. In this case, the degraded FWHM_x resolution for $\Delta\alpha_1$ and the vicinity of Thread 4 biased the iCyR estimation. For straight transmits, the iCyR decreases with the decreasing value of $\Delta\alpha$, which means that the spatial extension of the side lobes decreases and the contrast increases. The difference between $\Delta\alpha_2$ and $\Delta\alpha_3$ indicates that the latter angular sampling period should be preferred in case the image contrast is desired for the targeted application. Interestingly, the iCyR is close for the steered transmit at $\Delta\alpha_2$ than for the straight transmit at $\Delta\alpha_3$. The same result is observed for the C_{cAB} (**Figure 8 (a)**). Therefore, globally the lobes of the LSF for $\Delta\alpha_2$ could be mitigated by generating additional tilted planes waves and thereby reinforcing spatial averaging in the image during the reconstruction process.

Figure 8 (b) compares the anisotropic sectorial cystic resolution aCyR for Thread 2 and the different angular sampling periods. While FWHM_z and FWHM_x have similar values (**Figure 6**) indicating an isotropic center peak for the LSF, we note that the polar plot of the aCyR has the shape of a lemniscate (∞ -symbol) for every angular sampling period. The aCyR is much smaller around the z-axis than along the x-axis. This anisotropy of the side lobes is linked to the finite synthetic angular aperture (around 90°) and its orientation. Therefore, the image contrast depends on the orientation of the structure in the xz-plane. Second, the angular sampling mostly influences the aCyR along the x-axis. A left-right asymmetry of the aCyR can also be noticed. It may be due to the asymmetry of the scanning between the two translation directions in the practical implementation of the scanning scheme (**Figure 3**). On the right side of the polar plot ($\theta \in [-45^\circ; 45^\circ]$), we observe smaller aCyR values for smaller $\Delta\alpha$ in the straight transmit mode. The steered transmit at $\Delta\alpha_2$ leads to aCyR value intermediate between those of the straight transmit at $\Delta\alpha_2$ and $\Delta\alpha_3$.

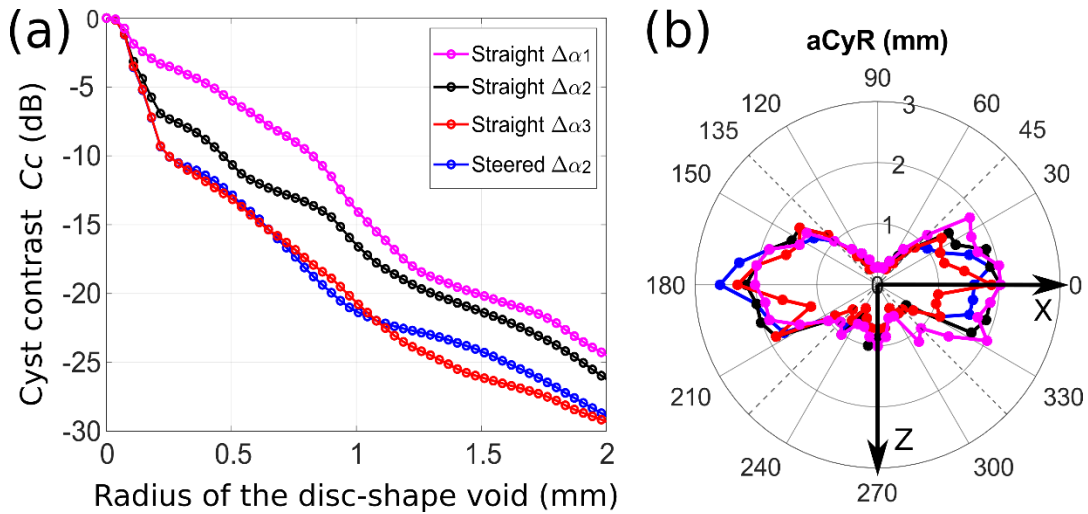


Figure 8. (a) Cyst contrast in dB, C_{cAB} , computed for LSF of Thread 2 as a function of the radius of disk-shaped void considered for equation (6). The curves correspond to the different angular sampling periods and transmit modes; (b) polar representation of the anisotropic cystic resolution aCyR assessed on the LSF of Thread 2 for the different angular sampling periods and transmit modes.

Table 3. Contrast parameters of the different acquisition modes. Translation range of $L = 30$ mm. The angular periods are $\Delta\alpha_1 \approx 8^\circ$, $\Delta\alpha_2 \approx 4^\circ$ and $\Delta\alpha_3 \approx 2^\circ$.

Rotate-translate scan		Straight transmit			Steered transmit
Contrast parameter	Location	$\Delta\alpha_1$	$\Delta\alpha_2$	$\Delta\alpha_3$	$\Delta\alpha_2$
iCyR (mm)	Thread 1	2.84	1.40	1.12	1.08
	Thread 2	1.48	1.30	0.97	0.90
	Thread 3	1.51	1.37	1.08	1.08
	Thread 4	1.48	1.40	1.04	0.97
	<i>Median</i>	1.49	1.38	1.06	1.02
$C0$ (dB) ¹	Hole 1	-24.3	-25.8	-28.7	-31.5
	Hole 2	-24.4	-26.2	-28.9	-31.1
	Hole 3	-24.7	-25.3	-27.9	-31.5
	<i>Median</i>	-24.4	-25.8	-28.7	-31.5

¹ Contrast obtained at the center (i.e. for the smallest cyst radius $r = 0.8$ mm).

3.4. Image contrast

The image contrast was also directly assessed on the three 5mm-diameter anechoic holes of Ph2. **Figure 7(b)** shows an image of Ph2 for the plane $y = 0$. The holes are identified as well as the speckled background area used for the calculation of $C0$. The holes 1, 2 and 3 have similar positions to the threads 1, 2 and 3 of Ph3, respectively.

Table 3 presents the contrast $C0$ obtained for the four rotate-translate scans presented in **Table 1** and for a cyst area defined by a disk of radius 0.8 mm centered on each hole. First, we note that the cylindrical anechoic holes can all be detected with a contrast higher than 20 dB compared to the speckle background. This result is in agreement with the iCyR values determined in section 3.3, because the radius of the holes is 2.5 mm and the largest median iCyR is 1.5 mm. The $C0$ values of **Table 3** are similar for the three holes. The contrast can then be considered as spatially homogeneous in the DSCA. However, $C0$ decreases with the decreasing angular period $\Delta\alpha$ for the straight transmit. Moreover, the contrast is stronger for the steered transmit acquisition at $\Delta\alpha_2$ than for the straight transmit acquisition at $\Delta\alpha_3$. For these two acquisitions, the iCyRs were both on the order of 1 mm. We can note that the disk of the cyst area is at a distance larger than 1 mm from the edges of the hole. As a consequence, the influence of the LSF on $C0$ might be considered low, and the lower value of $C0$ for the steered transmit at $\Delta\alpha_2$ is most likely linked to the higher number of tomographic positions in this mode (**Table 1**) and the resulting increased spatial averaging of the electronic noise during the reconstruction process. The $C0$ values of **Table 3** can be considered as a measure of the contrast to noise of the different acquisition parameters. They all decrease with the number of tomographic positions.

The contrast was evaluated for non-overlapping concentric rings of the same area as the central disk. **Figure 9(a)** displays $C0$ as a function of the external radius of each ring for hole 1. As expected, $C0$ reaches 0dB for rings located outside of the hole. Inside and in the vicinity of the scattering edges of holes, $C0_{AB}$ is influenced by the spread of the LSF. As for C_c shown in **Figure 8 (a)**, the contrast decreases with the decreasing $\Delta\alpha$ for the straight transmit. However, whereas the C_c values were similar for the straight transmit at $\Delta\alpha_3$ and the steered transmit at $\Delta\alpha_2$, $C0$ is lower for the steered transmit acquisition from a distance of about 1mm from the edges.

Figure 9 (b)-(e) illustrates the visibility of the anechoic hole 1 for the different rotate-translate acquisitions. For straight transmits, the center of the hole is indeed darker when $\Delta\alpha$ decreases. Additionally, the hole appears larger in the lateral direction (along the x-axis). This result corresponds to the anisotropy of the LSF, identified by the aCyR (**Figure 8(b)**).

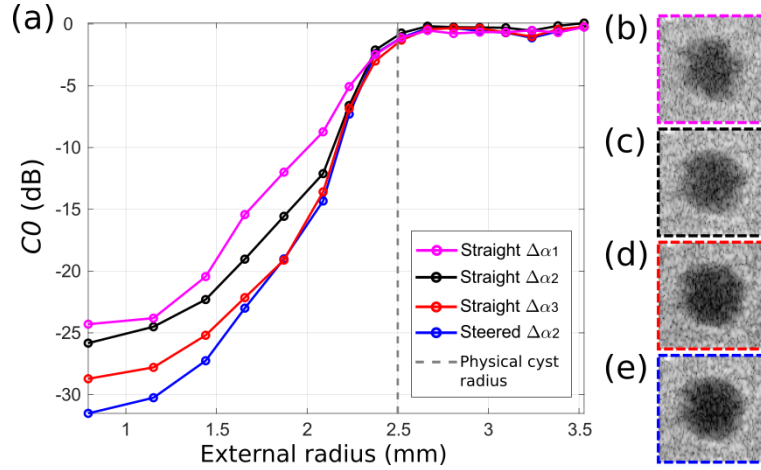


Figure 9. (a) $C0_{dB}$ curves plotted as a function of the external radius of each ring for Hole 1 and for different angular sampling periods. The angular periods are $\Delta\alpha_1 \approx 8^\circ$, $\Delta\alpha_2 \approx 4^\circ$ and $\Delta\alpha_3 \approx 2^\circ$; (b)-(e) xz-images of Hole 1 at $y = 0$ for the different acquisition modes: (b) straight $\Delta\alpha_1$, (c) straight $\Delta\alpha_2$, (d) straight $\Delta\alpha_3$ and (e) steered $\Delta\alpha_2$. The images are displayed with -60dB dynamic range.

3.5. Complex 3D phantom

To focus on the xz-plane where the rotate-translate scanning scheme has the greatest impact, the scattering structures were confined in a plane for Ph1 and, they were invariant along the y-axis for Ph2 and Ph3. Conversely, Ph4 is a 3-D scattering structure that is not confined to the plane $y = 0$ containing structures aligned along multiple orientations (**Figure 10** (a)). Threads are arranged in a net with knots and 4-way junctions. The mesh was large to ensure that the branches could be resolved in the rotate-translate mode regardless of their orientation.

Figure 10 (a) shows a photographic top-view of the net and **Figure 10** (b) displays the MAP US image along the z-axis for a steered transmit at $\Delta\alpha_2$. The two images correspond well, and both the knots and the branches can be identified in the MAP US image. The threads appear continuous even if a local amplitude heterogeneity is visible along the threads with orientations having a significant x-component. This may be linked to randomly distributed microbubbles trapped on the thread. For the junctions, mostly oriented along the y-axis, the lower FWHMy may smooth the reconstruction. The continuity of the threads is also visible on the MAP images along the y-axis (**Figure 10** (d)) and the x-axis (**Figure 10** (e)). As for **Figure 5**, the amplitude decreases with the increasing z coordinate, but the amplitude does not strongly depend on the orientation of the thread.

Figure 10 (c) and (f) present MAP images corresponding to a translate-only acquisition performed for Ph4 just after the rotate translate acquisition. In the translation-only mode, the resolution along the x axis is degraded throughout the entire imaged volume. This result was expected from 3.2, and it results in smearing and overlapping between the images of some threads (blue arrow in **Figure 10** (c)). The threads also appear discontinuous with bright and dark spots in the translation mode (pink arrows in **Figure 10** (c) and (f)). Video S2 further demonstrates the higher 3D image quality with the rotate-translate mode compared to the translate-only mode.

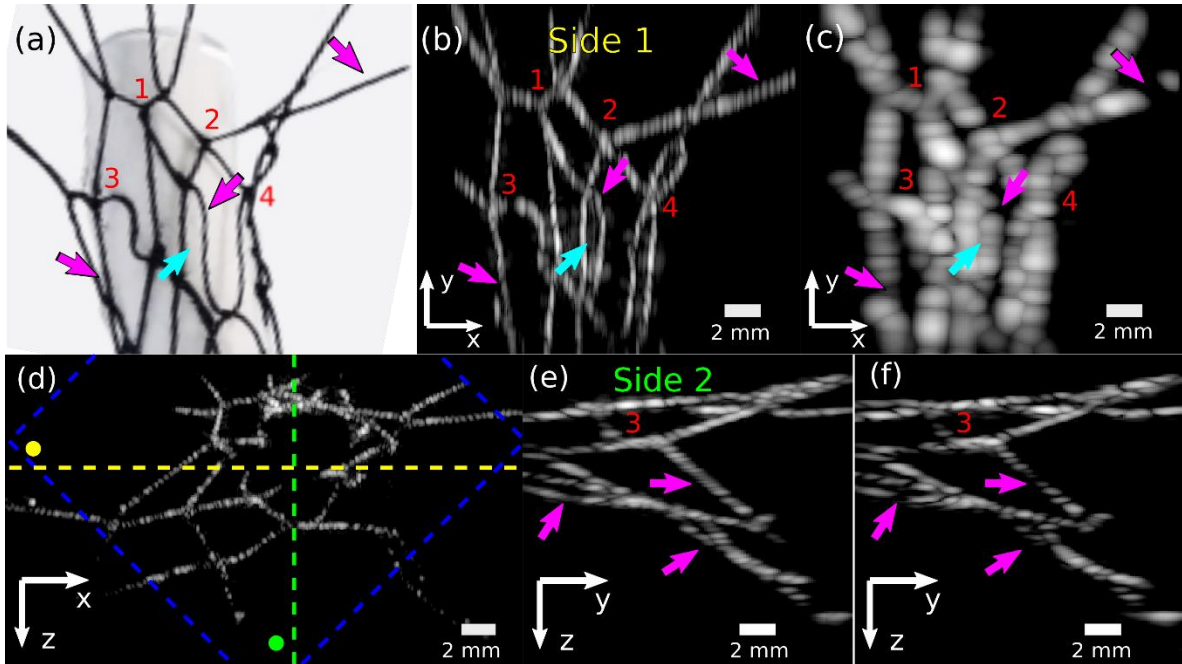


Figure 10. Images of a 3-D net. (a) Optical picture of the top of Ph4. A paper cylinder was inserted in the net to mask the lower part; (b), (d) and (e) display a volumetric image of Ph4 for a rotate-translate scan at Δa_2 with a steered transmit; (b) MAP image along z-axis of the top part of the volumetric image (part of the volume with z-coordinates smaller than the yellow dotted line in (d)); (d) MAP image along y-axis; (e) MAP image along x-axis of the left part of the volume (part of the volume with x-coordinates smaller than the green dotted line in (d)). The voxels outside of the DSCA were discarded for the MAP for (b) and (e); (c) and (f) display images extracted from the volumetric rendering of Ph4 for a translation-only scan, (c) MAP image along z-axis for the same volume as (b); (f) MAP image along x-axis for the same volume as (e); The colorscale for (b)-(f) is between -30 and 0 dB. Knots are identified with numbers that serve as landmarks. Pink arrows indicate threads that appear discontinuous in the image for the translation-only scan and are better mapped with the rotate-translate scan.

4. Discussion

We experimentally investigated the performance of a synthetic-aperture rotate-translate approach for volumetric US imaging with a linear ultrasound array. In the elevation direction of the array, this approach demonstrated the synthesis of an angular aperture several times larger than the aperture provided by the native elevation focus of the array. The aperture was increased by a factor of 5 and a Hamming apodization was implemented. As a result, the elevation resolution was improved by a factor 3 compared to a translate scanning approach. Moreover, the aperture synthesis in the elevation plane was obtained over a large area (the DSCA): an area of 4,5 cm² was covered here with a translation range of 3 cm. The elevation resolution was confirmed to be homogeneous in this area. Therefore, the rotate-translate scan was shown to yield superior image quality compared with a translation scan.

To the best of our knowledge, this study is the first demonstration that 3-D ultrasound imaging can be performed with a rotate-translate scanning scheme combined with coherent compounding. A similar scanning approach had previously been proposed for photoacoustic (PA) tomography [20]. However, the ultrasound sources in PA imaging are the illuminated optical absorbers. For PA imaging the transducer is scanned to a different orientation after each laser pulse to receive the ultrasound wavefield generated by absorbers in the medium. For US imaging, the ultrasound waves are both emitted and captured by the scanned US transducer array. As a consequence, the backscattered echoes from different orientations of the exciting US beam need to be recombined coherently to generate a high-quality image. This concept has been extensively used for plane-wave ultrasound imaging [8] and synthetic aperture imaging [31] with a fixed transducer array. However, in this case, the field-of-view and the accessible orientations are limited by the number and geometrical properties of the elements of the array. Coherent compounding was also recently shown for 2-D imaging using multiple transducer arrays with different orientations [32] or a rotation scan of an array [33]. Such approaches increase the angular aperture and

the lateral resolution but the transducer arrays were always oriented within the same imaging plane. Similar results were obtained in 2-D PA imaging [34]. Here, we performed 3-D synthetic-aperture scanning by applying coherent compounding from tomographic positions of the array with both different angular elevation orientations and different elevation spatial positions. Additionally, we combined the coherent summing of echoes obtained from different tomographic positions with the summing of echoes from beams electronically steered to different angles. For each steered angle, a dataset with the same translation and angular sampling periods was recorded. The steered angles were chosen to ensure uncorrelated transmitted wave-vectors. As a consequence, the coherent summation over all the steered angles during the reconstruction process reinforced coherent echoes and reduced incoherent noise which led to image contrast enhancement.

The proposed rotate-translate scanning scheme is novel for 3-D US imaging. Furthermore, since both PA and US imaging use the same detector, acquisition parameters optimized for one imaging modality can be applied directly to the other. We benefited from previous innovations in rotate-translate PA tomography such as continuous scanning [35] that showed a reduction in the scan duration. We further reduced the scan duration by more fully assessing the needs in terms of angular sampling. Two main improvements were made to angular scanning: 1) the angular spacing was chosen based on the elevation focusing of the array and 2) a spatial density taper was applied. The smallest angular period considered here $\Delta\alpha_3$ is 3 times larger than the angular period in [20]: $\lambda_c/F = 0,7^\circ$. Therefore, the optimization of the angular spacing reduces the number of tomographic positions by at least a factor of 3. Additionally, the spatial density taper reduced the number of tomographic positions by about 40% and reduced side lobes of the PSF in the elevation plane without any additional amplitude apodization. Indeed, strong side lobes are expected at $\pm 45^\circ$ with no apodization, but due to the spatial density taper used here they were not stronger at 45° than at 0° (**Figure 8 (b)**). Finally, the total number of tomographic positions was thus reduced by at least by a factor 5 (80% decrease) relative to the number previously reported in [20].

Three different angular periods $\Delta\alpha_1 \approx 8^\circ$, $\Delta\alpha_2 \approx 4^\circ$ and $\Delta\alpha_3 \approx 2^\circ$ were tested. The number of tomographic positions and the scan duration increase by a factor two when the angular period is divided by two (**Table 1**). Metrics were computed to evaluate the impact of the angular sampling period on the image quality. We found that $\Delta\alpha_1$ leads to a significant degradation of the FWHM resolution along the x -axis compared to $\Delta\alpha_2$ and $\Delta\alpha_3$. Therefore, $\Delta\alpha_1$ was determined to be too loose to prevent side lobes from degrading the main lobe of the PSF. The cystic resolution and the contrast on the edge of an anechoic region were also improved with the decreasing angular period. For the angular sampling $\Delta\alpha_2$, we performed acquisitions in straight transmit mode and in steered transmit mode. Interestingly, both contrast measurements improved with the addition of steered angles, while the angular sampling was the same. We can explain this result by the enhanced spatial averaging of the “diffraction noise” when steered transmits are performed. Moreover, the contrast parameters (C_c and C_0) were found to be similar with the angular sampling $\Delta\alpha_2$ in steered transmit and with $\Delta\alpha_3$ in straight transmit. The steered transmit does not modify the acquisition duration but does substantially increase the size of the dataset, while the scan duration at $\Delta\alpha_2$ is half that at $\Delta\alpha_3$. Therefore, a gain in the image quality can effectively be made without compromising the acquisition duration by the addition of a steered transmit. A systematic evaluation of the contrast for different numbers of steered angles is beyond the scope of this paper, but is of great interest for our rotate-translate system and will be considered in future studies. The angular periods $\Delta\alpha_2$ and $\Delta\alpha_3$ will also be implemented in PA tomography. As the tomographic system is implemented with a programmable ultrasound machine that can record US waves upon the arrival of a trigger pulse, PA tomography sequences with a pulsed laser could be implemented during scans. The interlacing of PA and US acquisitions will be investigated in future studies for simultaneous PA and US 3D imaging of the same volume with the scanner. Additional strategies such as tissue harmonic coherent compound imaging using advanced US sequences to isolate non-linear echoes [36, 37] and the use of contrast agents could be integrated within the tomographic system in the future to further improve US image contrast and specificity. Because of the scan duration, it is expected that contrast agents that could be retained within biological tissue would work best such as targeted microbubbles [38] or nanodroplets converted to microbubbles upon optical [39,40] or ultrasound [41] activation. Feasibility has been shown, for example, to optically activate microbubbles from

nanodroplets that are detectable with PA imaging so that, with the choice of appropriate dual-modality contrast agents PA and US can be used together to characterize agent arrival and delivery [40].

The system was developed with a single-side access for an accessibility to various body parts. The scan duration is also a crucial point for *in vivo* application, clinical or preclinical. Long acquisitions may cause discomfort and tissue motion that can cause image blurring. As mentioned above, the number of tomographic positions was already reduced by adjusting the spatial sampling. But the acquisition duration is the number of tomographic positions multiplied by the acquisition rate. With the ultrasound machine used in this study, the acquisition rate could be in the kHz range. Currently, we limited the acquisition rate to 50 Hz because of the maximum acceleration of the rotation stage (see section 2.3.2). The acquisition duration could then be greatly reduced with a faster rotation stage such as one with a magnetic motor. With our worm gear motor, we achieved a scan duration of 10 seconds for a 9 cm³ volume. This acquisition time is smaller compared to other rotate-translate scanning schemes that have been applied *in vivo* in PA tomography [42] and for incoherent spatial compounding of Doppler data [43,44]. Although these studies map functional information and not only pulse-echo US imaging, they give a reference for *in vivo* acquisition duration. Li et al [42] performed multispectral PA tomographic acquisitions in 12 minutes. For 3D Doppler tomography with incoherent compounding of Doppler images, reported acquisition times were of 15-20 min [43,44]. To avoid blurring due to respiratory motion, acquisition methods such as respiratory gating, i.e. acquisition only during the respiratory pause, can be considered. A weak oversampling can be applied to compensate for missing tomographic positions. With a current acquisition duration of 10 s for a 9 cm³ imaged volume (in the DSCA) in the steered transmit mode and a reconstruction duration of 95 s (**Table 1**), the scanning system can currently achieve a volumetric imaging rate of 0.57 volumes/min. The reconstruction duration could be further accelerated with a high-end GPU unit. However, even if the acquisition rate between tomographic positions was set in the kHz range, which is the maximum rate given the ultrasound propagation time and the ultrasound hardware, the full-volume acquisition duration will still be on the order of one second in the steered transmit mode. Therefore, real-time volumetric imaging (> 5 volume/s [4]) would only be achievable with degraded image quality (rotate-translate scan in the straight transmit mode and with $\Delta\alpha \geq \Delta\alpha_2$ or a translate-only scan). Such an approach could be used to position the volume of interest in the DSCA with a real-time display prior to a higher quality image acquisition.

Finally, the developed scanning method is applicable to a broad range of already-available US arrays. The scan parameters best-adapted for each array can be calculated based on its geometrical properties and the center frequency. Moreover, the one-side access design and the home-made (3-D printed) holder make the system easily adaptable to any kind of available probes. Although the feasibility was demonstrated with a 5-MHz ultrasound array, the method is of great interest for higher frequencies within the range of medical ultrasound (> 15 MHz), in particular to improve the sensitivity to smaller tissue scatterers and the resolution compared to low frequencies. For applications and ultrasound acquisition modes that do not require high frame rate imaging, we believe that our 3-D synthetic-aperture rotate-translate scanning method could greatly enhance the capacity of 3D biomedical ultrasound imaging without the complex development of new transducer arrays. Among clinical applications for which 3D ultrasonography has already been shown to be of high interest, our approach could specifically benefit those requiring a high contrast and resolution such as quantification of carotid atherosclerosis [45] and use of musculoskeletal ultrasonography to assess rheumatoid arthritis [4,46]. Additionally, we expect that our 3D scanning method will help longitudinal monitoring of pathological tissues for which high quality volumetric images are crucial for image processing and for accurate comparison of images acquired at different points in time.

5. Conclusions

We demonstrated here that a clinical ultrasound linear array designed for 2-D imaging can be used to obtain high resolution and contrast volumetric US images with a 3-D synthetic-aperture scanning method. We developed and experimentally implemented an advanced scanning scheme combining rotation and translation motions of the array. The angular sampling period was adjusted and tapered to optimize the scan duration without compromising the image quality. An acquisition duration of 10 s was achieved for a volume of 9 cm³. The image contrast was further enhanced by the addition of electronically steered exciting beams. The method is expected to benefit applications that require high image quality but a relatively low volumetric scanning rate such as longitudinal monitoring of pathological tissues.

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/xxx/s1, Video S1: Video of the experimental set-up showing the motion of the stages for an acquisition performed at $\Delta\alpha\approx 4^\circ$ with $L = 30\text{mm}$. Video S2: 3-D volume images of the net presented in **Figure 10** compared for the scan performed using the rotate-translate geometry (left) and the scan performed with translation only (right). Rotating maximum amplitude projection images around an arbitrarily selected z axis are displayed with a 10 deg angle between the projections. The grayscale display is between -30 and 0 dB for both images. The image display was obtained with the 3-D project option of the software ImageJ [47]. Figure S1: US images of Ph 1 performed with different translation ranges L . **(a)** Optical picture showing the spatial distribution of microspheres. **(b) to (d)** Maximum-amplitude projection (MAP) images along the y -axis for $L = 30, 20$ and 10 mm, respectively. This figure displays the full-size MAP images of **Figure 4** (c) and (d).

Author Contributions: Conceptualization, J.G.; methodology and investigation, T.L., I.Q and J.G.; software, T.L., I.Q and J.G.; validation, T.L., I.Q., L.B. and J.G.; formal analysis, I.Q. and J.G.; writing—original draft preparation, T.L., I.Q and J.G; writing—review and editing, L.B.; supervision, L.B.; project administration, J.G.; funding acquisition, J.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the MITI CNRS (Defi Imag'IN 2017-2018), Gefluc Paris- Ile de France (2017) and Sorbonne Université (Emergence 2019-2020). This work was performed by a laboratory member of France Life Imaging network (grant ANR-11-INBS-0006).

Acknowledgments: Isabelle Quidu thanks the Université de Bretagne Occidentale for their support to the 12-month visiting stay (Congés pour Recherches ou Conversions Thématiques) at the Laboratoire d'Imagerie Biomédicale from September 2019. The authors thank the Life Imaging Facility of Paris Descartes University (Plateforme Imageries du Vivant – PIV) for their technical support and fruitful discussions.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

Appendix A

In appendix A, we give details about the reconstruction algorithm. In particular, how we computed: 1) the two-way travel times between the US transducers and the center of each imaged voxel and 2) the apodization windows.

The 3-D image voxel grid is defined in the fixed coordinate system $(O, \mathbf{e}_x, \mathbf{e}_y, \mathbf{e}_z)$ presented in **Figure 1(b)**. In the xz -plane, the origin O corresponds to the rotation axis when $l_{trans} = 0$. Along the y -axis, O corresponds to the center of the active array aperture. The mobile Cartesian coordinate system $(O_a, \mathbf{u}, \mathbf{v}, \mathbf{w})$ is attached to the transducer array (**Figure 1(a)**). In 3-D, the origin O_a is set to the center of the array, and the elements of the array are uniformly distributed along the v -axis. For computation of the ultrasound pulse travel times, transformation from $(O_a, \mathbf{u}, \mathbf{v}, \mathbf{w})$ to $(O, \mathbf{e}_x, \mathbf{e}_y, \mathbf{e}_z)$ is performed in two steps. First, the coordinates of the basis $(\mathbf{u}, \mathbf{v}, \mathbf{w})$ are computed by taking into account potential misalignments of \mathbf{v} with \mathbf{e}_y and the rotation angle α_{rot} . Then, the coordinates of O_a in $(O, \mathbf{e}_x, \mathbf{e}_y, \mathbf{e}_z)$ are computed given a possible mismatch between O_a and O when $l_{trans} = 0$ and $\alpha_{rot} = 0$, the rotation angle α_{rot} , and the signed translation length l_{trans} . Misalignment parameters were determined with a calibration process: a known object (thread) was imaged and parameters were adjusted to maximize the amplitude of the reconstructed image.

For the pathway from the US array to the voxel, we assume that cylindrical waves are emitted. The distance between the emitting axis and the center P of one voxel is computed and divided by the speed of sound to get the travel time. The location of the emitting axis depends on the tomographic position and the steering angle γ_{st} . For the straight transmit ($\gamma_{st}=0$), the emitting axis is the v -axis. For $\gamma_{st} \neq 0$, the first firing element (at one edge of the emitting aperture) stays on the emitting axis, but the direction of the axis is rotated by γ_{st} around \mathbf{u} . The u -coordinate of P in the mobile coordinate system is computed and compared with d_u (**Figure 1 (b)**) to implement the apodization detailed in section 2.2. This apodization accounts for the focusing of the transducer elements in the elevation direction (u -axis) by limiting the contribution of the signals to a slice of width $2*d_u$, which is taken to be equal to the pulse-echo -12 dB full width of the ultrasound beam [21] (section 2.2.). This slice width is then related to the angular aperture β by the equation $d_u = 0.3* \lambda_c / \tan(\beta)$. For the pathway from the voxel to the US array,

we assume that the echo is a spherical wave emitted by P and detected by point detectors located at the center of each element of the array.

For each tomographic position, a dynamic aperture approach was implemented to keep the angle of acceptance in the lateral direction (along the v -axis) as constant as possible and thereby obtain a homogenous resolution in the e_y -direction for all the points in the 3D image [48]. A lateral f-number of 1.3 was considered. It corresponds to the ratio between the elevation focus of the array F and the reception aperture (64 elements), and to a compromise between the resolution value and its homogeneity. This dynamic aperture was apodized with a Hamming window to avoid strong side lobes.

From all the tomographic positions of the transducer during the experimental implementation of scanning, we discarded positions outside of the translation limits of the theoretical scanning scheme, such as from B to C in **Figure 3**. For the remaining positions (**Figure 3**), we applied weights equal to the actual velocity divided by the targeted velocity of equation (3). This apodization avoids higher amplitudes on the edge of the imaged area (**Figure 1(c)**).

The reconstruction algorithm was coded in CUDA and executed on GPU.

Appendix B

In appendix B, we explain the theoretical basis for choosing the angular sampling periods $\Delta\alpha$ for the rotate-translate scan. The translation period for the rotate-translate scan was set to $\Delta l = H$ as discussed in section 2.2. Additionally, we justify the translation sampling period chosen for the benchmark translation-only scan.

For the rotate-translate scan, the angular sampling problem is related to two different configurations: sampling for a circular ring array [22] and linear sampling with finite size transducers [24]. First, Simonetti *et al* [22] derived a spatial sampling criterion for imaging objects within a circular array comprised of point transducers deployed over the entire circular aperture. In such a case, the angular sampling period $\Delta\alpha$ depends on the maximal radial dimension r of the imaged object and should be adjusted so that $\Delta\alpha < \lambda_c / (2*r)$ to reject grating lobes outside of the imaged area. λ_c is the wavelength at the center frequency of the transducer. There is no fixed center of rotation in the coordinate system (O, e_x , e_y , e_z) in our synthetic rotation array, however we may consider that the rotation occurs around each point in the imaged area and, due to the amplitude masks in the reconstruction process, r could be replaced by $d_u = 0.6 * \lambda_c * \text{f-number}$. In this case, the sampling criterion would be $\Delta\alpha < 1/(1.2 * \text{f-number})$. This solution is independent of λ_c . Second, Cox *et al* [24] note that the finite size of a transducer element acts as a low-pass spatial filter reducing the Nyquist-Shannon frequency compared to point detectors. For a synthetic planar array comprised of disk transducers of radius a , Cox *et al* showed that an analysis in the spatial Fourier space leads to a sampling frequency equal to $a/4$, as opposed to the sampling frequency of $\lambda_c / 2$ that would be required for point detectors [24]. We apply similar reasoning. The angular aperture of the transducer is $[-\beta, \beta]$ with $\beta = \text{atan}(D/(2*F)) \approx 1/(2 * \text{f-number})$ (**Figure 1 (a)**). Therefore, in the Fourier space, the maximum angular frequency can be considered to be equal to $1/(2*\beta)$. Thus, the minimum angular sampling frequency can be set to $1/\beta$, and $\Delta\alpha \leq \beta$. This solution is also independent of λ_c . and, it is more restrictive than the criterion based on the circular array. However, in order to be sure to discard any aliasing effects, the maximum angular frequency can be considered as equal to $1/\beta$ or $2/\beta$. These frequencies lead to angular sampling periods equal to $\Delta\alpha = \beta/2$ and $\Delta\alpha = \beta/4$, respectively.

For the scans using only a translation, we applied the criterion based on the analysis developed for linear sampling with finite size transducers [24]. For our focused transducer, we considered that the transducer could be modeled as a segment of length H located at the focus where H is the two-way FWHM of the ultrasound beam. Therefore, an appropriate sampling period for translation is $\Delta l = H/8$ [24].

References

1. Fenster, A.; Downey, D.B.; Cardinal, H.N. Three-dimensional ultrasound imaging. *Phys. Med. Biol.* **2001**, *46*, R67–R99, doi:10.1088/0031-9155/46/5/201.
2. Fenster, A.; Parraga, G.; Bax, J. Three-dimensional ultrasound scanning. *Interface Focus* **2011**, *1*, 503–519,

doi:10.1098/rsfs.2011.0019.

3. Roh, Y. Ultrasonic transducers for medical volumetric imaging. *Jpn. J. Appl. Phys.* **2014**, *53*, 07KA01, doi:10.7567/JJAP.53.07KA01.
4. Huang, Q.; Zeng, Z. A Review on Real-Time 3D Ultrasound Imaging Technology. *Biomed Res. Int.* **2017**, *2017*, doi:10.1155/2017/6027029.
5. Morgan, M.R.; Broder, J.S.; Dahl, J.J.; Herickhoff, C.D. Versatile Low-Cost Volumetric 3-D Ultrasound Platform for Existing Clinical 2-D Systems. *IEEE Trans. Med. Imaging* **2018**, *37*, 2248–2256, doi:10.1109/TMI.2018.2821901.
6. Mozaffari, M.H.; Lee, W.S. Freehand 3-D Ultrasound Imaging: A Systematic Review. *Ultrasound Med. Biol.* **2017**, *43*, 2099–2124, doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2017.06.009.
7. Rohling, R.N.; Gee, A.H.; Berman, L. Automatic registration of 3-D ultrasound images. *Ultrasound Med. Biol.* **1998**, *24*, 841–854, doi:10.1016/S0301-5629(97)00210-X.
8. Montaldo, G.; Tanter, M.; Bercoff, J.; Benech, N.; Fink, M. Coherent plane-wave compounding for very high frame rate ultrasonography and transient elastography. *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* **2009**, *56*, 489–506, doi:10.1109/TUFFC.2009.1067.
9. Chi Hyung Seo; Yen, J.T. A 256 × 256 2-D array transducer with row-column addressing for 3-D rectilinear imaging. *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* **2009**, *56*, 837–847, doi:10.1109/TUFFC.2009.1107.
10. Wygant, I.O.; Zhuang, X.; Yeh, D.T.; Oralkan, Ö.; Ergun, A.S.; Karaman, M.; Khuri-Yakub, B.T. Integration of 2D CMUT arrays with front-end electronics for volumetric ultrasound imaging. *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* **2008**, *55*, 327–341, doi:10.1109/TUFFC.2008.652.
11. Provost, J.; Papadacci, C.; Arango, J.E.; Imbault, M.; Fink, M.; Gennisson, J.L.; Tanter, M.; Pernot, M. 3D ultrafast ultrasound imaging in vivo. *Phys. Med. Biol.* **2014**, *59*, L1–L13, doi:10.1088/0031-9155/59/19/L1.
12. Ramalli, A.; Boni, E.; Savoia, A.S.; Tortoli, P. Density-tapered spiral arrays for ultrasound 3-D imaging. *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* **2015**, *62*, 1580–1588, doi:10.1109/TUFFC.2015.007035.
13. Rasmussen, M.; Jensen, J. Comparison of 3-D synthetic aperture phased-array ultrasound imaging and parallel beamforming. *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* **2014**, *61*, 1638–1650, doi:10.1109/TUFFC.2014.006345.
14. Rasmussen, M.F.; Hansen, J.M.M.; Férin, G.; Dufait, R.; Jensen, J.A. Preliminary comparison of 3D synthetic aperture imaging with ExploScan. *Med. Imaging 2012 Ultrason. Imaging, Tomogr. Ther.* **2012**, *8320*, 8320F, doi:10.1117/12.913925.
15. Provost, J.; Papadacci, C.; Demene, C.; Gennisson, J.L.; Tanter, M.; Pernot, M. 3-D ultrafast doppler imaging applied to the noninvasive mapping of blood vessels in Vivo. *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* **2015**, *62*, 1467–1472, doi:10.1109/TUFFC.2015.007032.
16. Heiles, B.; Correia, M.; Hingot, V.; Pernot, M.; Provost, J.; Tanter, M.; Couture, O. Ultrafast 3D Ultrasound Localization Microscopy Using a 32 × 32 Matrix Array. *IEEE Trans. Med. Imaging* **2019**, *38*, 2005–2015, doi:10.1109/TMI.2018.2890358.
17. Nikolov, S.I.; Jensen, J.A. 3D synthetic aperture imaging using a virtual source element in the elevation plane. *Proc. IEEE Ultrason. Symp.* **2000**, *2*, 1743–1747, doi:10.1109/ultsym.2000.921659.
18. Nikolov, S.I.; Jensen, J.A.; Dufait, R.; Schoisswohl, A. Three-dimensional real-time synthetic aperture imaging using a rotating phased array transducer. In Proceedings of the 2002 IEEE Ultrasonics Symposium, 2002. Proceedings.; IEEE, 2002; Vol. 2, pp. 1585–1588.
19. Andresen, H.; Nikolov, S.I.; Pedersen, M.M.; Buckton, D.; Jensen, J.A. Three-dimensional synthetic aperture focusing using a rocking convex array transducer. *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* **2010**, *57*, 1051–1063, doi:10.1109/TUFFC.2010.1517.

20. Gateau, J.; Gesnik, M.; Chassot, J.-M.; Bossy, E. Single-side access, isotropic resolution, and multispectral three-dimensional photoacoustic imaging with rotate-translate scanning of ultrasonic detector array. *J. Biomed. Opt.* **2015**, *20*, 056004, doi:10.1117/1.JBO.20.5.056004.
21. Szabo, T.L. Advances in transducers and techniques for diagnostic ultrasound. *J. Phys. Conf. Ser.* **2004**, *1*, 3–10, doi:10.1088/1742-6596/1/1/003.
22. Simonetti, F.; Huang, L.; Duric, N. On the spatial sampling of wave fields with circular ring apertures. *J. Appl. Phys.* **2007**, *101*, doi:10.1063/1.2717086.
23. O'Brien, W.D. Ultrasound-biophysics mechanisms. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **2007**, *93*, 212–255, doi:10.1016/j.pbiomolbio.2006.07.010.
24. Cox, B.T.; Arridge, S.R.; Beard, P.C. Photoacoustic tomography with a limited-aperture planar sensor and a reverberant cavity. *Inverse Probl.* **2007**, *23*, S95–S112, doi:10.1088/0266-5611/23/6/S08.
25. Bucci, O.M.; D'Urso, M.; Isernia, T.; Angeletti, P.; Toso, G. Deterministic synthesis of uniform amplitude sparse arrays via new density taper techniques. *IEEE Trans. Antennas Propag.* **2010**, *58*, 1949–1958, doi:10.1109/TAP.2010.2046831.
26. Tanter, M.; Fink, M. Ultrafast imaging in biomedical ultrasound. *Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control. IEEE Trans.* **2014**, *61*, 102–119, doi:10.1109/tuffc.2014.6689779.
27. Gateau, J.; Chekkoury, A.; Ntziachristos, V. High-resolution optoacoustic mesoscopy with a 24 MHz multidetector translate-rotate scanner. *J. Biomed. Opt.* **2013**, *18*, 106005, doi:10.1117/1.JBO.18.10.106005.
28. Vilkomerson, D.; Greenleaf, J.; Dutt, V. Towards a resolution metric for medical ultrasonic imaging. *Proc. IEEE Ultrason. Symp.* **1995**, *2*, 1405–1410, doi:10.1109/ultsym.1995.495818.
29. Ranganathan, K.; Walker, W.F. Cystic resolution: A performance metric for ultrasound imaging systems. *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* **2007**, *54*, 782–792, doi:10.1109/TUFFC.2007.311.
30. Rodriguez-Molares, A.; Rindal, O.M.H.; D'Hooge, J.; Masoy, S.E.; Austeng, A.; Lediju Bell, M.A.; Torp, H. The Generalized Contrast-to-Noise Ratio: A Formal Definition for Lesion Detectability. *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* **2020**, *67*, 745–759, doi:10.1109/TUFFC.2019.2956855.
31. Jensen, J.A.; Nikolov, S.I.; Gammelmark, K.L.; Pedersen, M.H. Synthetic aperture ultrasound imaging. *Ultrasonics* **2006**, *44 Suppl 1*, e5–e15, doi:10.1016/j.ultras.2006.07.017.
32. Peralta, L.; Gomez, A.; Luan, Y.; Kim, B.; Hajnal, J. V.; Eckersley, R.J. Coherent Multi-Transducer Ultrasound Imaging. *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* **2019**, *66*, 1316–1330, doi:10.1109/TUFFC.2019.2921103.
33. Bottenus, N.; Long, W.; Zhang, H.K.; Jakovljevic, M.; Bradway, D.P.; Boctor, E.M.; Trahey, G.E. Feasibility of Swept Synthetic Aperture Ultrasound Imaging. *IEEE Trans. Med. Imaging* **2016**, *35*, 1676–1685, doi:10.1109/TMI.2016.2524992.
34. Zhang, P.; Li, L.; Lin, L.; Hu, P.; Shi, J.; He, Y.; Zhu, L.; Zhou, Y.; Wang, L. V. High-resolution deep functional imaging of the whole mouse brain by photoacoustic computed tomography in vivo. *J. Biophotonics* **2018**, *11*, e201700024, doi:10.1002/jbio.201700024.
35. Gateau, J.; Chekkoury, A.; Ntziachristos, V. High-resolution optoacoustic mesoscopy with a 24MHz multidetector translate-rotate scanner. *J. Biomed. Opt.* **2013**, *18*, doi:10.1117/1.JBO.18.10.106005.
36. Hemmsen, M.C.; Rasmussen, J.H.; Jensen, J.A. Tissue harmonic synthetic aperture ultrasound imaging. *J. Acoust. Soc. Am.* **2014**, *136*, 2050–2056, doi:10.1121/1.4893902.
37. Correia, M.; Provost, J.; Chatelin, S.; Villemain, O.; Tanter, M.; Pernot, M. Ultrafast Harmonic Coherent Compound (UHCC) Imaging for High Frame Rate Echocardiography and Shear-Wave Elastography. *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* **2016**, *63*, 420–431, doi:10.1109/TUFFC.2016.2530408.
38. Kaufmann, B.A.; Lindner, J.R. Molecular imaging with targeted contrast ultrasound. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2007**, *18*, 11–16, doi:10.1016/j.copbio.2007.01.004.

39. Fernandes, D.A.; Kolios, M.C. Near-infrared absorbing nanoemulsions as nonlinear ultrasound contrast agents for cancer theranostics. *J. Mol. Liq.* **2019**, *287*, 110848, doi:10.1016/j.molliq.2019.04.125.
40. Fernandes, D.A.; Kolios, M.C. Intrinsically absorbing photoacoustic and ultrasound contrast agents for cancer therapy and imaging. *Nanotechnology* **2018**, *29*, 505103, doi:10.1088/1361-6528/aadfb.
41. Lin, C.-Y.; Pitt, W.G. Acoustic Droplet Vaporization in Biology and Medicine. *Biomed Res. Int.* **2013**, *2013*, 1–13, doi:10.1155/2013/404361.
42. Li, J.; Chekkoury, A.; Prakash, J.; Glasl, S.; Vetschera, P.; Koberstein-Schwarz, B.; Olefir, I.; Gujrati, V.; Omar, M.; Ntziachristos, V. Spatial heterogeneity of oxygenation and haemodynamics in breast cancer resolved in vivo by conical multispectral optoacoustic mesoscopy. *Light Sci. Appl.* **2020**, *9*, doi:10.1038/s41377-020-0295-y.
43. Demené, C.; Tiran, E.; Sieu, L.A.; Bergel, A.; Gennisson, J.L.; Pernot, M.; Defieux, T.; Cohen, I.; Tanter, M. 4D microvascular imaging based on ultrafast Doppler tomography. *Neuroimage* **2016**, *127*, 472–483, doi:10.1016/j.neuroimage.2015.11.014.
44. Provost, J.; Garofalakis, A.; Sourdon, J.; Bouda, D.; Berthon, B.; Viel, T.; Perez-Liva, M.; Lussey-Lepoutre, C.; Favier, J.; Correia, M.; et al. Simultaneous positron emission tomography and ultrafast ultrasound for hybrid molecular, anatomical and functional imaging. *Nat. Biomed. Eng.* **2018**, *2*, 85–94, doi:10.1038/s41551-018-0188-z.
45. Cires-Drouet, R.S.; Mozafarian, M.; Ali, A.; Sikdar, S.; Lal, B.K. Imaging of high-risk carotid plaques: ultrasound. *Semin. Vasc. Surg.* **2017**, *30*, 44–53, doi:10.1053/j.semvascsurg.2017.04.010.
46. Naredo, E.; Möller, I.; Acebes, C.; Batlle-Gualda, E.; Brito, E.; De Agustín, J.J.; De Miguel, E.; Martínez, A.; Mayordomo, L.; Moragues, C.; et al. Three-dimensional volumetric ultrasonography. Does it improve reliability of musculoskeletal ultrasound? *Clin. Exp. Rheumatol.* **2010**, *28*, 79–82.
47. Schneider, C.A.; Rasband, W.S.; Eliceiri, K.W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* **2012**, *9*, 671–675, doi:10.1038/nmeth.2089.
48. Gateau, J.; Caballero, M.A.A.; Dima, A.; Ntziachristos, V. Three-dimensional optoacoustic tomography using a conventional ultrasound linear detector array: whole-body tomographic system for small animals. *Med. Phys.* **2013**, *40*, 013302, doi:10.1118/1.4770292.



© 2020 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Conclusion

Les principales contributions de ce travail se décomposent en quatre points. Le premier est l'exposition des équations régissant la photoacoustique et la photothermie tout en faisant le lien entre elles. Le second est la proposition de méthodologies de caractérisation d'agents photothermiques et/ou photoacoustiques se basant sur les équations thermodynamiques de la photothermie et les équations photoacoustiques. Le troisième concerne l'application de ces outils à des particules innovante développés en parallèle de mes travaux de thèses. Ces particules ont été développées avec diverses caractéristiques comme la synthèse en agrégats, des tailles différentes, et des combinaisons de différents matériaux. L'objectifs est de déterminer la possibilité de ces particules à devenir des APT. Enfin, le quatrième est la proposition de nouvelles méthodes d'imagerie 3D permettant le passage dans l'étude In vivo.

Le premier chapitre de cette thèse a permis de présenter les techniques d'imagerie photoacoustique et de thérapie photothermique ainsi que les principes physiques qui les régissent. Nous avons expliqué les phénomènes d'interaction entre la lumière et les agents photothermiques tels que la diffusion, l'absorption et l'extinction qui se produisent lors de ces techniques. Nous avons également décrit les propriétés optiques nécessaires pour que les agents photothermiques soient efficaces, ainsi que leur mécanisme d'internalisation dans les cellules cancéreuses. Enfin, nous avons mentionné la nigrosine qui a un potentiel élevé de devenir une référence en raison de son efficacité de conversion de la lumière en chaleur de 100%. Ce chapitre nous a permis de comprendre les fondements de ces techniques innovantes et de leur potentiel en médecine et biologie.

Nous avons présenté et validé, dans le chapitre 2, une méthode pour réaliser une mesure spectrométrique photoacoustique calibrée dans la plage de longueur d'onde de 680 à 970 nm avec un système PAI. Ce montage permet de mesurer un coefficient d'absorption photoacoustique en unités spectroscopiques. La comparaison entre les spectres obtenus et le spectre d'atténuation (UV-Vis) est utilisée pour étudier le lien entre les propriétés optiques et photothermiques d'un échantillon lors d'une illumination impulsionnelle.

Dans le chapitre 3, nous avons proposé différents systèmes de mesure pour la caractérisation des agents pour la thérapie photothermique. Le second montage est un montage photothermique in vitro qui permet de caractériser un échantillon thermiquement avec des illuminations continues. La mesure de température donne des informations sur la capacité à déployer de la chaleur de manière optique.

Dans le quatrième chapitre, nous nous sommes intéressés à plusieurs particules complexes en vue de les comparer entre elles. Les différentes méthodes des chapitres 2 et 3 ont été appliquées à des particules conçues au cours ou avant ma thèse, pour lesquelles une efficacité photothermique était espérée. Les résultats ont montré que les propriétés comme la taille, les matériaux utilisés, la distance interarticulaire ou la combinaison de différents matériau de nanoparticules ont une influence sur leur capacité à absorber la lumière et à convertir cette énergie en chaleur. Ils ont également montré qu'il est difficile de prévoir à l'avance l'efficacité d'une nouvelle particule et qu'il est donc nécessaire de procéder à des mesures quantitatives pour confirmer ou infirmer les attentes. Il est important de prendre en compte ces caractérisations pour choisir les meilleurs agents pour la photothermie. La photoacoustique a

été utilisée pour évaluer l'absorption des nanoparticules et pour mieux comprendre les propriétés des nanoparticules utilisées en photothermie.

Dans le chapitre 5, nous avons présenté et validé une méthode qui permet de réaliser une imagerie ultrasonore 3D de haute qualité en utilisant une approche de balayage combinant un mouvement de translation-rotation. Elle augmente l'ouverture angulaire et la résolution spatiale dans la direction d'élévation par rapport aux approches traditionnelles et peut être utilisée en combinaison avec d'autres modalités d'imagerie telles que la photoacoustique. Les résultats de cette étude offrent des perspectives intéressantes pour l'amélioration de l'imagerie ultrasonore 3D et pour le suivi de nanoparticules dans l'optique d'un montage bimodalité ultrasonore photoacoustique.

Pour résumer, notre étude a montré l'importance de la caractérisation des agents photothermiques pour l'optimisation de la thérapie photothermique et a développé des outils pour cette caractérisation. Nous avons comparé l'efficacité thermique de nanoparticules ayant des propriétés physico-chimiques variées, en utilisant un montage photoacoustique pour mesurer l'absorption optique des échantillons et un montage photothermique pour mesurer l'élévation de température et nous l'avons étudié en fonction du temps, l'absorption et la concentration. Les résultats de nos études indiquent que les matériaux utilisés ont un impact significatif sur les propriétés optiques des nanoparticules. De plus, la forme et la structure des nanoparticules peuvent également avoir une influence considérable sur leurs propriétés thermiques et optiques. Il est donc difficile de prévoir les propriétés photothermiques de nouveaux agents sans une caractérisation adéquate. C'est pourquoi la caractérisation est un élément clé pour sélectionner les agents les plus prometteurs pour des applications spécifiques.

Ces travaux ouvrent des perspectives à plusieurs niveaux.

Il est important de poursuivre les recherches sur la sélection des nanoparticules les plus appropriées pour chaque type de cancer, en fonction de leur biodistribution, de leur capacité à être internalisées par les cellules cancéreuses et de leur capacité à produire des effets cytotoxiques lorsqu'elles sont activées par la lumière. Cette problématique indique le besoin de cette thérapie d'être couplé à un système d'imagerie, car elle peut lui fournir un guidage en temps réel pour traiter la maladie métastatique avec une plus grande spécificité et sensibilité, permettant une meilleure planification thérapeutique avant et pendant l'opération des PTT [1–3]. Le guidage par imagerie peut être utilisé pour minimiser les effets secondaires en irradiant spécifiquement la tumeur ou les sites métastatiques, et optimiser le moment approprié de l'irradiation lorsque les agents photothermiques atteignent leurs pics d'accumulation pour améliorer l'efficacité thérapeutique. La combinaison de la tomographie 3D US et PA pour le suivi des nanoparticules est une réponse intéressante dans ce but. En utilisant la tomographie 3D PA pour suivre la répartition spatiale des nanoparticules après leur internalisation dans les tumeurs et en combinant ces informations avec l'imagerie anatomique, on peut obtenir des informations sur la distribution potentielle du traitement par hyperthermie dans les tissus et les zones ciblées qui pourrait échapper au traitement. Cette combinaison de technologies permet également de suivre l'efficacité de la thérapie au cours du temps (reperfusion, réduction du volume tumoral ...), ce qui est crucial pour évaluer les résultats de la thérapie. Cela permettra de mieux comprendre les différentes réponses thérapeutiques observées chez les patients atteints de cancer, et de développer des stratégies

thérapeutiques plus efficaces en fonction des caractéristiques des tumeurs et des patients. En outre, cela permet une meilleure évaluation des effets de la thérapie et une personnalisation thérapeutique suivant les patients.

Les études sur l'optimisation des paramètres d'irradiation, comme la dose d'énergie incidente et le temps d'irradiation, sont également cruciales pour améliorer l'efficacité de la PTT. De plus, des études sur les mécanismes d'action de la PTT sur les cellules cancéreuses et sur les interactions entre la PTT et les autres modalités de traitement sont nécessaires pour une meilleure compréhension des mécanismes de la PTT dans la lutte contre la métastase. Il est donc important de passer à des études *in vivo* pour évaluer les effets de la PTT sur les tumeurs. Cependant, cela est plus complexe, car il faut prendre en compte la perfusion qui peut altérer l'élévation de température attendue. Il est donc nécessaire de tenir compte des équations de Pennes [4–6] pour une meilleure compréhension de ces phénomènes.

Enfin, une des principales préoccupations dans l'utilisation de la photothermie est la capacité à induire une mort cellulaire. Il est donc important de continuer à étudier les effets de la chaleur sur les cellules cancéreuses, et de développer des méthodes pour minimiser les effets indésirables. Dans ce contexte, nous avons mis en place au cours de cette thèse un montage permettant d'illuminer des cellules en monocouche avec des nanoparticules internalisés. Dans un second temps, nous sommes capables de marquer les cellules apoptotiques ou nécrotiques via la fluorescence. Les expérimentations étant toujours en cours et étant menée par d'autres doctorants, les résultats n'ont pas été détaillés ici. Cet outil permet d'établir un lien entre l'élévation de température et l'effet thérapeutique. Enfin, la réalisation d'expériences animales est également une étape importante pour évaluer les effets de la PTT sur les tumeurs et améliorer les stratégies thérapeutiques.

Enfin, les recherches ont montré que lorsqu'elle est utilisée en combinaison avec la radiothérapie ou la chimiothérapie dans des essais cliniques[7–13], la PTT est efficace pour tuer ou affaiblir les cellules tumorales dans une grande variété de cancers. Les avancées dans la photothermie pourraient permettre le développement de nouvelles thérapies combinées pour lutter contre le cancer.

Bibliographie :

- [1] Liu J, Zheng X, Yan L, Zhou L, Tian G, Yin W, et al. Bismuth sulfide nanorods as a precision nanomedicine for in vivo multimodal imaging-guided photothermal therapy of tumor. *ACS Nano* 2015;9:696–707.
- [2] Liang S, Li C, Zhang C, Chen Y, Xu L, Bao C, et al. CD44v6 monoclonal antibody-conjugated gold nanostars for targeted photoacoustic imaging and plasmonic photothermal therapy of gastric cancer stem-like cells. *Theranostics* 2015;5:970.
- [3] Liang C, Diao S, Wang C, Gong H, Liu T, Hong G, et al. Tumor metastasis inhibition by imaging-guided photothermal therapy with single-walled carbon nanotubes. *Adv Mater* 2014;26:5646–52.
- [4] Ren Y, Yan Y, Qi H. Photothermal conversion and transfer in photothermal therapy: From macroscale to nanoscale. *Adv Colloid Interface Sci* 2022;102753.
- [5] Erkol H, Yelken SZ, Algarawi M, Gulsen G, Nouizi F. Validation of a comprehensive analytical model for photothermal therapy planning in a layered medium with gold nanoparticles. *Int J Heat Mass Transf* 2020;163:120438.
- [6] Farokhnezhad M, Esmailzadeh M. Graphene coated gold nanoparticles: an emerging class of nanoagents for photothermal therapy applications. *Phys Chem Chem Phys* 2019;21:18352–62.
- [7] Cai X, Jia X, Gao W, Zhang K, Ma M, Wang S, et al. A versatile nanotheranostic agent for efficient dual-mode imaging guided synergistic chemo-thermal tumor therapy. *Adv Funct Mater* 2015;25:2520–9.
- [8] Wang Y, Yang T, Ke H, Zhu A, Wang Y, Wang J, et al. Smart albumin-biomaterialized nanocomposites for multimodal imaging and photothermal tumor ablation. *Adv Mater* 2015;27:3874–82.
- [9] Su S, Ding Y, Li Y, Wu Y, Nie G. Integration of photothermal therapy and synergistic chemotherapy by a porphyrin self-assembled micelle confers chemosensitivity in triple-negative breast cancer. *Biomaterials* 2016;80:169–78.
- [10] Peng J, Xiao Y, Li W, Yang Q, Tan L, Jia Y, et al. Photosensitizer micelles together with IDO inhibitor enhance cancer photothermal therapy and immunotherapy. *Adv Sci* 2018;5:1700891.
- [11] Shang T, Yu X, Han S, Yang B. Nanomedicine-based tumor photothermal therapy synergized immunotherapy. *Biomater Sci* 2020;8:5241–59.
- [12] Liu H, Chen D, Li L, Liu T, Tan L, Wu X, et al. Multifunctional gold nanoshells on silica nanorattles: a platform for the combination of photothermal therapy and chemotherapy with low systemic toxicity. *Angew Chem Int Ed* 2011;50:891–5.
- [13] Luo L, Bian Y, Liu Y, Zhang X, Wang M, Xing S, et al. Combined near infrared photothermal therapy and chemotherapy using gold nanoshells coated liposomes to enhance antitumor effect. *Small* 2016;12:4103–12.

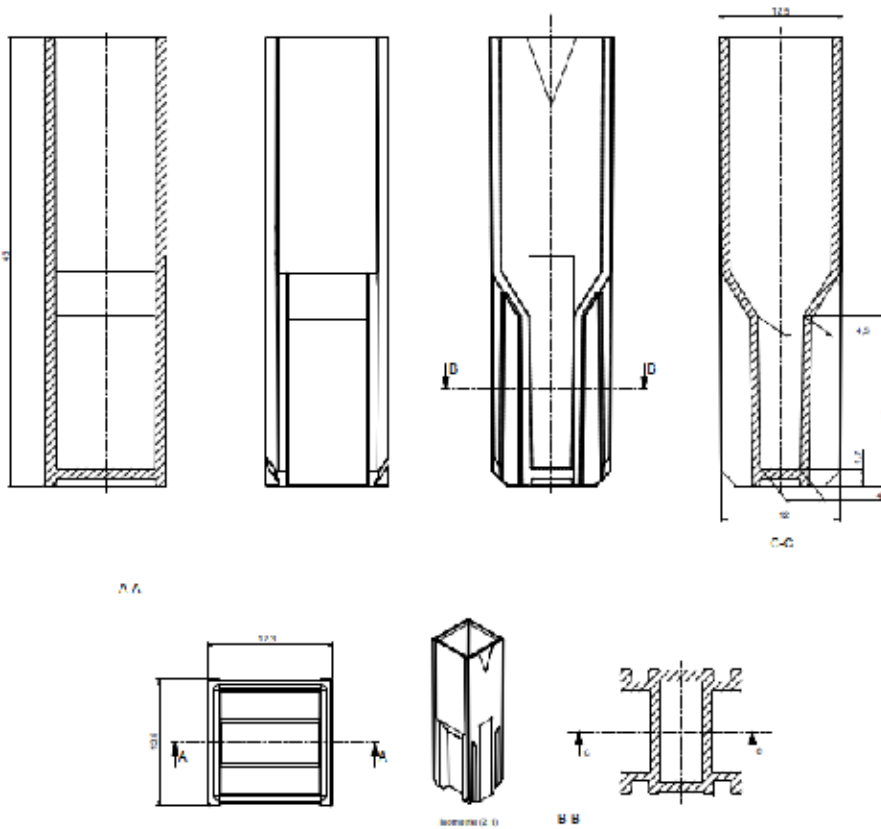
ANNEXES



Technical Diagram

634-0676 VWR Disposable Cuvette

Type	Range	Volume	Path length	Window material	Pk
Semi-micro	340 – 900 nm	1,5 – 3 ml	10 mm	PS	100



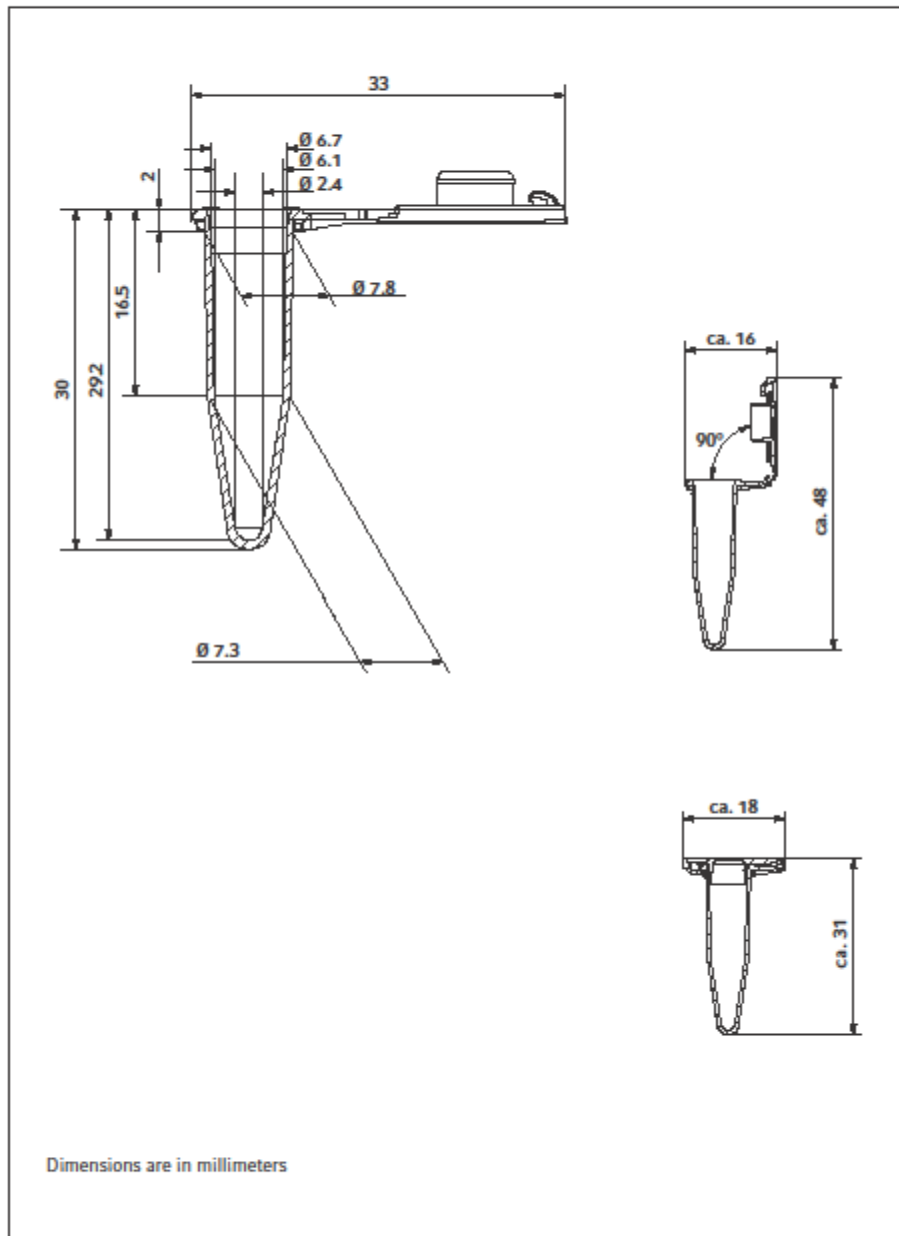
This document has been produced electronically and is valid without a signature

Date of issue: **September 2020**

VWR International bv, Researchpark Haasrode 2020, Geldenaaksebaan 464, 3001 Leuven, Belgium
<http://www.vwr.com>

Version: 4.0

Technical Data Sheet
 Eppendorf Safe-Lock Tubes 0.5 mL
 English (EN)



Your local distributor: www.eppendorf.com/contact
 Eppendorf AG · 22331 Hamburg · Germany
eppendorf@eppendorf.com · www.eppendorf.com

©2016 - Eppendorf® and the Eppendorf logo are registered trade marks of Eppendorf AG, Germany.
 007 010410-040-0216

Étude Ag₂S, IONF, Gionf

Ag₂S

PA Vs Spectro

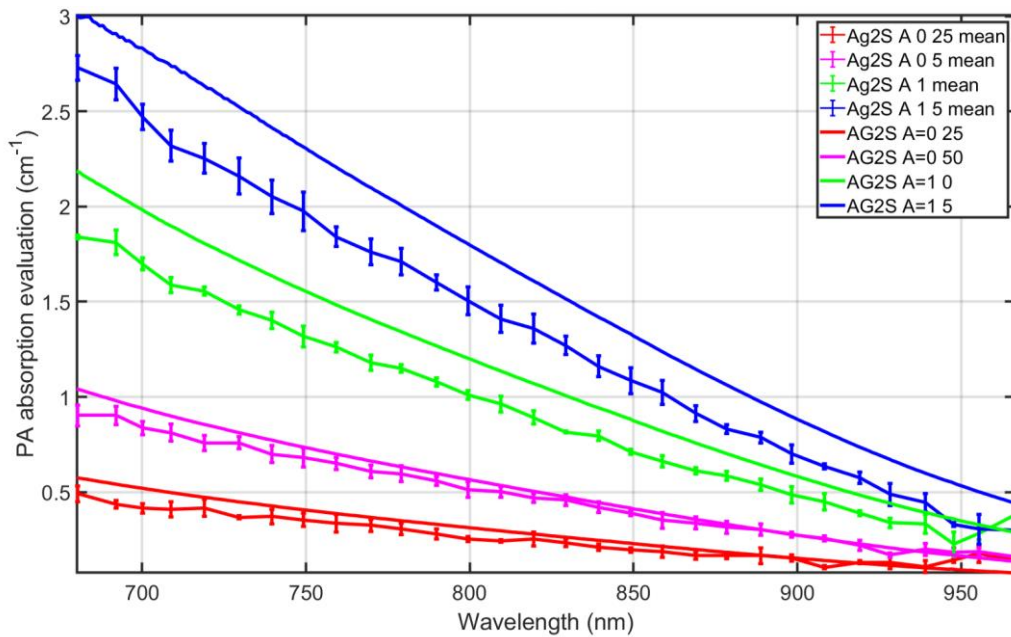


Figure SI.1. Spectre UV-visible et photoacoustique des Ag₂S en suspension dans l'eau à plusieurs concentrations. Les spectres photoacoustique sont mesuré avec une seule injection à une puissance de 40 mJ en sortie de laser et calculé grâce à la médiane et l'écart absolu médian sur les 4 tubes.

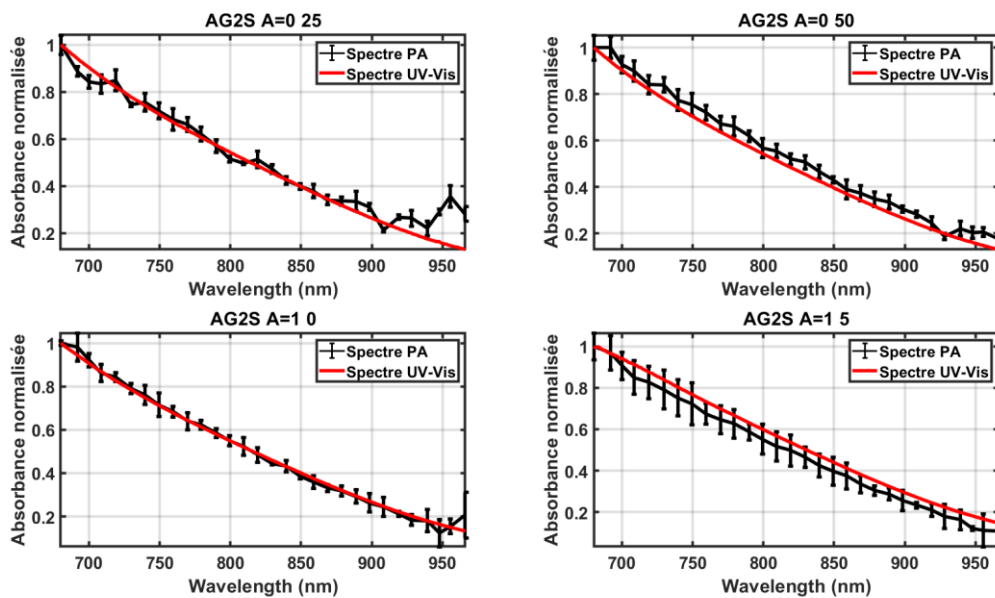


Figure SI.2. Spectre UV-visible et photoacoustique des Ag₂S à plusieurs concentrations normalisées. Les spectres sont normalisés par rapport à leur maximum.

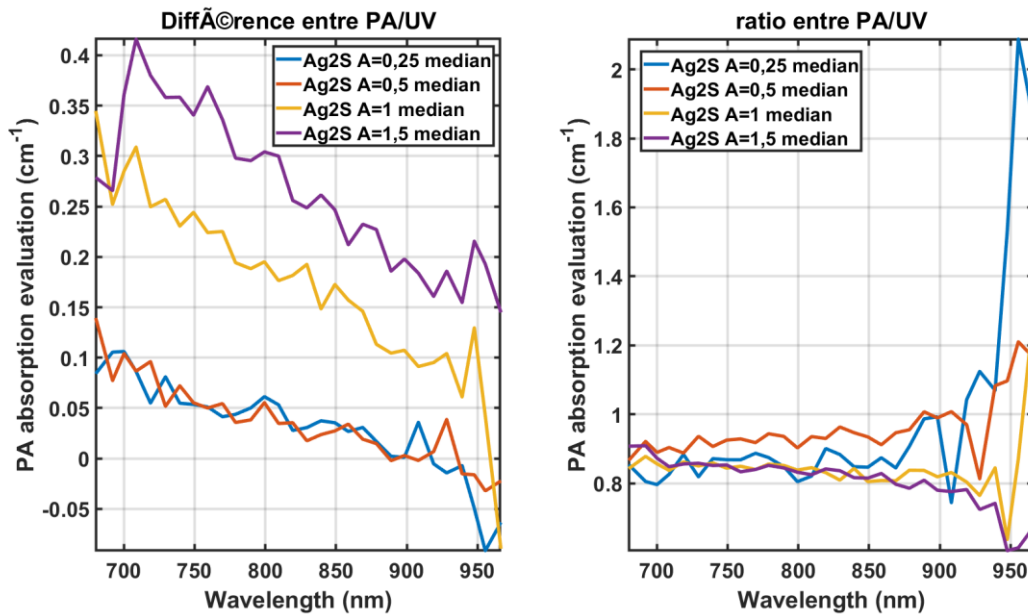


Figure SI.3. Détermination de la diffusion optique pour chaque concentration d'Ag₂S. (A) Calcul de la différence entre le spectre UV-Visible et le spectre photoacoustique. (B) Ratio entre le spectre photoacoustique et le spectre UV-Visible.

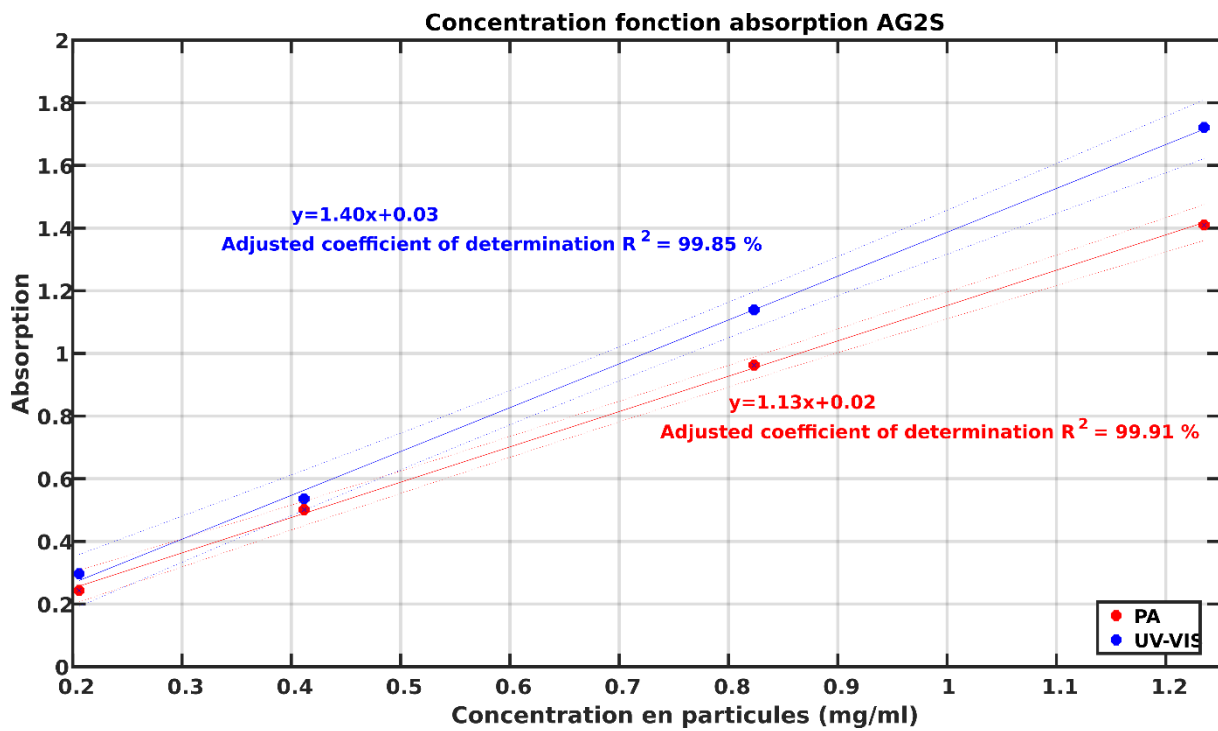


Figure SI.4. Comparaison de l'absorption photoacoustique et l'absorption UV-Visible à 809.4 nm en fonction de la concentration en nanoparticules en mg/ml.

Étude PTT

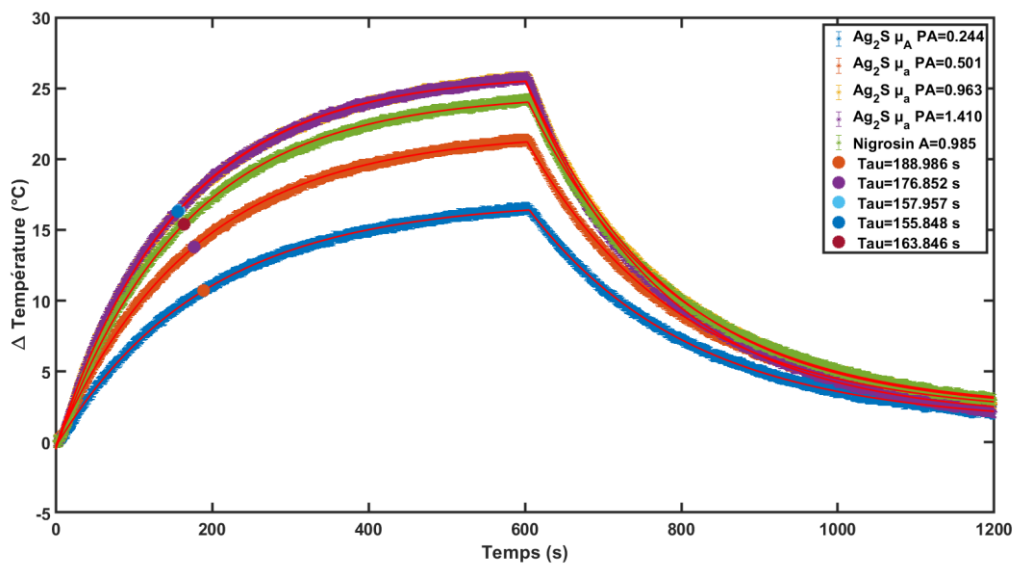


Figure SI.5. Propriétés thermiques des solutions aqueuses Ag_2S exposé à une illumination laser à longueur d'onde 808nm et à une densité surfacique de $1 W.cm^{-1}$. Les courbes rouges sont les ajustements exponentiels en accord avec les équations théoriques et calculé en fonction des données expérimentales. Les « points » représentent le temps caractéristique de chauffe pour chaque concentration d' Ag_2S . Ici, classé en PA. Les barres d'erreurs sont fixées au maximum des barre d'erreur de la nigrosine cf. étude nigrosine chapitre2.

	$Ag_2S \mu_a = 0,25$	$Ag_2S \mu_a = 0,5$	$Ag_2S \mu_a = 1$	$Ag_2S \mu_a = 1,5$
Dérivé à l'origine	0.0922	0.1252	0.1672	0.1699
$\Delta T * \beta_{montant}$	0.0905	0.1241	0.1651	0.1671
SAR(W/g)	1873.898	1272.741	849.816	575.777

PA vs PTT

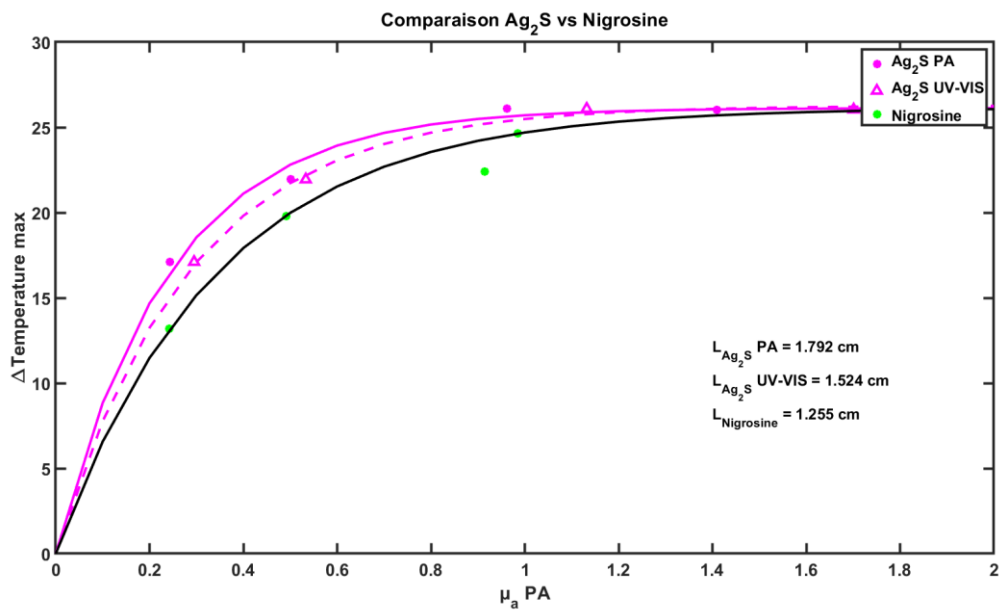


Figure SI.6. Comparaison de l'augmentation de température en fonction du μ_a photoacoustique et UV-Visible des Ag_2S et de la nigrosine de référence pour cette étude. Les courbes représentent les ajustements en accord avec les équations théoriques et calculés en fonction des données PA (traits pleins) et UV-Visible (trait pointillés). Les L représentent le chemin parcouru par la lumière calculé grâce à ces ajustements.

IONF

PA Vs Spectro

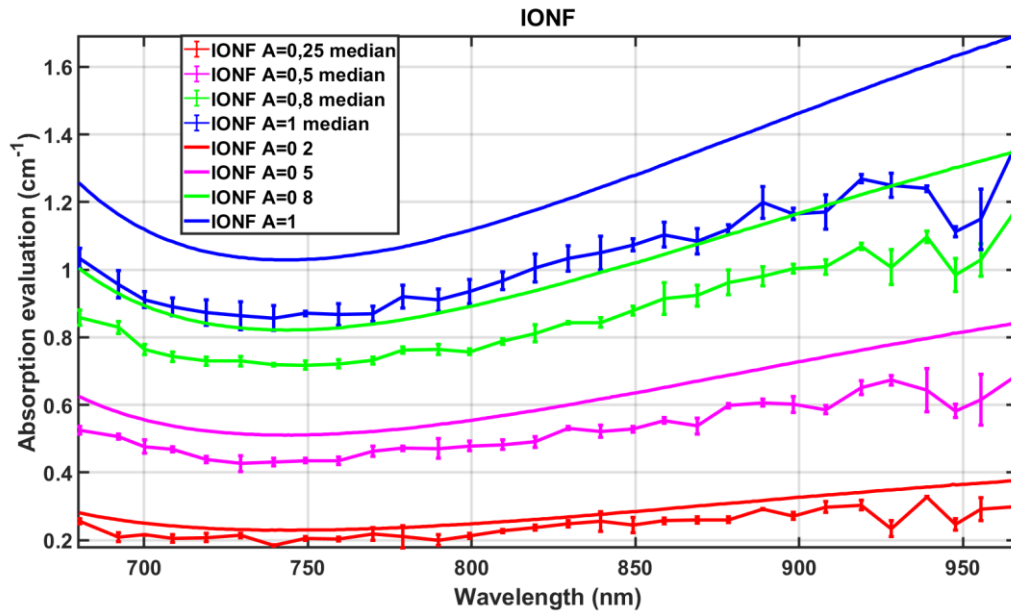


Figure SI.7. Spectre UV-visible et photoacoustique des IONF à plusieurs concentrations. Les spectres photoacoustique sont mesuré avec une seule injection à une puissance de 40 mJ en sortie de laser et calculé grâce à la médiane et l'écart absolu médian sur les 4 tubes.

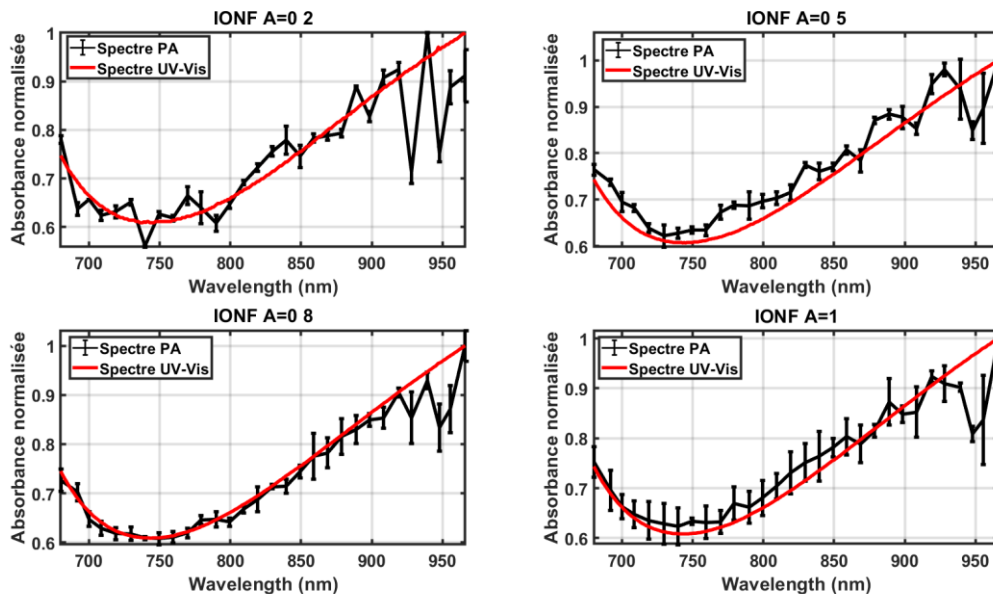


Figure SI.8. Spectre UV-visible et photoacoustique des IONF à plusieurs concentrations normalisées. Les spectres sont normalisés par rapport à leur maximum.

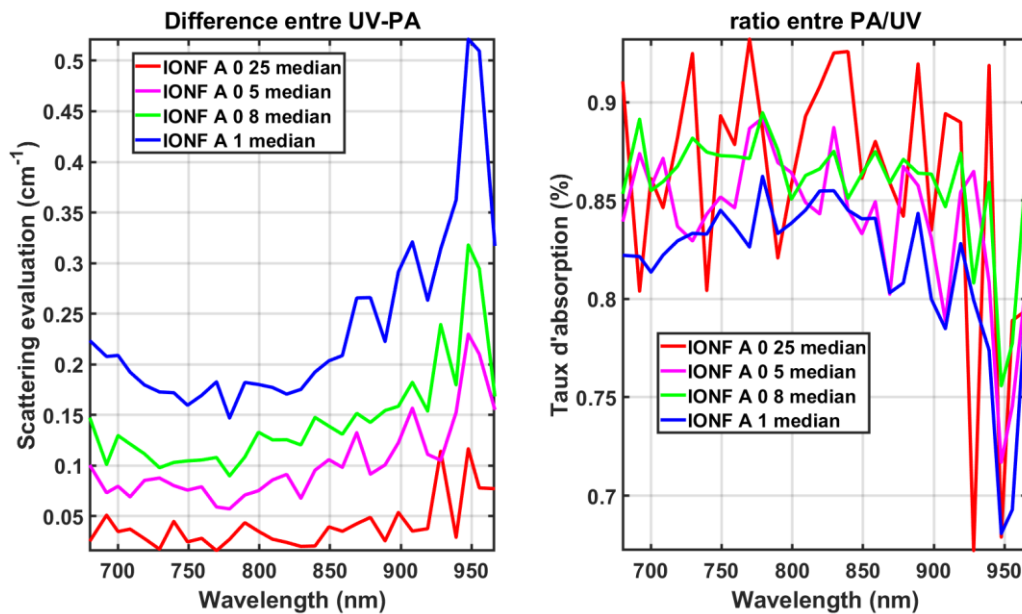


Figure SI.9. Détermination de la diffusion optique pour chaque concentration d'IONF. (A) Calcul de la différence entre le spectre UV-Visible et le spectre photoacoustique. (B) Ratio entre le spectre photoacoustique et le spectre UV-Visible.

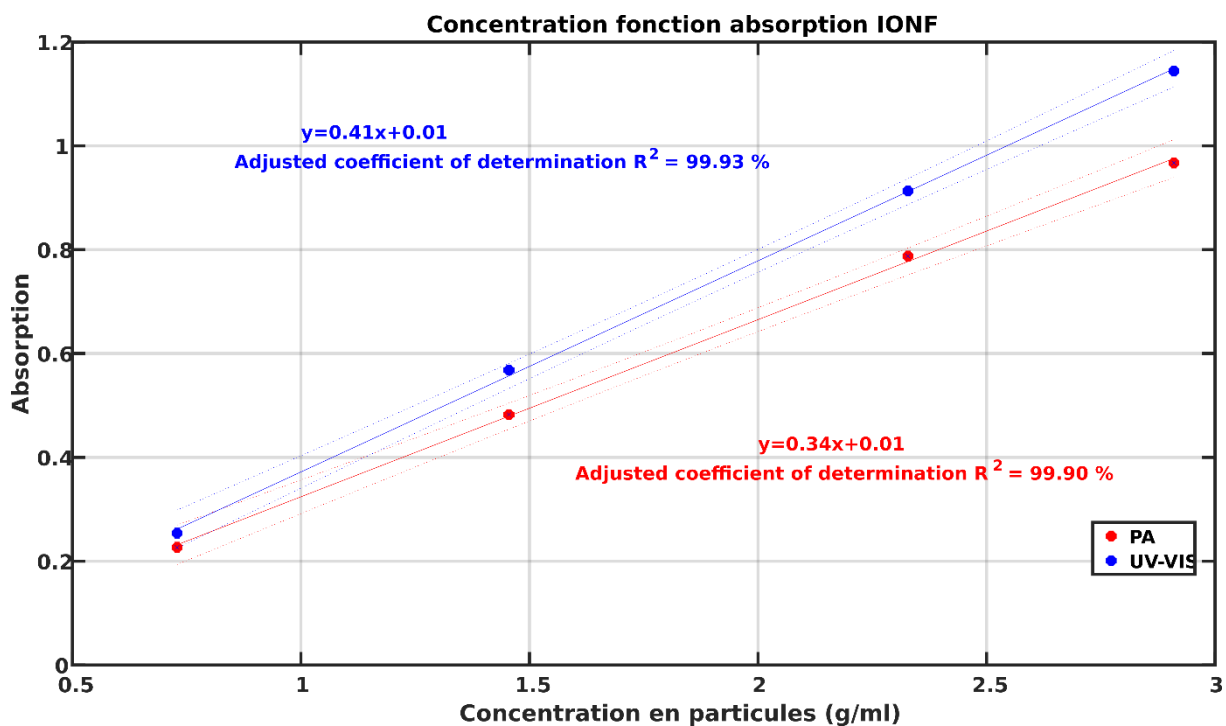


Figure SI.10. Comparaison de l'absorption photoacoustique et l'absorption UV-Visible en fonction de la concentration en nanoparticules en g/ml.

Étude PTT

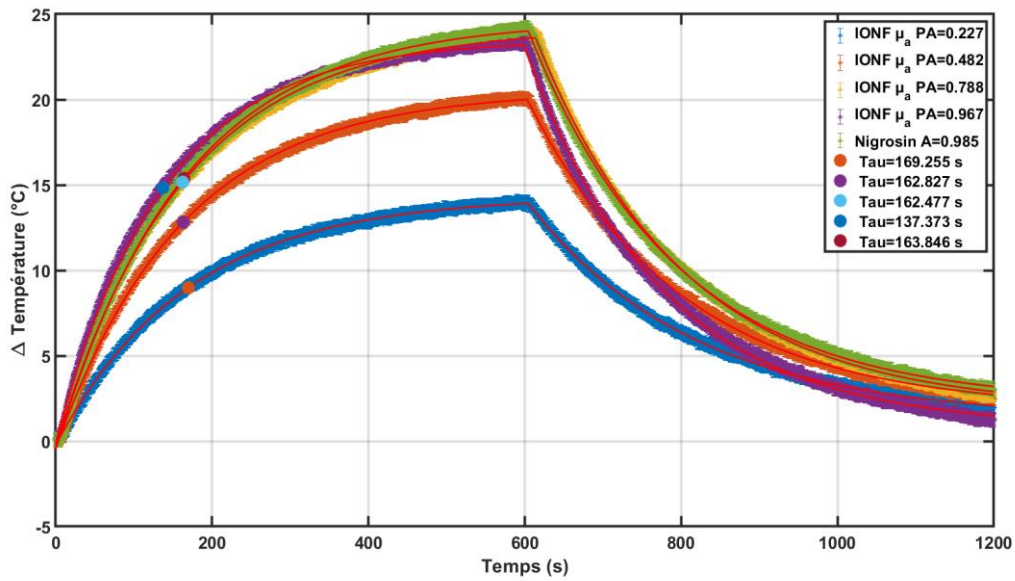


Figure SI.11. Propriétés thermiques des solutions aqueuses IONF exposé à une illumination laser à longueur d'onde 808nm et à une densité surfacique de 1 W.cm^{-2} . Les courbes rouges sont les ajustements exponentiels en accord avec les équations théoriques et calculé en fonction des données expérimentales. Les « points » représentent le temps caractéristique de chauffe pour chaque concentration d'IONF.

	'IONF $\mu_a = 0,25$ '	'IONF $\mu_a = 0,5$ '	'IONF $\mu_a = 0,8$ '	'IONF $\mu_a = 1$ '
Dérivé à l'origine	0.086	0.129	0.151	0.177
$\Delta T \cdot \beta_{\text{montant}}$	0.085	0.126	0.149	0.171
SAR(W/g)	494.13	370.15	270.88	246.82

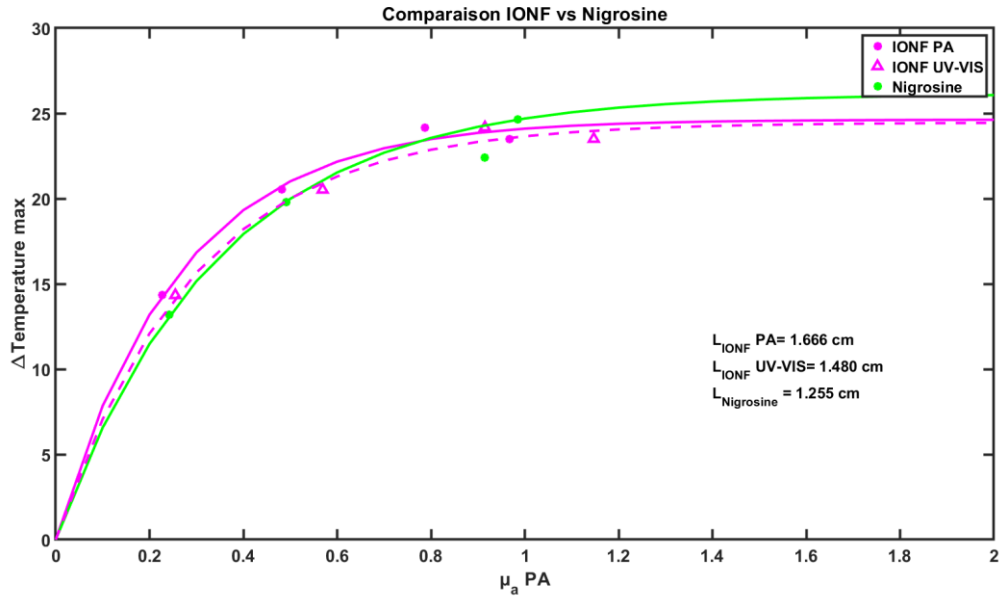


Figure SI.12. Comparaison de l'augmentation de température en fonction du μ_a photoacoustique et UV-Visible des Ag_2S et de la nigrosine de référence pour cette étude. Les courbes représentent les ajustements en accord avec les équations théoriques et calculés en fonction des données PA (traits pleins) et UV-Visible (trait pointillés). Les L représentent le chemin parcouru par la lumière calculé grâce à ces ajustements.

GIONF

PA Vs Spectro

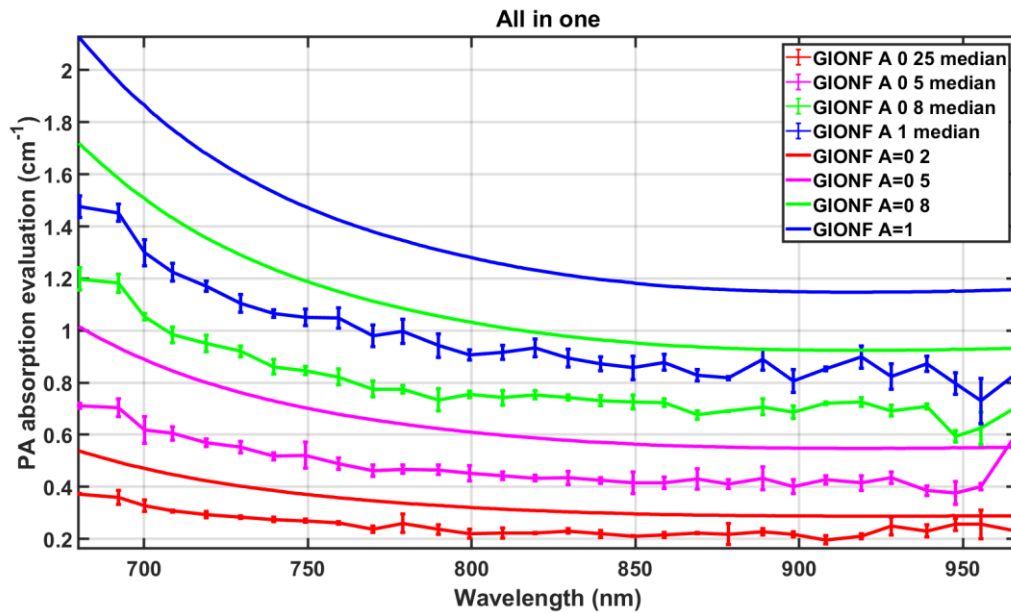


Figure SI.13. Spectre UV-visible (sans barre d'erreur) et photoacoustique des IONF à plusieurs concentrations. Les spectres photoacoustique sont mesuré avec une seule injection à une puissance de 40 mJ en sortie de laser et calculé grâce à la médiane et l'écart absolu médian sur les 4 tubes.

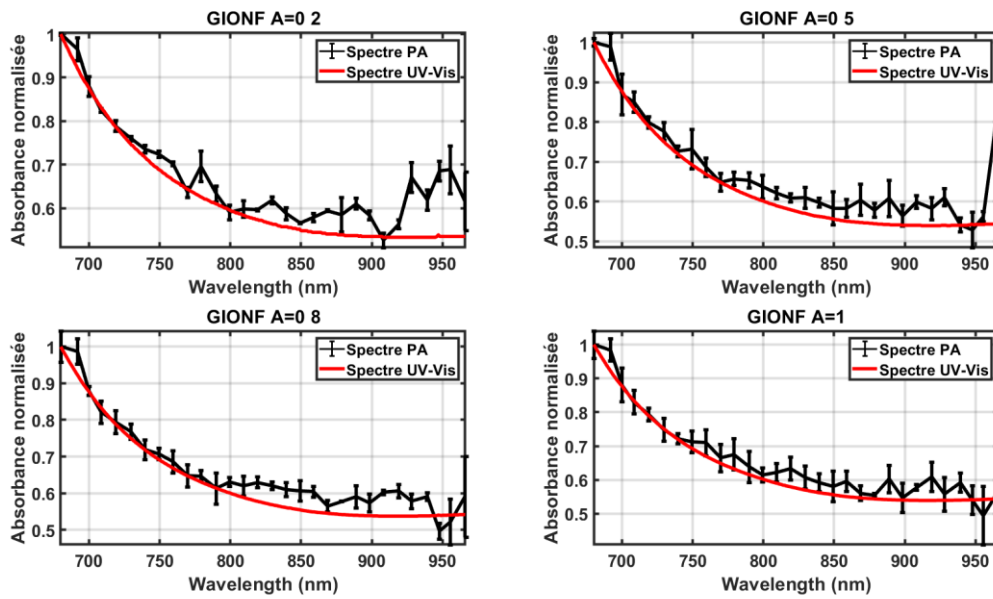


Figure SI.14. Spectre UV-visible et photoacoustique des GIONF à plusieurs concentrations normalisées. Les spectres sont normalisés par rapport à leur maximum.

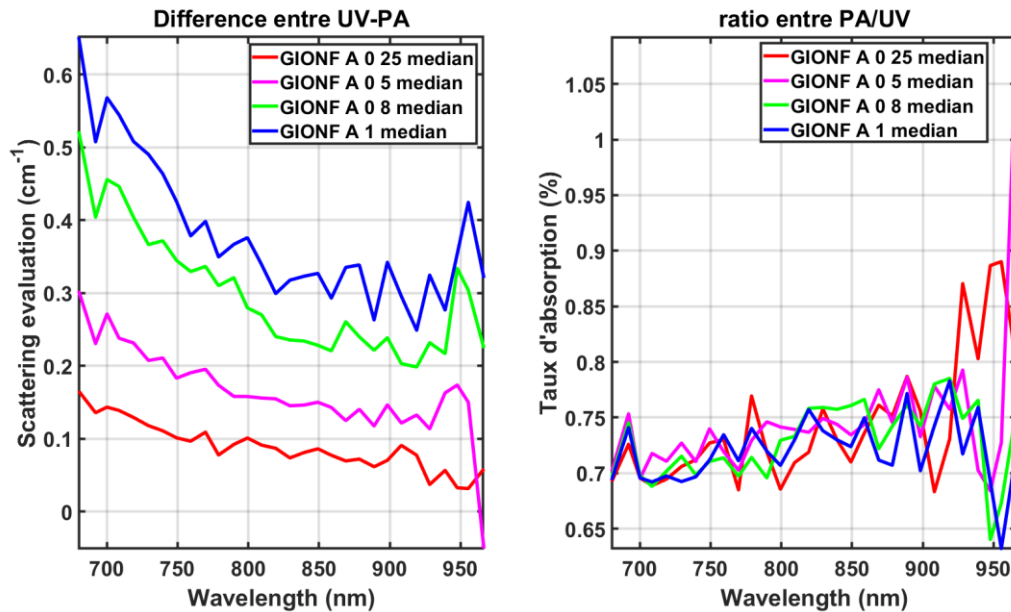


Figure SI.15. Détermination de la diffusion optique pour chaque concentration de GIONF. (A) Calcul de la différence entre le spectre UV-Visible et le spectre photoacoustique. (B) Ratio entre le spectre photoacoustique et le spectre UV-Visible.

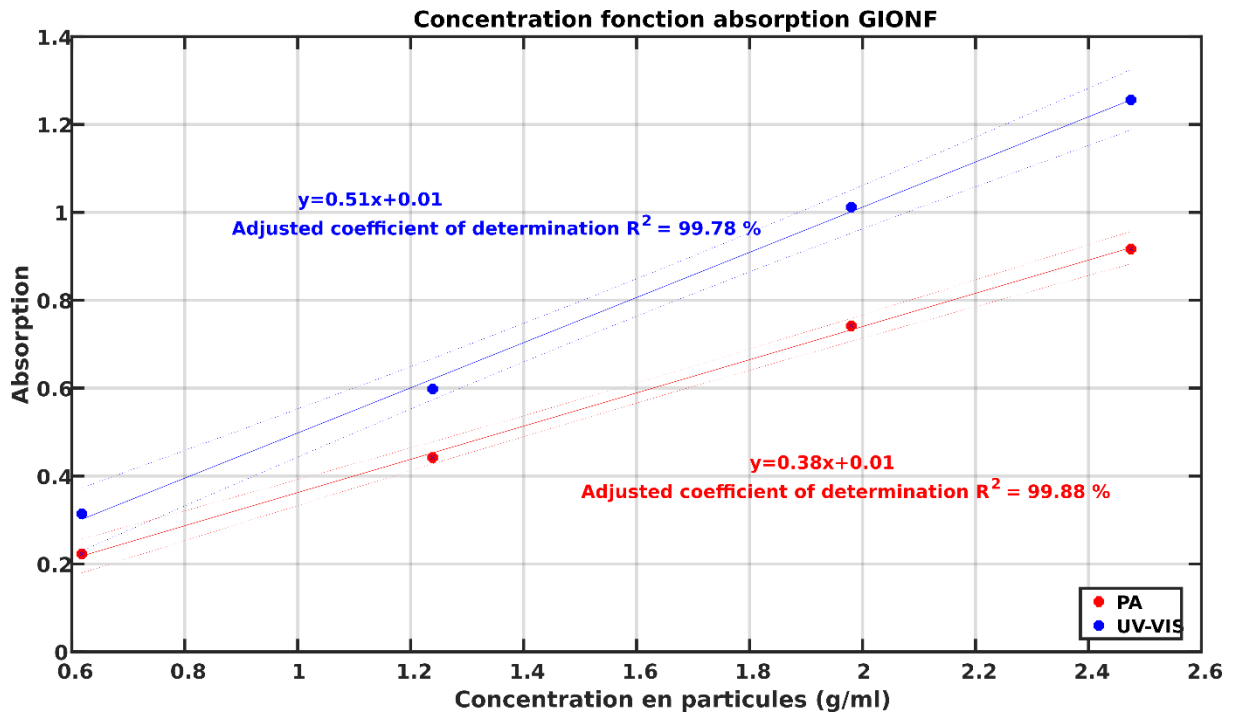


Figure SI.16. Comparaison de l'absorption photoacoustique et l'absorption UV-Visible en fonction de la concentration en nanoparticules en g/ml.

Étude PTT

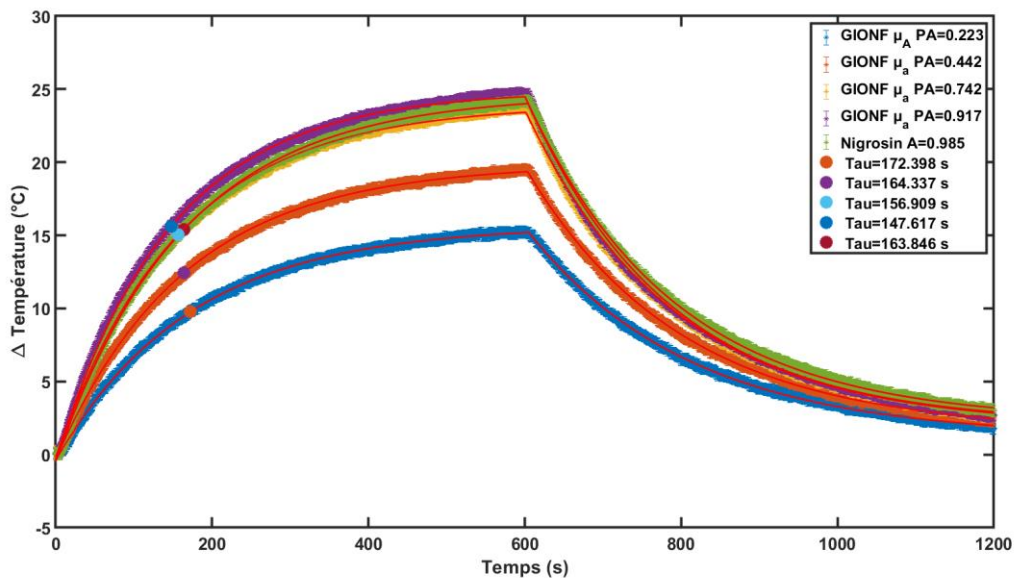


Figure SI.17. Propriétés thermiques des solutions aqueuses GIONF exposé à une illumination laser à longueur d'onde 808nm et à une densité surfacique de 1 W.cm^{-2} . Les courbes rouges sont les ajustements exponentiels en accord avec les équations théoriques et calculé en fonction des données expérimentales. Les « points » représentent le temps caractéristique de chauffe pour chaque concentration de GIONF.

	'GIONF $\mu_a = 0,25$ '	'GIONF $\mu_a = 0,5$ '	'GIONF $\mu_a = 0,8$ '	'GIONF $\mu_a = 1$ '
--	-------------------------	------------------------	------------------------	----------------------

Dérivé à l'origine	0.093	0.123	0.154	0.171
$\Delta T^* \beta_{montant}$	0.091	0.121	0.153	0.169
SAR(W/g)	631.28	415.36	324.85	289.55

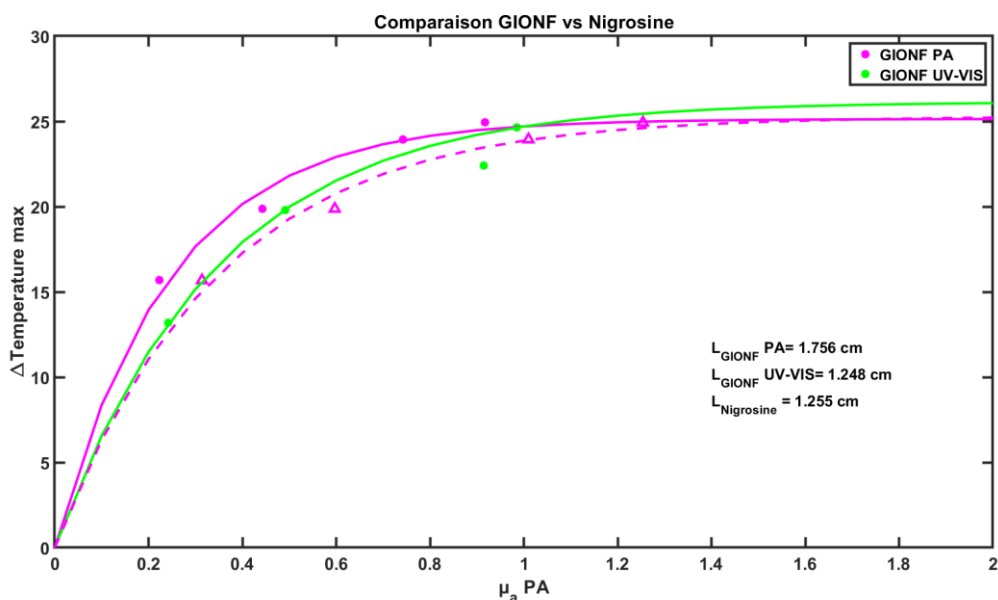


Figure SI.18. Comparaison de l'augmentation de température en fonction du μ_a photoacoustique et UV-Visible des Ag_2S et de la nigrosine de référence pour cette étude. Les courbes représentent les ajustements en accord avec les équations théoriques et calculés en fonction des données PA (traits pleins) et UV-Visible (trait pointillés). Les L représentent le chemin parcouru par la lumière calculé grâce à ces ajustements.

	Concentration (g/ml)	Extinction à 809 nm (cm^{-1})	Absorption PA à 809 nm (cm^{-1})	η optique (%)	Moyenne η optique (%)	IHCE 794nm (%)	η méthode exponentiel	η PTT méthode de la limite	
Nigrosine (1)*	0.0346				94%	104.9			
	0.0173					108.1			
Nigrosine (2)*	0.0866	0.993	0.9261	94%					
	0.0693	0.744	0.6823						
	0.0433	0.494							
	0.0216	0.243							
Ag ₂ S	0.2058	0.297	0.2437	82.06	85.5 %	83 %*	138.28	103.14 %	
	0.4117	0.536	0.5012	93.51			115.47		
	0.8234	1.139	0.9625	84.50			92.88		
	1.235	1.7213	1.41	81.91			82.37		

IONF	0.7290	0.254	0.2268	72.22	76.92 %	82 %*	153.9	96.75 %
	1.4550	0.568	0.4822	80.64			118.10	
	2.3280	0.913	0.7877	77.83			103.89	
	2.91	1.144	0.9669	76.98			90.35	
GIONF	0.618	0.314	0.2228	87.70	81.73 %	86 %*	123.38	98.75%
	1.239	0.598	0.4421	77.83			99.09	
	1.98	1.012	0.7418	81.24			90.29	
	2.475	1.256	0.9167	80.13			86.43	

	Absorption	ϕ	Beta montan t (1/ τ) (10 ⁻³)	Beta descendant(1/ τ) (10 ⁻³)	Ratio des ΔT_{max}	Light to heat coeff	SAR	L
Nigrosin 04/02	0.0883	5.924	4.235	4.278				1.356 2
	0.1976	7.3804	4.415	4.221				
	0.3973	12.792 7	5.247	4.567				
	0.5965	15.765 8	5.402	4.666				
	0.8002	16.785 1	5.549	4.777				
	1.0423	17.502 9	5.559	4.917				
Nigrosin 31/03	0.1	6.25	4.54	4.269				1.414 6
	0.2	10.02	5.209	4.462				
	0.4	15.54	5.542	4.638				
	0.6	17.12	5.9	4.793				
	0.8	19.48	5.861	4.867				
	1	20.62	5.912	5.054				
Nigrosin 25/03	0.2	10.65	5.187	4.435				1.425 6
	0.3	13.38	5.387	4.624				
	0.5	15.82	5.779	4.87				
	1	20.61	6.141	5.26				
Nigrosin 20/04	0.5	21.30	5.756	5.049				1.165 7
	1	26.33	6.013	5.311				
	2	28.68	6.607	5.818				
Supraballs	0.25	8.6393	5.305	5.421	0.7089		0.046	1.408
	0.5	12.191 8	5.637	5.24	0.7097		0.069 2	3

	1	16.204 1	6.078	5.607	0.7106		0.099	
	2	14.845 1	5.935	5.403	0.7109		0.091 9	
[Au]=1mg/ml	0.25	8.3033	5.741	6.288	0.6030		0.043	1.934
	0.5	8.0988	5.152	4.933	0.5551		0.041 1	9
	1	12.509 3	5.508	4.935	0.5141		0.070 2	
	2	10.337 1	5.164	4.713	0.5008		0.053 5	
[Au]=3mg/ml	0.25	7.5616	4.653	4.174	0.6006		0.035 8	1.157 9
	0.5	11.389 7	2.896	4.593	0.63		0.034 8	
	1	13.201 1	5.702	4.936	0.6655		0.077 2	
	2	15.630 2	5.646	5.003	0.6854		0.090 8	
[Au]=5mg/ml	0.25	10.428 0	5.124	4.533	0.8108		0.053 9	1.619 5
	0.5	13.268 0	5.35	4.839	0.7831		0.071 7	
	1	15.927 1	5.8	5.143	0.7561		0.094 5	
	2	16.679 9	6.845	5.827	0.7455		0.115 1	
[Au]=10mg/ml	0.25	8.9225	5.237	4.571	0.6343	0.30	0.047 5	0.917 4
	0.5	12.349 2	5.741	4.823	0.6988	0.385 4	0.072 8	
	1	15.073 0	5.778	4.951	0.7873	0.542 2	0.090 6	
	2	19.647 8	7.073	6.146	0.8498	0.739 8	0.137 8	
Cyanine 250 μM 1T	0.25	4.9397	6.505	4.597	0.3489			0.653
	0.5	6.0194	6.319	4.361	0.4079			3
	1	10.995 4	7.598	4.51	0.5001 7			
	2	11.681 5	9.919	5.516	0.5904			
QcQc	0.0770	5.5595	4.573	4.436	1.21			2.355
	0.1132	8.4952	4.99	4.484	1.1782			2
	0.2510	11.551 7	4.988	4.448	1.056			
	0.4817	15.807 5	5.671	4.841	0.9299			

AlQc	0.25	5.8020	5.095	5.613	0.5705			0.700 3
	0.5	13.236 3	5.447	4.525	0.6608			
	0.75	18.596 7	5.426	4.951	0.7384			
	1	19.516 4	6.068	5.224	0.8007			

	Absorption μ_{10}^{PA} à 810 nm	ΔT_{max}	η optique	iHCE	SAR	L (cm)
Nigrosine 04/02	0.09	5.924				1.3562
	0.2	7.3804				
	0.4	12.7927				
	0.6	15.7658				
	0.8	16.7851				
	1	17.5029				
Nigrosine 31/03	0.1	6.25				1.4146
	0.2	10.02				
	0.4	15.54				
	0.6	17.12				
	0.8	19.48				
	1	20.62				
Nigrosine 25/03 (ref Suprastructure)	0.2	10.65				1.4256
	0.3	13.38				
	0.5	15.82				
	1	20.61				
Nigrosine 20/04	0.5	21.30				1.1657
	1	26.33				
	2	28.68				
Nigrosine (ref AG ₂ S/IONF/GIONF)	0.25	13.2	94%	>100%		1.297
	0.5	19.8				
	0.8	22.4				
	1	24.6				
Supraballs	0.25	8.6393			0.046	1.4083
	0.5	12.1918			0.0692	
	1	16.2041			0.099	
	2	14.8451			0.0919	
[Au]=1mg/ml [Fe ₃ O ₄]=15mg/ml	0.25	8.3033			0.043	1.9349
	0.5	8.0988			0.0411	
	1	12.5093			0.0702	
	2	10.3371			0.0535	
[Au]=3mg/ml	0.25	7.5616			0.0358	1.1579

[Fe ₃ O ₄]=15mg/ml	0.5	11.3897		20.1%	0.0348	
	1	13.2011			0.0772	
	2	15.6302			0.0908	
[Au]=5mg/ml [Fe ₃ O ₄]=15mg/ml	0.25	10.4280			0.0539	1.6195
	0.5	13.2680			0.0717	
	1	15.9271			0.0945	
	2	16.6799			0.1151	
[Au]=10mg/ml [Fe ₃ O ₄]=15mg/ml	0.25	8.9225		25.3%	0.0475	0.9174
	0.5	12.3492			0.0728	
	1	15.0730			0.0906	
	2	19.6478			0.1378	
Cyanine 250 μM 1T	0.25	4.9397				0.6533
	0.5	6.0194				
	1	10.9954				
	2	11.6815				
QcQc	0.08	5.5595				2.3552
	0.1	8.4952				
	0.25	11.5517				
	0.5	15.8075				
AlQc	0.25	5.8020				0.7003
	0.5	13.2363				
	0.75	18.5967				
	1	19.5164				
Nano batonnet	0.3		68.86%			
Ag ₂ S@MUA	0.25	17.1	82.1	83 %*		1.524
	0.5	21.94	93.5			
	1	26.09	84.5			
	1.4	26.21	82.4			
IONF	0.2	14.34	89.3	82 %*		1.48
	0.5	20.52	84.9			
	0.8	24.17	86.3			
	1	23.5	84.5			
GIONF	0.2	15.68	70.9	86 %*		1.248
	0.4	19.87	73.9			
	0.7	23.94	73.3			
	0.9	24.93	73			

Publications réalisées pendant ce travail de thèse :

- **Lucas T**, Quidu I, Bridal SL, Gateau J. High-contrast and-resolution 3-D ultrasonography with a clinical linear transducer array scanned in a rotate-translate geometry. Appl Sci 2021.
- Bodin J-B, Gateau J, Coïs J, **Lucas T**, Lefebvre F, Moine L, et al. Biocompatible and Photostable Photoacoustic Contrast Agents as Nanoparticles Based on Bodipy Scaffold and Polylactide Polymers: Synthesis, Formulation, and In Vivo Evaluation. ACS Appl Mater Interfaces 2022.
- Xiao Y, Pandey K, Nicolás-Boluda A, Onidas D, Nizard P, Carn F, **Lucas T** et al. Synergic Thermo-and pH-Sensitive Hybrid Microgels Loaded with Fluorescent Dyes and Ultrasmall Gold Nanoparticles for Photoacoustic Imaging and Photothermal Therapy. ACS Appl Mater Interfaces 2022.
- **Lucas T**, Sarkar M, Atlas Y, Linger C, Renault G, Gazeau F, et al. Calibrated photoacoustic spectrometer based on a conventional imaging system for in vitro characterization of contrast agents. Sensors 2022.
- Linger C, Atlas Y, Winter R, Vandebrouck M, Faure M, **Lucas T**, et al. Volumetric and Simultaneous Photoacoustic and Ultrasound Imaging with a Conventional Linear Array in a Multiview Scanning Scheme. IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control, 2023.

Affichées lors de congrès

- Calibrated Photoacoustic Spectrometry with a Standard Imaging Setup Mitradeep Sarkar, **Théotim Lucas**, Gilles Renault, Lori Bridal, Jérôme Gateau. IEEE IUS, 2020, Las Vegas. Poster A4P-21: MPA: Poster PM – Quantitative Photoacoustic Imaging
- High-Resolution 3D Ultrasound Imaging Using a Clinical Linear Array **Théotim Lucas**, Isabelle Quidu, Lori Bridal, Jérôme Gateau. IEEE IUS, 2020, Las Vegas. Poster A4P-28: MBB: Poster PM - Volumetric Beamforming & Imaging
- Photoacoustic spectroscopy for the guidance of photothermal therapy **Théotim Lucas**, Lori Bridal, Florence Gazeau, Jérôme Gateau. Poster Séminaire de l'école doctorale 393 Pierre-Louis de Santé publique

Enseignements :

- Architecture des processeurs. Polytech Sorbonne UFR 933 TP 76h Master 1
- Approfondissement II : architecture système. Polytech Sorbonne UFR 933 TP 116 h Licence 3