



HAL
open science

Bodipy pour l'imagerie photoacoustique : formulation en nanoparticules polymères, caractérisation photophysique avancée et évaluation biologique *in vitro* et *in vivo*

Jean-Baptiste Bodin

► To cite this version:

Jean-Baptiste Bodin. Bodipy pour l'imagerie photoacoustique : formulation en nanoparticules polymères, caractérisation photophysique avancée et évaluation biologique *in vitro* et *in vivo*. Polymères. Université Paris-Saclay, 2022. Français. NNT : 2022UPASF045 . tel-04689994

HAL Id: tel-04689994

<https://theses.hal.science/tel-04689994>

Submitted on 6 Sep 2024

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.

Bodipy pour l'imagerie photoacoustique : Formulation en nanoparticules polymères, caractérisation photophysique avancée et évaluation biologique *in vitro* et *in vivo*

Bodipys for photoacoustic imaging: formulation as polymer nanoparticles, thorough photophysical characterization, in vitro and in vivo biological evaluation

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 571, Sciences Chimiques : Molécules, Matériaux, Instrumentation et Biosystèmes (2MIB)
Spécialité de doctorat : chimie
Graduate School : chimie. Référent : Faculté des sciences d'Orsay

Thèse préparée dans les unités de recherche : **Institut des Sciences Moléculaires d'Orsay** (Université Paris-Saclay, CNRS) et à **l'Institut Galien Paris-Saclay** (Université Paris-Saclay, CNRS), sous la direction de **Rachel Méallet-Renault**, Professeure des Universités, et la co-direction de **Nicolas Tsapis**, Directeur de recherche

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 7 juillet 2022, par

Jean-Baptiste BODIN

Composition du Jury

Avec voix délibératives :

Laure CATALA Professeure des universités, Université Paris-Saclay	Présidente
Emmanuel BOSSY Professeur des universités, Université Grenoble Alpes	Rapporteur & Examinateur
Christine GOZE Maître de conférences, HDR, Université Bourgogne	Rapportrice & Examinatrice
Lori BRIDAL Directrice de recherche, Sorbonne Université	Examinatrice
Jean-Olivier DURAND Directeur de recherche, Université Montpellier	Examinateur

Sans voix délibératives :

Rachel MEALLET-RENAULT Professeure des universités, Université Paris-Saclay	Directrice de thèse
Nicolas TSAPIS Directeur de recherche, Université Paris-Saclay	Co-directeur de thèse

Titre : Bodipy pour l'imagerie photoacoustique : Formulation en nanoparticules polymères, caractérisation photophysique avancée et évaluation biologique *in vitro* et *in vivo*

Mots clés : Photoacoustique, Imagerie médicale, nanoparticules, Bodipy, photophysique, polymère

Résumé : Nous avons synthétisé un nouveau Bodipy efficace pour l'imagerie photoacoustique (PA) *in vivo* de nanoparticules (NP) couramment utilisées comme nanovecteurs de médicaments. Le Bodipy possède une bande d'absorption optimisée dans la fenêtre du proche infrarouge pour les tissus biologiques et un faible rendement quantique de fluorescence qui conduit à une bonne efficacité de génération photoacoustique. Après la polymérisation par ouverture de cycle du lactide amorcée par le Bodipy, le polylactide-Bodipy (PLA-Bodipy) a été formulé en nanoparticules PEGylées avec différents taux d'encapsulation du Bodipy. Les NP formulées, d'environ 100 nm, présentent d'excellentes propriétés PA : une bande d'absorption à 760 nm et un coefficient d'absorption molaire situé entre celui des petites molécules organiques et celui des NP d'or. Une photostabilité très améliorée - par rapport aux NP PLA marquées avec une cyanine - ainsi qu'une innocuité sur des macrophages en culture ont été démontrées. Après injection intraveineuse chez des animaux sains, les NP ont été facilement détectées à l'aide d'un système commercial d'imagerie PA et d'une séparation spectrale. Afin de comprendre la relation entre les propriétés photophysiques des NP et le signal photoacoustique généré, nous avons montré que l'effet d'extinction de fluorescence provoqué par l'agrégation du Bodipy est étroitement relié à l'efficacité de génération photoacoustique.

Pour cela, des NP avec différents taux de chargement de PLA-Bodipy et un spectrophotomètre photoacoustique calibré ont été exploités. Nous avons démontré la présence de deux régimes différents pour l'émission photoacoustique : un régime monomère et un régime d'extinction causée par l'agrégation. Dans le régime monomère, en dessous de 10% en masse de PLA-Bodipy, l'émission de fluorescence du Bodipy monomère limite le rendement photoacoustique. Au-dessus de 10% de PLA-Bodipy, dans le régime d'extinction par agrégation, les désactivations non-radiatives sont majoritaires et le rendement photoacoustique atteint une valeur asymptotique élevée de 90%. Un modèle mathématique a été proposé pour prédire le taux d'encapsulation minimal pour atteindre le régime d'extinction causé par agrégation. Nous avons également démontré une perte du signal photoacoustique à haute fluence laser ($3,5 \text{ mJ.cm}^{-2}$) par dépopulation de l'état fondamental. Cet effet non-linéaire peut être supprimé avec des NP dans le régime d'extinction causée par agrégation. Les NP possédant plus de 10% de PLA-Bodipy démontrent une efficacité de génération photoacoustique élevée et une faible perte de signal par des effets non-linéaires. Enfin, un AZA-Bodipy a été synthétisé pour conférer une sensibilité au pH aux NP polymère.

Title : Bodipys for photoacoustic imaging: formulation as polymer nanoparticles, thorough photophysical characterization, *in vitro* and *in vivo* biological evaluation.

Keywords : Photoacoustic, medical imaging, nanoparticles, Bodipy, photophysical, polymer

Abstract : We have designed a novel Bodipy for efficient *in vivo* photoacoustic (PA) imaging of nanoparticles (NPs) commonly used as drug nanovectors. It has an optimized absorption band in the near-infrared window in biological tissue and a low fluorescence quantum yield that leads to a good photoacoustic generation efficiency. After Bodipy-initiated ring opening polymerization of lactide, the polylactide-Bodipy (PLA-Bodipy) was formulated into PEGylated nanoparticles at different Bodipy concentrations. Formulated ≈ 100 nm NPs exhibit excellent PA properties: 760 nm absorption band and molar absorption coefficient in between molecular PA absorbers and gold NPs. Highly improved photostability -compared to cyanine-labelled PLA NPs as well as innocuity in cultured macrophages were demonstrated. After intravenous injection in healthy animals, NPs were easily detected using a commercial PA imaging system and spectral unmixing. In an attempt to understand the relationship between the photophysical properties of the nanoparticles and the generated photoacoustic signal, we have shown that Bodipy aggregation caused quenching effect is closely related to the photoacoustic generation efficiency.

For this purpose, NPs with different PLA-Bodipy loadings and a calibrated photoacoustic spectrophotometer were exploited. We have demonstrated the presence of two different regimes for photoacoustic emission: a monomer regime and an aggregation caused quenching regime. In the monomer regime, below 10% in weight of PLA-Bodipy, the fluorescence emission from the Bodipy monomer limits the photoacoustic yield. Above 10% of PLA-Bodipy, in the aggregation caused quenching regime, non-radiative deactivations are predominant and the photoacoustic yield reaches a high asymptotic value of 90%. A mathematical model is then proposed to predict the minimum dye loading to reach the aggregation caused quenching regime. We have also demonstrated the loss of photoacoustic signal at high laser fluency (3.5 mJ.cm^{-2}) by ground state depopulation. This nonlinear effect can be suppressed with NPs in the aggregation caused quenching regime. Above 10% of PLA-Bodipy NPs show high photoacoustic generation efficiency and poor signal loss by nonlinear effect. Finally, an AZA-Bodipy was synthesized to confer pH sensitivity to the polymer NPs.

"A straight line may be the shortest distance between two points, but it is by no means the most interesting"

(3rd Doctor, doctor who)

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres du jury pour avoir pris le temps de me lire, pour tous vos conseils et pour vos remarques qui vont nous être très utiles pour le prochain article que nous souhaitons publier. Merci pour la discussion très riche que nous avons eue.

Je tiens ensuite à remercier également mes directeurs de thèse qui sont tous les deux exceptionnels ! Tant par leurs grandes qualités humaines que par leur très haut niveau scientifique sur de nombreux domaines : de la physique, à la biologie, la pharmacie et la chimie.

Rachel, je vous ai rencontré en tant qu'élève, vous étiez et vous êtes toujours une enseignante formidable, très à l'écoute des étudiants et pleine de passion et d'enthousiasme dans tout ce que vous faites. J'ai adoré assister à vos TD et TP en tant qu'étudiant et je n'hésiterai pas à m'inspirer de vos méthodes pédagogiques pour ma future carrière. En tant que directrice de thèse, vous avez su m'accompagner scientifiquement, mais également sur mon projet professionnel. J'ai longuement hésité à faire une thèse, vous avez accompagné mes réflexions, mes questionnements, sans jamais remettre en cause mes choix. Vous avez su me donner confiance en moi. Nous avons construit ensemble le dossier pour obtenir le CDSN et je ne regrette absolument pas ce choix, car j'ai passé trois années formidables à vos côtés. Nos échanges réguliers sur la photophysique, la spectroscopie, mais aussi sur pleins d'autres sujets (pédagogie, éducation, la science, la vie...) autour d'un café et de sucreries vont me manquer. J'ai pu grandir avec vous scientifiquement, mais aussi humainement, et je n'oublierai jamais tout ce que je vous dois. Je sais que vous allez répliquer votre fameux : "*My job, my pleasure*", je tenais à vous dire que "*my pleasure*" c'est d'avoir travaillé avec vous.

Nicolas, j'ai appris à te connaître durant ces trois années de thèse, tu es un encadrant exceptionnel ! J'ai énormément appris à tes côtés, notamment à avoir un esprit de synthèse et à bien tout aligner sur mes diapositives et mes figures ;). Tu m'as fait découvrir le monde des nanoparticules, des polymères et des études *in vivo* et *in vitro*, toujours de manière très pédagogique. Tu m'as également conseillé et

accompagné dans ma carrière et dans mon projet professionnel, pour les candidatures en tant que PRAG à l'IUT et à l'université et tous tes conseils m'ont énormément apporté. J'ai adoré travailler avec toi, tu es quelqu'un de super et je n'oublierai jamais tout ce que je te dois.

Je tiens à vous remercier tous les deux parce que vous m'avez fait très vite confiance, vous m'avez laissé beaucoup de libertés dans la direction que je donnais à cette thèse, et vous avez su chaque fois qu'il était nécessaire me réorienter avant l'impasse. Je pense notamment à la cyanine et aux problèmes de synthèse que nous avons rencontrés. Nicolas, quand cela ne fonctionnait pas, tu n'as jamais remis en cause ma manière de travailler et tu as tout de suite su trouver diverses solutions alternatives (changer le solvant, changer la température, HPLC préparative, changer de réaction) et proposé des discussions qui nous ont fait avancer (avec Laurence, Julien Nicolas, Gilles, et le service HPLC avec Karine Leblanc). Rachel, grâce à votre réseau professionnel et à vos connaissances, vous nous avez permis d'échanger avec Jean-Pierre Malval et Keitaro Nakatani sur la physique non-linéaire. Nous nous sommes perdus plusieurs fois dans ces intenses réflexions, mais cela permet de nourrir la discussion et surtout de nous donner confiance dans nos données. Nous avons fini par converger vers une explication et c'est grâce à votre aide précieuse.

Je tiens à remercier énormément Gilles et Jérôme pour les nombreux conseils, le temps qu'ils ont pris pour me répondre et m'encadrer. Gilles, tu m'as accueilli trois mois pour faire de la synthèse dans ton laboratoire, tu m'as formé et accompagné à faire de la chimie orga, et tu as réussi à me faire apprécier un peu la chimie organique, ce qui n'est pas chose aisée ^^ . Merci pour tes nombreuses aides sur la synthèse, tes relectures, les analyses RMN et les spectres de masse et pour ta bonne humeur.

Jérôme, sans toi, il n'y aurait pas d'expériences photoacoustique et il manquerait une énorme partie de cette thèse ^^ . Tu as très souvent proposé des échanges téléphoniques, par mail ou en visio pour répondre à mes nombreuses questions. Je te remercie pour tout ton temps, ta confiance et tes conseils. Merci pour ton accueil, dans ton laboratoire, où j'ai pu tester nos nanoparticules sur ton super spectrophotomètre photoacoustique. Merci pour le temps que vous

avez passé, toi et Clément, à faire des fits de nos spectres. C'est une grande plus-value à l'article que nous souhaitons publier et c'est grâce à votre travail acharné, votre rigueur scientifique et au temps que vous y avez passé.

Je dois dire que j'ai pris un énorme plaisir à travailler sur ce sujet de thèse ! Merci à tous les quatre, Gilles, Jérôme, Nicolas et Rachel, **les quatre fantastiques de la photoacoustique**, d'avoir créé ce sujet de thèse qui a été passionnant pour moi ! Et le fait que ma thèse se soit bien déroulée doit beaucoup à la force de votre groupe et de votre entente.

Je remercie Clément pour les très belles expériences qu'il a réalisé pour nous : les cartes paramétriques et les modélisations mathématiques. Ce n'était pas directement lié à ton sujet, mais tu t'es investi dans ces expériences avec beaucoup de sérieux et de rigueur, en travaillant plusieurs heures d'affilées dans ton minuscule placard. Les figures qui en ressortent sont particulièrement belles et pertinentes pour l'article que nous souhaitons publier. Tu as très vite maîtrisé la synthèse du polymère, des nanoparticules et les méthodes spectroscopiques pour les caractériser et c'est grâce à tes connaissances pluridisciplinaires. Grâce à toi, j'ai également pu échanger de nombreuses fois sur les expériences photoacoustiques et essayé de comprendre toujours mieux le travail que vous faisiez avec Jérôme sur la calibration du spectrophotomètre. J'ai aimé discuter avec toi de tout et de rien, aux pauses du midi au CROUS, dans le bureau lorsque l'on se croisait à l'IGPS. Enfin, je suis très heureux de savoir qu'il y ait quelqu'un pour prendre un peu la suite, et je suis certain que tu vas faire du très bon boulot avec Jérôme et Nicolas ! Je te souhaite plein de réussites et surtout de prendre du plaisir dans ce que tu fais. Photoacoustique forever !

Je remercie les deux laboratoires que j'ai côtoyés : IGPS et ISMO, car ce sont des laboratoires où il fait bon vivre et où j'ai rencontré de très belles personnes et des amis.

A l'institut Galien, j'ai été très bien accueilli par Flora, qui m'a formé sur la synthèse du polymère et sur la RMN. Merci beaucoup Flora pour ta joie de vivre et tes conseils. Le début de ma thèse s'est

très bien déroulé grâce à ta présence. J'ai pu trouver une personne sur qui me reposer au début quand tout est nouveau tout neuf : les techniques, les machines, les personnes, le fonctionnement du laboratoire. Je remercie également Laurence Moine, qui m'a également beaucoup aidé pour la synthèse des polymères, la caractérisation, la RMN, les questions de purification et pour changer les voies de synthèse notamment avec la cyanine. Merci pour ton temps et tes conseils. Je remercie Stéphanie Denis, grâce à qui nous avons obtenu de jolies courbes de viabilité cellulaire. Même si les expériences n'ont pas fonctionné dès le début, vous avez su trouver des solutions toi et Nicolas. Merci pour ton temps, ta rigueur scientifique et ton organisation sans faille. Je tiens à remercier également Catherine Cailleau, pour les expériences in vivo sur les souris, expériences très importantes qui nous ont permis de mesurer un signal photoacoustique in vivo ! Merci également pour ta bonne humeur et ta gentillesse. Je remercie aussi Magali Noiray pour les expériences de NTA que nous avons réalisées ensemble, j'ai beaucoup aimé discuter avec toi durant les expériences. Je remercie David Chapron pour les expériences de DSC sur les nanoparticules et Julie Mouglin pour la formation à la DLS. Je remercie tout particulièrement l'équipe 7, notamment Julien Nicolas, Théo Pessenti, Maelle Lage pour leur aide et leur temps sur la caractérisation des polymères par chromatographie d'exclusion stérique. Je remercie Elias Fattal de son accueil au sein de l'équipe, où il fait bon vivre, avec un haut niveau scientifique, un esprit d'entraide et un bon encadrement. Enfin, je remercie toutes les personnes que j'ai croisées dans ce laboratoire avec qui j'ai aimé échanger, discuter : merci à Juliette, Hervé, François, Nicolas, Elias, Clément, Sylvie, Van, Géraldine, Maud, Justine, Lorenzo, Kamila, Jessica, Clélia, Adrouchan, Virginia, Sezen. J'ai une pensée toute particulière pour Younes, Natalia, Qinglin, Alexandre (chef photographe, grand pro d'Excel et expert en alignement), Van, Clément et Alessandro avec qui j'ai passé de très bons moments à la fois au bureau, parfois à l'extérieur, et aux repas du midi. Merci les amis !

A l'ISMO, j'ai également rencontré des personnes formidables. Grâce à Minh, Karine et Anam, j'ai pu faire des expériences d'absorption transitoire qui nous ont été très utiles. Je vous remercie

pour votre temps, pour les réunions que nous avons eues pour discuter des données et des interprétations et pour l'utilisation de votre setup. Merci beaucoup à Anam qui a effectué les expériences avec moi et qui m'a aidé pour traiter les données sur Orgin. Je remercie également Théo, stagiaire en M1, qui a dû faire face au confinement et n'a pu manipuler que quelques semaines au laboratoire. Malgré ce temps restreint, tu as réussi à obtenir des beaux spectres de reprecipitation qui nous ont beaucoup aidé à comprendre l'agrégation au sein des NPs. Je remercie Satchin, Michel et Jordan pour leur expertise sur les spectres de masse et l'utilisation de leur spectromètre de masse. Merci également pour les pauses café et les discussions que nous avons eues dans le bureau de Jordan ou dans votre salle de pause. C'était très agréable de parler avec vous de tout et de rien ☺, et j'espère que nous garderons le contact. Je remercie Ludivine et Farah grâce à qui les laboratoires de l'ISMO sont très bien gérés ! Merci pour les formations hygiène et sécurité, les formations au confocal et pour la formation aux risques biologiques. Merci à Ludivine pour le prêt du spectro fibré et du puissance mètre, et surtout pour m'avoir montré l'expérience sur l'extraction de l'ADN de banane. Je remercie également Farah pour les expériences de spectroscopie qu'elle a réalisée avec nous. Les expériences ont été plus nombreuses et plus longues et difficiles que prévues et je te remercie pour la quantité et la qualité des spectres que tu as obtenu dans un temps limité ! J'espère juste ne pas t'avoir dégoûté de la spectroscopie et des lignes de bases ;). Merci à Ludivine et Farah pour votre bonne humeur, c'était un plaisir de travailler et discuter avec vous. Je remercie Enzo Bertuit, qui a été le premier à débroussailler la photoacoustique en stage avec Rachel. C'est grâce à ton travail préliminaire que j'ai dû faire face à peu de problèmes expérimentaux. Je remercie Emmanuel Dartois, mon chef d'équipe pour ton soutien et ton aide lors des démarches administratives et pour m'avoir permis de présenter mon travail lors de réunions d'équipes. Je remercie également les deux directeurs qui m'ont accueilli à l'ISMO : Bernard Bourguignon et Thomas Pino, un laboratoire où il fait bon vivre avec un haut niveau scientifique, un esprit d'entraide et un bon encadrement. Je dis également merci à Nicolas Solem, en stage de L3 avec nous et Irma Liascukiene, avec qui j'ai longuement discuté, échangé autour de café, et de discussions de couloirs ☺. Enfin, je dis merci à tous les étudiants avec lesquels je me

suis senti chez moi à l'ISMO :

Charles, camarade de bureau, toujours prêt pour faire des pauses boissons pendant la journée. Ça a été un plaisir de partager le bureau avec toi, tu es quelqu'un de super avec qui la discussion est facile et intéressante. Toujours prêt à rendre service, merci pour ta bonne humeur et j'espère qu'on va garder contact 😊

Abigail, toujours joyeuse et pleine de vie. Nos discussions vont me manquer. Tu as su donner de la vie à ce laboratoire en organisant des soirées/rencontres entre les doctorants malgré les différentes difficultés sanitaires. Coach sportive à tes heures perdues, les quelques séances de courses que j'ai faites avec toi et Lancelot étaient très éprouvantes ^^, mais agréables, et m'ont permis de souffler (beaucoup souffler) pendant la rédaction. Grande cheffe des cookies au caramel !

Jordan, j'ai adoré venir faire des pauses dans ton bureau. Les soirées Mario Kart/jeux de sociétés/escape-game chez Yann ou à la maison ont toujours été de super moments et j'espère qu'on continuera à en faire (mis à part le mélange football américain et Warhammer, là c'était chaud ;)) !

Laurent, avec toi, on ne s'ennuie jamais ^^ . Grand chef des Kahoot ! Reste comme tu es, garde ton esprit ouvert, gentil et toujours très intéressé par tout (sauf le sport et la forêt ;)). Nos discussions vont me manquer.

Lancelot, tu as réussi à me motiver à venir courir le midi ! J'ai régulièrement essayé de te faire venir manger, le midi, sans grande réussite quand il n'y avait pas de frites ^^ . Grand chef des belles présentations sur fond noir ! C'était un plaisir de discuter avec toi et de te connaître 😊

Erika, cela fait trois ans et demi que je te connais ! Tu es super, très à l'écoute de tes étudiants malgré tout le boulot que tu as ! J'ai adoré discuter avec toi aux salles de pauses et lors des repas ! Je te souhaite plein de réussite dans vos expériences d'irradiations et de NPs avec Charles et tous tes futurs étudiants/collègues. Et j'espère bien que l'on va garder contact.

César, Xiaomin et Pauline, mes collègues de bureau et amis, le temps passé à vos côtés dans le bureau est passé à une vitesse folle. Les pauses café et repas avec vous ont été un bonheur. Les confinements et le fait que j'étais sur deux laboratoires ont fait que l'on s'est moins croisé sur la fin de vos contrats, je le regrette, mais je n'oublie pas tous les bons moments passés avec vous.

Je remercie toutes les personnes formidables et les amis que j'ai croisés à l'ISMO. Un grand merci à Céline, Chiara, Joséphine, Sandrine L-F, Taha, Cassandre, Tom, Pan, Anam, Olivia, Ozan, Jeffrey, Jesus, Killian, Xiaomin, Lisa, Roch, Jingwen, Jennifer, Thomas, Valeria, Gaëlle, Marie-Aline, Loise, Delphine.

Je remercie les étudiants du LIB : Mitradeep Sarkar et Théotim Lucas, qui ont effectué des expériences de photoacoustique pour nous avec rigueur et attention. Merci beaucoup à tous les deux !

Je remercie Elise Michel au PPSM, qui m'a aidé et accueilli dans le laboratoire et qui a fait des synthèses de Bodipy pour nous. Je n'oublie pas de dire un grand MERCI à Justine Coïs, en stage de M1 avec Gilles au PPSM. Tu as énormément débroussaillé toutes les synthèses : du Bodipy, des polymères et des NPs. Grâce à toi, je suis arrivé en septembre et toutes les synthèses fonctionnaient déjà du tonnerre ! Merci pour tout le travail que tu as fait pendant ton stage 😊.

Je remercie Michel Sliwa qui a été mon comité de suivi de thèse. Merci pour ton écoute, tes conseils et ton expertise sur la spectroscopie. Nos discussions nous ont aidées à y voir plus claire.

Je remercie Jean-Pierre Malval pour son expertise sur la physique non-linéaire, et ses conseils sur nos données.

Merci également à l'IUT d'Orsay : Anne Migan-Dubois, Florian-Rabah Monsef, Claude Frappart pour le prêt d'un pyranomètre pour des expériences de photostabilité.

Je remercie tous les profs et enseignants qui m'ont éclairé pendant ma scolarité : Rachel, Satchin, Anne Lafosse, Minh, Jonathan Piard, Claude Frappart, Marie Erard, Fabien Cailliez, Valérie Génot, Nathalie Rougeau, Thomas Zabulon, David Chapelier, Anne Bleuzen.

Merci aux collègues de l'IUT d'Orsay chez qui j'ai effectué ma mission d'enseignement. Un grand grand merci à Claude et Florian qui m'ont soutenu et formé pour enseigner à l'IUT ! Merci pour vos nombreux conseils sur les TP/TD, sur la manière d'enseigner. Merci pour votre soutien dans les démarches administratives et pour les candidatures aux postes de PRAG. Merci à Fabrice, Aurélie, Martine, Saïd, Anthony, Malika, pour la bonne ambiance et les échanges sur les enseignements. Un merci tout particulier à Jonathan Piard et Pierre-Etienne Rouet qui m'ont énormément épaulé pour les candidatures aux postes de PRAG. Merci à tous les deux pour vos conseils précieux et votre temps. Vous êtes tous les deux des très bons enseignants et j'espère le devenir autant que vous.

Je remercie mes amis d'être venu assister à ma thèse et d'avoir posé des jours de congé pour venir me voir. Merci également à ceux qui n'ont pas pu venir et qui m'ont envoyé leur message de soutien ☺ ! Merci également pour vos conseils et vos réponses aux questions de chimie orga et sur la rédaction. Un grand merci à Yann, Mathilde, Jordan, Céline, Anthony, Nico, Nathy, Blaise, Marie, Antho, Emilie, Gab, Ju et Gaspard.

Je remercie ma grande famille, les Bodin, de s'être déplacé au complet pour venir me voir. Merci à Raph, Mallow et Mathieu qui ont posé des jours de congé pour venir me voir. Merci à Papa et Maman pour l'éducation que vous m'avez donnée, et à Papa pour cet amour de la science que tu m'as transmis grâce à tes nombreuses lectures et aux réponses aux nombreuses questions que l'on t'a posées étant enfant.

Un grand merci à la famille Lecoq-Barbé d'être venu me soutenir, merci à Franck et Pierre-Ewen d'avoir posé un jour de congé pour venir m'écouter. Merci beaucoup à Chloé d'être venue après ta soutenance de M2 pour célébrer avec nous. Et un grand merci à Franck et Christine pour toute l'aide pour l'organisation du pot, pour le délicieux jus de pomme maison et les madeleines !

Enfin, merci beaucoup à Meije, sans qui je ne serai que l'ombre de moi-même. Tu me donnes confiance en moi tous les jours. Tu t'es énormément investie dans cette thèse, tu as répondu à mes questions,

tu m'as conseillé sur la rédaction, tu as effectué des relectures, et tu as été une excellente consultante en chimie orga ! Tu m'as énormément aidé pour l'organisation du pot et de la soutenance ! Tu as stressé tout autant que moi si ce n'est plus ^^.

Merci tout simplement d'être là à mes côtés !

TABLE DES MATIERES

Table des matières	5
1 Introduction	14
1.1 Les nanoparticules à visée thérapeutique.....	15
1.1.1 Le ciblage passif : nanoparticules de deuxième génération.....	16
1.1.2 Le ciblage actif : nanoparticules de troisième génération.....	17
1.1.3 La nanomédecine personnalisée : le nanotheranostique.....	18
1.2 La photoacoustique pour faire du nanotheranostique.....	20
1.2.1 Sons et lumières : une image du monde et du vivant.....	20
1.2.2 L'effet photoacoustique.....	23
1.2.3 L'imagerie photoacoustique.....	25
1.3 Spectroscopie photoacoustique : mieux entendre c'est mieux voir.....	28
1.3.1 Signal photoacoustique : équations et grandeurs.....	28
1.3.2 Améliorer le coefficient d'absorption molaire.....	31
1.3.3 Améliorer l'efficacité de génération de l'onde acoustique (PGE)	36
1.3.4 Relation structure propriétés photoacoustiques : augmenter l'efficacité photothermique.....	40
1.3.5 La photoacoustique non linéaire.....	49
1.3.6 Bilan.....	51
1.4 Les agents de contrastes de l'imagerie photoacoustique.....	52
1.4.1 Les agents de contrastes endogènes.....	52
1.4.2 Les agents de contrastes exogènes.....	55
1.5 Objectifs de la thèse.....	81
1.6 Références.....	82
Travaux expérimentaux	97
2 Chapitre 2 : Biocompatible and photostable photoacoustic contrast agents as nanoparticles based on bodipy-scaffold and polylactide polymers: synthesis, formulation and <i>in vivo</i> evaluation	99
2.1 Introduction.....	102
2.2 Results and discussion.....	104
2.3 Conclusion.....	115
2.4 Materials and methods.....	116
2.4.1 Materials.....	116

	2.4.2 Methods.....	117
	2.5 Acknowledgements.....	126
	2.6 References.....	127
	2.7 Supporting Information.....	133
3	Chapitre 3 : How aggregation caused quenching allows to finely tune photoacoustic generation efficiency ?.....	147
	3.1 Introduction.....	151
	3.2 Materials and methods.....	153
	3.2.1 Materials.....	153
	3.2.2 Bodipy and polymer synthesis.....	154
	3.2.3 Nanoparticles synthesis.....	154
	3.2.4 Nanoparticle characterization.....	154
	3.2.5 Bodipy Reprecipitation experiments.....	155
	3.2.6 Photophysical measurements.....	155
	3.2.7 Fluorescence anisotropy.....	156
	3.2.8 Solvatochromism.....	157
	3.2.9 Transient absorption spectroscopy.....	157
	3.2.10 Photoacoustic spectrum measurements.....	158
	3.2.11 PES and UV-spectra fitting.....	160
	3.3 Results.....	161
	3.4 Conclusion.....	178
	3.5 Supplementary.....	179
	3.6 References.....	200
4	Chapitre 4 : des nanoparticules biocompatibles sensibles au pH.....	211
	4.1 Introduction.....	213
	4.2 Les Aza-Bodipy sensibles au pH.....	213
	4.3 Sensibilité au pH des NP de PLA-Bodipy.....	217
	4.3.1 Sensibilité au pH du Bodipy.....	217
	4.3.2 Sensibilité au pH des NP de Bodipy [3]	234
	4.3.3 Dosage du Bodipy [3] en surface des NP.....	242
	4.4 Synthèse des Aza-Bodipy.....	246
	4.5 Conclusion.....	249
	4.6 Partie expérimentale.....	250

4.6.1	Matériel	250
4.6.2	Etude du pH.....	250
4.6.3	Synthèse de l'Aza-Bodipy	253
4.6.4	Synthèse du PLA-PEG-N ₃	260
4.7	Annexe.....	261
4.7.1	Annexe 1 : Précipitation du Bodipy [3] en milieu acide	261
4.7.2	Annexe 2 : Attribution des bandes d'absorption et d'émission du Bodipy [3] dans le mélange tampon/DMSO.....	263
4.7.3	Annexe 3 : Equations acide base et dosage.....	265
4.7.4	Annexe 4 : suivi du signal de fluorescence du Bodipy [3] à 697 nm dissous dans les solutions tampons.	268
4.8	Bibliographie.....	268
5	Conclusions et perspectives.....	273
5.1	Conclusions	273
5.2	Perspectives.....	277
5.2.1	Regarder la cartographie de l'accumulation des NP sur des modèles de tumeurs	277
5.2.2	Favoriser la séparation spectrale avec l'hémoglobine	277
5.2.3	Compréhension photophysique des mécanismes de génération de l'onde acoustique	280
5.2.4	Lien photoacoustique et extinction de fluorescence par agrégation : étude sur différents chromophores.....	282
5.2.5	Contre-ions volumineux et mobilité des rotors moléculaires.....	282
5.3	bibliographie.....	285
6	Publications scientifiques	288
6.1	"CinNapht" dyes: a new cinnoline/naphthalimide fused hybrid fluorophore. Synthesis, photo-physical study and use for bio-imaging	288
6.2	Biocompatible and photostable photoacoustic contrast agents as nanoparticles based on bodipy-scaffold and polylactide polymers: synthesis, formulation and in vivo evaluation.....	288
6.3	How aggregation caused quenching and excitation energy transfer allow to finely tune photoacoustic efficiency ?	289
7	Congrès	291
7.1	Communications orales.....	291
7.2	Posters.....	292

Liste des abréviations

- ϵ : Coefficient d'absorption molaire
- k_r : Constante de vitesse radiative
- k_{nr} : Constante de vitesse non-radiative
- k_{ACQ} : Constante de vitesse d'inhibition par agrégation
- Φ_F : Rendement quantique de fluorescence
- μ : Moment dipolaire électrique
- $\langle R \rangle$: Distance moyenne au plus proche voisin
- R_0 : Rayon de Förster
- σ : Déplacement de Stokes
- τ : Durée de vie de fluorescence (expérimentale)
- $\bar{\tau}$: Durée de vie de fluorescence moyenne
- \bar{r} : Anisotropie stationnaire
- r_∞ : Anisotropie aux temps infinis
- $\lambda_{abs, max}$: longueur d'onde du maximum d'absorption
- $\lambda_{em, max}$: longueur d'onde du maximum d'émission
- Γ : Coefficient de Grüneisen
- A : Absorbance
- ACQ : Aggregation Caused Quenching (Inhibition de fluorescence par agrégation)
- AIE : Aggregation Induced Emission (Emission induite par agrégation)
- A.u. : Arbitrary Units
- Aza-Bodipy : Aza-boradiazaindacènes
- B : Brilliance
- Bodipy : 4-difluoro-4-bora-3A,4A-diaza-s-indacène (abréviation pour "Boron-dipyrrométhène")
- BV : Orbitale la plus Basse Vacante
- CCM : Chromatographie sur Couche Mince
- $CHCl_3$: Chloroforme
- Chloranile : Tétrachloro-p-benzoquinone
- CI : Conversion Interne
- CIS : Croisement Inter-Système
- CMC : Concentration Micellaire Critique
- CP : Conjugated Polymer (Polymère conjugué)
- CPMAS : Cross Polarization Magic Angle Spinning (polarisation croisée à l'angle magique)
- DCC : N,N'-dicyclohexylcarbodiimide
- DCM : Dichlorométhane
- DDQ : 2,3-Dichloro-5,6-Dicyano-p-benzoQuinone
- DIPEA N,N-diisopropylethylamine
- DLS : Dynamic Light Scattering (Diffusion Dynamique de la lumière)

- DMF : diméthylformamide
- DMSO : Diméthylsulfoxyde
- DSC : Differential Scanning Calorimetry (Calorimétrie Différentielle à Balayage)
- DSPE : 1,2-Distéaroyl-sn-glycéro-3-phosphoryléthanolamine
- ELVIS : Extravasation through Leaky Vasculature and subsequent Inflammatory cell-mediated Sequestration
- EP : Ether de Pétrole
- EPR : Enhanced Permeation and Retention Effect
- EtOH : Ethanol
- FBS : fetal bovin serum (serum de veau foetal)
- FDA : Food and Drug Administration
- FRET : Förster Resonance Energy Transfer (transfert d'énergie résonant de type Förster)
- FWHM : Full Width at Half Maximum (largeur à mi-hauteur)
- HO : Orbitale la plus Haute Occupée
- HPS : Hexaphénylsilole
- HSPC : Hydrogenated Soy PhosphatidylCholine
- ICT : Intramolecular Charge Transfer (Transfert de charge intramoléculaire)
- ICG : Indocyanine Green (Vert d'Indocyanine)
- ISC : Intersystem Crossing (Croisement inter-système)
- IR : Infra-Rouge
- LASER : Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation
- LE : Localement Excité
- MeOH : Méthanol
- Mn : Masse molaire moyenne en nombre
- MRI : Magnetic Resonance Imaging (Imagerie par résonance magnétique)
- MTT : [3-(4,5-diMethylThiazol-2-yl)-2,5-diphenyl Tetrazolium bromide]
- NHS : N-hydroxysuccinimide
- NP : Nanoparticule
- n_p : Nombre de molécules par nanoparticule par nm^3
- NV : Nanovector
- NIR : Near Infra-Red (proche infra-rouge)
- NTA : Nanoparticle Tracking Analysis (analyse de suivi des nanoparticules)
- PA : Photoacoustique
- PABs : Photoacoustic ABSorbance (absorbance photoacoustique)
- PACA : PhotoAcoustic Contrast Agent (agent de contraste photoacoustique)
- PAI : Photoacoustic Imaging (Imagerie Photoacoustique)
- PAY : Photoacoustic Yield (Efficacité Photoacoustique)
- PBS : Phosphate Buffered Saline (tampon phosphate salin)
- PDI : PolyDispersity Index
- PDT : PhotoDynamic Therapy (Thérapie Photodynamique)

- PE : Petroleum Ether (Ether de pétrole)
- PEG : poly(éthylène glycol)
- PES : Photoacoustic Excitation Spectra (spectre d'excitation photoacoustique)
- PET : PhotoInduced Electron Transfer (transfert d'électron photoinduit)
- PET : Positron Emission Tomography (tomographie par émission de positons)
- pH : Potentiel Hydrogène
- PLA : Polylactic Acid (Acide Polylactique)
- PLGA : Poly(Lactic-co-Glycolic Acid) (Acide polylactique-co-glycolique)
- PMMA : poly(methyl methacrylate) (poly(métacrylate de méthyle))
- PGE : Photoacoustic Generation Efficiency (Efficacité de génération de l'onde acoustique)
- PTT : Photothermal Therapy (Thérapie Photothermique)
- QY : Fluorescence Quantum Yield (Rendement quantique de fluorescence)
- RADAR : RADio Detection and Ranging
- ROI : Region Of Interest (Région d'intérêt)
- RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
- ROP : Ring Opening Polymerisation (Polymérisation par ouverture de cycle)
- ROS : Reactive Oxygen Species (Espèces Réactives de l'oxygène)
- R_g : Relative Gap (écart relatif)
- RT : Room Temperature (Température Ambiante)
- SEC : Size Exclusion Chromatography (Chromatographie d'exclusion stérique)
- SONAR : SOund Navigation and Ranging
- SP : Semi-conducting Polymer (Polymère semi-conducteur)
- T : Température
- TCSPC : Time-correlated Single-Photon Counting (Comptage de photons uniques corrélés dans le temps)
- T_g : Température de transition vitreuse
- TEM : Transmission Electronic Microscopy (Microscopie à Transmission Electronique)
- THF : TétraHydroFurane
- TFA : Acide TrifluoroAcétique
- TICT : Twisted Intramolecular Charge Transfer (transfert de charge Intramoléculaire par torsion)
- TPA : triphénylamine
- TPE : tétraphényléthylène
- U.A. : Unités Arbitraires
- UV : Ultra-Violet

Cette thèse s'intéresse à l'étude de nanoparticules ayant une pertinence clinique, biocompatibles et biodégradables pour faire de l'imagerie photoacoustique. Les nanoparticules sont constituées du mélange de deux polymères : un polylactide-Bodipy et un polylactide poly(éthylène glycol). Nous allons donc étudier les propriétés physico-chimiques (taille, stabilité, potentiel zêta, forme, taux d'encapsulation), les propriétés spectroscopiques (coefficient d'extinction molaire, rendement quantique de fluorescence, temps de vie de fluorescence) et les propriétés photoacoustiques (efficacité photoacoustique, brillance) de ces NP.

Le manuscrit de thèse commence par une introduction sur l'état de l'art des nanoparticules à visée thérapeutique, sur l'imagerie et la spectroscopie photoacoustique, et sur les agents de contraste couramment utilisés pour l'imagerie photoacoustique. Puis dans le chapitre 2, l'objectif est de fournir une preuve de concept des NP de PLA-Bodipy pour détecter un signal photoacoustique *in vivo* dans des souris. Le chapitre 3 permettra de développer une étude plus approfondie de la spectroscopie photoacoustique des NP de PLA-Bodipy. L'objectif est de comprendre comment favoriser les voies de désexcitation non-radiatives pour augmenter l'efficacité photoacoustique. Nous caractériserons l'efficacité photoacoustique des NP, leur brillance et leur sensibilité à des effets non-linéaires à fortes fluences. Le chapitre 4, s'intéresse à l'étude de la sensibilité aux conditions acides des NP de PLA-Bodipy et à la synthèse d'un nouveau type de chromophore sensible au pH : un Aza-Bodipy. L'objectif est à terme d'obtenir des NP d'Aza-Bodipy sensibles au pH pour permettre un suivi multi-ondes, photoacoustique et fluorescence, de l'internalisation des NP dans des cellules. Enfin, après une conclusion permettant de résumer l'ensemble des résultats, nous évoquerons les perspectives de ce travail.

1 INTRODUCTION



« Les moindres bruits se transmettaient avec une vitesse à laquelle l'oreille n'est pas habituée sur la terre. En effet, l'eau est pour le son un meilleur véhicule que l'air, et il s'y propage avec une rapidité quadruple. »

Jules Verne, *Vingt mille lieues sous les mers* (1869-1870).

1.1 LES NANOPARTICULES A VISEE THERAPEUTIQUE

En médecine, l'utilisation de nanoparticules (NP) est en plein essor. On l'a vu notamment dans le cadre de la pandémie de SARS-CoV-2 (2020-2022) et le développement de vaccins à acide ribonucléique messager (ARNm) véhiculés sous forme de nanoparticules lipidiques (Tenchov et al. 2021). Les nanoparticules sont prometteuses pour permettre le développement de traitements de maladies très graves telles que les cancers, les maladies auto-immunes et inflammatoires, le diabète et les maladies neurodégénératives (Mura et Couvreur 2012).

Par définition une nanoparticule est un objet dont les trois dimensions de l'espace sont inférieures à 100 nm : norme ISO/TS 80004-2 (« ISO/TS 80004-1:2010, Nanotechnologies — Vocabulary — Part 1: Core terms » 2010). Pour des NP à visée thérapeutique, par convention, on parle de nanoparticules lorsque leur taille est inférieure à 1 μm . Il existe de très nombreuses sortes de nanoparticules. Historiquement, les premières sont les liposomes développés par Bangham (Bangham et Horne 1964) dans les années 1960. Dans les années 70, Birrenbach and Speiser (Birrenbach et Speiser 1976), ont développé des nanoparticules polymères. Sont ensuite venues les nanoparticules de silice, d'oxydes métalliques etc... Pour les applications biomédicales, les NP sont principalement utilisées pour la thérapie et le diagnostic (*in vitro ou in vivo*). Il existe actuellement une cinquantaine de formulations de NP sur le marché (Taxol[®], Doxil[®], vaccin ARNm...) (Anselmo et Mitragotri 2019).

Afin d'obtenir une accumulation des NP au site pathologique, deux stratégies peuvent être envisagées : soit par « ciblage passif » en favorisant la circulation sanguine prolongée des nanoparticules par un recouvrement de surface de polymère hydrophile et en bénéficiant des caractéristiques physiologiques du tissu malade, soit par « ciblage actif » en utilisant des interactions ligands-récepteurs qui nécessitent la fonctionnalisation de surface des NP. On définit alors trois types de génération de NP. Les nanoparticules de première génération avec des surfaces plutôt hydrophobes, les nanoparticules de deuxième génération avec un polymère hydrophile greffé en surface et les nanoparticules de troisième génération fonctionnalisées par des ligands ciblant des récepteurs spécifiques.

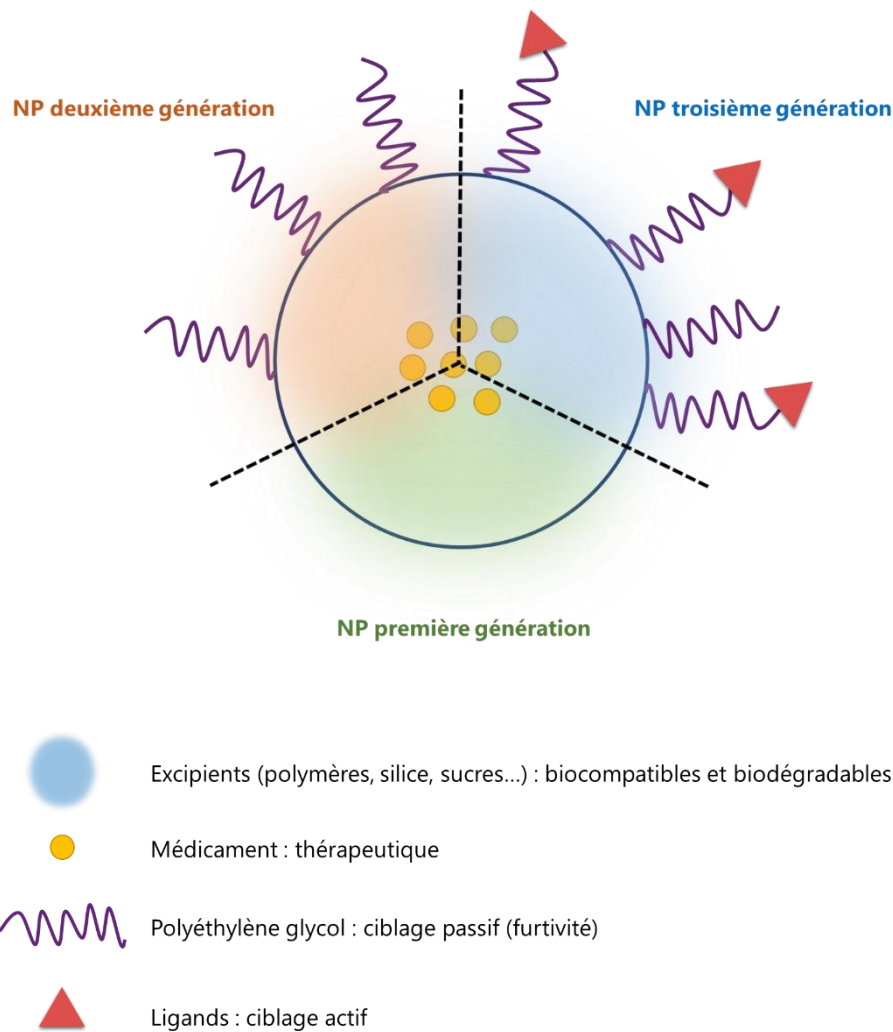


Figure 1.1 : Représentation schématique des différentes générations de nanoparticules

1.1.1 Le ciblage passif : nanoparticules de deuxième génération

Le « ciblage passif » fonctionne grâce à l'effet EPR (Enhanced Permeation and Retention Effect) pour les tumeurs solides (Espinosa-Cano et al. 2019) et grâce à l'effet ELVIS (Extravasation through Leaky Vasculature and subsequent Inflammatory cell-mediated Sequestration) pour les pathologies inflammatoires (Q. Wang et Sun 2017; Yuan et al. 2012). Ces deux effets proviennent du fait que lors de la croissance tumorale ou des processus inflammatoires, on observe la croissance de néo-vaisseaux dont la paroi vasculaire est plus poreuse et peut plus facilement laisser passer des nanoparticules/macromolécules vers les tissus malades, à condition que ces dernières possèdent un temps de circulation suffisamment long dans le compartiment sanguin (figure 1.2). De plus, le drainage lymphatique est diminué dans les tissus tumoraux, ralentissant l'élimination des NP. La PEGylation, qui correspond au greffage de chaînes de poly(éthylène glycol) (PEG) en surface des nanoparticules, permet de bénéficier de

l'effet EPR ou ELVIS et l'on obtient alors des nanoparticules furtives qui sont éliminées beaucoup plus lentement du compartiment sanguin (Owens et Peppas 2006). Par répulsion stérique, les chaînes de PEG empêchent les opsonines de s'adsorber sur les NP et de provoquer leur phagocytose. Cependant, le ciblage passif ne fonctionne qu'avec des nanoparticules de tailles comprises entre 10-300 nm, qui sont à même de traverser les pores des parois endothéliales inflammées (Fattal et al. 2012). L'équipe de Wang a par exemple démontré que l'utilisation de micelles (100 nm) co-délivrant la dexaméthasone et un petit ARN interférent, permet une accumulation dans les tissus inflammés d'une souris atteinte d'arthrite rhumatoïde et la réduction de cette inflammation grâce à l'effet ELVIS (Q. Wang et al. 2017). Des observations similaires d'accumulation ont été faites par Tsapis et son équipe sur le même modèle inflammatoire (Lorscheider et al. 2019) mais aussi sur un modèle murin de cancer du côlon (Boissenot et al. 2016).

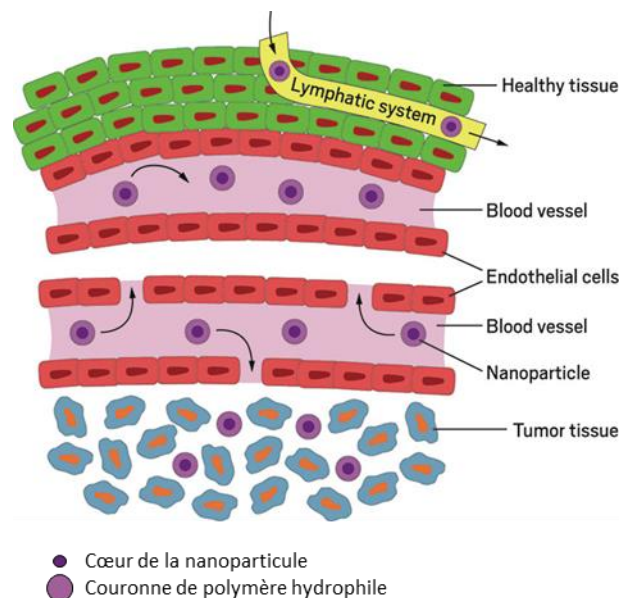


Figure 1.2 : Représentation schématique de l'effet EPR pour Enhanced Permeability and Retention. Le schéma du haut correspond à des tissus sains et celui du bas à des tissus cancéreux. Image provenant de : Does nanomedicine have a delivery problem?, C&EN, volume 14, Issue 25, june 2016 (Torrice 2016).

1.1.2 Le ciblage actif : nanoparticules de troisième génération

Le ciblage actif fonctionne grâce à un ligand présent à la surface des NP qui va interagir avec un récepteur spécifique présent à la surface des cellules à traiter/à imager. L'accumulation des NP est alors favorisée par des interactions de type « clé-serrure » avec la cellule ciblée et permet d'obtenir un bien meilleur index thérapeutique*, de diminuer les effets secondaires et la toxicité. Les ligands peuvent

être des peptides (transferrine, lectine), des anticorps, des aptamères, ou bien des petites molécules (folate) (Yoo et al. 2019).

*Index thérapeutique

Il correspond à la comparaison entre la quantité d'agent thérapeutique qui peut conduire à un effet curatif et la quantité pouvant amener un effet toxique.

$$\text{Index thérapeutique} = \frac{DL_{50}}{DE_{50}}$$

Avec DL_{50} la dose létale médiane et DE_{50} la dose efficace médiane.

Les ligands sont accrochés à la surface des NP soit par liaison covalente, soit par liaisons de Van der Waals, ioniques, ou liaisons hydrogène. Les ligands accrochés par liaisons non covalentes utilisent essentiellement l'interaction biotine/avidine (ou biotine/neutravidine ou biotine/streptavidine), l'une des liaisons non covalentes les plus fortes en biochimie (90 kJ.mol^{-1} pour la liaison biotine-avidine) (Wilchek et Bayer 1990; Vijayalakshmi 2002). Des anticorps monoclonaux ont été fixés par exemple sur des nanoparticules possédant des biotines en surface (Le Droumaguet et al. 2012). La fonctionnalisation en surface par des biotines est également directement utilisée pour cibler les tumeurs puisque les cellules cancéreuses sur-expriment les récepteurs de la biotine (Marques et al. 2020). Récemment, des liposomes fonctionnalisés en surface avec de la biotine greffée de manière covalente, ont démontré une concentration cytotoxique médiane plus faible pour les cellules cancéreuses (photosensibilisateur) que pour les mêmes liposomes sans biotine (de Freitas et al. 2019). Les ligands peuvent aussi être fixés de manière covalente à la surface des NP grâce à la chimie click (cycloaddition de Huisgen) ou par couplage peptidique (dicyclohexylcarbodiimide (DCC) et ester activé par N-hydroxysuccinimide (NHS)). Par exemple, le groupe de Hyeon a proposé le ciblage des cellules immunitaires monocytes grâce à une réaction de chimie click entre l'anticorps anti-CD11b modifié avec un (E)-cyclooctène et des nanoparticules mésoporeuses de silice possédant une tétrazine en surface. Les cellules monocytes, ciblées (antigène CD11b), permettent le transport de ces NP encapsulant l'anticancéreux doxorubicine directement dans les régions tumorales (Lee et al. 2019).

1.1.3 La nanomédecine personnalisée : le nanothéranostique

Malgré les avancées en terme de traitement via les ciblage actifs et passifs, l'efficacité de la délivrance d'agents thérapeutiques par les NP reste bien souvent faible (Torrice 2016). Les limites viennent de grandes différences d'expression des cibles au sein d'une même tumeur, des variations des marqueurs tumoraux au cours d'un

traitement pour un même patient, d'une grande hétérogénéité de l'effet EPR/ELVIS entre les patients et selon le stade de développement de la tumeur, et d'un accès difficile aux cellules et aux tissus malades (Couvreur 2021; Nicolas et Couvreur 2017). Tous ces paramètres peuvent beaucoup varier d'un patient à un autre, voire même changer au sein des cellules malades d'un même patient, rendant compliqués des traitements universels par des NP.

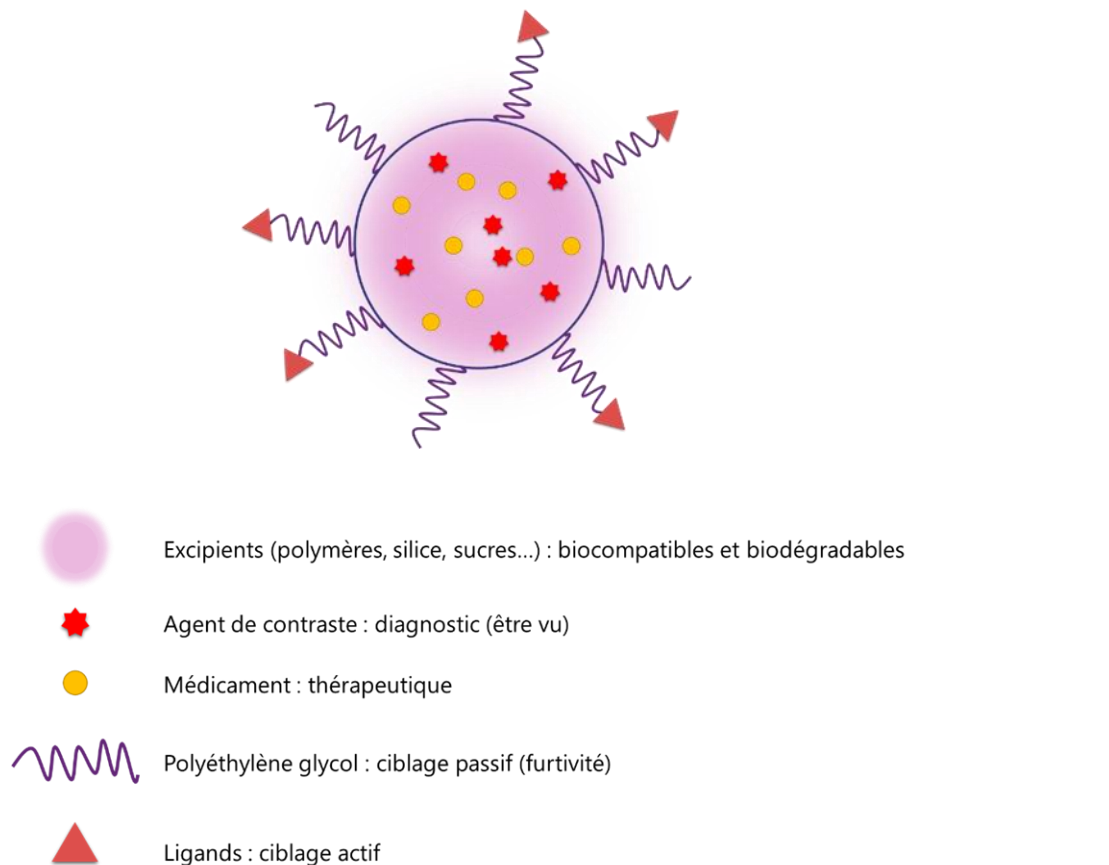


Figure 1.3 : Schéma d'une NP à visée théranostique. Image inspirée de (Couvreur 2021).

Pour répondre à ces limites, le concept de médecine personnalisée a émergé, ce qui signifie que les traitements doivent prendre en compte les différences génétiques et phénotypiques des patients, mais également permettre le suivi de l'évolution de la maladie et du traitement au cours du temps. Pour les NP, la nanomédecine personnalisée doit permettre de savoir, avant l'encapsulation du médicament, si les NP vont bien s'accumuler au site pathologique (la tumeur, zone inflammatoire etc..). Une fois cette condition vérifiée, des NP identiques mais chargées en principe actif sont alors injectées et leur accumulation suivie au cours du traitement. Pour permettre ce suivi, il faut dès lors rassembler le traitement (agent thérapeutique) et l'outil de diagnostic (agent de contraste) au sein d'une même NP : c'est le développement du nanothéranostique (Mura et Couvreur 2012; Fornaguera et García-Celma 2017).

La NP idéale se doit alors d'être furtive (NP de seconde génération), éventuellement d'être spécifique pour un bio-marqueur (NP de troisième génération), elle doit encapsuler un agent thérapeutique ainsi qu'un agent de contraste (imagerie), être non toxique, biocompatible et biodégradable (figure 1.3).

1.2 LA PHOTOACOUSTIQUE POUR FAIRE DU NANOTHERANOSTIQUE

Dans le cadre de l'utilisation de nanoparticules pour distribuer des médicaments, le développement d'une imagerie moléculaire précise est primordial. L'étude non invasive des NP *in vivo*, de leur devenir et de leur accumulation est en effet indispensable pour améliorer cette branche de la médecine. Dès lors quelle technique d'imagerie médicale utiliser ?

1.2.1 Sons et lumières : une image du monde et du vivant

La lumière, onde électromagnétique progressive et le son, onde mécanique progressive, sont deux ondes aux propriétés bien différentes. La lumière ne nécessite pas de milieu matériel pour se propager, ce qui n'est pas le cas des ondes sonores. Les moyens biologiques de détection sont également bien différents : le tympan de l'oreille détecte des variations de pression tandis que la rétine des yeux permet de détecter les photons qui l'atteignent.

L'Homme a essayé de d'exploiter les caractéristiques de chacune de ces deux ondes pour mieux se repérer dans son environnement. Dans l'air, les ondes électromagnétiques sont très présentes. Elles ont permis à l'Homme de communiquer à très longue distance et d'échanger d'importante quantité d'informations (télécommunications). Le RADAR (RAdio Detection and Ranging) permet notamment de détecter la présence d'objets et informe sur leur vitesse à l'aide d'ondes électromagnétiques. Dans le vide, l'exploration spatiale, à l'aide des télescopes, comme le James-Webb télescope tout récemment déployé (décembre 2021), utilise essentiellement la détection d'ondes électromagnétiques (détection infra-rouge) (Fontez 2021).

Cependant, dans les milieux marins, les ondes électromagnétiques sont très peu présentes. La lumière y est très vite atténuée par diffusion et absorption et ne peut pas parcourir de longues distances. Dans ces conditions, l'Homme et les animaux marins, utilisent le son pour se repérer. C'est le cas avec le SONAR (SOund Navigation and Ranging) qui permet de détecter la présence et la distance de gros objets (icebergs, sous-marins, bancs de poissons). Les ondes sonores ont une meilleure vitesse de propagation dans l'eau (1500 m.s^{-1} contre 340 m.s^{-1} dans l'air) et y sont beaucoup moins atténuées que dans l'air. Dans l'eau, les ondes sonores, permettent donc aller sonder beaucoup plus loin que les ondes lumineuses (Lurton 1998; Poirier-Quinot 2019).

Le corps humain étant composé essentiellement d'eau, c'est assez naturellement que l'échographie ultrasonore s'est développée en tant que technique d'imagerie médicale, notamment très utilisée dans le cadre d'examens échographiques prénataux. Les ondes sonores sont très peu diffusées par les tissus, contrairement à la lumière, ce qui confère à l'échographie une très bonne résolution spatiale (< 1 mm) et une très bonne profondeur de pénétration (quelques centimètres) (Poirier-Quinot 2019). De plus, il s'agit d'une technique peu coûteuse et facilement accessible pour les patients, contrairement par exemple aux techniques d'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM). Cependant, malgré ces avantages, l'échographie s'est très peu développée comme outil de suivi de l'accumulation des NP. L'amplitude du signal échographique dépend de la différence d'impédance acoustique entre les milieux traversés par l'onde. Malheureusement, dans les milieux biologiques, il n'existe pas une grande diversité d'impédances acoustiques, les propriétés mécaniques et élastiques des différents tissus étant assez proches (sauf les os). Ainsi l'échographie donne des images à faible contraste, où il sera difficile de distinguer les NP des tissus tumoraux (Weber, Beard, et Bohndiek 2016; « La physique par les objets quotidiens » 2016).

L'imagerie de fluorescence, quant à elle, doit faire des concessions entre profondeur de pénétration et bonne résolution spatiale à cause de l'aspect très diffusif des tissus. La microscopie de fluorescence permet de récupérer des photons peu ou pas diffusés, et donc d'avoir une bonne résolution spatiale ($1\mu\text{m}$) mais doit pour cela aller sonder à de faibles profondeurs (1 mm). À l'inverse la tomographie de fluorescence va sonder plus en profondeur (quelques cm) mais elle collecte alors des photons diffusés (non balistiques) et perd donc en résolution spatiale (inférieure à 1 mm) (Weber, Beard, et Bohndiek 2016). Cependant, l'imagerie de fluorescence a l'avantage de posséder un grand contraste grâce à la bonne sélectivité spectrale des absorbeurs. Il est possible d'exciter seulement les molécules que l'on souhaite observer en sélectionnant les longueurs d'onde d'excitation et d'émission. Typiquement, la fenêtre du proche infra-rouge (IR) est privilégiée pour les absorbeurs et les émetteurs car dans cette zone la diffusion et l'absorption par les tissus est moindre. Le signal d'autofluorescence des tissus sera alors moins élevé et permettra de mieux voir les molécules d'intérêt.

La combinaison du très bon contraste des ondes lumineuses avec la très bonne résolution spatiale des ondes acoustiques, au sein d'un même dispositif d'imagerie médicale est prometteuse pour fournir des images de très bonne qualité : c'est l'imagerie multi-ondes (Fink 2014). En particulier, l'imagerie photoacoustique exploite l'absorption d'ondes lumineuses (bon contraste) pour générer des ondes acoustiques (bonne résolution spatiale).

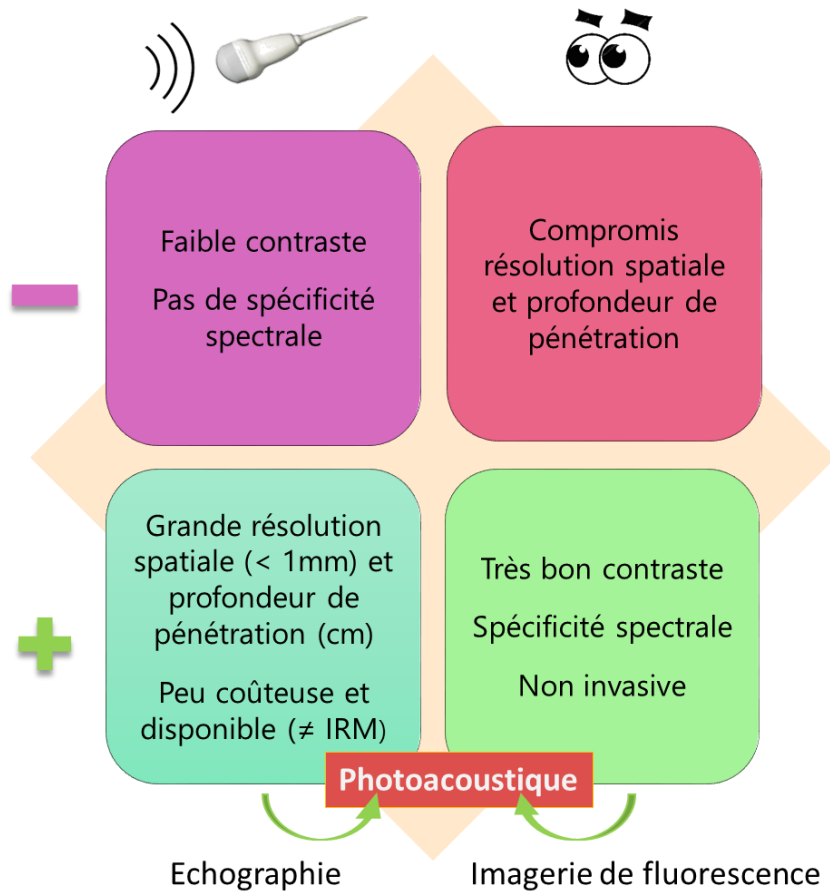


Figure 1.4: Schéma des avantages et inconvénients des techniques d'imagerie échographique et d'imagerie de fluorescence. IRM : Imagerie par Résonance Magnétique.

1.2.2 L'effet photoacoustique

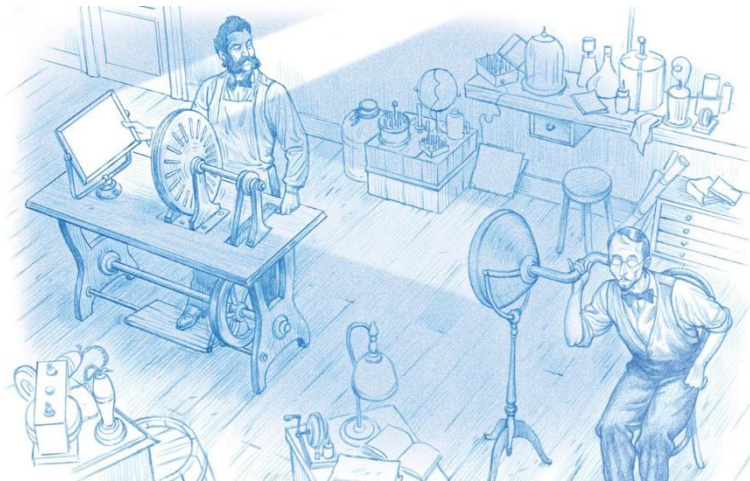


Figure 1.5 : Schéma de l'expérience du photophone d'Alexander Graham Bell. Tiré de *Pour la science*, septembre 2021 (Kierlik et Courty 2021).

Découvert dans les années 1880 par Alexander Graham Bell et Charles Summer Tainter, l'effet photoacoustique (ou optoacoustique) consiste en une conversion de l'énergie lumineuse en énergie acoustique. Bell souhaitait transmettre les conversations entre individus par le biais d'ondes lumineuses grâce à un appareil : le photophone. Lors de leur expériences, Bell et Tainter ont découvert qu'en faisant converger la lumière du soleil sur un matériau et en modulant périodiquement cette lumière par le biais de disques percés tournants (hacheur optique), un son est émis par le matériau (figure 1.5). C'est l'effet photoacoustique (PA). Bell et Tainter ont par la suite montré que la fréquence du son émis ne dépendait pas du matériau employé mais seulement de la modulation du faisceau lumineux. Ils remarquèrent également que plus les matériaux étaient absorbants plus ils émettaient un son de grande amplitude (Bell 1880; Kierlik et Courty 2021). L'effet photoacoustique est donc relié au phénomène d'absorption de la lumière.

Lorsque le matériau absorbe la lumière, les molécules de ce dernier passent alors dans un état excité. Elles vont ensuite se désexciter par des vibrations et des collisions entre elles ou avec le solvant/matériau (désexcitations par des voies non-radiatives) qui vont créer un échauffement en surface du matériau (ou du solvant à proximité pour des molécules en solution). Sous réserve d'un matériau faiblement conducteur de chaleur, cet échauffement va par la suite se transmettre à la couche d'air directement en contact avec lui. La modulation de la lumière provoque donc des phases d'échauffement/refroidissement périodiques de la couche d'air et donc par effet thermoélastique, des phases périodiques d'expansion/compression de l'air (ou du solvant) : une onde sonore se crée (figure 1.6).

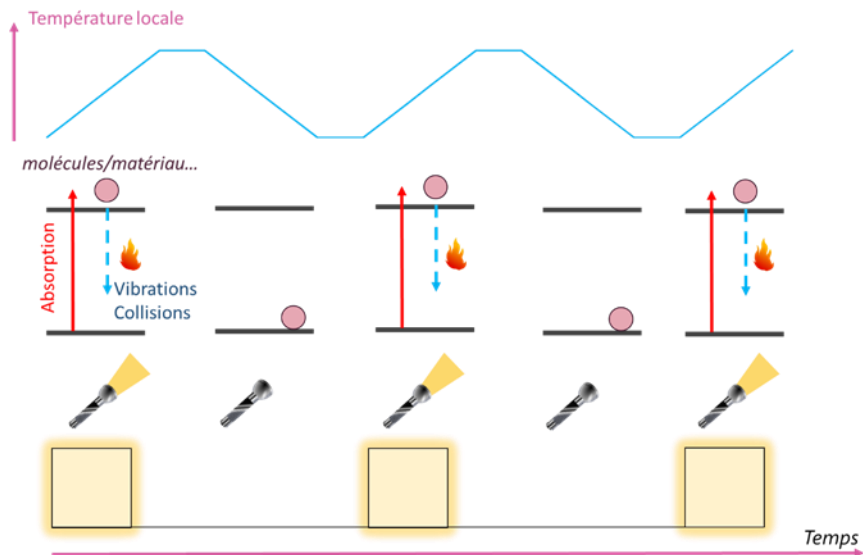


Figure 1.6 : Principe de fonctionnement de l'effet photoacoustique. Inspiré de *Pour la science*, septembre 2021 (Kierlik et Courty 2021).

Depuis l'avènement du LASER dans les années 1960 et des sources lumineuses impulsionnelles, la photoacoustique s'est énormément développée. Les LASER permettent de facilement moduler l'amplitude de la lumière sans passer par un hacheur de faisceau, d'atteindre des fréquences jusqu'à plusieurs mégahertz et de sélectionner la longueur d'onde d'excitation (Palzer 2020). Une recherche statistique sur la base de données « Web of science » avec le mot clé « photoacoustic » montre le nombre croissant de publications depuis quarante ans : près de 1500 articles publiés en 2020 (figure 1.7). Les domaines d'applications de l'effet photoacoustique sont nombreux. Dans le paragraphe ci-dessous, quelques applications non exhaustives de l'effet photoacoustique sont présentées.

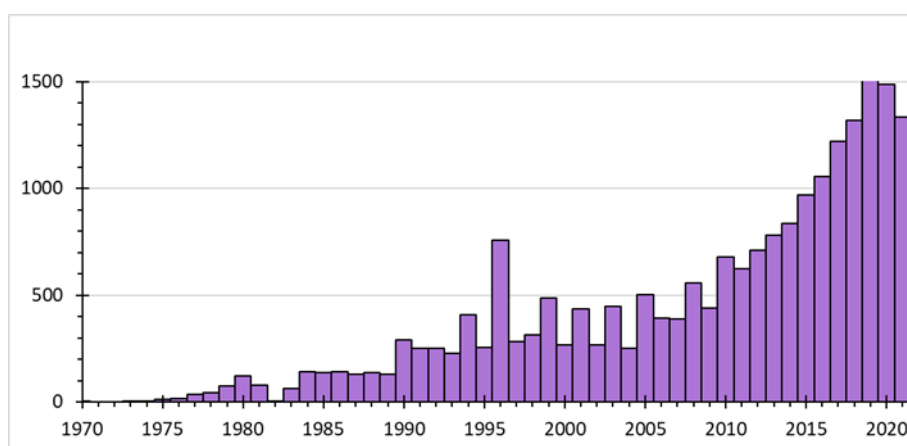


Figure 1.7 : Etude statistique des publications portant sur la photoacoustique depuis 1997, effectuée grâce au moteur de recherche *Web of Science*. Mot clé : « Photoacoustic ».

L'importante sensibilité de l'effet photoacoustique est très utilisée pour la détection de gaz à l'état de traces. Dans le domaine de l'environnement, l'effet photoacoustique est utilisé pour détecter la présence de polluants industriels et déterminer leur concentration dans l'air, ainsi que pour le contrôle atmosphérique des gaz à effet de serres (CH_4 , CO_2) (Berrou et al. 2009). Dans le domaine des semi-conducteurs et des batteries au lithium, la photoacoustique permet de contrôler très finement l'épaisseur des différentes couches des matériaux et les défauts (croissance de dendrites pour les batteries au lithium) de façon non destructive (« Sons et lumière » 2016; H. Liu et al. 2020; Podymova et Karabutov 2010). Un instrument commercial a par ailleurs été développé, MetaPULSE®, pour déterminer l'épaisseur de films métalliques (résolution jusqu'à 50 Å) en utilisant la photoacoustique femtoseconde (« MetaPULSE® - Machine de mesure d'épaisseur stationnaire by Onto Innovation Inc. | DirectIndustry »). La spectroscopie photoacoustique est aussi très intéressante pour étudier des solides opaques ou doser des substances très absorbantes, comme par exemple les colorants des teintures (industrie textile) ou des polymères (« Sons et lumière » 2016; Schmid et al. 2003). En 2016 Zhao et son équipe ont utilisé l'effet photoacoustique sur des NP d'or pour développer un test immunologique peu cher, quantitatif et 143 fois plus sensible qu'un test standard dosant l'interleukine 8, un marqueur clé de l'inflammation (Y. Zhao et al. 2016). Enfin, la miniaturisation d'appareils de spectroscopie photoacoustique est utilisée pour détecter la présence d'explosifs et de leurs précurseurs comme l'acétone (Patel 2008; Raybaut et al. 2011; Elbasuney et El-Sharkawy 2018).

1.2.3 L'imagerie photoacoustique

L'effet photoacoustique présente un intérêt majeur dans le cadre de l'imagerie biomédicale. L'imagerie photoacoustique est une technique multi-ondes qui va utiliser la lumière pour exciter les tissus biologiques, les agents de contrastes exogènes ou endogènes, et qui va détecter un signal ultrasonore obtenu par effet photoacoustique.

Grâce à l'excitation lumineuse, les images obtenues possèdent un bon contraste. Pour cela il suffit de sélectionner les longueurs d'ondes d'absorption des molécules que l'on souhaite observer, seules ces dernières seront alors excitées et conduiront à un effet acoustique. Les molécules non excitées, seront alors invisibles. Pour augmenter le plus possible ce contraste, la fenêtre du proche infra-rouge est privilégiée car c'est dans cette de région que l'atténuation de la lumière par les tissus est moindre et que la profondeur de pénétration sera meilleure. Par exemple, l'observation d'une lumière blanche transmise à travers les doigts de la main montre que la lumière rouge a été moins absorbée que les autres couleurs (Figure 1.8 gauche). Dans la zone entre 650 nm et 950 nm les coefficients d'absorption des molécules biologiques sont plus faibles (figure 1.8 droite) et permettent à la lumière de se propager sur plusieurs centimètres de profondeur. Grâce à l'imagerie photoacoustique il est possible, par exemple, de

distinguer des nanoparticules des tissus dans lesquels elles s'accumulent. L'équipe de Kai Cheng, a réussi à observer le signal photoacoustique de nanoparticules d'or (Au-tripods) ciblant des cellules tumorales (U87MG) (figure 1.9). Les nanoparticules sont excitées à 700nm et génèrent un signal photoacoustique (en vert) qui permet de les distinguer des tissus. En revanche, avec l'imagerie ultrasonore (en gris), les nanoparticules ne sont pas décelables (Cheng et al. 2014). Le contraste est bien meilleur pour observer les NP en imagerie PA qu'avec l'imagerie ultrasonore seule.

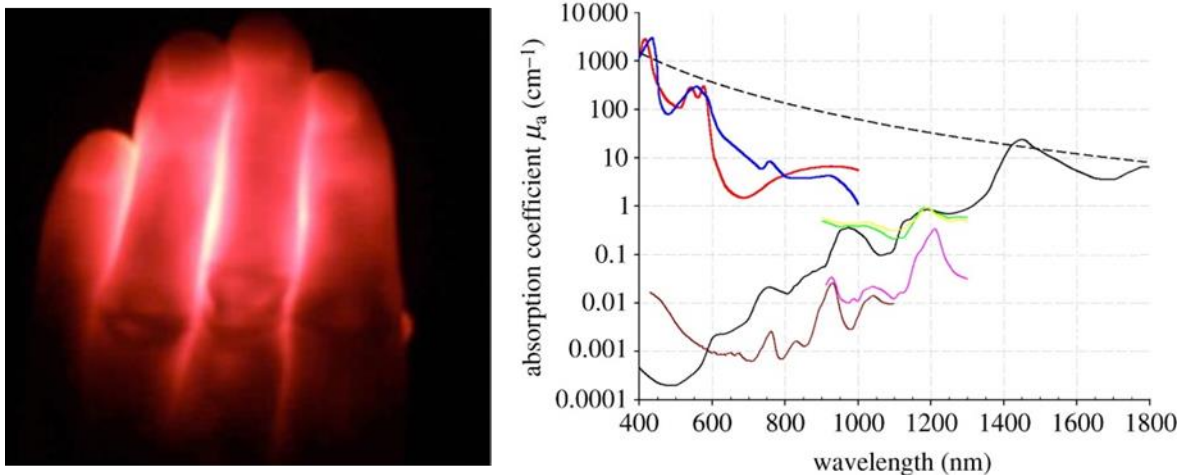


Figure 1.8 : (Gauche) Observation d'une lumière blanche transmise par les doigts de la main. Image provenant de scilogs.fr/questions-de-couleurs, La couleur du sang dans tous ses états ⁴⁰ © Bernard Valeur. (Droite) Spectres d'absorption des chromophores endogènes. (Bleu, désoxyhémoglobine 150 g.L^{-1}) ; (Rouge, oxyhémoglobine 150 g.L^{-1}) ; (Noir, eau) ; (Rose et marron, lipides) ; (Vert, collagène) ; (Jaune, élastine) ; (Pointillés, Mélanine). Image tirée de (Beard 2011).

Avec l'imagerie photoacoustique, la diffusion et l'absorption de la lumière dans les tissus limitent seulement la quantité de lumière pouvant atteindre les absorbeurs, et donc le nombre de molécules excitées et les profondeurs sondées. Cependant la diffusion de la lumière n'a aucune influence sur la résolution spatiale de l'image, cette dernière est imposée par les ondes acoustiques émises. Les ondes sonores étant moins diffusées par les tissus que la lumière, l'imagerie photoacoustique permet d'obtenir des résolutions spatiales inférieures au millimètre pour des profondeurs sondées de quelques centimètres (Weber, Beard, et Bohndiek 2016). Sur la figure 1.10 est représentée l'image d'une jeune feuille de rose observée avec une imagerie bimodale de microscopie photoacoustique et de fluorescence par l'équipe de Tserevelakis (Tserevelakis, Tsagkaraki, et Zacharakis 2016). Sur cette image, on voit que la résolution spatiale des nervures donnée par la microscopie photoacoustique (observation de l'anthocyanine en rouge) est bien meilleure que celle observée en microscopie de fluorescence (en vert chlorophylle). La photoacoustique permet donc d'obtenir des images avec une bien meilleure résolution spatiale que l'imagerie de fluorescence.

Dans cet article, les images obtenues par microscopie photoacoustique possèdent une résolution spatiale de 23 μm en axial et de 3 μm en latéral contre 106 μm en axial et 3 μm en latéral pour la microscopie optique.

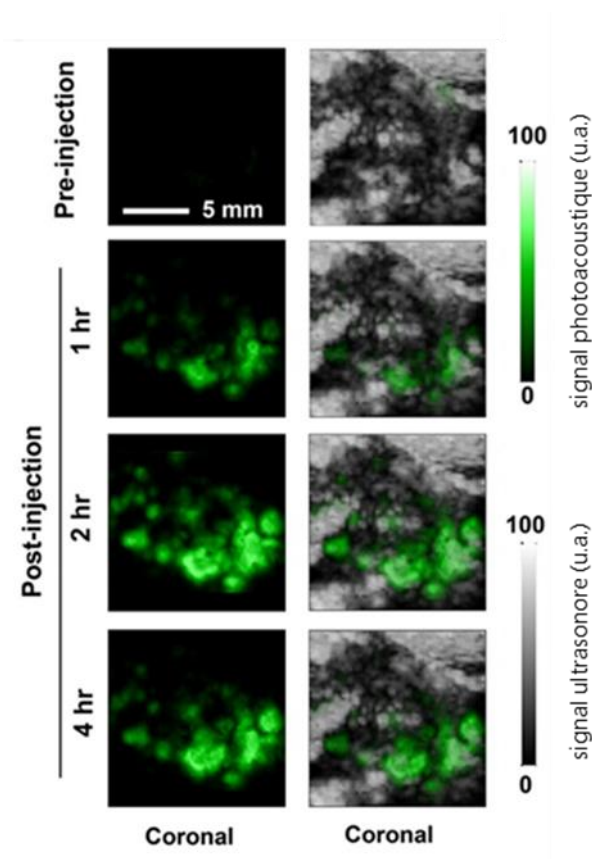


Figure 1.9 : Imagerie photoacoustique (colonne de gauche) et superposition d'imagerie ultrasonore et PA (colonne de droite) d'une souris possédant des cellules cancéreuses (U87MG) sur-exprimant le récepteur intégrine $\alpha\beta 3$. Ces cellules sont ciblées par des NP d'or (Au-tripods). Le signal photoacoustique est représenté en nuances de vert, excitation à 700 nm (transducteur 5 MHz). Le signal ultrasonore obtenu par échographie ultrasonore est indiqué en nuances de gris (transducteur 25 MHz). D'après (Cheng et al. 2014).

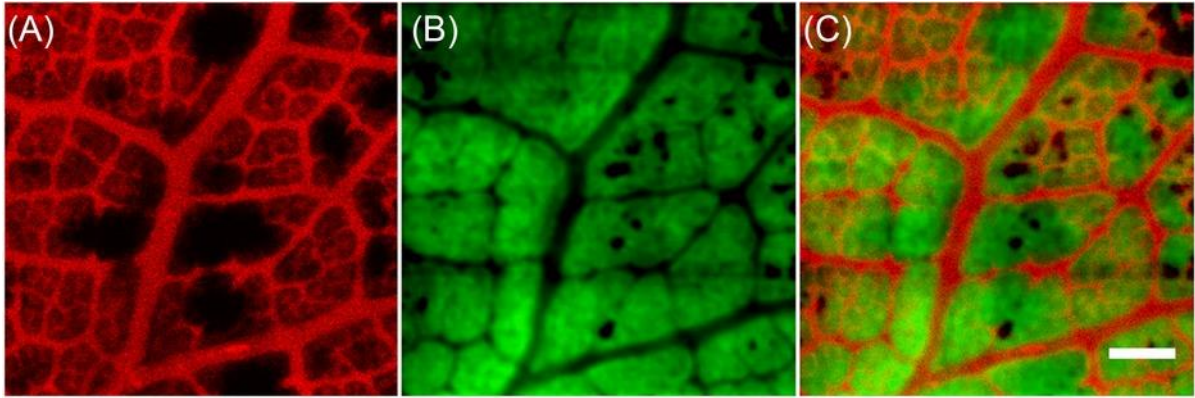


Figure 1.10 : Imagerie d'une jeune feuille de rosier. (A) Image de microscopie photoacoustique, observation du signal photoacoustique des Anthocyanines. Excitation à 532 nm. (B) Image de fluorescence des chlorophylles sur la même région. Excitation à 473 nm (C) Image combinée des deux techniques d'imagerie. Echelle 500 μm , zone étudiée 3 x 3 mm. Image tirée de (Tserevelakis, Tsagkaraki, et Zacharakis 2016).

L'imagerie photoacoustique est donc très prometteuse pour permettre d'observer l'accumulation de NP avec un très bon contraste et une bonne résolution spatiale (inférieure à 1 mm pour quelques cm de profondeur pour la tomographie photoacoustique). Cependant, comme l'ont vu Bell et Tainter, tous les matériaux ne sont pas à même de générer un signal photoacoustique. De la même manière, certaines molécules ou particules seront plus efficaces que d'autres pour générer de forts signaux photoacoustiques. Pour pouvoir améliorer le contraste photoacoustique, il est alors nécessaire de comprendre, quantifier et si possible maîtriser, l'ensemble des processus à même de générer l'effet photoacoustique : c'est la spectroscopie photoacoustique.

1.3 SPECTROSCOPIE PHOTOACOUSTIQUE : MIEUX ENTENDRE C'EST MIEUX VOIR

1.3.1 Signal photoacoustique : équations et grandeurs

Dans le cadre de cette thèse, nous nous intéresserons essentiellement à un signal photoacoustique généré en régime de confinement thermique. C'est-à-dire que le temps de diffusion thermique peut être négligé devant le temps d'impulsion du LASER (τ_{laser}).

$$\tau_{\text{laser}} \ll \frac{d^2}{4D_{\text{th}}} \quad (1)$$

Avec D_{th} le coefficient de diffusion thermique en $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ et d la dimension caractéristique de l'objet d'étude en m.

Le régime de confinement de contrainte doit également être satisfait. L'onde de pression n'a pas le temps de diffuser pendant la durée d'une impulsion LASER.

$$\tau_{laser} \ll \frac{d}{c} \quad (2)$$

Avec c la célérité du son dans les milieux biologiques (1500 m.s^{-1}). Dans un milieu biologique de l'ordre d'une dizaine de micromètres et en sachant que le coefficient de diffusion thermique est de $0,14 \text{ mm}^2.\text{s}^{-1}$ dans les tissus biologiques (Duck 2013), le confinement thermique est respecté pour des impulsions LASER inférieures à $179 \mu\text{s}$. Le confinement de contrainte est satisfait pour des impulsions LASER inférieures à 7 ns . Lorsque les deux régimes sont vérifiés, l'amplitude de l'onde acoustique émise est optimale. Dans le cadre de l'imagerie photoacoustique, des impulsions LASER de quelques nanosecondes sont donc utilisées.

Dès lors, l'amplitude de l'onde de pression au temps initial peut s'exprimer comme suit (Sarkar et al. 2021) :

$$p_0(\lambda) = PGE_{éch}(\lambda) \cdot \varepsilon(\lambda) \cdot C \cdot \Phi(\lambda) \cdot \Gamma_{solvant} \quad (3)$$

Avec p_0 la pression initiale générée par l'effet photoacoustique en excitant à la longueur d'onde λ . $PGE_{éch}$ correspond à l'efficacité de génération photoacoustique de l'échantillon (en anglais Photoacoustic Generation Efficiency PGE, est parfois appelé $\eta_{échantillon}$). PGE est sans dimension et exprime l'efficacité de conversion d'énergie lumineuse absorbée en énergie acoustique (figure 1.15). $\Gamma_{solvant}$ est le coefficient de Grüneisen* du solvant et est une grandeur sans dimension. A 22°C dans l'eau le coefficient de Grüneisen vaut $0,12$ mais la présence de solutés ou de particules dans l'eau peuvent changer sa valeur (Sarkar et al. 2021). Φ correspond à la fluence du LASER (en J.cm^{-2}) sur l'échantillon pour une longueur d'onde donnée. $\varepsilon(\lambda)$ est le coefficient d'absorption molaire de l'échantillon en $\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ à la longueur d'onde étudiée et C est la concentration de l'échantillon en mol.L^{-1} .

*Coefficient de Grüneisen

Il peut être déterminé à partir de la célérité du son dans le solvant v_s , du coefficient de dilatation isobare β et de la capacité thermique isobare du milieu C_p

$$\Gamma_{solvant} = \frac{\beta v_s^2}{C_p}$$

Dans la littérature, le PGE est parfois remplacé par la grandeur $(1-\Phi_F)$, avec Φ_F le rendement quantique de fluorescence (Hatamimoslehabadi et al. 2017; Zhou et al.

2019; Z. Zhao et al. 2019; Hatamimoslehabadi et al. 2017). Cependant la fluorescence n'est pas la seule voie de désexcitation possible qui conduise à une perte de signal acoustique (génération d'espèces réactives de l'oxygène, phosphorescence, se conférer au paragraphe 1.3.3) (Fuenzalida Werner et al. 2020). Le terme PGE permet alors de rassembler l'ensemble des pertes d'énergie possibles dans un même terme pour exprimer l'efficacité globale de transformation de l'énergie lumineuse absorbée en énergie acoustique.

Ainsi l'amplitude de l'onde de pression peut être augmentée en jouant sur quatre paramètres : PGE, ϵ , C et Φ . Dans le cadre d'une utilisation biomédicale de l'effet photoacoustique, il est important de ne pas trop augmenter la fluence** d'irradiation pour éviter de brûler les tissus. Pour la peau à 750 nm et pour des impulsions LASER de quelques nanosecondes, l'exposition maximale permise est de 20 mJ.cm^{-2} (Paschotta; Li et Wang 2009). De la même manière, il est préférable de ne pas avoir des concentrations trop élevées pour limiter la toxicité des agents de contrastes introduits dans le corps. Par ailleurs, pour des agents de contrastes endogènes, le contrôle de la concentration est impossible. Ainsi, pour des applications biomédicales, les paramètres concentration et fluence ont une influence très limitée. On peut toutefois remarquer que le signal de pression photoacoustique est proportionnel à la concentration, tout comme en spectroscopie d'absorption (loi de Beer-Lambert) et de fluorescence. Il est alors possible, en photoacoustique, d'effectuer des dosages d'espèces par étalonnage, comme vu au paragraphe 1.2.2 pour les teintures ou les polymères.

**Fluence

En optique la fluence d'une impulsion LASER correspond à l'énergie lumineuse délivrée par unité de surface (en J.cm^{-2}).

Dans le cas de dommages causés par des impulsions LASER, la fluence est souvent employée comme seuil d'endommagement (ou exposition maximale). Attention cependant ce seuil d'exposition maximale diminue avec la durée de l'impulsion LASER (Paschotta).

Pour une concentration et une fluence donnée, le meilleur contraste en imagerie photoacoustique sera obtenu avec des échantillons pour lesquels le produit $\text{PGE} \times \epsilon$ sera le plus grand possible. Cette situation n'est pas sans rappeler celle de l'imagerie de fluorescence pour laquelle les plus grands contrastes sont obtenus avec les particules les plus brillantes : $B = \Phi_F \times \epsilon$. Avec B la brillance de l'échantillon en $\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, Φ_F le rendement quantique de fluorescence (l'efficacité de l'émission de fluorescence) et ϵ le coefficient d'absorption molaire de l'échantillon (Braslavsky 2007). Zhou et son équipe, en 2017, ont par exemple défini la brillance photoacoustique

comme le produit $\epsilon \times (1-\Phi_F)$ (Zhou et al. 2019). Mais actuellement très peu d'articles font référence ou exploitent la grandeur « brillance photoacoustique ».

1.3.2 Améliorer le coefficient d'absorption molaire

Pour améliorer la brillance photoacoustique, il faut donc augmenter deux paramètres : le coefficient d'absorption molaire et l'efficacité de génération des ondes acoustiques PGE.

Le coefficient d'absorption molaire, ϵ , représente la capacité d'une molécule à absorber la lumière. Lors de l'absorption d'un photon par une molécule, un électron d'une orbitale moléculaire de l'état fondamental va être excité vers une orbitale moléculaire vide. Cette transition électronique est gouvernée par des règles de sélection qui vont indiquer si la transition est plus ou moins permise. Les plus grands coefficients d'absorption molaire sont obtenus pour des transitions permises de spin et permises de symétrie : $\epsilon > 1000 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. Pour que la transition électronique soit permise de spin il faut que le spin de la molécule ne change pas lors de la transition électronique : par exemple transition singulet \rightarrow singulet. Les transitions permises de symétrie s'expliquent en utilisant la théorie des groupes et les symétries des fonctions d'ondes des orbitales. Leur étude n'est pas discutée ici. Les transitions de type $\pi \rightarrow \pi^*$ qui sont permises de symétrie possèdent de forts coefficients d'absorption molaire pouvant aller jusqu'à $10^5 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ (Valeur et Berberan-Santos 2013). Ces transitions sont visibles dans les molécules possédant des doubles liaisons (ou triples) et des systèmes conjugués, comme des composés aromatiques, des diènes ou polyènes conjugués. Dans le tableau 1.1 sont représentés les ordres de grandeurs des coefficients d'absorption molaire de certains chromophores.

Molécule	$\epsilon \text{ (L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1})$	Molécule	$\epsilon \text{ (L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1})$
Fluorène	9 000 (266, CHCl_3)	Bianthryle	24 000 (390, cyclohexane)
Anthracène	10 000 (356, cyclohexane)	Acridine orange	30 000 (430, éthanol)
Sulfate de quinine	10 000 (349 nm, eau H_2SO_4)	Pérylène	34 000 (434, cyclohexane)
Adénine	12 000 (261, eau)	Eosine Y	90 000 (525, éthanol)
Biphényle	16 000 (247, éthanol)	Rhodamine B	105 000 (543, éthanol)

Tableau 1.1 : Ordre de grandeurs des coefficients d'absorption molaire (au maximum de la bande) de quelques chromophores – les structures sont données figure 1.11. Entre parenthèse sont indiquées les longueurs d'ondes des maxima d'absorption en nm et le solvant utilisé (<https://omlc.org/index.html>).

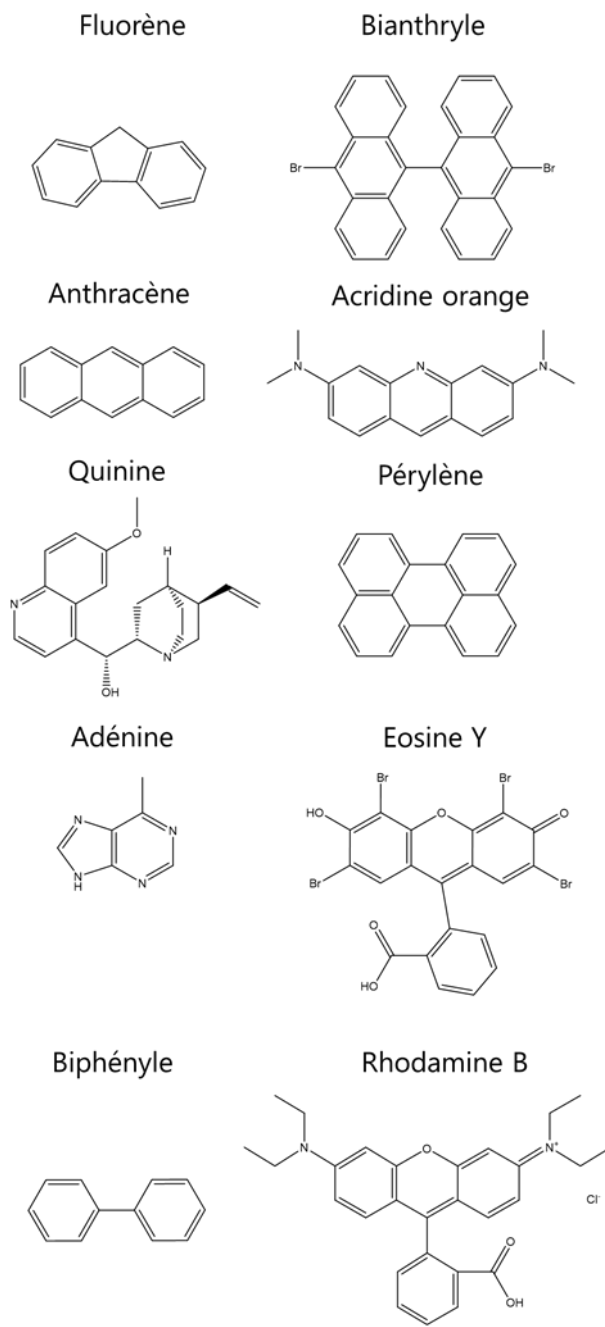


Figure 1.11 : Structure des chromophores organiques associés au tableau 1.1.

Dans le cadre de l'imagerie photoacoustique, il est non seulement important d'avoir des agents de contraste avec des coefficients d'absorption molaire élevés mais il est également indispensable que le maximum de la bande d'absorption se situe dans le proche infra-rouge entre 650 et 950 nm. Dès lors, comment optimiser la structure des absorbeurs afin d'obtenir des coefficients d'absorption molaire élevés dans le proche infra-rouge ?

1.3.2.1 Augmenter la taille du système π conjugué

Pour les molécules organiques, lors de l'absorption d'un photon, un électron va passer d'une orbitale pleine : l'orbitale la plus « Haute Occupée » (HO), vers une orbitale vide, la plus basse vacante (BV). Pour une absorption dans le proche infra-rouge, il faut alors une faible différence d'énergie entre la HO et la BV. L'augmentation du système π conjugué est une stratégie bien connue pour décaler les spectres d'absorption et d'émission des molécules organiques vers le rouge (Delaire et al. 2017; Qi, Qiao, et Wang 2016). Pour les polyènes conjugués neutres, l'augmentation de la longueur d'onde d'absorption avec le nombre de liaisons conjuguées reste limitée. Pour onze liaisons π conjuguées, on observe un maximum d'absorption aux alentours de 400 nm. Figure 1.12, on peut voir la structure du bêta-carotène et de ses orbitales HO (π) et BV (π^*), qui possède 11 liaisons π conjuguées et un maximum d'absorption vers 450 nm.

On peut toutefois relever le cas des cyanines qui peuvent avoir de très grandes longueurs d'ondes d'absorption avec un nombre modéré de liaisons conjuguées. Par exemple, la cyanine 7 (figure 1.12) possède un maximum d'absorption à 750 nm (Delaire et al. 2017). L'ajout de groupement aromatique dans le système conjugué diminue également l'écart en énergie HO-BV grâce à l'énergie de résonance aromatique. Par exemple, les polythiophènes possèdent des écarts en énergie plus faibles que les polyéthylènes grâce à l'énergie de résonance aromatique (Qi, Qiao, et Wang 2016).

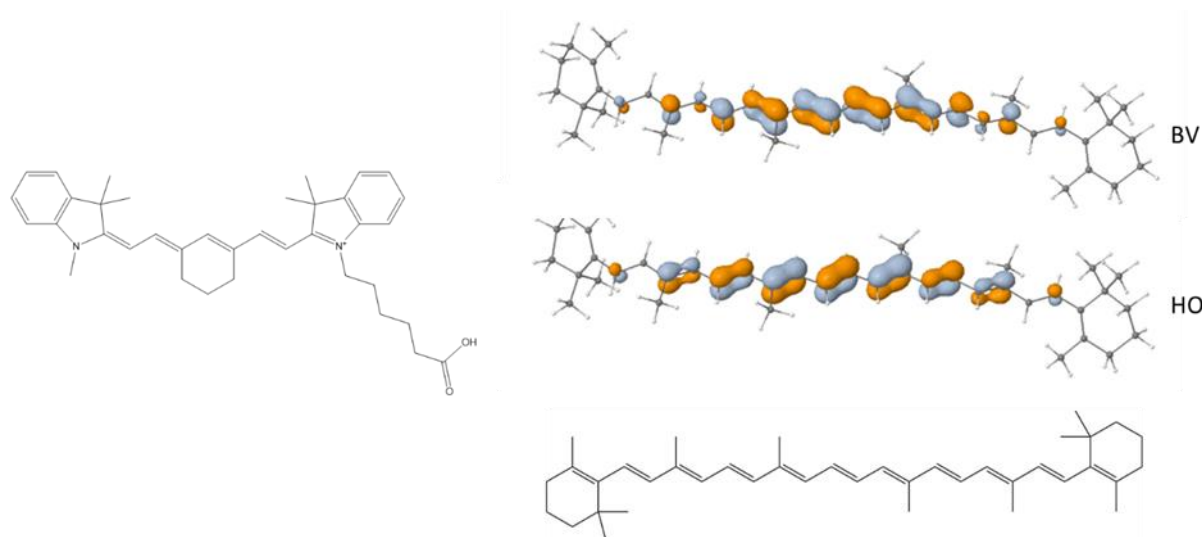


Figure 1.12 : (Gauche) Structure de la molécule cyanine 7. (Droite) Structure de la molécule bêta-Carotène, ainsi que les orbitales moléculaires HO (de type π) et BV (de type π^*). Orbitales tirées de la base de données en ligne Orbimol (« OrbiMol 4.1 (LCT Sorbonne Université) »)

1.3.2.2 Molécules à transfert de charge

Les molécules organiques à transfert de charge intramoléculaire sont connues pour avoir un maximum d'absorption décalé vers le rouge. Cette stratégie est souvent désignée comme la plus efficace pour décaler le maximum d'absorption vers le rouge (Qi, Qiao, et Wang 2016). La molécule possède alors un groupe donneur d'électrons (D) et un groupe accepteur d'électrons (A) reliés entre eux par un système π conjugué D- π -A. On parle alors de structure dipolaire. Il existe également des structures quadripolaires D- π -A- π -D et même octupolaires. Le décalage bathochrome peut s'expliquer par l'hybridation des orbitales frontières du pont conjugué avec D et A, qui va provoquer la diminution de l'écart en énergie entre HO et BV (figure 1.13). L'écart HO-BV peut être modifié en jouant sur la force de l'accepteur, la force du donneur, la présence de liaisons hydrogènes intramoléculaires avec l'accepteur et la présence d'hétérocycles aromatiques comme les groupements pyroles (Qi, Qiao, et Wang 2016).

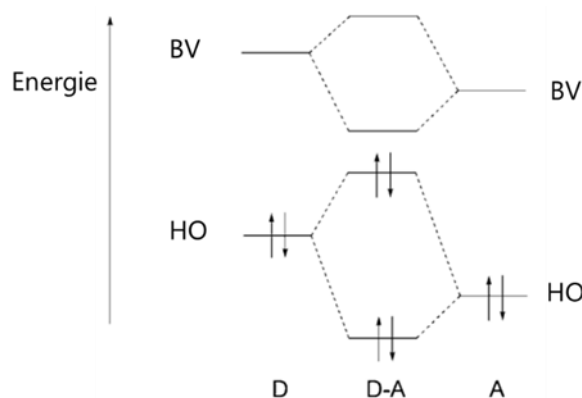


Figure 1.13 : Diagramme d'énergie des orbitales frontières HO et BV des groupements donneur et accepteur d'électrons conduisant à un écart en énergie HO-BV plus faible pour l'ensemble D-A. Diagramme tiré de (Qian et Wang 2010).

L'équipe de Ji Qi a par exemple développé une molécule quadripolaire de type D- π -A- π -D, avec comme groupement donneur un dérivé de la triphénylamine, comme accepteur un cœur benzothiadiazole, et un pont conjugué de type thiophène reliant les deux et jouant également le rôle de groupement donneur supplémentaire. La réaction du cœur accepteur avec le monoxyde d'azote va former un cycle triazole plan qui augmente le transfert de charge intramoléculaire, déplace le maximum d'absorption de 459 nm à 686 nm avec un fort coefficient d'absorption molaire de $3,2 \times 10^4 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. Cette molécule est alors utilisée pour faire de l'imagerie photoacoustique (paragraphe 1.3.4.5) (Qi et al. 2021). De nombreux autres articles utilisent des molécules à transfert de charge intramoléculaire pour faire de l'imagerie photoacoustique et déplacer le maximum d'absorption dans le proche infra-rouge (Guo et al. 2017; Cai et al. 2017; J.-S. Ni et al. 2020; Qi et al. 2018).

Les molécules avec de grands systèmes π conjugués et de forts transferts de charges intramoléculaires permettent donc de maximiser le coefficient d'absorption molaire dans la région du proche infra-rouge. Toutefois, pour augmenter la brillance photoacoustique, c'est-à-dire le produit $PGE \times \epsilon$, il est également possible d'optimiser l'efficacité de génération acoustique (PGE). Dès lors, quelle stratégie adopter pour maximiser le PGE ?

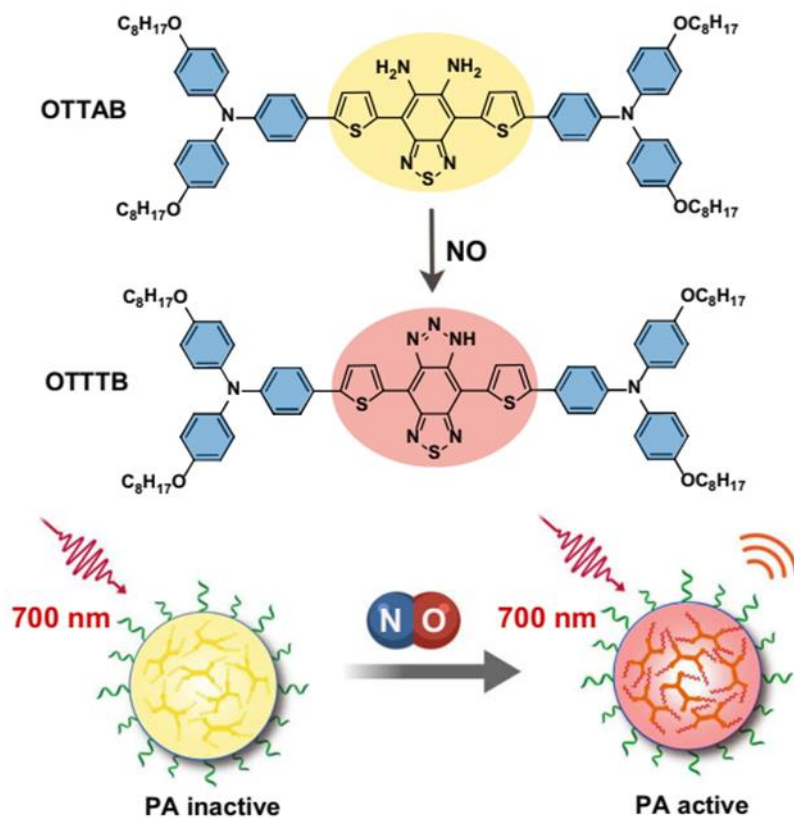


Figure 1.14 : Structure des molécules de type D- π -A- π -D à transfert de charge utilisées par l'équipe de Ji Qi. La force du transfert de charge est augmentée après réaction avec le monoxyde d'azote et formation du cycle triazole. Tiré de (Qi et al. 2021).

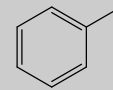
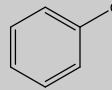
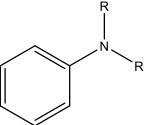
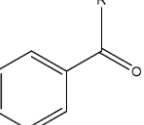
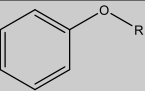
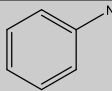
Groupement donneur (base de Lewis)	Groupement accepteur (acide de Lewis)
	
	
	

Tableau 1.2 : Structure de certains groupements donneurs et accepteurs classiques.

1.3.3 Améliorer l'efficacité de génération de l'onde acoustique (PGE)

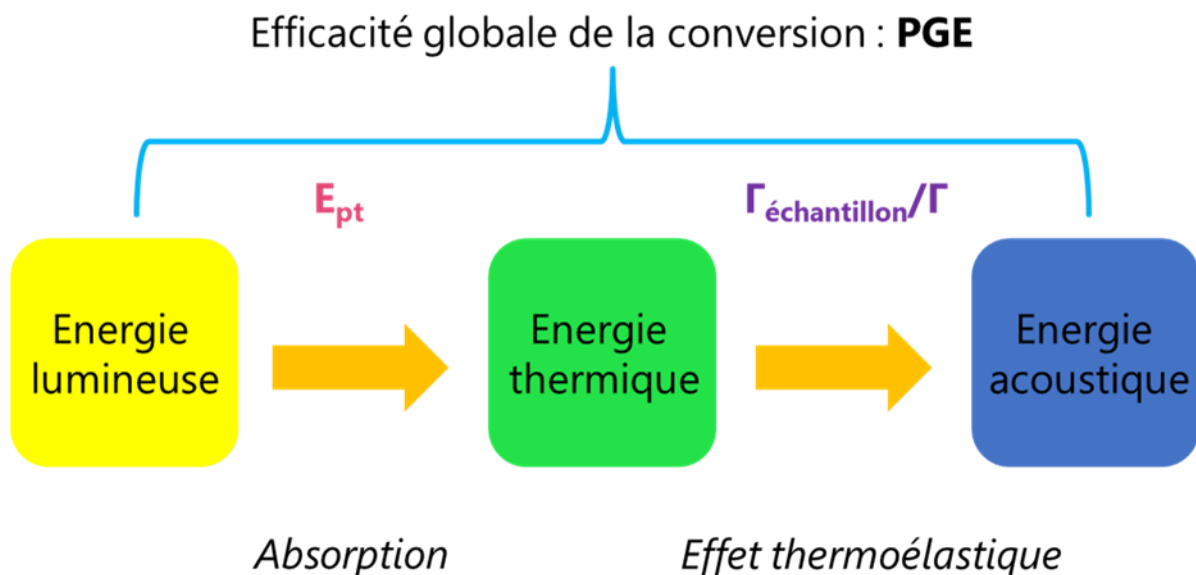


Figure 1.15 : Schéma de la conversion d'énergie pour l'effet photoacoustique.

L'efficacité de génération acoustique de l'échantillon peut s'exprimer comme suit (Sarkar et al. 2021):

$$PGE_{\text{échantillon}}(\lambda) = E_{pt}(\lambda) \frac{\Gamma_{\text{éch}}}{\Gamma} \quad (4)$$

Avec E_{pt} l'efficacité photothermique (sans dimension) et $\Gamma_{\text{éch}}$ le coefficient de Grüneisen de la solution contenant l'échantillon actif en photoacoustique. L'efficacité photothermique représente l'efficacité de la conversion d'énergie lumineuse en énergie thermique (figure 1.15). Le quotient $\Gamma_{\text{éch}} / \Gamma$ représente l'efficacité de la conversion d'énergie thermique en énergie acoustique de la solution contenant l'échantillon comparée à celle du solvant seul (figure 1.15). L'influence de ce quotient

sur le PGE est limitée : pour une solution de sulfate de cuivre pentahydraté à $0,25 \text{ mol.L}^{-1}$, ce quotient vaut 1,14 (Sarkar et al. 2021). On peut également relever qu'à proximité des protéines ou des particules il peut exister un microenvironnement qui fait varier les paramètres thermodynamiques liés à l'effet thermoélastique et donne un quotient $\Gamma_{\text{éch}} / \Gamma$ différent de 1 (Kurian, Prendergast, et Small 1997; Sarkar et al. 2021). Dès lors, pour améliorer le PGE il faut surtout augmenter l'efficacité photothermique E_{pt} : c'est-à-dire la conversion d'énergie lumineuse absorbée en énergie thermique.

Une fois la lumière absorbée et la molécule dans son état électronique excité, différentes voies de désexcitation s'offrent à elle et toutes ne vont pas conduire à un signal photoacoustique. Les différents processus de relaxation depuis les états électroniques excités sont bien décrits grâce au diagramme de Perrin-Jablonski.

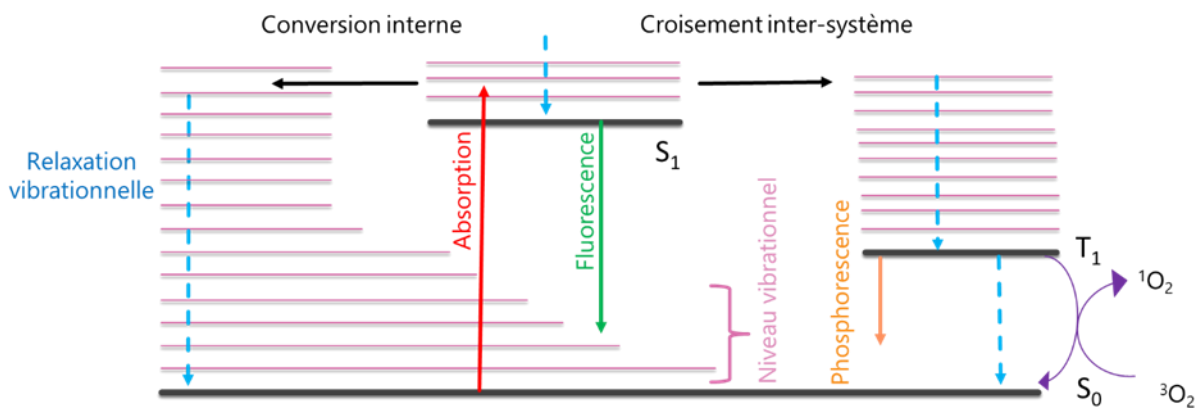


Figure 1.16 : Diagramme de Perrin-Jablonski. Les flèches en pointillés représentent les processus de relaxation vibrationnelle. Les flèches horizontales représentent les processus non-radiatifs à énergie constante et les flèches verticales les processus radiatifs. Les flèches incurvées violettes représentent la génération d'oxygène singulet à partir de la molécule dans son état électronique excité T_1 et d'oxygène triplet.

Lors de l'absorption d'un photon, la molécule passe très rapidement (10^{-15} s) de l'état électronique fondamental S_0 à l'état électronique excité singulet S_1 . Elle peut ensuite se désexciter par (Delaire et al. 2017) :

- **Fluorescence** : processus de désexcitation radiatif qui a lieu entre S_1 et S_0 et caractérisé par la constante de vitesse k_r (en s^{-1}). Elle a lieu sur des échelles de temps entre 1 ps et 1 μs . Ce phénomène ne conduit pas à un échauffement local du milieu et ne génère donc pas d'onde acoustique.
- **Le croisement inter-système** : processus non-radiatif qui a lieu à énergie constante entre deux états électroniques de spin différents, par exemple de S_1 vers T_1 . La transition se fait sans perte d'énergie, il n'y a pas d'échauffement local du milieu et donc pas d'effet photoacoustique. Le croisement inter-système est une transition interdite de spin et possède donc une constante de vitesse plus faible k_{cis} .

- **La conversion interne** : processus non-radiatif à énergie constante. Lors de cette transition le spin de la molécule est conservé. Elle ne produit pas de signal acoustique.
- **La relaxation vibrationnelle** : permet à une molécule qui se trouve dans des états vibrationnels excités de perdre son énergie grâce à des collisions avec le solvant ou son environnement. C'est cette transition non radiative qui est responsable de l'augmentation locale de température au voisinage de la molécule et qui va ensuite créer une onde acoustique.

Le passage de la molécule par l'état triplet T_1 n'est pas souhaitable pour améliorer l'efficacité photothermique E_{pt} . En effet, même si cette transition peut conduire à des relaxations vibrationnelles très efficaces pour générer des ondes acoustiques, elle donne également accès à d'autres processus ne générant pas d'ondes acoustiques. En effet, une fois à l'état triplet, la molécule peut se désexciter par phosphorescence (phénomène radiatif) ou perdre son énergie en réagissant avec l'oxygène pour former de l'oxygène singulet. Ce dernier peut présenter un intérêt pour faire de la thérapie photodynamique et détruire des cellules tumorales. Cependant, dans l'objectif d'obtenir le meilleur contraste en imagerie, la formation d'oxygène singulet est une perte d'énergie au détriment de l'effet photoacoustique (Guo et al. 2017). Bien souvent, le croisement inter-système est négligeable, la transition singulet \rightarrow triplet est interdite de symétrie.

La désexcitation par l'ensemble des processus non radiatifs (relaxation vibrationnelle, croisement inter-système et conversion interne) est caractérisée par la constante de vitesse non radiative k_{nr} (en s^{-1}). Par définition, le rendement quantique de fluorescence d'une molécule, c'est-à-dire le rapport du nombre de photons émis et du nombre de photons absorbés s'exprime comme suit :

$$\phi_F = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} = k_r \tau \quad (5)$$

Avec τ la durée de vie de l'état excité en seconde.

Pour augmenter la conversion d'énergie lumineuse absorbée en énergie thermique, il faut donc favoriser le plus possible les processus de relaxation vibrationnelle. En première approximation, on peut considérer que k_{nr} doit être le plus grand possible, ou Φ_F le plus faible possible, et k_{cis} le plus faible possible. (Qi et al. 2018; Laufer et al. 2013; Lyu et al. 2016; Zhen, Pu, et Jiang 2021). L'équipe de Ji Qi montre dans leur publication que le signal de fluorescence et la production d'espèces réactives de l'oxygène sont en compétition avec le signal photoacoustique. La répartition de l'énergie absorbée est modélisée par une balance énergétique (figure 1.17). Ils montrent qu'ils peuvent alors passer d'une molécule active en fluorescence (isomère

diaryléthène ouvert) à une molécule active en photoacoustique (isomère diaryléthène fermé) par photocommutation (Qi et al. 2018).

La constante de vitesse radiative k_r peut être déterminée pour une molécule à partir de son spectre d'absorption et de son spectre d'émission en utilisant la relation de Strickler-Berg :

$$k_r = 2,88 \times 10^{-9} n^2 \frac{\int F(\bar{\nu}_F) d\bar{\nu}_F}{\int \frac{F(\bar{\nu}_F)}{\bar{\nu}_F^3} d\bar{\nu}_F} \int \frac{\epsilon(\bar{\nu}_A) d\bar{\nu}_A}{\bar{\nu}_A} \quad (6)$$

Avec n l'indice de réfraction du milieu, $\bar{\nu}_F$ et $\bar{\nu}_A$ les nombres d'ondes des spectres de fluorescence et d'absorption en cm^{-1} , $F(\bar{\nu}_F)$ est le spectre de fluorescence (Valeur et Berberan-Santos 2013).

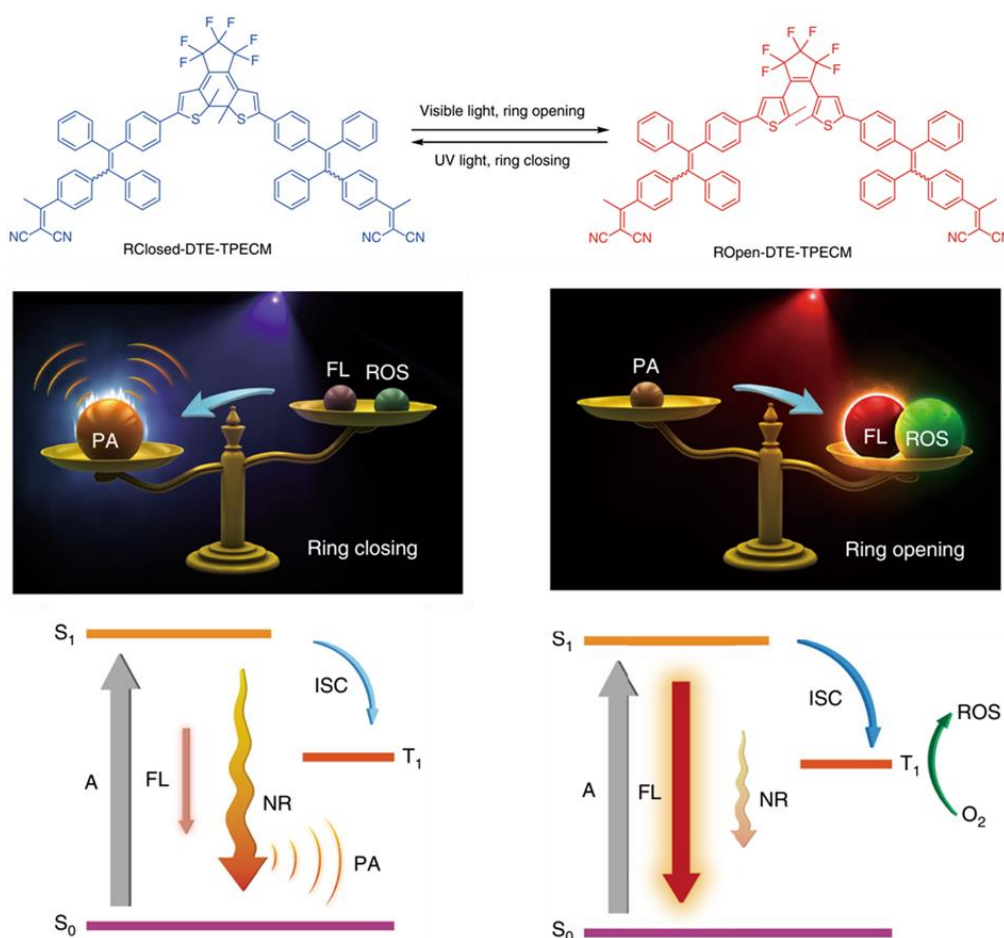


Figure 1.17 : Illustration de la « balance énergétique » : répartition de l'énergie absorbée entre la fluorescence, la création d'espèces réactives de l'oxygène et le signal photoacoustique. Le passage d'un côté à l'autre de la balance est rendu possible ici par fermeture de cycle d'une molécule photocommutable de type diaryléthène. A : absorption. FL : Fluorescence. NR : non-radiatif. ISC : Croisement inter-système. PA : photoacoustique. ROS : Espèces réactives de l'oxygène. Adapté de (Qi et al. 2018)

Bien d'autres processus de désexcitation de la molécule existent, comme les transferts d'électrons, les transferts de charge intramoléculaires, les transferts de protons, la formation d'exciplexes ou d'excimères, les transferts d'énergie, les transformations photochimiques et les changements de conformation (Fuenzalida Werner et al. 2020) (liste non exhaustive). Dès lors, quelles désexcitations photophysiques vont contribuer à un fort signal photoacoustique et comment optimiser la structure des molécules pour les favoriser ?

1.3.4 Relation structure propriétés photoacoustiques : augmenter l'efficacité photothermique

Diminuer le rendement quantique de fluorescence des molécules permet de favoriser les désexcitations par des voies non-radiatives et donc d'augmenter le signal photoacoustique. De nombreuses stratégies sont proposées dans la littérature pour abaisser le rendement quantique de fluorescence.

1.3.4.1 Molécules possédant des rendements quantiques faibles

Dans leur article de 2013, Laufer et son équipe ont étudié le spectre photoacoustique de protéines fluorescentes communément utilisées (mCherry, dsRed...) et de protéines non-fluorescentes qu'ils ont synthétisées. Les efficacités de génération d'onde acoustique PGE de ces protéines ont été estimées. Ils ont alors démontré que les protéines fluorescentes présentent de plus grands écarts entre leur spectre photoacoustique et leur spectre d'absorption comparées aux protéines non-fluorescentes. Les protéines fluorescentes ont également des PGE plus faibles que celles non fluorescentes et sont moins photostables. Le très faible signal d'émission des protéines non-fluorescentes est responsable de la très bonne efficacité de génération d'onde acoustique (Laufer et al. 2013).

L'équipe de Fuenzalida Werner s'est intéressée à la protéine fluorescente smURFP. Ils ont modifié cette protéine génétiquement pour optimiser ses propriétés photophysiques afin d'en faire un meilleur agent de contraste photoacoustique. La mutation à la position Y56 de la protéine a permis de réduire les rendements quantiques de fluorescence du chromophore et d'augmenter le PGE des protéines mutantes. Le mutant Y56L possède notamment un PGE 50% plus grand que la protéine non mutée dont 18% proviennent directement de la chute du rendement quantique de fluorescence (Fuenzalida Werner et al. 2019).

1.3.4.2 Transfert d'électron*

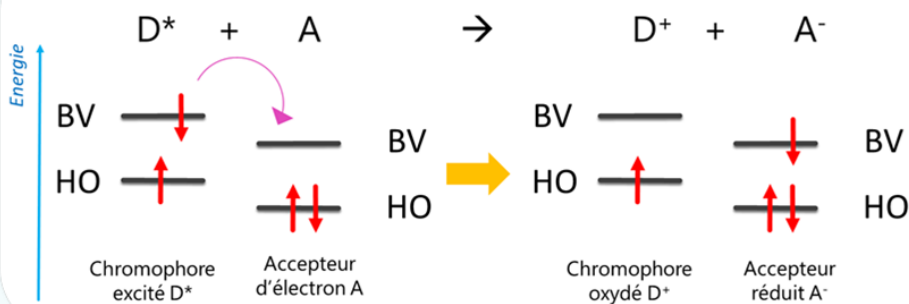
La diminution du rendement quantique de fluorescence peut aussi être provoquée par des transferts d'électrons photoinduits entre un accepteur et un donneur d'électrons (Delaire et al. 2017). C'est la stratégie qu'ont adoptée Pu et son

équipe sur des nanoparticules de polymère semi-conducteurs. Les nanoparticules ont été dopées avec des nano-boîtes (nanodots en anglais) de fullerène : les accepteurs d'électrons. Le donneur d'électrons est le polymère semi-conducteur lui-même (figure 1.18). La fluorescence des NP diminue avec l'augmentation du taux de dopage et le signal photoacoustique augmente. Les NP dopées avec 20% massique de fullerène possèdent un signal photoacoustique 2,6 fois plus important que celles non dopées (Lyu et al. 2016).

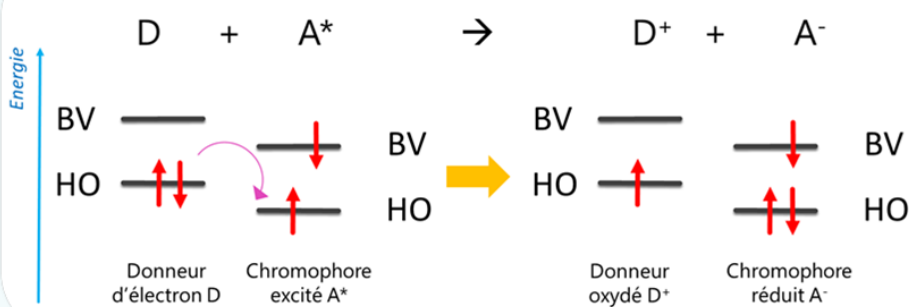
*Transfert d'électrons photoinduit (PET)

Le transfert d'électrons photoinduit provoque généralement une inhibition de la fluorescence. Il consiste à tout d'abord exciter le donneur d'électron (ou bien l'accepteur) puis il est suivi d'un transfert d'électrons entre le donneur et l'accepteur : phénomène non-radiatif qui a lieu à courte distance. Il s'agit donc d'une réaction d'oxydo-réduction. Le donneur est noté D et l'accepteur A.

Transfert d'électron oxydatif



Transfert d'électron réductif



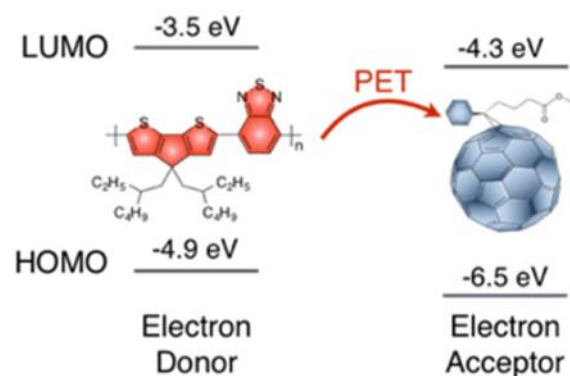


Figure 1.18 : Représentation schématique du transfert d'électron entre les orbitales du donneur d'électrons : le polymère semi-conducteur et les orbitales de l'accepteur : le fullerène. Les énergies des orbitales sont indiquées en électronvolt (eV). LUMO : Lowest Unoccupied Molecular Orbital en anglais, BV en français. HOMO : Highest Occupied Molecular Orbital en anglais, HO en français. PET : PhotoInduced Electron Transfer en anglais (transfert d'électron photoinduit). Image tirée de (Lyu et al. 2016).

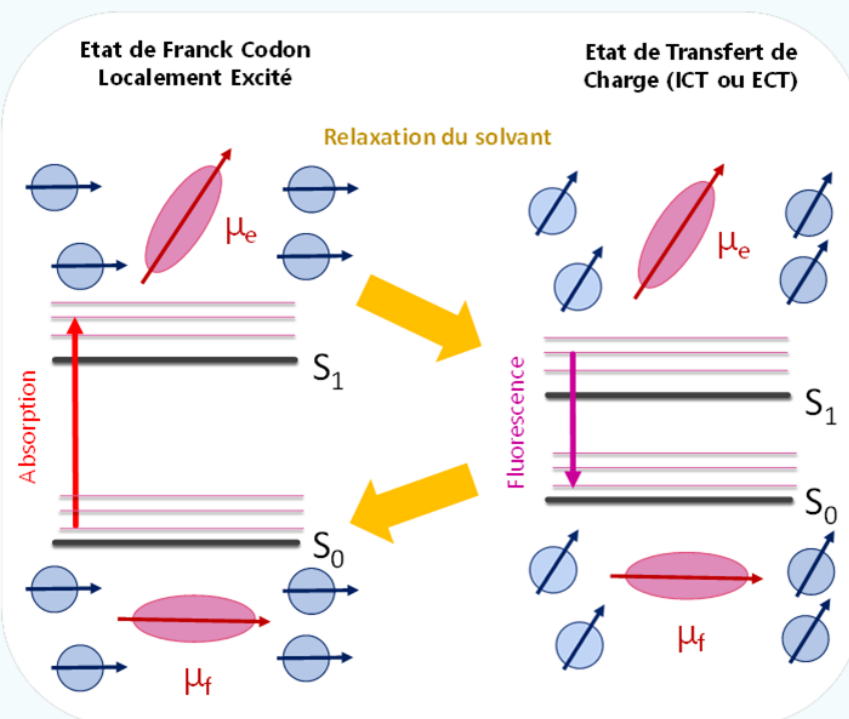
1.3.4.3 Transfert de charge**

Les molécules à transfert de charge peuvent également induire une perte de fluorescence. Dans ces molécules, l'absorption d'un photon conduit au passage d'une orbitale pleine vers une orbitale vide. Si la position géométrique des orbitales dans la molécule change lors de l'absorption, alors la transition électronique provoque un changement immédiat du moment dipolaire de la molécule. Ces transferts de charge peuvent être facilités en introduisant un groupement donneur (D) et un groupement accepteur (A) dans la molécule, reliés entre eux par des liaisons π conjuguées (Valeur et Berberan-Santos 2013).

Dans les solvants polaires, la séparation des charges est facilitée et provoque une perte de fluorescence par interaction dipolaire entre la molécule et le solvant (Delaire et al. 2017). Bing Guo et son équipe ont par exemple synthétisé des polymères semi-conducteurs avec des groupements accepteurs et donneurs d'électrons de différentes forces. Ils ont pu démontrer que l'augmentation de la force du couple donneur-accepteur influençait la diminution du rendement quantique de fluorescence des molécules en solution. Une fois formulé en nanoparticules, le polymère avec le couple D-A le plus fort restait le moins fluorescent et possédait le signal photoacoustique le plus fort. De plus, les différences d'absorption molaire entre les polymères n'étaient pas suffisantes pour expliquer cette augmentation du signal photoacoustique, mais la perte de fluorescence le permettait (Guo et al. 2017).

**Transfert de charge intramoléculaire

Lors de l'excitation d'une molécule, un électron passe d'une orbitale vers une autre plus haute en énergie. Si les deux orbitales ne sont pas situées au même endroit dans la molécule, l'excitation va alors provoquer un changement instantané du moment dipolaire de la molécule. Pour des molécules de type D- π -A, le changement de moment dipolaire peut être très grand et bien souvent, le moment dipolaire de l'état fondamental (μ_f) est plus faible que celui de l'état excité (μ_e). L'absorption lumineuse étant un phénomène très rapide (10^{-15} s), l'état excité de Franck Codon atteint par la molécule (appelé état localement excité LE), n'est pas en équilibre avec les molécules de solvant. Les dipôles des molécules de solvant vont alors se réorienter pour atteindre un état d'équilibre thermodynamique avec le moment dipolaire de la molécule dans son état excité. Un état excité appelé état de transfert de charge (ETC ou ICT en anglais pour Intramolecular Charge Transfer) est alors atteint par la molécule. Plus le solvant est polaire, plus il va stabiliser l'état de transfert de charge et donc plus l'émission de fluorescence sera décalée vers le rouge.



Le groupe de Wang a également travaillé sur des molécules à transfert de charge pour détecter la présence de monoxyde d'azote (NO). Ces molécules possèdent un cœur benzothiadiazole et deux groupes diphénylamine aux extrémités pour donner une structure D- π -A- π -D à transfert de charge (figure 1.19). La réaction avec le monoxyde d'azote permet de former un cycle triazole qui augmente la force de l'accepteur d'électrons. L'augmentation du transfert de charge intramoléculaire provoque la baisse du rendement quantique de 5,2% à moins de 1% en milieu polaire

(tampon phosphate). Le signal photoacoustique, mesuré dans des fantômes de test*** (imaging phantom ou phantom en anglais), est plus fort pour les molécules oxydées par NO que celui sans réaction avec NO (S. Wang et al. 2018). Cette stratégie n'est pas sans rappeler celle évoquée au paragraphe 1.3.2.2 par l'équipe de Ji Qi (figure 1.14).

***Fantôme de test

C'est un objet imitant les tissus biologiques ciblés créé pour tester, évaluer, analyser les performances d'un système d'imagerie. Ses caractéristiques dépendent de la technique d'imagerie étudiée.

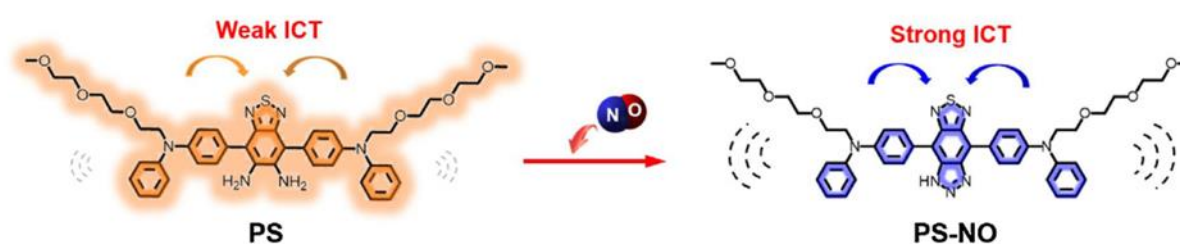


Figure 1.19 : Structure de la molécule PS et représentation schématique de sa réaction avec le monoxyde d'azote (NO). ICT : « Internal Charge Transfer » en anglais, transfert de charge intramoléculaire. Image tirée de (S. Wang et al. 2018).

L'équipe de Xiaozhen Li a développé des oligomères avec une structure de type A- π -D- π -A formulés en nanoparticules. Le rendement quantique de ces NP est proche de zéro grâce au fort transfert de charge intramoléculaire et est en partie responsable de la très bonne efficacité photothermique et du fort signal photoacoustique détectable *in vivo* et *in vitro* (X. Li et al. 2019).

Les molécules à transfert de charge intramoléculaire sont donc particulièrement intéressantes puisqu'elles permettent de déplacer l'absorption dans la fenêtre du proche infra-rouge (1.3.2.2) ainsi que de diminuer le rendement quantique de fluorescence dans les solvants polaires.

1.3.4.4 Les rotors moléculaires

Les rotors moléculaires sont des groupements de molécules qui se sont beaucoup développés avec les machines moléculaires (prix Nobel de chimie 2016). Le mouvement intramoléculaire : par rotation, par vibration ou par torsion, d'une molécule dans son état électronique excité peut favoriser les désexcitations par voies non-radiatives. Le greffage de rotors moléculaires sur des molécules permet alors de

favoriser ces désexcitations non-radiatives (Qi et al. 2021; Z. Zhao et al. 2019). Parmi les rotors classiques, on peut notamment citer le groupement tétraphényléthylène (TPE), la triphénylamine (TPA) ou l'hexaphénylsilole (HPS) (figure 1.20). Ces rotors moléculaires n'ont été développés que très récemment pour faire de l'imagerie photoacoustique (depuis 2017). Ils sont habituellement utilisés pour créer des molécules susceptibles de devenir plus fluorescentes à l'état solide (aggregation induced emission en anglais).

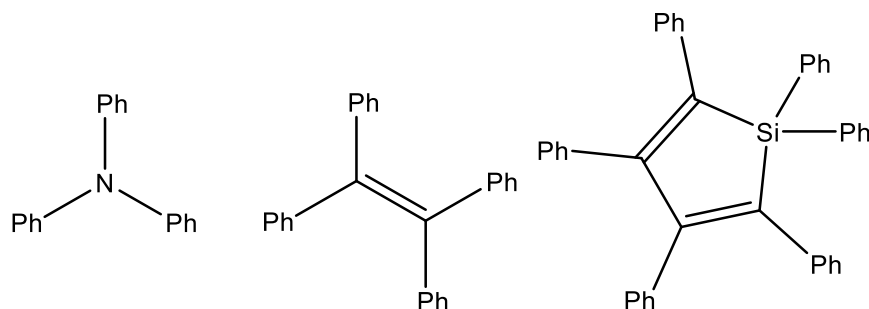


Figure 1.20 : Structure de trois rotors moléculaires, de gauche à droite : triphénylamine, tétraphényléthylène, et hexaphénylsilole

L'équipe de Xiaolei Cai en 2017 a, par exemple, utilisé le rotor moléculaire triphényléthylène (TPE) en tant que donneur d'électrons pour former des molécules de type D- π -A- π -D. L'accepteur d'électrons est le groupement 4,9-di-(5-bromothiophén-2-yl)thiadiazolo-quinoxaline (TTQ, figure 1.21). La molécule possède alors un transfert de charge intramoléculaire qui lui permet de déplacer le maximum d'absorption et d'émission dans le proche infrarouge. Le rendement quantique de fluorescence est diminué par transfert de charge et par mouvements intramoléculaires du rotor TPE. Les auteurs ont démontré que la molécule BTPETTQ (figure 1.21) possède une fluorescence plus faible dans le tétrahydrofurane (THF) que le TTQ seul, mais un signal photoacoustique 30% plus important. Pour éliminer l'influence du coefficient d'absorption molaire, les auteurs ont travaillé à la même absorbance pour toutes les molécules. La présence de rotors moléculaires a donc permis de favoriser des désexcitation par des voies non radiatives et d'améliorer l'efficacité photothermique E_{pt} (Cai et al. 2017).

En 2019, le groupe de Zheng Zhao a greffé deux groupements donneurs TPE sur la molécule NDTA (structure de type naphthalène diimide sur lequel est greffé un groupement 2-(1,3-dithiol-2-ylidène)acétonitrile (figure 1.22) comme accepteur d'électrons (D- π -A- π -D)). En solution dans le THF, le rendement quantique de fluorescence de la molécule 2TPE-NDTA est de 0,4% alors que celui du NDTA en solution est de 17%. Zhao et son équipe ont alors démontré que le TPE accélère les

désexcitations par voies non radiatives grâce à la rotation des noyaux phényles. La dynamique de relaxation a été mise en évidence par des études de spectroscopie d'absorption transitoire femtoseconde. La molécule TPE-NDTA possède une durée de vie de l'état excité de 54 ps et la transition $S_1 \rightarrow S_0$ s'effectue par conversion interne et relaxation vibrationnelle très rapide. Cette valeur est très faible devant le temps de vie de l'état excité S_1 de la molécule de NDTA seule qui est de 1,5 ns. Enfin le mouvement des rotors a été démontré par RMN du carbone 13 (technique CPMAS Cross Polarization Magic Angle Spinning).

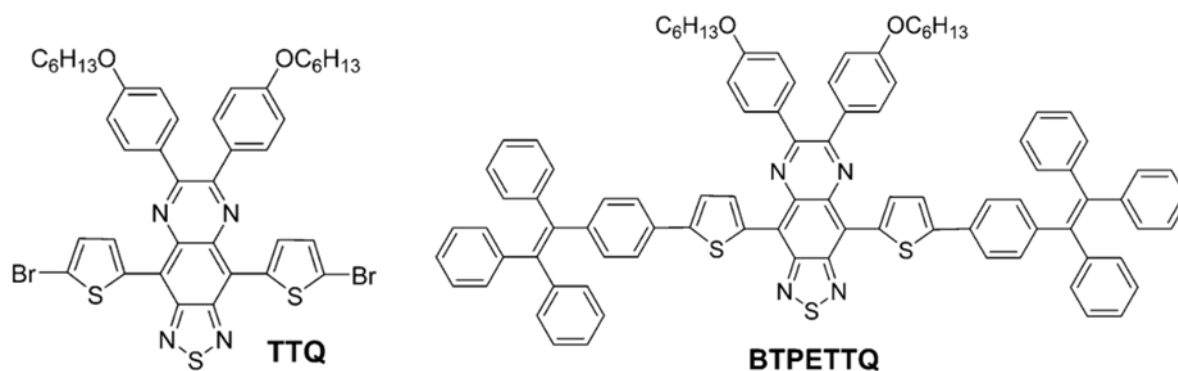


Figure 1.21 : Structures de la molécule TTQ et de la molécule BTPETTQ utilisées par l'équipe de Xiaolei Cai (Cai et al. 2017)

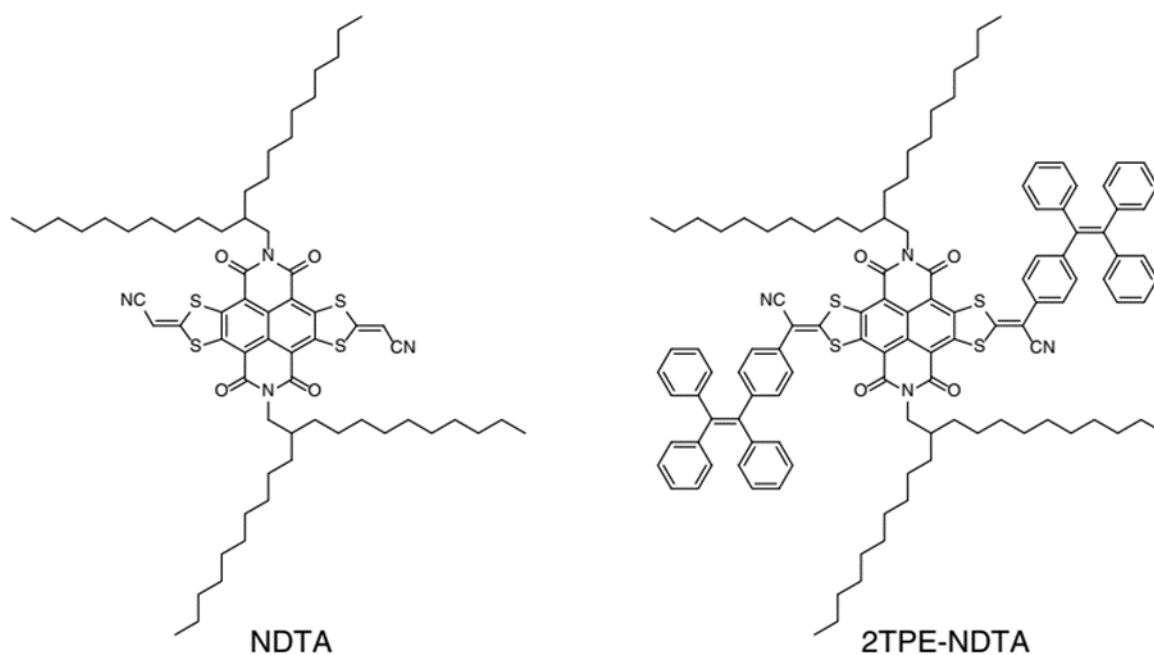


Figure 1.22 : Structure des molécules NDTA et de 2TPE-NDTA utilisées par le groupe de Zheng Zhao (Z. Zhao et al. 2019).

1.3.4.5 Mobilité des rotors à l'état solide

L'utilisation de ces agents de contraste très actifs en photoacoustique pour faire de l'imagerie, conduit bien souvent à leur encapsulation dans des nanoparticules. Les rotors moléculaires, très mobiles en solution, le sont alors beaucoup moins à l'état solide. L'obtention de molécules à fluorescence induite à l'état solide s'appuie sur ce phénomène : la perte de mobilité des rotors moléculaires à l'état solide augmente l'émission de fluorescence (Cai et al. 2017; Z. Zhao et al. 2019). L'augmentation de la fluorescence à l'état solide, ou agrégé dans des nanoparticules, est alors néfaste pour le signal photoacoustique. Pour remédier à ce problème, il est nécessaire de trouver des solutions pour que les rotors moléculaires conservent leur mobilité à l'état solide.

Espaceurs volumineux

Une première stratégie consiste à utiliser des groupements très volumineux, comme de longues chaînes alkyles, qui vont libérer des espaces entre les molécules pour permettre aux rotors de conserver de la mobilité (figure 1.23). C'est par exemple la stratégie employée par Shunjie Liu et son groupe : ils ont fixé des groupements alkyles volumineux de différentes tailles sur des molécules de type D- π -A- π -D. Ils ont alors démontré que dans les nanoparticules, l'augmentation de la taille des groupements alkyles greffés sur la molécule provoquait une augmentation du signal photoacoustique. Les NP avec des espaceurs de type hexyle possèdent un signal photoacoustique 1,5 plus faible que celles avec des espaceurs de type 11-méthyltricosane $\text{CH}_2\text{CH}(\text{C}_{10}\text{H}_{21})(\text{C}_{12}\text{H}_{25})$. A l'état agrégé, les molécules avec de petites chaînes alkyles possèdent une fluorescence plus grande que celles avec une grande chaîne alkyle. Le passage d'un espaceur de type hexyle à 11-méthyltricosane s'accompagne d'une diminution de 125% du rendement quantique de fluorescence des NP. Comme vu au paragraphe 1.3.4.4, la mobilité des rotors moléculaires, permise grâce aux espaceurs, favorise les voies de désexcitation non-radiatives et donc un signal photoacoustique plus fort (S. Liu et al. 2019).

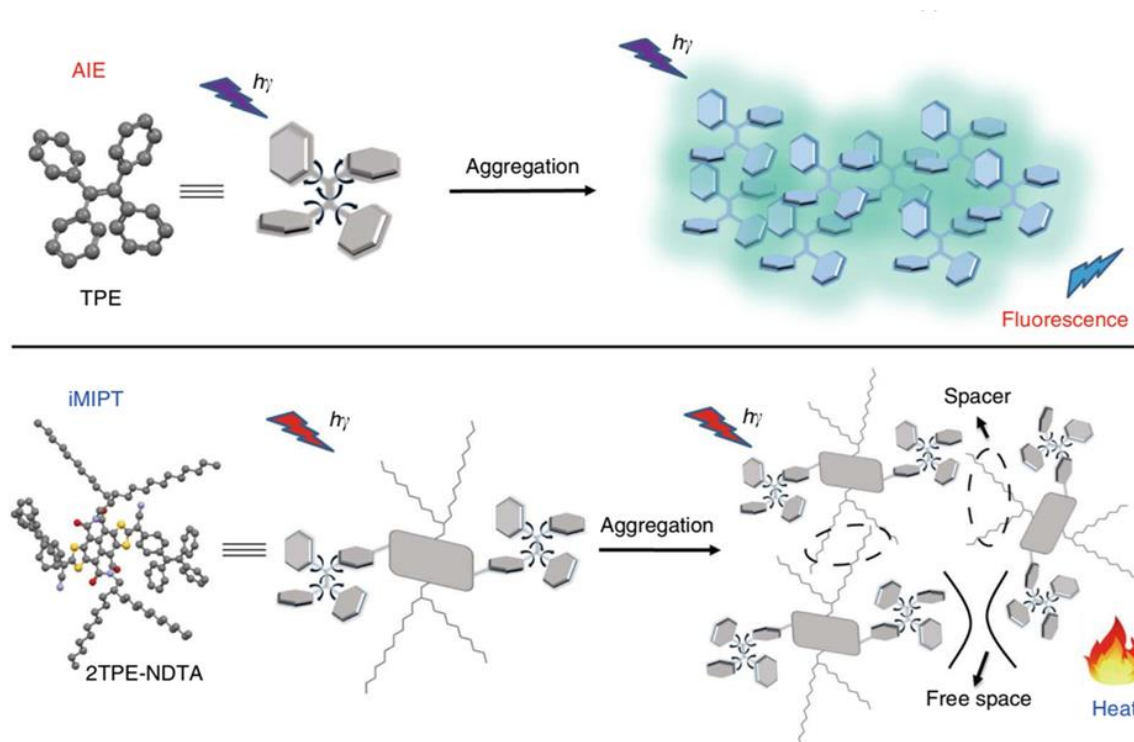


Figure 1.23 : (En haut) Schéma du mécanisme de fluorescence induite par agrégation (AIE : Aggregation Induced Emission en anglais) sur la molécule de Triphényléthylène (TPE). (En bas) Schéma du mécanisme de photothermie induite par mouvement intramolécule (IMIPT pour Intramolecular Motion-Induced PhotoThermality en anglais). Image tirée de (Z. Zhao et al. 2019).

Le groupe de Zheng Zhao a également étudié le comportement de la molécule 2TPE-NDTA (paragraphe 1.3.4.4) à l'état agrégé. Ils ont démontré que dans des films la diminution de la longueur de la chaîne alkyle de 16 à 6 atomes de carbone provoque une chute du rendement quantique de fluorescence de 17% à 6%. Les NP de 2TPE-NDTA possèdent un signal photoacoustique 5,9 fois plus grand que les NP de NDTA seul. Les amplitudes photoacoustiques des NP de 2TPE-NDTA sont plus fortes que celles du bleu de méthylène (cf paragraphe 1.4.2.1 et figure 1.30) ou des NP de polymères semi-conducteurs. La présence de longues chaînes alkyles permet, à l'état agrégé, de libérer de l'espace entre les molécules et facilite le mouvement moléculaire des rotors. Ces derniers sont particulièrement efficaces pour promouvoir des désexcitations par voies non-radiatives et augmenter le signal photoacoustique (figure 1.23) (Z. Zhao et al. 2019). D'autres équipes exploitent l'utilisation d'espaces pour conserver le mouvement moléculaire des rotors à l'état agrégé (Qi et al. 2021; Diez-Cabanes, Monari, et Pastore 2021; Gao et al. 2021).

Contre-ions

Afin de lutter contre l'extinction de fluorescence causée par agrégation, l'équipe de Klymchenko a proposé d'introduire des contre-ions organiques volumineux dans les NP avec les chromophores (figure 1.24). Les contre-ions servent alors d'espaceurs entre les chromophores, empêchant les liaisons π - π intermoléculaires néfastes pour la fluorescence (Reisch et al. 2014; Andreiuk et al. 2019). Appliquer cette stratégie au domaine de l'imagerie photoacoustique, pourrait permettre à des rotors moléculaires de bouger dans les NP sans nécessairement greffer de longues chaînes alkyles sur les molécules. Les synthèses organiques et les modes opératoires seraient alors simplifiés puisqu'il suffirait d'ajouter un contre ion volumineux lors de la formulation. Actuellement, aucune trace de cette stratégie adaptée à la photoacoustique des nanoparticules n'a été trouvée dans la littérature.

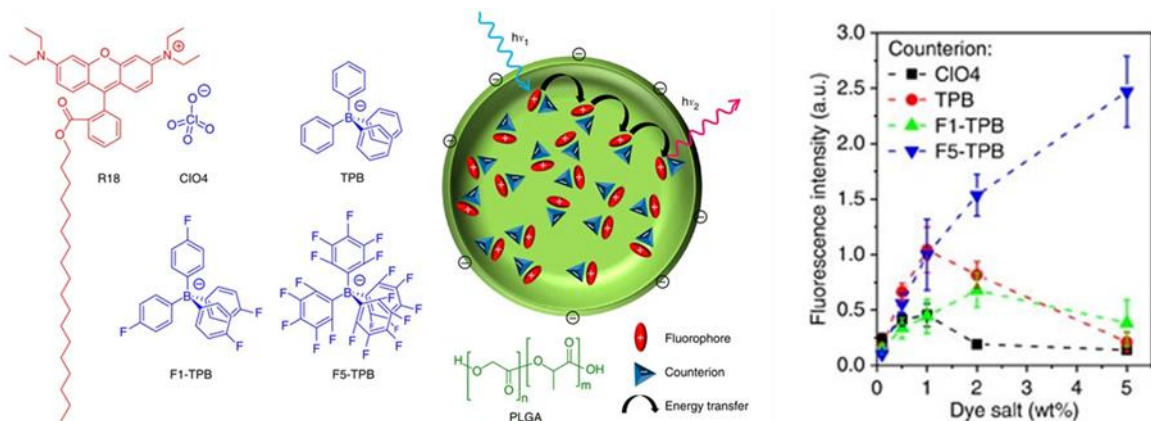


Figure 1.24 : En Rouge structure de la Rhodamine B ester octadécyle. En Bleu les structures des différents contre-ions volumineux utilisés. L'augmentation du pourcentage massique de contre ion permet de conserver une fluorescence élevée à fort taux de dopage en chromophore. Image tirée de (Reisch et al. 2014).

1.3.5 La photoacoustique non linéaire

Si la stratégie de diminuer la fluorescence des molécules organiques pour augmenter le signal photoacoustique est très répandue dans la littérature, certains articles relèvent la possibilité d'avoir des molécules avec de forts rendements quantiques de fluorescence et de forts signaux photoacoustiques. L'équipe de Mathieu Frenette et Jonathan Rochford explique ce phénomène par des effets non linéaires d'absorption dans les états excités. L'équation de génération de l'onde acoustique est alors changée en (Hatamimoslehabadi et al. 2017; Borg et Rochford 2018a):

$$p_0(\lambda) = PGE_{ech}(\lambda)\varepsilon(\lambda)C\Phi(\lambda)\Gamma_{eau} + \varepsilon_e C_e \Phi^2 \Gamma_{eau} + \dots + \varepsilon_n C_n \Phi^{n+1} \Gamma_{eau} \quad (7)$$

Avec ε_e coefficient d'absorption molaire du premier état excité S_1 , C_e la concentration dans l'état excité S_1 , ε_n et C_n respectivement les coefficients d'absorption

molaire de S_n et la concentration molaire dans S_n . Dans les états excités, ils supposent d'après la règle de Kasha, que les désexcitations par relaxation vibrationnelle des états excités S_n vers S_1 sont très rapides et très efficaces (Kasha 1950). Ainsi les PGE pour des désexcitations vers les états $\{S_n, \dots, S_1\}$ sont égaux à 100% et ne sont donc pas indiqués dans la formule. La dépendance non linéaire en photoacoustique provient de l'exposant n sur la fluence du LASER, avec n le niveau d'énergie qui absorbe. Avec la formule (7) on peut remarquer qu'il est possible d'avoir de très mauvaises efficacités de génération d'onde acoustique (PGE) (ou un grand rendement quantique), mais néanmoins d'avoir un signal photoacoustique amplifié par l'absorption dans les états excités. Pour observer ces phénomènes non linéaires, il faut alors des coefficients d'absorption molaire dans les états excités forts ($\epsilon_e, \dots, \epsilon_n$) et de grandes concentrations dans les états excités (C_e, \dots, C_n). Rochford et son équipe définissent alors trois classes d'absorbants :

- Les absorbants linéaires : ce sont des émetteurs photoacoustiques linéaires qui suivent l'équation classique de la photoacoustique (3). Ils possèdent un temps de vie dans l'état excité qui est négligeable comparé au temps caractéristique de l'impulsion LASER : $\tau \ll \tau_{\text{laser}}$. Les molécules retournent très rapidement dans l'état fondamental et la concentration dans les états excités est très faible : pas d'absorption dans les états excités.
- Les absorbants saturables : ce sont de faibles émetteurs photoacoustiques. Ils possèdent des coefficients d'absorption dans les états excités faibles : $\epsilon_e < \epsilon$ mais des temps de vie de l'état excité plus longs que l'impulsion LASER : $\tau > \tau_{\text{laser}}$. Les molécules restent alors plus longtemps dans l'état excité S_1 , mais peu de molécules sont excitées vers des états S_n . Durant une impulsion, une dépopulation de l'état fondamental peut avoir lieu à forte puissance LASER. L'absorbance de la molécule, et donc le signal photoacoustique, diminue avec la puissance du LASER.
- Les absorbants saturables inverses : Ils absorbent beaucoup dans les états excités (ϵ_e fort) et les molécules restent suffisamment longtemps dans les états excités ($\tau > \tau_{\text{laser}}$) pour avoir des concentrations C_e non négligeables. Ce sont des émetteurs photoacoustiques non-linéaires. Leur absorbance et leur signal photoacoustique augmentent beaucoup avec la puissance LASER.

L'équipe de Rochford a alors démontré que certaines molécules présentaient un signal photoacoustique non linéaire avec l'augmentation de la fluence du LASER. La tétraphénylporphyrine de zinc (ZnTPP), le fullerène C_{60} , le bleu de méthylène et le ruthéniumtris(bipyridine) ($\text{Ru}(\text{bpy})_3$) sont des exemples d'absorbants saturables inverses (figure 1.25). On peut toutefois remarquer que les fluences LASER nécessaires pour observer ces phénomènes non linéaires dépassent l'exposition maximale permise de $20 \text{ mJ} \cdot \text{cm}^{-2}$ pour un LASER pulsé nanoseconde à 750 nm (C. Li et Wang 2009).

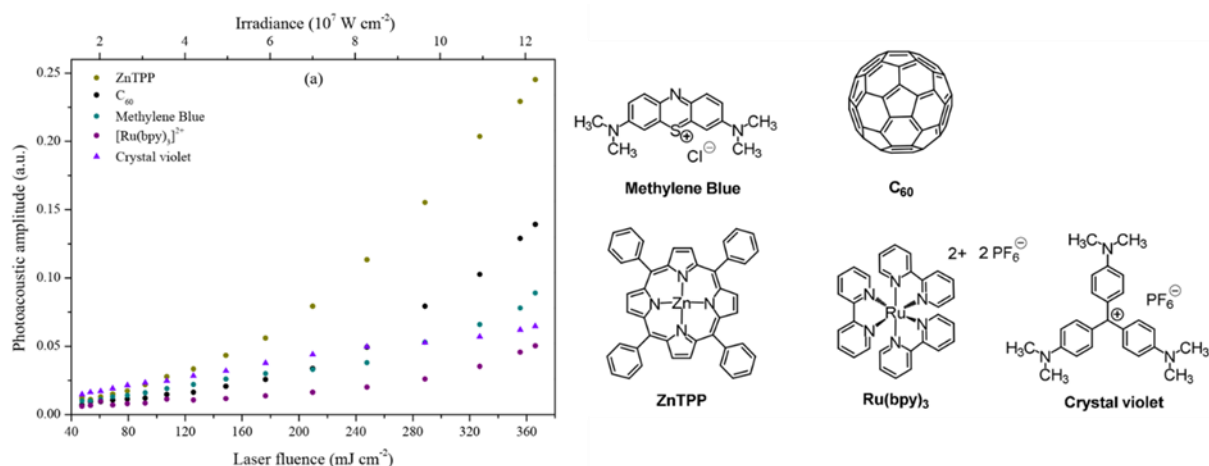


Figure 1.25 : Mise en évidence d'absorbeurs saturables inverses. (Gauche) Signal photoacoustique en excitant 532 nm en fonction de la fluence du LASER. (Droite) Structure des absorbeurs. Le Cristal violet est pris comme une référence pour le signal photoacoustique. Images tirées de (Hatamimoslehabadi et al. 2017).

1.3.6 Bilan

Pour résumer, afin d'obtenir le meilleur contraste photoacoustique, il faut maximiser le produit $\epsilon \times \text{PGE}$. Avec ϵ le coefficient d'absorption molaire (L.mol⁻¹.cm⁻¹) et PGE l'efficacité de génération photoacoustique (sans dimension). Ce produit d'un coefficient d'absorption molaire et d'un terme représentant l'efficacité de l'émission est très similaire à la brillance utilisée en fluorescence $B = \epsilon \times \Phi_F$. Cependant très peu d'articles font référence à une brillance photoacoustique. Un seul l'a véritablement explicitée et définie (Zhou et al. 2019). En effet, beaucoup d'articles traitant d'agents de contraste photoacoustiques s'intéressent seulement à maximiser le coefficient d'absorption molaire et très peu mentionnent l'efficacité de l'émission de l'onde acoustique. Par exemple dans la revue très citée de Weber, les agents de contraste sont classés sur une échelle en fonction de leur coefficient d'absorption molaire (Weber, Beard, et Bohndiek 2016). Récemment, certaines équipes ont commencé à s'intéresser à l'efficacité d'émission photoacoustique, notamment celles traitant de la thérapie photothermique. La compréhension de l'ensemble des phénomènes photophysiques permettant de générer une onde acoustique et leur quantification sont encore mal maîtrisées. Mais les outils et les connaissances en spectroscopie photoacoustique commencent à se développer.

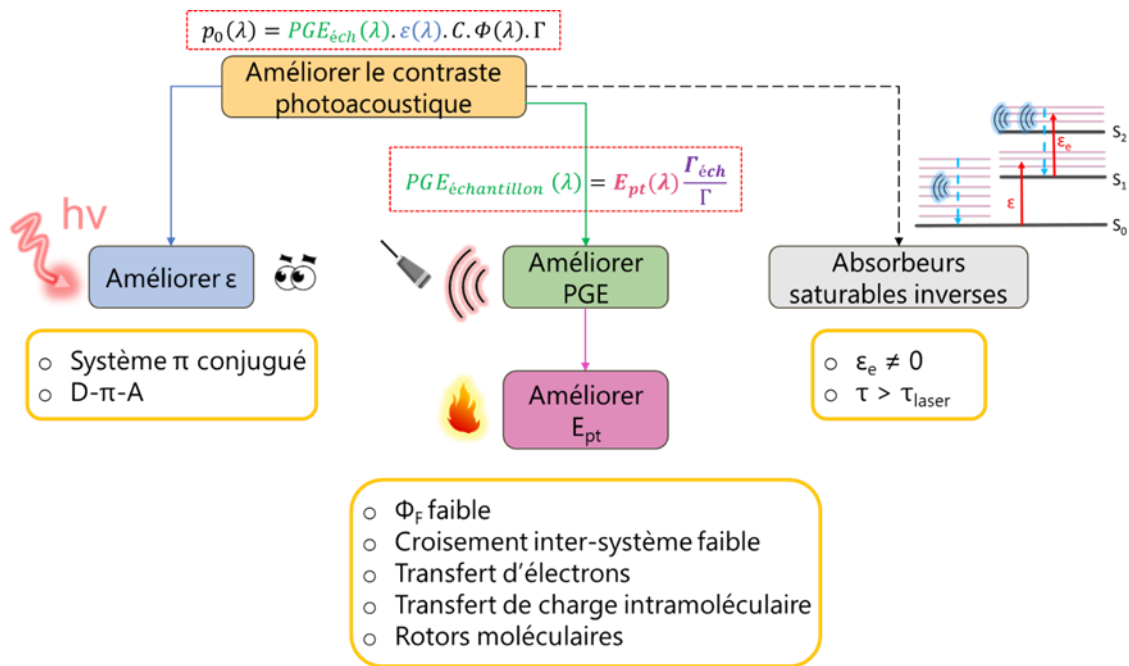


Figure 1.26 : Schéma récapitulatif des différentes stratégies possibles pour augmenter le signal photoacoustique.

L'analyse des paramètres photophysiques importants en spectroscopie photoacoustique nous a permis de déceler les différentes stratégies envisageables pour augmenter le signal photoacoustique (figure 1.26). Cependant, dans le cadre du développement de particules nanothéranostiques, le contraste photoacoustique n'est pas le seul paramètre à prendre en compte. Il est également important de connaître et maîtriser : la solubilité/dispersibilité des agents de contraste, leur stabilité, leur temps de demi-vie dans le sang, leur toxicité, leur photostabilité ainsi que la possibilité de les fonctionnaliser en surface. Dès lors, comment sélectionner les meilleurs agents de contraste photoacoustique pour imager le vivant ?

1.4 LES AGENTS DE CONTRASTES DE L'IMAGERIE PHOTOACOUSTIQUE

1.4.1 Les agents de contrastes endogènes

Dans le corps, certaines molécules possèdent des coefficients d'absorption molaire élevés dans le proche infra-rouge. Dès lors, il est possible en les excitant de recueillir le signal photoacoustique provenant de ces molécules endogènes. Elles ont l'avantage d'être non toxiques contrairement aux agents de contrastes exogènes qu'il faut administrer et qui peuvent induire une toxicité. De plus les agents de contraste endogènes ne vont pas modifier les conditions physiologiques du corps au cours de l'imagerie et peuvent permettre d'observer certains processus biologiques.

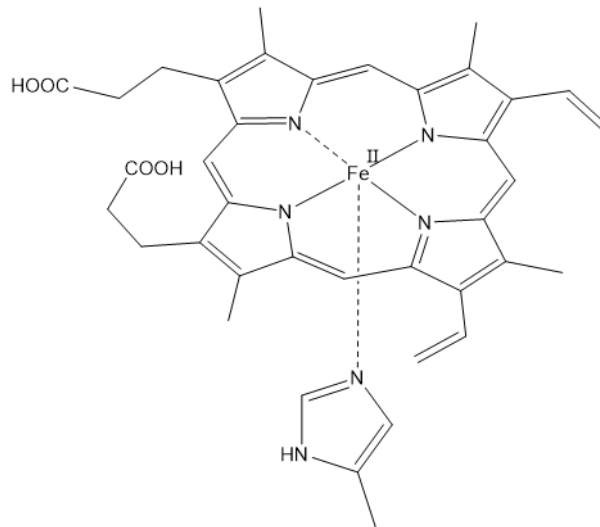


Figure 1.27 : Structure de l'hème b de la désoxyhémoglobine.

L'hémoglobine possède une forte absorption dans l'infra-rouge et son spectre change avec la complexation de dioxygène sur le cycle porphyrine (Figure 1.27 et 1.8). Grâce à l'imagerie photoacoustique, il est possible d'obtenir une image fine de l'ensemble du système vasculaire. C'est ce qu'ont réalisé Deán-Ben et son équipe en imageant *in vivo*, sur tout le corps, le système vasculaire sanguin d'une souris en environ 5 minutes grâce à de la tomographie photoacoustique (figure 1.28) (Deán-Ben et al. 2017). Le changement de spectre de l'hémoglobine avec la complexation de dioxygène peut être exploité pour visualiser le métabolisme de l'oxygène, doser la quantité totale d'hémoglobine (oxy- et désoxy-) et mesurer la saturation en dioxygène de l'hémoglobine (SO_2). Récemment, l'équipe de Liu a observé le système vasculaire de l'oreille d'une souris grâce à un appareil de microscopie photoacoustique. Ils ont pu cartographier la concentration totale en hémoglobine, la vitesse de circulation sanguine, ainsi que le taux de saturation en dioxygène grâce à une excitation à trois longueurs d'ondes (558, 545, et 532 nm) (Figure 1.29). Ces trois paramètres du système sanguin peuvent servir pour diagnostiquer des maladies comme les maladies neurodégénératives, les cancers, le diabète, les accidents vasculaires cérébraux (C. Liu, Liang, et Wang 2020). Pour le cancer, les tissus avec un faible taux d'oxygène ou en hypoxie ont de plus fortes probabilités d'être des tumeurs et l'hypoxie peut limiter l'efficacité de la radiothérapie (Lavaud et al. 2017; Colliez, Gallez, et Jordan 2017).

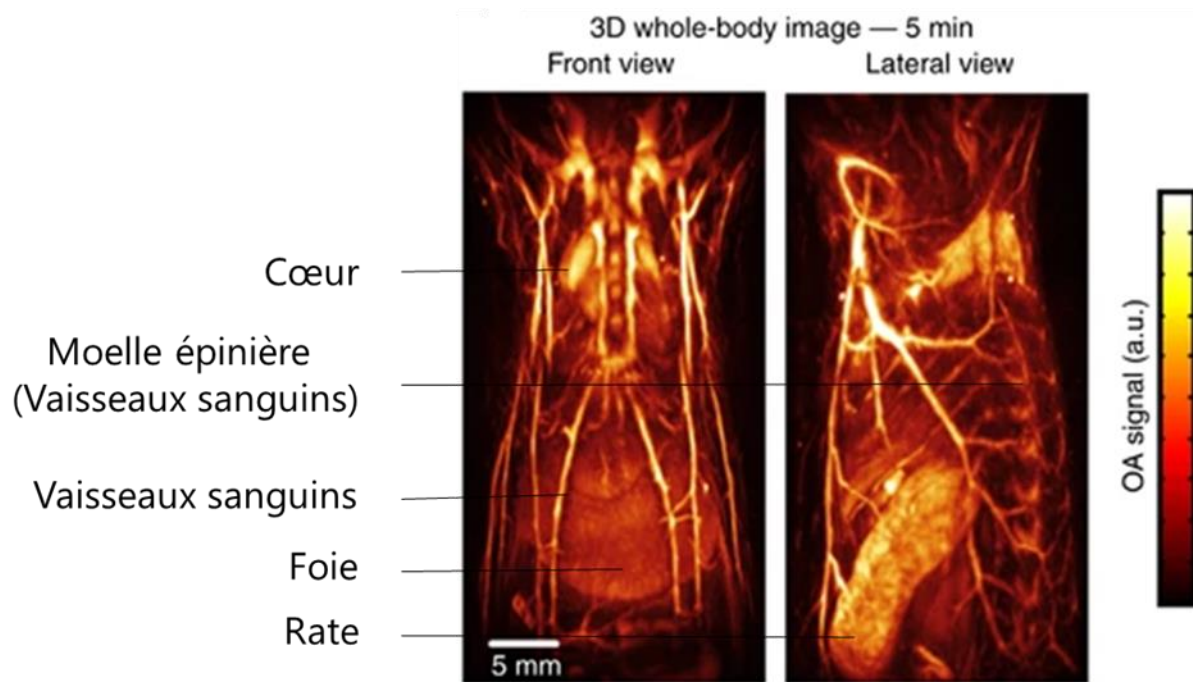


Figure 1.28 : Image 3D *in vivo* du système vasculaire sanguin d'une souris obtenue en tomographie photoacoustique (agent de contraste endogène étudié : l'hémoglobine). Excitation à 800 nm. Image adaptée de (Deán-Ben et al. 2017).

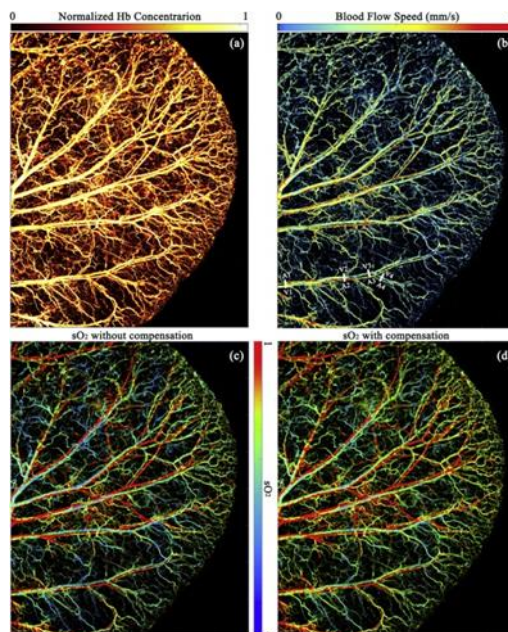


Figure 1.29 : Image du système sanguin de l'oreille d'une souris obtenue à l'aide d'un appareil de microscopie photoacoustique. (a) Concentration totale en hémoglobine. (b) Vitesse de circulation sanguine. (c) et (d) Taux de saturation en dioxygène de l'hémoglobine obtenue respectivement sans correction et avec correction de l'effet de relaxation du coefficient de Grüneisen. La zone imagée correspond à 8,75 mm x 10 mm. Image tirée de (C. Liu, Liang, et Wang 2020).

La mélanine, les lipides sont également visibles par imagerie photoacoustique. L'observation de la mélanine peut être utilisée dans le cadre des cancers de la peau et notamment des mélanomes. Lavaud et son équipe, ont par exemple, montré la présence de mélanine dans des cellules tumorales du cerveau, avec un signal trois fois plus grand que dans un cerveau sain. La mélanine permet alors de mettre en évidence la présence de cellules de mélanome dans le cerveau signe d'un processus métastatique (Lavaud et al. 2017). L'observation des lipides par tomographie photoacoustique est aussi réalisable. L'observation de l'accumulation des lipides sur les parois d'une artère est intéressante dans le cadre de diagnostic de l'athérosclérose. Cao et son équipe ont notamment pu détecter le signal photoacoustique *in vivo* de lipides déposés sur la paroi d'une aorte de lapin (Cao et al. 2018). Le signal photoacoustique de l'eau (975 nm) peut également être cartographié *in vivo*, il peut par exemple permettre de suivre l'accumulation d'eau dans les œdèmes cérébraux (Xu, Zhu, et Wang 2011).

Malgré leur intérêt, les agents de contrastes endogènes ne permettent de visualiser qu'un nombre limité de processus biologiques. Une manière de remédier à ce problème sans introduire d'agents exogènes est l'utilisation de chromophores modifiés génétiquement. Ces derniers permettent d'éviter des injections longues et répétées d'agents exogènes, comme par exemple lors du suivi du développement de tumeurs (Weber, Beard, et Bohndiek 2016). Les protéines génétiquement modifiées et photocommutables sont particulièrement intéressantes car elles permettent d'obtenir de très bons contrastes en imagerie photoacoustique grâce à l'imagerie différentielle entre les états allumés et éteints. Yao et son équipe ont utilisé le phytochrome BphP1 modifié génétiquement qui possède des propriétés photocommutables lorsqu'il est complexé à la biliverdine, pour imager la croissance de tumeurs et la présence de métastases avec une résolution de 100 μm pour 10 mm de profondeur (Weber, Beard, et Bohndiek 2016; Yao et al. 2016). L'utilisation de modifications génétiques n'est pas toujours facile ou souhaitable pour l'imagerie notamment lorsqu'elle a pour objectif d'imager des patients humains (Lemaster et Jokerst 2017). Dès lors pour pouvoir observer un plus vaste champ de processus biologiques et de cellules, il faut se tourner vers des agents de contrastes exogènes.

1.4.2 Les agents de contrastes exogènes

En plus de permettre d'observer des phénomènes ou des cellules peu absorbantes dans le proche IR, les agents de contrastes exogènes permettent d'augmenter la gamme de longueurs d'onde utilisables et de synthétiser des agents de contrastes aux longueurs d'onde souhaitées, notamment là où l'hémoglobine et la mélanine absorbent le moins. Il est également possible de développer une imagerie multispectrale en introduisant plusieurs agents de contraste avec des longueurs d'ondes d'absorption différentes. L'imagerie multispectrale est par exemple très

intéressante pour imager la présence de tumeurs et en même temps suivre l'internalisation des nanovecteurs au sein des cellules, ou bien pour imager *in vivo* l'activité de certaines enzymes comme les protéases en utilisant des particules activables (Yang et al. 2014; Levi et al. 2013).

Un bon agent de contraste exogène photoacoustique doit posséder les caractéristiques suivantes (Lemaster et Jokerst 2017; Weber, Beard, et Bohndiek 2016). Tout d'abord pour avoir le plus grand contraste il faut :

1. Une forte absorption dans le proche infra-rouge à faible concentration pour limiter les effets toxiques. Cela se traduit par des coefficients d'absorption molaires, ϵ , les plus grands possibles.
2. Une forte sélectivité spectrale (c'est-à-dire des bandes avec de faibles largeurs à mi-hauteur), pour que les agents de contrastes absorbent essentiellement à une longueur d'onde donnée et permettre de facilement séparer spectralement plusieurs absorbeurs dans le cadre d'une imagerie multispectrale (« spectral unmixing » en anglais) et que ces bandes soient distinctes de celles de l'hémoglobine et de la mélanine (Weber, Beard, et Bohndiek 2016).
3. Avoir une bonne conversion photothermique (E_{pt}) : c'est-à-dire favoriser les voies de relaxation non-radiatives. Le rendement quantique de fluorescence (Φ_F) doit être faible et le passage par l'état triplet évité (croisement inter-système) (paragraphe 1.3.3)

Un bon agent de contraste photoacoustique doit également être :

4. Biodégradable : C'est-à-dire qu'il peut subir des dégradations par des processus biologiques et conduire à une perte de sa masse molaire (Chemistry IUPAC).
5. Biocompatible : il doit être accepté par les tissus et l'organisme dans son ensemble, et par exemple ne pas induire d'inflammation. Si l'agent de contraste est destiné à être dégradé, les produits de dégradation ne doivent pas nuire à l'organisme et aux tissus (Park et Lakes 2007).
6. Photostable : c'est-à-dire qu'il n'est pas détérioré (perte d'absorption, perte d'émission et/ou destruction de la molécule) par la lumière. Cette caractéristique est particulièrement importante en photoacoustique puisque les irradiations se font souvent avec des LASER pulsés de forte puissance.
7. Fonctionnalisable en surface : il est possible de fixer des ligands en surface du matériau, ce qui peut s'avérer très intéressant dans le cadre de particules théranostiques avec un ciblage actif (section 1.1.3).
8. Stable et soluble/dispersable dans les liquides biologiques, tampons, solutions de culture cellulaire.

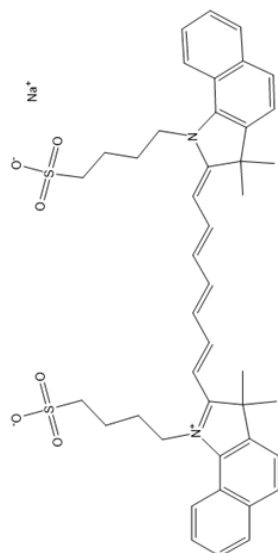
1.4.2.1 Les petites molécules organiques

Cette classe d'agents de contraste regroupe des molécules organiques possédant de nombreuses chaînes carbonées conjuguées et des cycles aromatiques qui leurs permettent d'absorber dans le proche infra-rouge. Elles possèdent de forts coefficients d'absorption molaire à même de générer un signal photoacoustique important. De plus, certaines de ces molécules sont facilement modifiables chimiquement, elles peuvent alors servir de plateforme pour ajuster leurs caractéristiques photophysiques afin de générer le plus fort signal photoacoustique dans le proche IR (paragraphe 1.3.4). Par ailleurs, la petite taille des molécules organiques en fait des agents de contraste peu toxiques, rapidement éliminés par le corps et qui peuvent parfois marquer des cellules après une injection intraveineuse (Weber, Beard, et Bohndiek 2016; Lemaster et Jokerst 2017).

Les molécules approuvées cliniquement

Il existe trois colorants pour l'imagerie photoacoustique qui sont approuvés cliniquement par la « Food and Drug Administration » (FDA) : l'IndoCyanine Green (ICG), le bleu de méthylène et le bleu d'Evans (Laramie et al. 2018). En plus d'être des molécules commerciales et donc facilement accessibles, ces molécules peuvent être utilisées pour des études cliniques. Leurs pharmacocinétiques et pharmacodynamiques sont très bien connues. De plus ces composés possèdent des forts coefficients d'absorption molaire (Figure 1.30), même si le bleu d'Evans et le bleu de méthylène sont à la limite de la fenêtre du proche infra-rouge.

Autorisé par la FDA depuis 1959 (« Drugs@FDA: FDA-Approved Drugs »), l'ICG présente l'avantage de posséder un très fort coefficient d'absorption molaire dans le proche infra-rouge (Figure 1.30). La première correspondance *in vitro* entre le spectre d'absorption et le spectre photoacoustique de l'ICG a été démontrée en 2000 par l'équipe de Fainchtein (Fainchtein et al. 2000). En 2007, l'équipe de Kim a encapsulé l'ICG dans des nanoparticules de type silicate. Ces nanoparticules ont été fonctionnalisées par un ligand pour cibler les cellules cancéreuses de la prostate *in vitro* et observer un fort contraste en imagerie photoacoustique entre les cellules ciblées et non ciblées. La possibilité d'utiliser ces NP pour de la thérapie photodynamique a également été démontrée *in vitro* (G. Kim et al. 2007). L'ICG a également été utilisé pour co-localiser par imagerie de fluorescence et photoacoustique les ganglions sentinelles sur des rats, avec un intérêt pour évaluer la présence de métastases pour le cancer du sein (C. Kim, Song, et al. 2010).



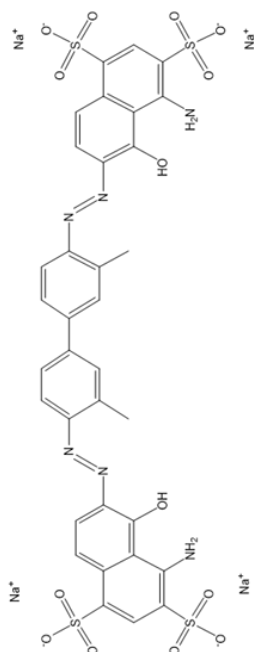
Indocyanine Green

(« Optical Absorption of Indocyanine Green (ICG) »)

$\lambda_{\text{abs, max}} = 780 \text{ nm (eau)}$

$\epsilon (780) = 1,1 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

$\Phi_{\text{F}} = 11\% \text{ (DMSO) (Brouwer 2011)}$

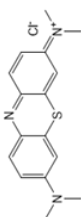


Bleu d'Evans

(Taniguchi et Lindsey 2018)

$\lambda_{\text{abs, max}} = 608 \text{ nm (eau)}$

$\epsilon (606) = 8,6 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$



Bleu de méthylène

(Cenens et Schoonheydt 1988)

$\lambda_{\text{abs, max}} = 664 \text{ nm (eau)}$

$\epsilon (664) = 9,5 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

$\Phi_{\text{F}} = 4\% \text{ (eau) (Santin et al. 2015)}$

Figure 1.30 : Structures et propriétés photophysiques des chromophores autorisés par la FDA.

Cependant, l'ICG présente de nombreux problèmes. Il possède une faible solubilité dans l'eau malgré la présence de groupements sulfonates cationiques : 1 mg.mL^{-1} (« Indocyanine green | 3599-32-4 »). La présence de charges rend toute imagerie du cerveau impossible (« Definition of Indocyanine Green Solution - NCI Drug Dictionary - National Cancer Institute » 2011). Son temps de demi-vie dans le sang est très court : 3 à 5 min, puis il est éliminé à 97% par le foie (De Gasperi, Mazza, et Prosperi 2016). Il se dimérise et s'agrège en solution aqueuse et a tendance à se fixer sur les protéines et les phospholipides des bicouches lipidiques. Ces interactions peuvent conduire à des déformations spectrales et des modifications des propriétés photophysiques de l'ICG qui rendent plus compliquées l'imagerie et la séparation spectrale (Borg et Rochford 2018b). Il est possible d'augmenter sa demi-vie en le greffant sur des anticorps, ou en l'encapsulant dans des NP ou des micelles (Sano et al. 2017; 2015). Cependant l'ICG est délicat à fonctionnaliser (Weber, Beard, et Bohndiek 2016). De plus, il possède un rendement quantique de fluorescence faible mais non négligeable, qui se traduit par une perte d'énergie qui ne sera pas convertie en chaleur et donc un signal photoacoustique plus faible. Il peut également produire des espèces réactives de l'oxygène en se désexcitant depuis l'état triplet, voie de désexcitation en compétition avec la production d'une onde acoustique. (G. Kim et al. 2007; Guo et al. 2017). Enfin l'inconvénient le plus important de l'ICG est sa très faible photostabilité qui rend compliquée l'utilisation d'illumination pulsée en photoacoustique (Laufer, Zhang, et Beard 2010).

Les cyanines

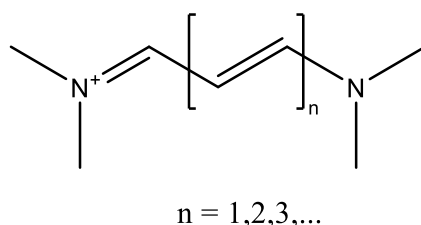


Figure 1.31 : Structure caractéristique du pont polyméthine des cyanines. Le nombre d'atomes de carbone conjugués du pont peut être modifié pour changer les propriétés spectrales.

Pour répondre aux nombreux problèmes de l'utilisation de l'ICG, de nombreuses cyanines ont été développées en tant qu'agents de contraste pour l'imagerie photoacoustique, avec cependant le désavantage de ne plus être cliniquement approuvées. Les cyanines sont caractérisées par une chaîne carbonée polyméthine reliant deux atomes d'azote. Une charge positive est délocalisée le long de la chaîne polyméthine. Augmenter la longueur de la chaîne polyméthine permet de décaler

l'absorption et l'émission dans le proche infra-rouge, cependant cela a également pour effet de diminuer le coefficient d'absorption molaire (Borg et Rochford 2018b). Les cyanines possèdent de forts coefficients d'absorption molaire (souvent supérieurs à $1 \times 10^5 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) (« Cyanine dyes »). L'équipe de Temma a développé une cyanine « IC7-1-Bu » sans marqueur, afin d'imager *in vivo* son accumulation dans les tumeurs d'une souris. La molécule en question possède un signal photoacoustique 2,5 fois plus important que le bruit de fond et 2,3 fois plus important que celui de l'ICG (Temma et al. 2014). La conception de cette cyanine a été améliorée par la suite afin d'obtenir des cyanines photostables possédant un signal photoacoustique tout aussi important (Onoe et al. 2015). L'heptacyanine commerciale IRDye800CW présente un intérêt majeur par son maximum d'absorption à 795 nm, par la présence de nombreux groupes sulfonates qui augmentent sa solubilité dans l'eau (meilleure que celle de l'ICG) et par la possibilité d'avoir différentes fonctionnalisations commercialement accessibles (azoture, NHS ester, maléimide, ...). L'équipe de Kovar a pu imager le métabolisme du glucose dans des tumeurs *in vivo* par tomographie photoacoustique multispectrale grâce à une cyanine IRDye800CW marquée avec du 2-désoxyglucose. Un signal photoacoustique 3,3 fois plus fort a été observé dans les tumeurs comparées aux tissus sains (Kovar et al. 2009). Malgré de nombreuses applications en imagerie photoacoustique, la principale limitation des cyanines reste leur photostabilité (X. Wu et Zhu 2015; Zhang et al. 2017; Song et al. 2004; X. Chen et al. 2006; Funabiki et al. 2016).

Les Bodipy

Le 4-difluoro-4-bora-3A,4A-diaza-s-indacène encore appelé Bodipy pour BORon DIPYrométhène est la source d'une famille très connue de fluorophores. Le Bodipy est constitué d'un noyau émissif rassemblant deux pyroles à l'aide d'un pont liant : le groupement BF_2 , donnant de la rigidité à la molécule (figure 1.32)

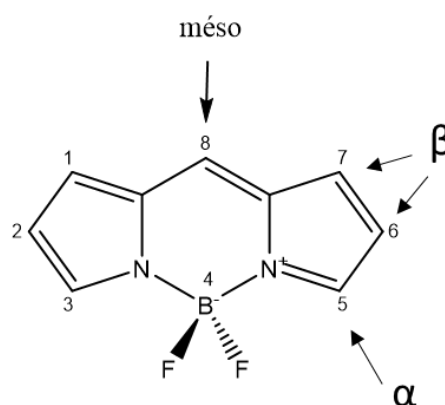


Figure 1.32 : structure du noyau du Bodipy ainsi que la numérotation officielle et les appellations des atomes.

Les Bodipy absorbent dans le domaine visible et sont réputés pour leur coefficient d'absorption molaire élevés (ϵ), généralement aux alentours de $8-9 \times 10^4 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ (López Arbeloa et al. 1998). Le maximum d'absorption du Bodipy est aux alentours de 530 nm et correspond à la transition électronique $S_0 \rightarrow S_1$. Cette bande possède un épaulement vibrationnel décalé d'environ 1100 cm^{-1} vers les plus hautes énergies (vers 500 nm). La bande d'absorption du Bodipy est plus étroite que celle de la Rhodamine et de la fluorescéine, ce qui en fait une molécule possédant une bonne sélectivité spectrale (Lakowicz 2007). Concernant les propriétés de fluorescence, les Bodipy possèdent des rendements quantiques de fluorescence importants ($\Phi_F > 0,6$) (Loudet et Burgess 2007) ce qui a priori n'en fait pas des composés de choix pour l'imagerie photoacoustique. Les Bodipy possèdent un faible déplacement de Stokes ($500-700 \text{ cm}^{-1}$) ce qui peut favoriser la perte de fluorescence des Bodipy à l'état solide par extinction de fluorescence causée par agrégation* (Aggregation Caused Quenching ACQ en anglais) (T. T. Vu et al. 2013). Il est intéressant de relever que les Bodipy se désexcitent très peu par passage à l'état triplet (Y. Zhao et al. 2016; Filatov et al. 2017), ce qui limite les pertes d'énergie pour l'effet photoacoustique.

*Extinction de fluorescence causée par agrégation (ACQ)

De nombreux fluorophores possèdent des structures planes avec une grande conjugaison et des noyaux aromatiques conjugués. À forte concentration, le rapprochement des molécules va favoriser la formation d'agrégats et la présence d'interactions $\pi-\pi$ entre les noyaux aromatiques ainsi que d'autres types d'interactions (transfert d'énergie ou de charges, réactions dans les états excités, formation d'excimères ou d'exciplexes). Ces interactions sont néfastes pour la fluorescence du monomère et provoquent son extinction.

Pour pouvoir développer l'utilisation des Bodipy en tant qu'agents de contraste photoacoustique il est primordial de déplacer leur maximum d'absorption dans le proche IR, de réduire leur rendement quantique de fluorescence, tout en conservant un fort coefficient d'extinction molaire et un faible passage par l'état triplet. Les Bodipy sont de véritables plateformes sur lesquelles il est facile de greffer de nombreux groupements et ligands afin de modifier les propriétés spectrales (Loudet et Burgess 2007; Ulrich, Ziessel, et Harriman 2008; T. Vu et al. 2015; Sobenina et al. 2011; Schmidt et al. 2011). Dès lors comment adapter la structure des Bodipy pour en faire de bons agents de contraste photoacoustique ?

L'équipe de Jean-Michel Merkes a, par exemple, synthétisé en 2020 un Bodipy conjugué à un groupement donneur d'électrons : un pyrrole. Le transfert d'électron photoinduit entre le pyrrole et le cœur du Bodipy a permis de déplacer le maximum d'absorption dans le proche infra-rouge (800 nm), et de diminuer grandement l'efficacité de fluorescence du Bodipy. Les Bodipy synthétisés possèdent de forts coefficients d'absorption molaire $5,6 \times 10^4$ à $9,5 \times 10^4 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, une fluorescence non

déTECTABLE, pas de génération d'espèces réactives de l'oxygène (absence de croisement intersystème), et une bonne photostabilité. La solubilité des Bodipy dans les solutions aqueuses est améliorée par greffage de chaînes polyéthylène glycol (PEG), ce qui en outre permet d'augmenter leur demi-vie dans le sang. Malgré le greffage de PEG, la solubilité dans le sang n'est pas optimale et 5% volumique de DMSO sont tout de même nécessaires pour solubiliser les Bodipy à 10^{-4} mol.L⁻¹ en solution aqueuse. Le signal photoacoustique des Bodipy a été détecté dans des fantômes de test jusqu'à une concentration limite de 1×10^{-6} mol.L⁻¹. Cependant les spectres photoacoustiques se superposent mal avec les spectres d'absorption et l'ajout d'un tensio-actif (Cremophore EL) est nécessaire pour solubiliser le chromophore en solution de tampon phosphate.

Le groupe de Yong Ni a développé des Bodipy D- π -A avec un ester à la position méso et des groupements donneurs d'électrons aux positions alpha du Bodipy. Le transfert de charge intramoléculaire a permis de déplacer le maximum d'absorption dans la région du proche infra-rouge vers 820 nm, avec de très bons coefficients d'absorption molaire $6,7 \times 10^4$ L.mol⁻¹.cm⁻¹. Les Bodipy synthétisés possèdent une bonne photostabilité et les meilleurs signaux photoacoustiques sont obtenus avec les Bodipy possédant les plus grands transferts de charge (groupement thiophène). Dans des fantômes de test, le Bodipy possédant des thiophènes présente un signal photoacoustique 6 fois plus important que celui de l'ICG. Les expériences ont toutefois été réalisées dans du DMSO attestant de la très faible solubilité du Bodipy dans l'eau.

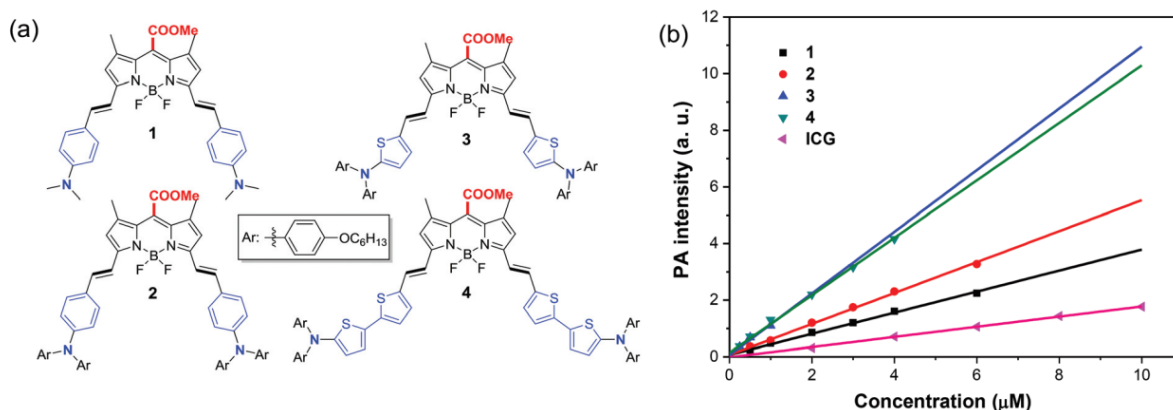


Figure 1.33 : (a) Structure des Bodipy avec un ester à la position méso et différents donneurs d'électrons en position alpha. (b) Signaux photoacoustiques des Bodipy et de l'ICG mesurés dans des fantômes de test au maximum d'absorption. Image tirée de (Y. Ni et al. 2017).

Les petites molécules présentent cependant des inconvénients. De par leurs grandes chaînes carbonées conjuguées et leurs cycles aromatiques, ce sont majoritairement des molécules peu solubles dans l'eau et donc dans les milieux

cellulaires et liquides biologiques. De plus, afin d'éviter des problèmes de toxicité, de faibles doses sont souvent injectées, ce qui peut conduire à des signaux photoacoustiques faibles malgré une forte absorption molaire. Les petites molécules sont de plus généralement très rapidement éliminées et ne restent pas longtemps dans le sang, ce qui peut limiter leur accumulation dans les tumeurs par exemple. Enfin, il faut également faire face à des problèmes de photostabilité et de phototoxicité (fabrication d'espèces réactives de l'oxygène). Dès lors, des solutions doivent être trouvées pour augmenter la quantité introduite d'agent de contraste dans le corps tout en palliant aux problèmes de solubilité, de toxicité et de rapide élimination par le corps. La solution est l'utilisation de « cargos » par exemple des NP.

1.4.2.2 *Les nanoparticules lipidiques*

L'utilisation de NP en tant que cargo pour encapsuler les agents de contraste permet de pallier les problèmes de solubilité dans l'eau des petites molécules organiques. De plus, il est possible d'utiliser des polymères ou lipides biodégradables et biocompatibles ce qui permet d'éviter les problèmes de toxicité tout en permettant d'introduire dans le corps de plus grandes quantités d'agent de contraste.

Les Micelles

Les micelles sont constituées de molécules amphiphiles qui, au-delà d'un seuil de concentration, s'auto-assemblent de manière spontanée en petits agrégats. A faible concentration, les molécules sont solubilisées dans les solvants aqueux, mais au-dessus de la Concentration Micellaire Critique (CMC), les micelles se forment spontanément. Elles possèdent un cœur hydrophobe regroupant les longues chaînes hydrophobes de la molécule, et une surface hydrophile (figure 1.35). Leur taille est inférieure à 100 nm. Les micelles sont le plus simple des systèmes colloïdaux. Le Taxol®, médicament anticancéreux, en est un exemple : il s'agit de paclitaxel encapsulé dans des micelles à base de triglycérides (Kolliphor EL ou Cremophor EL) (Sofias et al. 2017).

Le phospholipide 1,2-Distéaroyl-sn-glycéro-3-phosphoéthanolamine (DSPE) accroché de manière covalente à un PEG : DSPE-PEG, est très utilisé dans la littérature pour obtenir des nanoparticules actives en photoacoustique. Il est biocompatible et biodégradable et peut être facilement fonctionnalisé, par exemple avec un maléimide (Qi et al. 2018). Les formulations, rencontrées dans la littérature, pour les agents de contraste photoacoustiques sont majoritairement obtenues par nanopréciipitation du DSPE-PEG. Les différentes voies possibles de formulation ne sont pas discutées ici mais le lecteur peut se référer aux articles suivants pour en apprendre plus sur le sujet (Fattal et al. 2012; Zielińska et al. 2020; K. Li et Liu 2014). Les NP obtenues sont de taille inférieure à 100 nm. L'équipe de Wenbo Hu, a par exemple, encapsulé un Bodipy actif en photoacoustique dans des micelles formées à partir du phospholipide DSPE-PEG₅₀₀₀ (figure 1.34). Les nanoparticules sont sphériques, de diamètre hydrodynamique 35 nm

et sont stables pendant deux jours dans du sérum physiologique. Aucun effet cytotoxique n'a été observé sur des cellules Hela jusqu'à des concentrations de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ en DSPE-PEG. Le signal PA des NP a été observé *in vivo* après injection intraveineuse dans la queue d'une souris. Le signal photoacoustique détectable dans le sang atteint son maximum au bout de 30 min, puis les NP s'accumulent dans le foie et les tumeurs et sont éliminées via les reins. La petite taille des NP et l'utilisation de lipides biodégradables favorisent ce faible temps de demi-vie dans le sang. Les NP obtenues sont également actives pour faire de la thérapie photothermique (Hu et al. 2019).

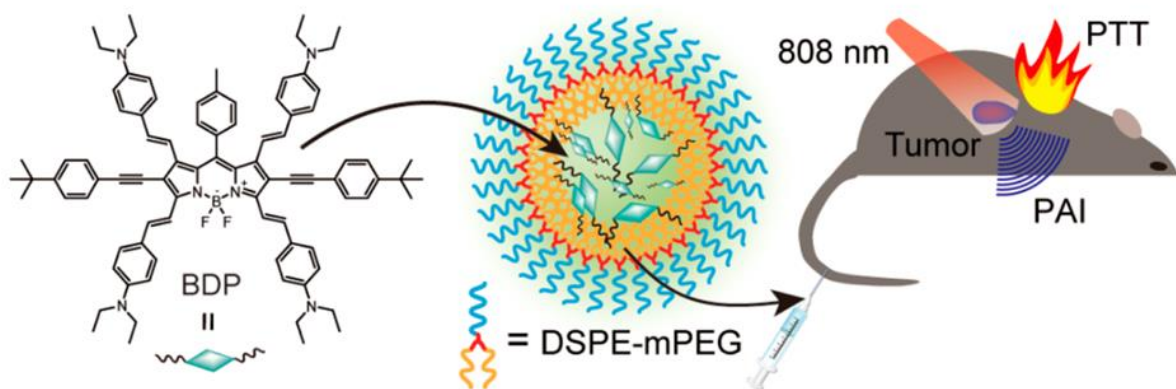


Figure 1.34 : Structure du Bodipy et représentation schématique des NP lipidiques utilisées par l'équipe de Wenbo Hu pour faire de l'imagerie photoacoustique et de la thérapie photothermique. Image tirée de (Hu et al. 2019).

De très nombreuses autres publications relatent l'utilisation de micelles lipidiques obtenues à partir du phospholipide DSPE-PEG pour faire de l'imagerie photoacoustique (Cai et al. 2017; Xi et al. 2020; Z. Zhao et al. 2019; Guo et al. 2017; Qi et al. 2018; 2021; X. Li et al. 2019; Gao et al. 2021; K. Li et Liu 2014). Cependant, les très faibles taux de chargement possibles avec les micelles et leur rapide déstabilisation lors de l'injection chez le patient ont beaucoup limité leur utilisation (Kahraman, Güngör, et Özsoy 2017).

Les Liposomes

Les liposomes sont également constitués de molécules amphiphiles qui s'auto-assemblent. Cependant, ils sont constitués d'un compartiment aqueux entouré d'une bicouche de phospholipides hydrophobes mimant la structure de la membrane cellulaire (figure 1.35). Leur taille peut être ajustée et pour l'administration intraveineuse elle est d'environ 100 à 300 nm. Ils peuvent encapsuler des molécules hydrophiles dans leur compartiment aqueux et des molécules hydrophobes dans la bicouche lipidique. Le Doxil® ou Caelyx® est un liposome utilisé commercialement encapsulant la doxorubicine* (Gabizon 2001). Le contrôle de la taille et la possibilité de

greffer des ligands en surface font des liposomes des cargos très intéressants pour des applications théranostiques (Sawant et Torchilin 2010). Pour la photoacoustique, l'encapsulation de molécules hydrophobes dans la membrane des liposomes peut conduire à des phénomènes d'extinction de fluorescence par agrégation, favorisant alors les désexcitations par voies non-radiatives et donc améliorant le signal photoacoustique (Lovell et al. 2011; Weber, Beard, et Bohndiek 2016). Les liposomes présentent cependant certains inconvénients comme de faibles taux d'encapsulation de molécules hydrophobes et des problèmes de stabilité à forts taux de chargement (Feng et Mumper 2012). L'emploi de cholestérol dans les formulations de liposomes permet d'augmenter leur stabilité *in vivo*, d'améliorer leur résistance à l'agrégation, renforce la rigidité de leur membrane, et diminue leur perméabilité (Briuglia et al. 2015).

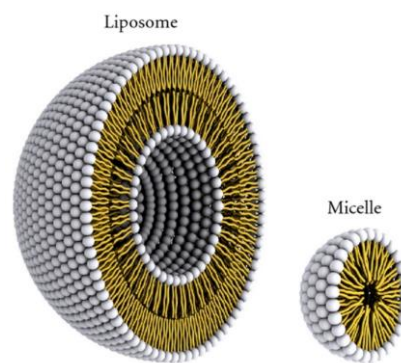
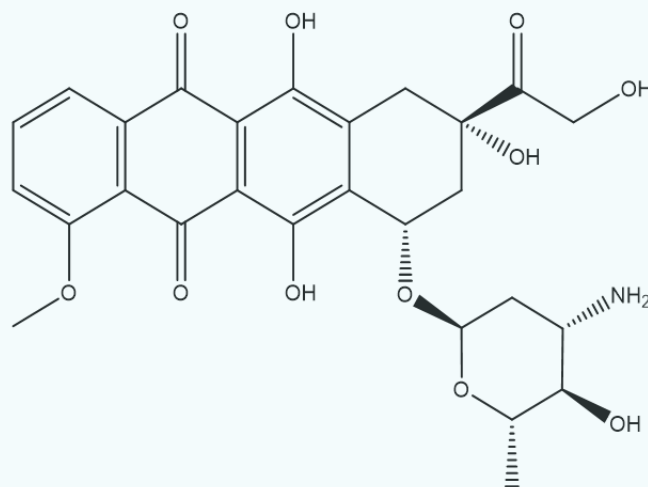


Figure 1.35 : Représentation schématique de la structure d'un liposome et d'une micelle. En jaune sont représentées les longues chaînes hydrophobes des phospholipides. Le blanc correspond à la tête hydrophile des phospholipides. Image tirée de (Bitounis et al. 2012).

*Doxorubicine

Médicament antibiotique anticancéreux utilisé en chimiothérapie, de la famille des anthracyclines.



En 2015 Vasilis Ntziachristos et son équipe ont formulé des liposomes encapsulant l'ICG. Les liposomes employés sont uniquement constitués de molécules approuvées par la « Food and Drug Administration » : le phospholipide PEGylé 1,2-distéaroyl-sn-glycéro-3-phosphoéthanolamine (DSPE-PEG), la phosphatidylcholine de soja hydrogénée (HSPC pour Hydrogenated Soy PhosphatidylCholine en anglais), du cholestérol ainsi que l'ICG jusqu'à des concentrations de $75 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Des taux d'encapsulation entre 36 et 46 % d'ICG ont été obtenus pour des tailles de liposomes de 120 à 130 nm. Le signal PA des liposomes a été détecté *in vivo* par tomographie photoacoustique et séparation spectrale (spectral unmixing en anglais) sur des modèles de tumeurs murines. Les liposomes ont été détectés juste après injection dans le système vasculaire, puis ils s'accumulent au site de la tumeur pour atteindre un plateau au bout de 4 h. Les liposomes ont démontré une bonne stabilité *in vivo* ainsi qu'un temps de circulation sanguine d'au moins 24 h. Dans des fantômes de test, le signal photoacoustique des liposomes d'ICG est trois fois plus grand que celui de nanobâtonnets d'or à la même concentration massique (Beziere et al. 2015). Cependant, pour isoler le signal photoacoustique de l'ICG, la séparation spectrale est nécessaire et ardue car son maximum d'absorption (800 nm) est proche de la longueur d'onde utilisée pour détecter l'hémoglobine.

Pour pallier ce problème, l'équipe de Cayla A. Wood a proposé d'encapsuler de très grandes quantités d'ICG dans des liposomes pour former des agrégats de type J** d'ICG (figure 1.36) (Wood et al. 2021). La formation d'agrégats J provoque un décalage vers le rouge du maximum d'absorption (890 nm) et facilite la séparation spectrale avec l'hémoglobine. La formulation en liposomes est constituée du phospholipide DSPE-PEG, de cholestérol, du phospholipide 1,2-dipalmitoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine (DPPC). L'ICG est agrégé dans le cœur hydrophile du liposome. Les liposomes obtenus font 130 nm de diamètre et possèdent jusqu'à $1,5 \times 10^6$ molécules d'ICG par liposome, ce qui est environ 400 fois plus que les liposomes de l'équipe de Vasilis Ntziachristos (Beziere et al. 2015). De plus, l'absorbance des agrégats J est trois fois plus grande que celle des monomères d'ICG à la même concentration molaire. La bonne séparation spectrale de l'oxyhémoglobine et des liposomes d'ICG permet d'améliorer la mesure conjointe du taux de saturation (SO_2) en oxygène et du signal PA des liposomes. Une erreur absolue de 18 % pour SO_2 a été obtenue lieu de 50 % avec l'ICG sous forme monomère. Les liposomes ont ensuite été fonctionnalisés en surface avec des anticorps monoclonaux ciblant les cellules tumorales sur-exprimant le récepteur $\text{FR}\alpha$. L'équipe de Cayla Wood a alors démontré le ciblage efficace des cellules cancéreuses de l'ovaire (SKOV3) avec une augmentation significative du contraste photoacoustique (avant-après injection) comparé aux liposomes sans ciblage actif. Cependant, la formulation de ces liposomes nécessite 60 jours de synthèse pour obtenir les agrégats J d'ICG, ce qui rend la synthèse difficile et coûteuse. De plus, dans du sérum fœtal de bovin à 37°C le signal photoacoustique des agrégats est réduit de 22 % en 6 h au profit du signal PA du monomère. Après 48 h, 50 % du signal des agrégats J est perdu. Les liposomes

se dégradent donc dans des conditions physiologiques. Le temps de demi-vie des liposomes a été estimé à 10 min dans une veine superficielle du cou de la souris (Wood et al. 2021).

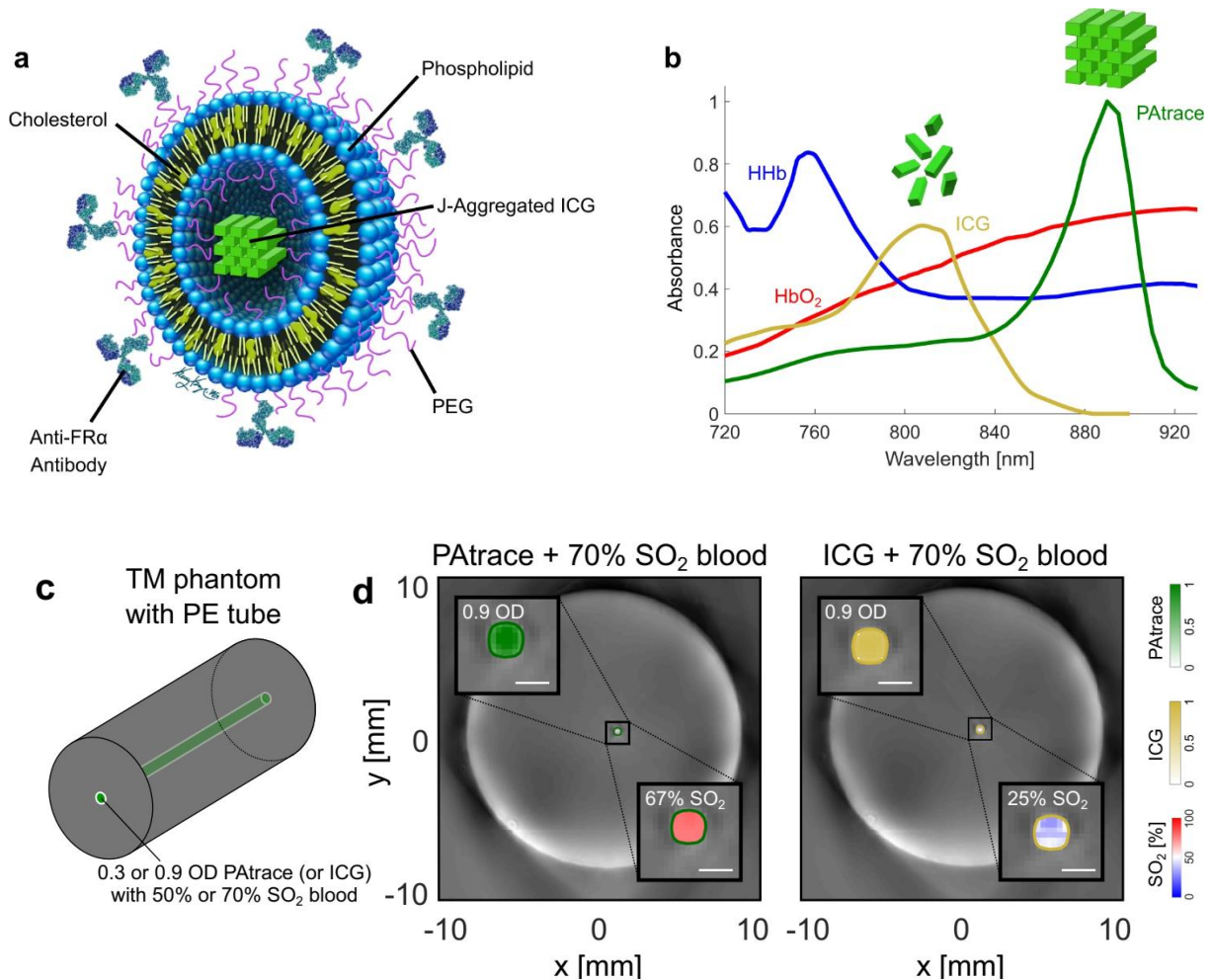
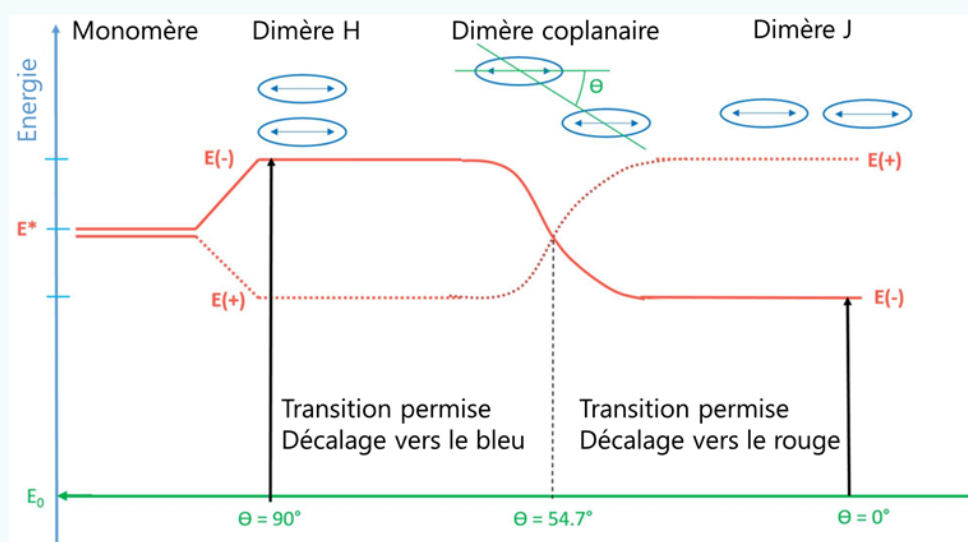


Figure 1.36 : (a) Représentation schématique des liposomes encapsulant les agrégats de type J d'IndoCyanine Green (ICG). (b) Spectres d'absorption de la désoxyhémoglobine (bleu), de l'oxyhémoglobine (rouge), de l'ICG dans du sérum sanguin (jaune), et des agrégats J de l'ICG dans du sérum sanguin (vert). (c) Représentation schématique des fantômes de test imitant les tissus utilisés pour détecter le signal photoacoustique de des NP et du taux de saturation en dioxygène (TM : tissue-mimicking en anglais), PE : polyéthylène. (d) Image photoacoustique des fantômes de test contenant du sang à un taux de saturation en dioxygène de 70% et soit de l'ICG soit des NP d'agrégats d'ICG (appelées PAttrace) (OD : Optical Density en anglais, absorbance). Echelle 0,5 mm. Image tirée de (Wood et al. 2021).

**Agréats de type J et H

Lorsque la concentration en fluorophore est grande, des agrégats peuvent se former. La molécule individuelle non agrégée est appelée monomère. La formation d'agrégats peut modifier les niveaux d'énergie des molécules et ainsi changer leurs propriétés spectroscopiques. La théorie de l'exciton définit deux modèles limites d'agrégats. Les agrégats de type H, qui s'empilent de manière parallèle comme des sandwichs, et les agrégats J, qui ont un empilement linéaire (tête-à-queue ou tête-tête).

Les agrégats J possèdent une fluorescence et une absorption décalées vers le rouge par rapport au monomère. Les agrégats H ne sont pas fluorescents et leur absorption est décalée vers le bleu.



Les forts taux d'encapsulation et le décalage vers le rouge de ces liposomes les rendent attractifs, mais la faible stabilité et la difficulté de la synthèse sont de sérieuses limitations à leur utilisation pour l'imagerie PA. Pour pallier ces problèmes de stabilité et de perte d'agent de contraste, certaines équipes ont proposé d'attacher de manière covalente les molécules aux phospholipides des liposomes. Lovell et son équipe ont par exemple fixé de manière covalente des porphyrines sur des phospholipides et les ont formulés en liposomes appelés : porphysomes (figure 1.37). Le fort taux d'encapsulation de porphyrine dans la bicouche lipidique permet la formation d'agrégats J qui décalent le maximum d'absorption dans le rouge et diminuent le rendement quantique de fluorescence. Le signal photoacoustique des porphyrines est alors amélioré (Weber, Beard, et Bohndiek 2016; Lovell et al. 2011). Les porphysomes ont des tailles d'une centaine de nanomètres et encapsulent jusqu'à 8×10^4 porphyrines par liposomes (95 % molaire de porphyrine-lipidiques). Les porphysomes à 100 % molaire de porphyrine-lipidiques possèdent alors de très forts coefficients d'extinction molaire : $2,9 \times 10^9 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ (figure 1.45) et ont démontré une fluorescence 1200 fois plus faible par rapport à celles à 5 % molaire. Après injection sous-cutanée des

porphysomes dans des rats, une image par tomographie photoacoustique du système lymphatique a pu être mesurée en 15 min.

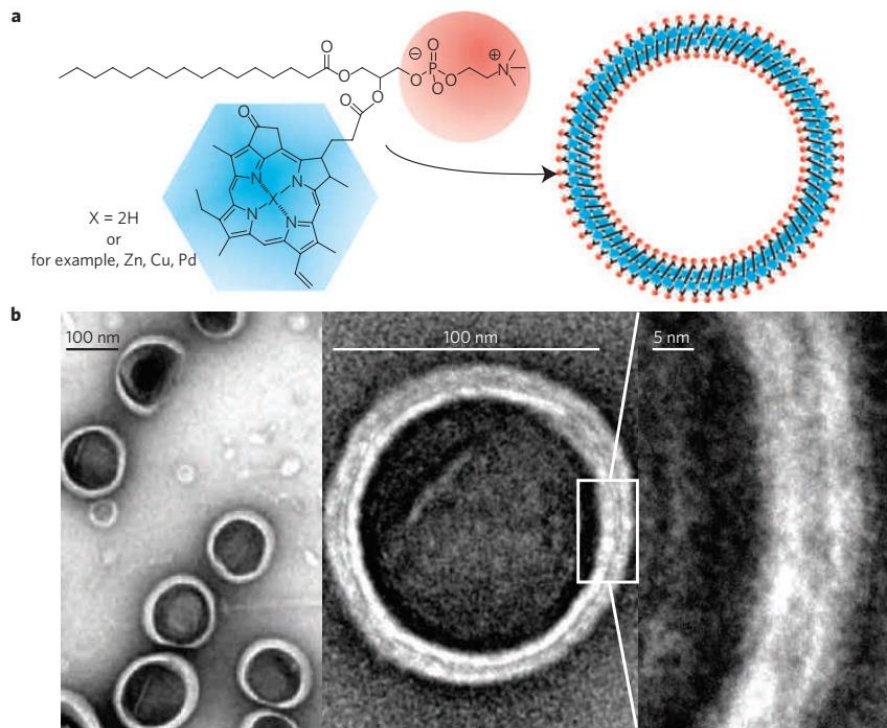


Figure 1.37 : (a) Structure du pyrophéophorbide (type porphyrine) lié de manière covalente au lipide 1-palmitoyl-2-hydroxysn-glycéro-3-phosphocholine et schéma du liposome obtenu appelé porphysome. (b) Images de microscopie électronique de porphysomes avec une coloration négative (95% molaires de lipides PEGylés, 5% molaires de lipides avec la porphyrine).

Cependant les porphyrines constituant les porphysomes sont réputées pour être de bons photosensibilisateurs. Cette toxicité peut être désirée, dans le cas de la thérapie photodynamique, ou non désirée, dans le cadre d'un diagnostic (Wood et al. 2021). Les formulations à base de cholestérol présentent également certains désavantages. Les cholestérols commercialement disponibles proviennent des œufs ou de la lanoline et sont peu adaptés pour des applications pharmaceutiques sur l'Homme à cause de contaminations virales potentielles. Les cholestérols sont de plus facilement oxydables et peuvent générer des sous-produits possiblement toxiques (« Cholesterol in Liposomes »). L'encapsulation de petites molécules organiques dans des NP plus stables et interagissant moins avec les biomolécules est alors désirable. Les NP de polymères peuvent répondre à ce besoin.

1.4.2.3 Les NP de polymère

Les NP peuvent également être obtenues à partir de polymères. Il est possible d'utiliser des polymères synthétiques approuvés par la FDA, comme l'acide PolyLactique (PLA) ou l'acide polylactique-co-glycolique (PLGA) ou des polymères naturels comme le chitosane ou le collagène. Les avantages des NP de polymères sont nombreux, ils sont biocompatibles et biodégradables, ils sont facilement fonctionnalisables en surface, ils sont stables dans les fluides biologiques et permettent d'augmenter l'index thérapeutique des principes actifs encapsulés. De plus, il est possible de contrôler la libération des principes actifs beaucoup plus facilement qu'avec les liposomes. L'utilisation d'un stimulus (température, pH, illumination, ...) peut permettre une libération contrôlée au site et au moment désiré (Zielińska et al. 2020). Les NP obtenues sont alors de taille entre 20 et 200 nm. Deux voies d'encapsulation sont alors possibles : 1) par interactions faibles (Van Der Waals, liaisons hydrogène) et auto-assemblage entre le principe actif et le polymère ou 2) par liaison covalente entre la molécule et le polymère puis formulation. L'encapsulation par liaison covalente correspond à la formation de « prodrogue polymère » : le principe actif et le polymère sont liés chimiquement, ce qui permet d'augmenter grandement les taux d'encapsulation (jusqu'à plus de 30 % en masse avec des chaînes courtes) et de limiter les phénomènes de libération très rapide juste après injection (« Burst Release » en anglais). Trois voies de synthèse sont possibles pour les prodrogues polymères (figure 1.38) : 1) greffer la molécule sur un polymère déjà synthétisé, 2) greffer le principe actif sur le monomère puis polymériser, ou bien 3) le principe actif amorce lui-même la polymérisation (Nicolas et Couvreur 2017).

Il est courant d'utiliser des copolymères diblocs afin d'avoir des macromolécules avec une partie hydrophobe et une partie hydrophile pour permettre d'obtenir des NP furtives avec un temps de circulation sanguine prolongée.

En 2019 l'équipe de Dong Wang a encapsulé, par auto-assemblage, une molécule active en photoacoustique appelée TFM avec un copolymère dibloc de polylactide-polyéthylène glycol (Figure 1.39). Les NP obtenues sont sphériques, de diamètre 72 nm et restent stables pendant 50 h dans de l'albumine de sérum bovin. Le colorant possède une structure de type D- π -A- π -D (paragraphe 1.3.4.3), des rotors moléculaires (triphénylamine), un fort coefficient d'extinction molaire à 665 nm $2,8 \times 10^4 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, une bonne photostabilité et une très faible fluorescence. Les NP ont démontré une toxicité négligeable sur des cellules cancéreuses EMT-6 sans irradiation, mais génèrent des espèces réactives de l'oxygène et une forte toxicité après irradiation (photothérapie dynamique). Les NP ont ensuite été injectées par voie intraveineuse dans un modèle murin de cancer. Le signal photoacoustique au site de la tumeur augmente jusqu'à 3 h après injection pour atteindre un signal 10 fois plus important que le bruit de fond. Puis, entre 3 h et 12 h après injection, le signal photoacoustique

diminue dans la tumeur, indiquant une bonne élimination et la dégradation des NP (D. Wang et al. 2019).

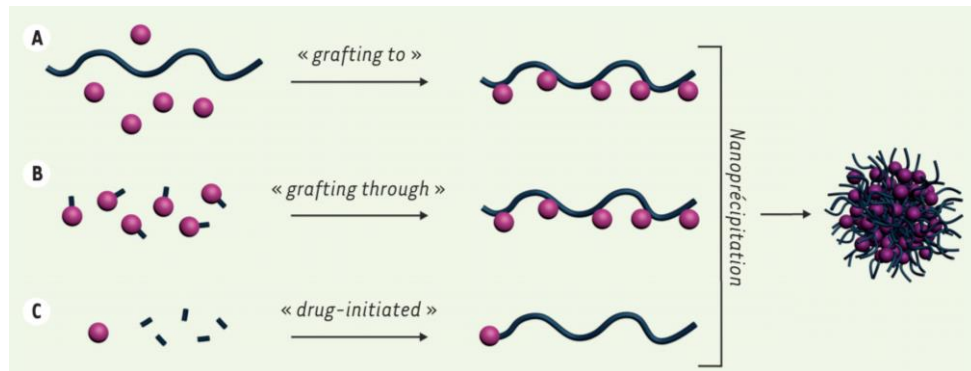


Figure 1.38 : Représentation schématique des différentes voies de synthèse des prodrogues polymères. (A) « Grafting to » : greffage du principe actif sur un polymère déjà synthétisé. (B) « Grafting Through » : greffage du principe actif sur le monomère puis polymérisation. (C) « Drug-Initiated » : le principe actif est l’amorceur de la polymérisation. Image tiré de (Nicolas et Couvreur 2017).

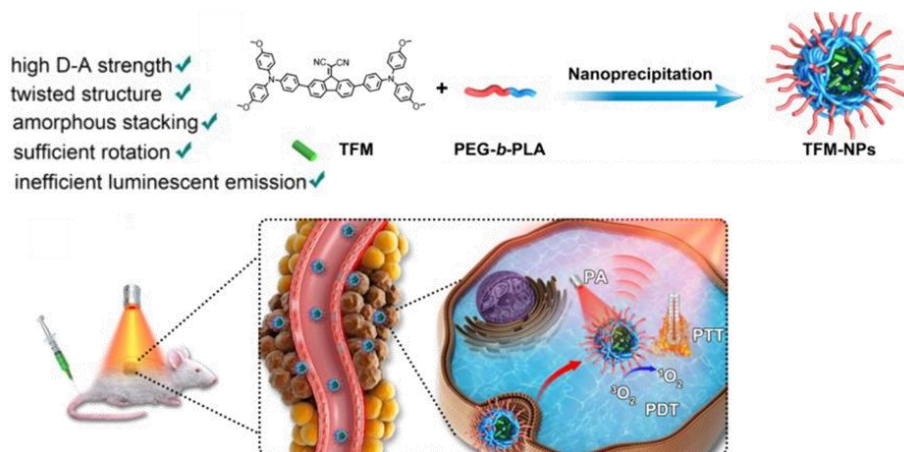


Figure 1.39 : Structure de la molécule TFM utilisée par l’équipe de Dong Wang et représentation schématique de la formulation par nanoprécipitation du polymère et de la molécule. Image tirée de (D. Wang et al. 2019).

L’équipe de Shuo Huang a également encapsulé par auto-assemblage une molécule active en photoacoustique avec un copolymère dibloc : polycaprolactone-polyéthylène glycol. Les NP font 68 nm de diamètre et possèdent un très bon rendement d’encapsulation : 93 %. Les NP sont stables dans du tampon phosphate à 37°C pendant une semaine sans perte observée du colorant. Dans des fantômes de tests, un signal photoacoustique 10 fois plus grand a été mesuré pour les NP comparé au signal provenant d’un échantillon de sang animal (Huang et al. 2016).

A ce jour, je n'ai pas trouvé d'article relevant des NP formulées à partir de polymère greffé de manière covalente avec l'agent de contraste pour faire de l'imagerie photoacoustique.

L'encapsulation de l'agent de contraste dans une matrice polymère est une stratégie très intéressante pour avoir des NP biocompatibles, biodégradables et employables cliniquement. Mais pour optimiser le signal photoacoustique, de fort taux d'encapsulation sont préférables. Il se pose alors la question de la stabilité de ces NP très fortement chargées. Une manière de résoudre ce problème est d'envisager que l'agent de contraste actif en photoacoustique soit la matrice polymère elle-même. C'est la stratégie adoptée par le développement des polymères semi-conducteurs (PS), dont l'expertise et le développement proviennent des matériaux pour le photovoltaïque et les diodes électroluminescentes (Weber, Beard, et Bohndiek 2016; Pu et al. 2014).

1.4.2.4 Les NP de polymère semi-conducteur

Ce sont des polymères pour lesquels les liaisons π sont très fortement délocalisées sur l'ensemble de la chaîne polymérique. Cette très forte conjugaison permet de décaler le maximum d'absorption dans le proche infra-rouge. Ces polymères peuvent être formulés en NP pour donner des agents de contraste avec de forts coefficients d'extinction molaire et une bonne biocompatibilité et biodégradabilité. De plus, les polymères utilisés sont facilement modulables et fonctionnalisables.

En 2014 Pu et son équipe ont synthétisé des NP de polymères semi-conducteurs à base de poly(cyclopentadithiophène-alt-benzothiadiazole) SP1 ou de poly(acénaphthothiényropyrazine-alt-benzodithiophène) SP2 (figure 1.40). SP1 et SP2 possèdent de très faibles efficacités de fluorescence, avec un rendement quantique de 0,1 % pour SP1, prometteur pour de fort signaux photoacoustiques. Les SP (Semiconducting Polymer) ont été formulés en NP par nanopréciipitation avec un phospholipide. Les NP font 43 nm de diamètre avec une bonne polydispersité (0,2) et sont stables dans du tampon phosphate pendant 6 jours. Les NP absorbent dans le proche IR : 660 nm pour SPN1 et 700 nm pour SPN2. SPN1 possède un fort coefficient d'extinction massique de $93 \text{ L.g}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. A masse égale, le signal photoacoustique des SPN1 est 7 fois plus important que celui de nanobâtonnets d'or et de nanotubes de carbone simple-feuillet (figure 1.43) (Pu et al. 2014).

Certaines équipes ont eu l'idée d'exploiter les avantages donnés par les molécules à transfert de charge (faible fluorescence, fort signal photoacoustique, forte absorption dans le proche IR) pour les transposer aux polymères semi-conducteurs. Les polymères obtenus possèdent alors une conjugaison et des transferts de charge tout le long de la chaîne polymère. C'est la stratégie adoptée par Bing Guo et son équipe. Ils ont synthétisé des polymères avec différentes forces de groupements donneur-accepteur (figure 1.41). Les polymères ont ensuite été formulés en NP par

nanoprécipitation avec du DSPE-PEG. Les NP de polymère semi-conducteur avec le plus grand transfert de charge intramoléculaire (CP3) sont celles possédant le plus fort signal photoacoustique (dans des fantômes de test), le plus grand coefficient d'extinction molaire (808 nm, 57,7 L.g⁻¹.cm⁻¹) et le plus faible signal de fluorescence. Pour CP3 l'accepteur est de type dicétopyrrolopyrrole et les donneurs sont des cycles thiophène et les 4H-dithiéo[3,2-b:2',3'-d]pyrrole (figure 1.41 CP3). Le signal photoacoustique de ces NP est environ 6,7 fois plus grand que celui de l'ICG à 0,125 mg.mL⁻¹ (Guo et al. 2017).

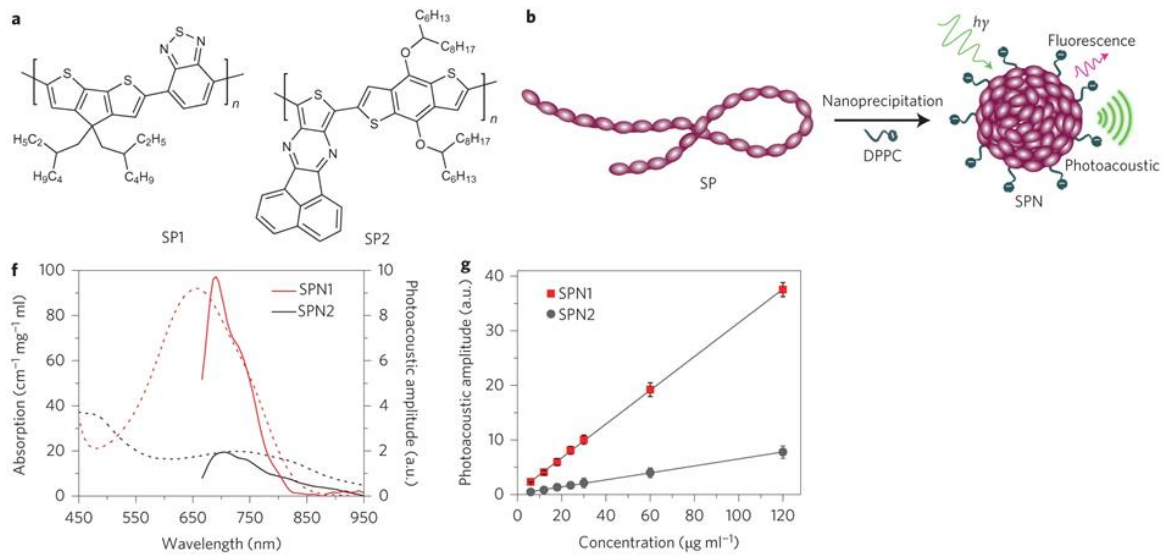


Figure 1.40 : (a) Structure des polymères semi-conducteurs SP1 et SP2. (b) Représentation schématique de la formulation en nanoparticules. DPPC est le lipide 1,2-dipalmitoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine. (f) spectres d'absorption des NP (pointillé) et spectres photoacoustiques des NP (continu). (g) Signal photoacoustique à 700nm des NP en fonction de la concentration mesuré dans des fantômes de test. R² = 0,998 et 0,997 pour SPN1 et pour SPN2. Image tirée de (Pu et al. 2014)

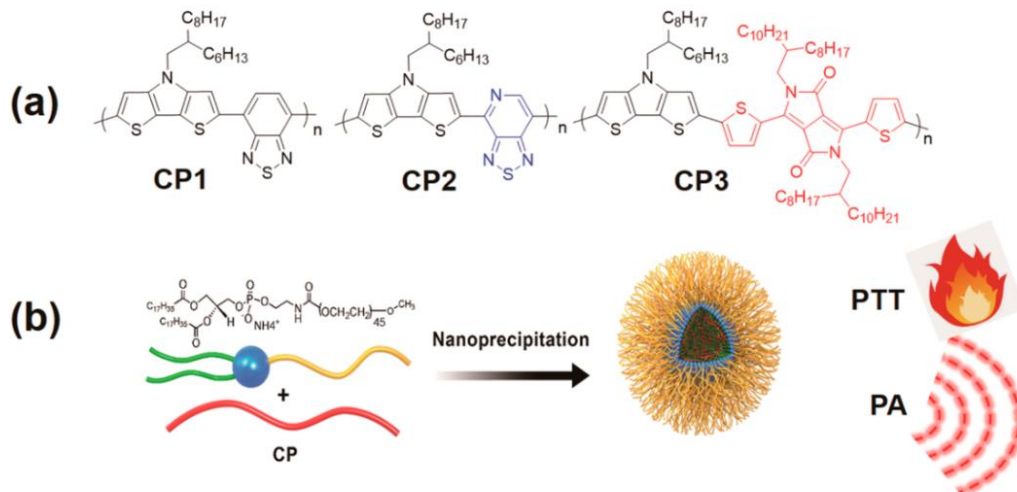


Figure 1.41 : (a) Structure des différents polymères semi-conducteurs à transfert de charge employés par l'équipe de Bing Guo. (b) Représentation schématique de la formulation en NP à l'aide du phospholipide DSPE-PEG. Image tirée de (Guo et al. 2017). PTT : PhotoThermal Therapy en anglais, thérapie photothermique ; PA : signal PhotoAcoustique.

Les NP de polymères semi-conducteurs sont très prometteuses pour obtenir des agents de contraste photoacoustique avec de fort signaux photoacoustiques, et une bonne photostabilité. Cependant la toxicité *in vivo* de ces nouveaux agents de contraste est encore mal connue et nécessite d'être plus documentée (Weber, Beard, et Bohndiek 2016).

1.4.2.5 Les NP métalliques

Les NP métalliques ont une taille comprise entre 20 et 150 nm. Leurs propriétés d'absorption dépendent essentiellement du phénomène de résonance plasmonique de surface. Lorsqu'une onde électromagnétique de longueur d'onde très grande devant la taille des NP métalliques interagit avec elles, une oscillation collective en phase des électrons de la bande de conduction se produit. Pour une fréquence d'illumination correspondant à la fréquence propre des oscillations, un phénomène de résonance se produit. C'est la résonance plasmonique de surface. La fréquence de résonance, et donc le maximum d'absorption, dépend de la nature du métal, de la taille des NP et de leur forme. Seules les NP d'or, d'argent et de cuivre présentent des bandes d'absorption dans le domaine visible (Delaire et al. 2017). De plus, les métaux nobles sont préférés pour des applications biomédicales puisque l'oxydation peut provoquer une perte du phénomène de résonance plasmonique de surface (Anker et al. 2008).

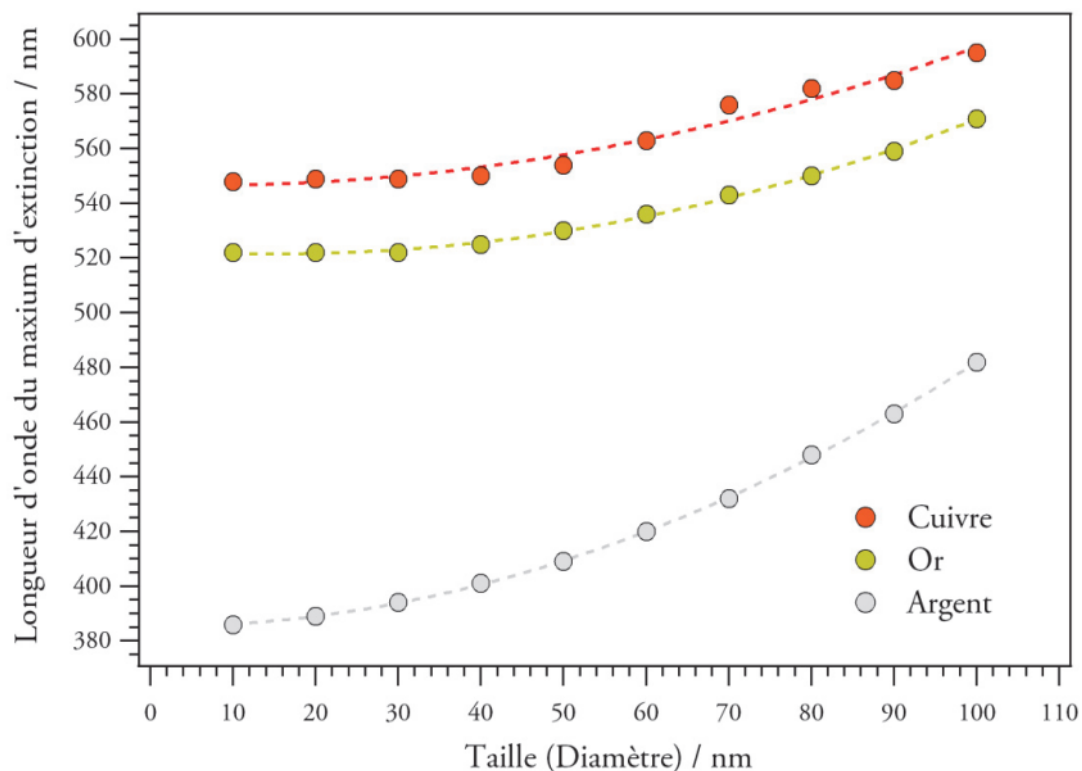


Figure 1.42 : Evolution du maximum d'absorption des NP métalliques sphériques en fonction de leur diamètre. Image tirée de (Delaire et al. 2017).

Pour les NP sphériques, il est possible de décaler le maximum d'absorption vers le rouge en augmentant le diamètre des NP. Il est cependant bien difficile d'atteindre la région du proche infra-rouge avec cette géométrie. Pour des NP d'or sphériques de 10-20 nm, le maximum d'absorption est aux alentours de 520 nm, et pour un diamètre de 80 nm, il est situé vers 550 nm (figure 1.42).

Les NP asymétriques ont l'avantage de présenter deux bandes : une bande décalée vers le rouge pour une oscillation longitudinale et une bande décalée vers le bleu pour une oscillation transversale. Il est alors plus facile d'atteindre la région du proche infra-rouge. Pour des nano-bâtonnets d'argent la position de la bande longitudinale peut varier de 550 à 850 nm en changeant la longueur du bâtonnet (100 à 200 nm) (Delaire et al. 2017). Par ailleurs, le contrôle des propriétés d'absorption avec la taille et la forme des NP est très intéressant pour faire de l'imagerie photoacoustique multispectrale.

Les NP métalliques possèdent de très grands coefficients d'extinction molaire à peu près 5 puissances de 10 au-dessus de celles des petites molécules organiques. Cependant, les métaux nobles possèdent de grandes masses molaires ($197 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ pour l'or). Dès lors certains articles préfèrent comparer les performances des NP avec leur coefficients d'absorption massique, plus représentatifs des masses à introduire

pour les expériences *in vivo/in vitro* et les problèmes de toxicité liés à la dose (Pu et al. 2014; Weber, Beard, et Bohndiek 2016). En 2014 Pu et son équipe ont étudié les performances des NP de polymères semi-conducteurs et les ont comparées à celles des nanobâtonnets d'or et des nanotubes de carbone simple-feuillet (figure 1.43). Deux situations ont été étudiées : à concentration massique fixée (en rouge) et à concentration molaire fixée (en orange). Pour une même concentration molaire l'amplitude PA des NP d'or est bien meilleure, mais pour une même concentration massique c'est celle des NP de polymères qui l'emporte (Pu et al. 2014). Dans leur revue de 2016 Weber et son équipe conseillent alors d'utiliser les deux grandeurs, coefficients d'absorption massique et molaire pour comparer les NP (Weber, Beard, et Bohndiek 2016).

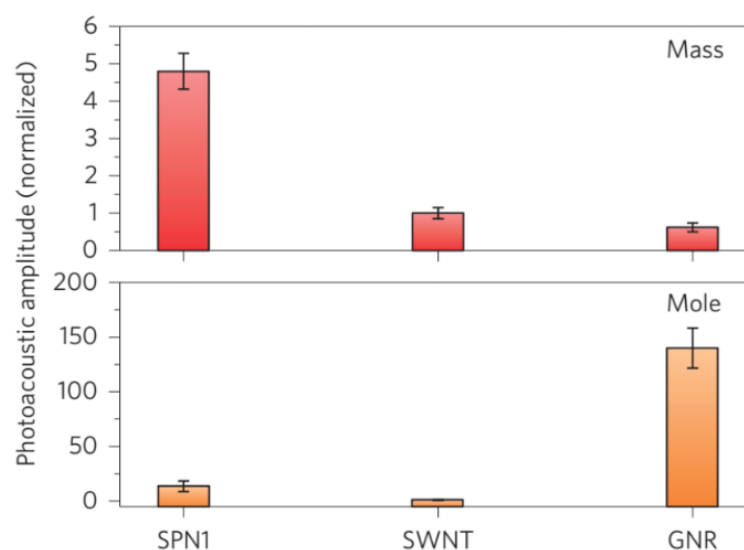


Figure 1.43 : Signal photoacoustique de trois particules dans des fantômes de test : des NP de polymères semi-conducteur (SPN1), des nano-tubes de carbone simple-feuillet (SWNT) et des nanobâtonnets d'or (GNR). En rouge les concentrations massiques des trois NP sont identiques (25 µg.L⁻¹) et en orange ce sont les concentrations molaires qui sont fixées (48 nmol .L⁻¹). Image tirée de (Pu et al. 2014).

Parmi les NP métalliques, les nanoparticules d'or sont particulièrement intéressantes puisqu'elles peuvent être facilement fonctionnalisées en surface par des liaisons thiol avec l'or. Il est alors possible d'obtenir des NP permettant un ciblage actif ou passif des cellules malades. De plus, les NP d'or possèdent les coefficients d'extinction molaire les plus grands dans la région du proche infra-rouge et ont par ailleurs de très bonnes efficacités de génération d'ondes acoustiques (Weber, Beard, et Bohndiek 2016). Parmi les différentes géométries possibles, les nanobâtonnets d'or sont très utilisés pour l'imagerie photoacoustique. Ils présentent des coefficients d'extinction molaire importants et leur efficacité de conversion photoacoustique peut

être grandement augmentée en les encapsulant dans des coquilles de silice. En effet, il existe une forte résistance thermique à l'interface or-solvant qui peut réduire le PGE. Yun-Sheng Chen et son équipe ont démontré que les nanobâtonnets enrobés de silice possédaient un signal photoacoustique trois fois plus important que celles sans silice (Y.-S. Chen et al. 2011). La coquille de silice permet de plus d'augmenter la photostabilité des nanobâtonnets d'or (Y.-S. Chen et al. 2010).

Les NP métalliques, malgré leur propriétés photophysiques très intéressantes, présentent le désavantage de ne pas pouvoir encapsuler de médicaments. Cependant le développement de NP poreuses d'or, comme les nanocages, les nanocoquilles, et les NP enrobées de polymères ou de silice, a permis de répondre à cette problématique. Figure 1.44 sont représentées des images de microscopie électronique à transmission de différentes structures de NP d'or.

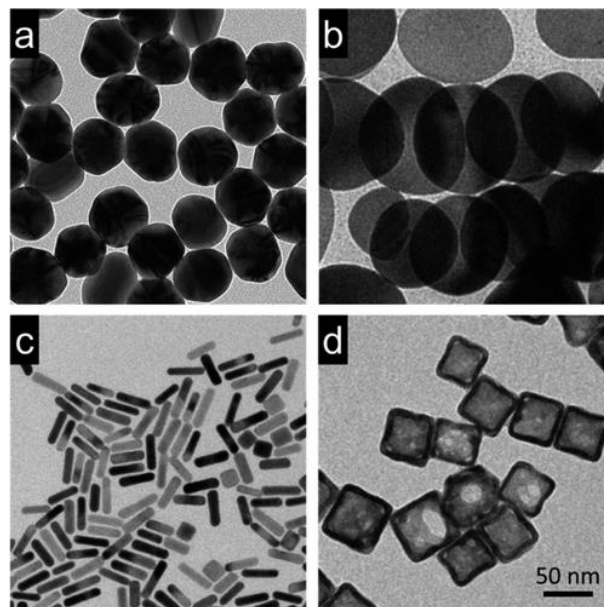


Figure 1.44 : Images de microscopie électronique à transmission de quatre géométries de NP d'or. (a) Les nanosphères (b) Les nanodisques (c) Les nanobâtonnets et (d) les nanocages. Images tirées de (Black et al. 2014).

Les NP d'or de types « nanocoquilles » (nanoshells en anglais) sont également très utilisées en imagerie photoacoustique. Elles possèdent un cœur constitué de silice poreuse, qui peut permettre d'encapsuler des médicaments, et une coquille métallique d'or en surface. Elles possèdent des coefficients d'extinction molaire similaires voire supérieurs aux NP d'or (D. Wu et al. 2014) et il est possible de moduler la position du maximum d'absorption en jouant sur le diamètre total et sur le rapport des diamètres entre le cœur et la coquille. Par exemple, des nanocoquilles d'or de 120 nm de rayon et de 20 nm d'épaisseur de coquille absorbent à 756 nm et 1120 nm (Jain et al. 2006). Cependant les nanocoquilles possèdent un signal de diffusion plus grand que le signal

d'absorption ce qui limite la profondeur de pénétration et le nombre d'absorbeurs excités (Cole et al. 2009; Nehl et al. 2004).

Les nanocages d'or sont particulièrement intéressantes pour encapsuler des médicaments. Ce sont des structures cubiques creuses et poreuses obtenues par remplacement des atomes d'argent par de l'or à l'aide d'un précurseur en solution (HAuCl_4). Yavuz et son équipe ont alors proposé de recouvrir la surface des nanocages avec un polymère thermosensible. Le médicament encapsulé peut alors être délivré grâce à un LASER infra-rouge. Ils ont alors démontré que des nanocages, encapsulant de la doxorubicine, irradiées pendant 2 min avec un LASER infrarouge conduisait à une mort cellulaire 40% plus importante que sans NP avec 2 min d'irradiation (Yavuz et al. 2009). Les nanocages possèdent par ailleurs de très bons coefficients d'extinction molaire et sont actives en photoacoustique. L'équipe de Kim, a par exemple, étudié des nanocages d'or fonctionnalisées en surface avec une hormone mélanotrope pour un ciblage actif des mélanomes. Les vaisseaux sanguins ont alors été imagés à 570 nm et les NP à 778 nm. Un signal photoacoustique trois fois plus important a été détecté pour les nanocages avec un ciblage actif par rapport à celles fonctionnalisées avec un PEG (C. Kim, Cho, et al. 2010).

Les NP métalliques présentent cependant certains inconvénients, elles sont moins facilement utilisables en tant que nanovecteurs de médicaments, elles sont peu biodégradables, s'accumulent dans la rate et le foie avec des temps d'élimination assez longs et peuvent être toxiques (Lemaster et Jokerst 2017). Les nanobâtonnets d'or peuvent présenter des problèmes de photostabilité à cause d'un changement de taille et de géométrie sous irradiation pulsée (Link et al. 2000; Y. Liu et al. 2019). Enfin les synthèses utilisent souvent le tensioactif toxique bromure de cetyltriméthylammonium comme stabilisant (Y. Liu et al. 2019).

Agent de contraste	Avantages	Inconvénients
Endogènes	Non toxiques Pas de modification des conditions physiologiques	Nombre limité de processus biologiques visibles
Chromophores modifiés génétiquement	Observation de processus biologiques	Non réalisable sur l'homme
Petites molécules	Commerciales Approuvées cliniquement Forte absorption molaire	Solubilité dans l'eau Rapide élimination Signaux photoacoustiques faibles
NP métalliques	Très forte absorption Très fort signal photoacoustique	Encapsulation de médicament difficile Toxicité Photostabilité
NP lipidiques	Biocompatible/Biodégradable Fonctionnalisable Nanovecteurs	Stabilité Faible taux d'encapsulation
NP polymère	Biocompatible/Biodégradable Fonctionnalisable Nanovecteurs	Montée en échelle Données toxicologiques insuffisantes sur certains polymères Difficulté à encapsuler molécules hydrophiles
NP de polymère semi-conducteurs	Fonctionnalisable Nanovecteurs Forte absorption Fort signal photoacoustique	Toxicité <i>in vivo</i> mal connue

Tableau 1.3 : Tableau récapitulatif des agents de contrastes utilisés en imagerie photoacoustique et de leurs caractéristiques.

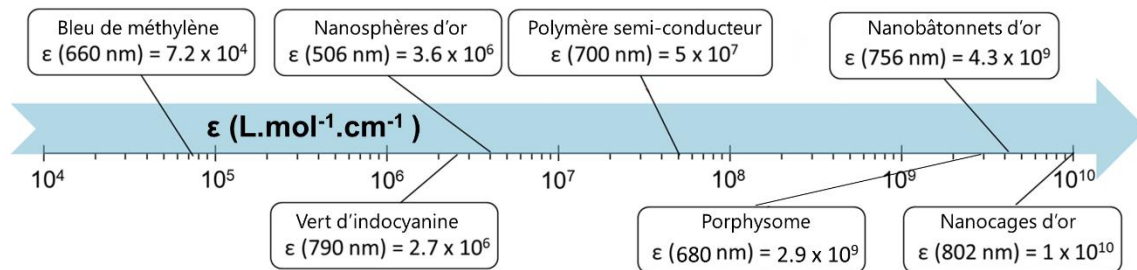


Figure 1.45 : Echelle des coefficients d'extinction molaire d'agents de contraste utilisés pour l'imagerie photoacoustique. Les valeurs indiquées sont tirées des articles suivants : bleu de méthylène (Ashkenazi 2010), vert d'indocyanine (Weber, Beard, et Bohndiek 2016), nanosphère d'or (X. Liu et al. 2007), polymère semi-conducteur (Pu et al. 2014), porphysome (Lovell et al. 2011), nanobâtonnets d'or (Jokerst et al. 2012), nanocages d'or (Srivatsan et al. 2014). Image inspirée de (Weber, Beard, et Bohndiek 2016).

Les petites molécules organiques, comme les Bodipy et les cyanines, sont des plateformes très intéressantes pour moduler les propriétés photophysiques (absorption, émission) et en faire de bons agents de contraste photoacoustique. L'utilisation de prodrugs polymères biocompatibles et biodégradables pour encapsuler ces chromophores organiques reste cependant une voie non explorée dans le cadre de l'imagerie photoacoustique. C'est la stratégie que nous allons utiliser dans le cadre de cette thèse.

1.5 OBJECTIFS DE LA THESE

L'objectif de ce travail est de synthétiser des nanoparticules de polymère et d'optimiser leurs caractéristiques physico-chimiques et photophysiques afin de cartographier leur accumulation *in vivo* dans les tissus. Les NP exploitées devront être transposables cliniquement et conserver une bonne biocompatibilité. Pour pouvoir finement observer l'accumulation des NP dans les tissus, nous allons exploiter l'imagerie photoacoustique qui possède une forte résolution spatiale et qui est peu coûteuse et non invasive. Notre premier objectif consiste à synthétiser un nouveau colorant de la famille des Bodipy. Nous avons adapté sa structure afin d'en faire un Bodipy à transfert de charge susceptible de décaler le maximum d'absorption dans le proche infrarouge et de diminuer le rendement quantique de fluorescence. Ce Bodipy sera par la suite encapsulé dans des NP de polymères biocompatibles et biodégradables à base de polylactide. Afin d'éviter les problèmes de libération rapide et de faible taux de chargement, nous avons envisagé de greffer le Bodipy de manière covalente au polymère. L'ensemble des paramètres physico-chimiques des NP devront être caractérisés (taille, géométrie, stabilité, toxicité) mais aussi les paramètres photophysiques (absorption, émission, photostabilité). Enfin le signal photoacoustique de ces NP pourra être observé *in vivo*.

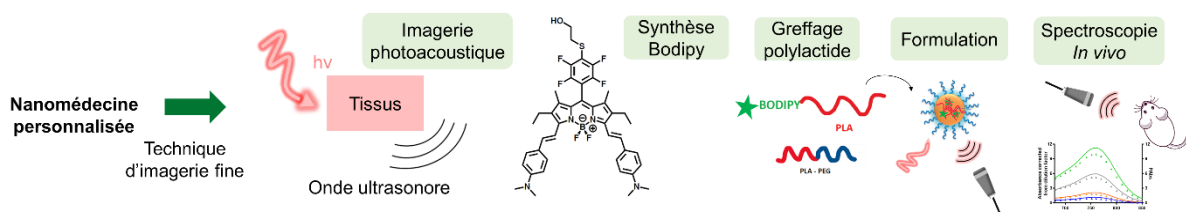


Figure 1.46 : Représentation schématique du premier objectif de la thèse : cartographier l'accumulation fine des NP dans les tissus par imagerie photoacoustique.

Notre second objectif est de mieux comprendre et exploiter la relation entre les caractéristiques photophysiques des NP et le signal photoacoustique généré. Pour cela, nous allons utiliser le spectromètre photoacoustique calibré de l'équipe de Jérôme Gâteau au Laboratoire d'Imagerie Biomédicale (LIB). Les NP seront étudiées avec différents taux de chargement de Bodipy : nous allons essayer de comprendre l'effet de l'agrégation sur l'efficacité de génération de l'onde acoustique et le lien avec la perte de fluorescence des NP. Des études photophysiques poussées (temps de vie, rendement quantique de fluorescence, anisotropie de fluorescence, absorption transitoire) seront nécessaires pour comprendre la dynamique de relaxation des NP dans leurs états excités. L'objectif est de trouver les conditions optimales en termes de taux de chargement, de longueur d'onde d'excitation et de puissance laser pour générer le plus grand signal photoacoustique.

Le dernier objectif de cette thèse s'intéresse au devenir des NP après leur accumulation dans les tissus. L'objectif est de pouvoir suivre la cinétique d'internalisation des NP dans les cellules *in vivo*. L'internalisation dans les endosomes puis dans les lysosomes s'accompagne d'une diminution du pH de 7,4 à 4. Nous souhaitons développer des NP sensibles au pH à l'aide d'une fonctionnalisation en surface avec un Aza-Bodipy. L'objectif est alors de synthétiser un Aza-Bodipy sensible au pH, de le greffer de manière covalente en surface des NP et d'observer le signal photoacoustique et le signal de fluorescence de ces NP sur des fantômes de test.

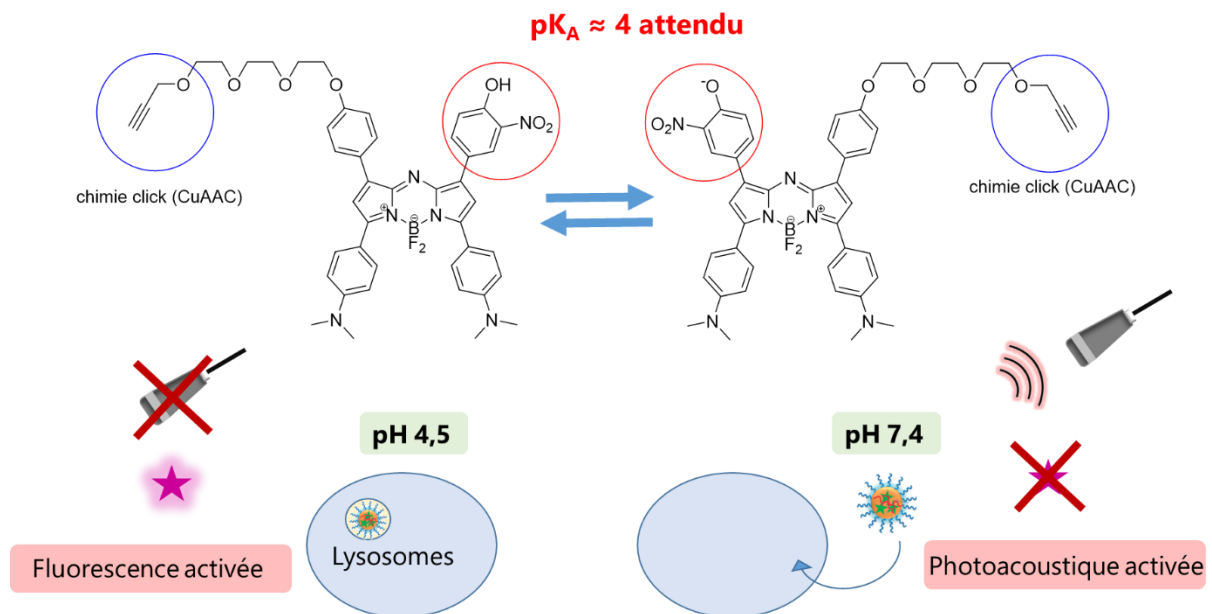


Figure 1.47 : Représentation schématique du troisième objectif de la thèse. Obtenir des NP sensibles au pH grâce à un Aza-Bodipy greffé en surface par chimie click.

1.6 REFERENCES

- Andreiuk, Bohdan, Andreas Reisch, Eduard Bernhardt, et Andrey Klymchenko. 2019. « Fighting Aggregation-Caused Quenching and Leakage of Dyes in Fluorescent Polymer Nanoparticles: Universal Role of Counterion ». *Chemistry - An Asian Journal* 14 (janvier). <https://doi.org/10.1002/asia.201801592>.
- Anker, Jeffrey N., W. Paige Hall, Olga Lyandres, Nilam C. Shah, Jing Zhao, et Richard P. Van Duyne. 2008. « Biosensing with Plasmonic Nanosensors ». *Nature Materials* 7 (6): 442-53. <https://doi.org/10.1038/nmat2162>.
- Anselmo, Aaron C., et Samir Mitragotri. 2019. « Nanoparticles in the clinic: An update ». *Bioengineering & Translational Medicine* 4 (3): e10143. <https://doi.org/10.1002/btm2.10143>.

- Ashkenazi, Shai. 2010. « Photoacoustic Lifetime Imaging of Dissolved Oxygen Using Methylene Blue ». *Journal of Biomedical Optics* 15 (4): 040501. <https://doi.org/10.1117/1.3465548>.
- Bangham, A. D., et R. W. Horne. 1964. « Negative Staining of Phospholipids and Their Structural Modification by Surface-Active Agents as Observed in the Electron Microscope ». *Journal of Molecular Biology* 8 (5): 660-IN10. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(64\)80115-7](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(64)80115-7).
- Bell, Alexander Graham. 1880. « On the Production and Reproduction of Sound by Light ». *American Journal of Science* s3-20 (118): 305-24. <https://doi.org/10.2475/ajs.s3-20.118.305>.
- Berrou, A., M. Raybaut, A. Godard, et M. Lefebvre. 2009. « High-Resolution Photoacoustic and Direct Absorption Spectroscopy of Main Greenhouse Gases by Use of a Pulsed Entangled Cavity Doubly Resonant OPO ». *Applied Physics B* 98 (1): 217. <https://doi.org/10.1007/s00340-009-3710-x>.
- Beziere, Nicolas, Neus Lozano, Antonio Nunes, Juan Salichs, Daniel Queiros, Kostas Kostarelos, et Vasilis Ntziachristos. 2015. « Dynamic Imaging of PEGylated Indocyanine Green (ICG) Liposomes within the Tumor Microenvironment Using Multi-Spectral Photoacoustic Tomography (MSOT) ». *Biomaterials* 37 (janvier): 415-24. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.10.014>.
- Birrenbach, G., et P. P. Speiser. 1976. « Polymerized Micelles and Their Use as Adjuvants in Immunology ». *Journal of Pharmaceutical Sciences* 65 (12): 1763-66. <https://doi.org/10.1002/jps.2600651217>.
- Black, Kvar C. L., Yucai Wang, Hannah P. Luehmann, Xin Cai, Wenxin Xing, Bo Pang, Yongfeng Zhao, et al. 2014. « Radioactive ¹⁹⁸Au-Doped Nanostructures with Different Shapes for In Vivo Analyses of Their Biodistribution, Tumor Uptake, and Intratumoral Distribution ». *ACS Nano* 8 (5): 4385-94. <https://doi.org/10.1021/nn406258m>.
- Boissenot, Tanguy, Alexandre Bordat, Elias Fattal, et Nicolas Tsapis. 2016. « Ultrasound-triggered drug delivery for cancer treatment using drug delivery systems: From theoretical considerations to practical applications ». *Journal of Controlled Release* 241 (novembre): 144-63. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.09.026>.
- Borg, Raymond E., et Jonathan Rochford. 2018a. « Molecular Photoacoustic Contrast Agents: Design Principles & Applications ». *Photochemistry and Photobiology* 94 (6): 1175-1209. <https://doi.org/10.1111/php.12967>.
- Braslavsky, S. E. 2007. « Glossary of terms used in photochemistry, 3rd edition (IUPAC Recommendations 2006) ». *Pure and Applied Chemistry* 79 (3): 293-465. <https://doi.org/10.1351/pac200779030293>.
- Briuglia, Maria-Lucia, Chiara Rotella, Amber McFarlane, et Dimitrios A. Lamprou. 2015. « Influence of Cholesterol on Liposome Stability and on in Vitro Drug Release ». *Drug Delivery and Translational Research* 5 (3): 231-42. <https://doi.org/10.1007/s13346-015-0220-8>.

- Cai, Xiaolei, Jie Liu, Weng Heng Liew, Yukun Duan, Junlong Geng, Nitish Thakor, Kui Yao, Lun-De Liao, et Bin Liu. 2017. « Organic Molecules with Propeller Structures for Efficient Photoacoustic Imaging and Photothermal Ablation of Cancer Cells ». *Materials Chemistry Frontiers* 1 (8): 1556-62. <https://doi.org/10.1039/C7QM00056A>.
- Cao, Yingchun, Ayeeshik Kole, Jie Hui, Yi Zhang, Jieying Mai, Mouhamad Alloosh, Michael Sturek, et Ji-Xin Cheng. 2018. « Fast Assessment of Lipid Content in Arteries in Vivo by Intravascular Photoacoustic Tomography ». *Scientific Reports* 8 (1): 2400. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20881-5>.
- Chemistry (IUPAC), The International Union of Pure and Applied. s. d. « IUPAC - biodegradable polymer (BT07169) ». Consulté le 23 février 2022. <https://doi.org/10.1351/goldbook.BT07169>.
- Chen, Xiuying, Xiaojun Peng, Aijun Cui, Bingshuai Wang, Li Wang, et Rong Zhang. 2006. « Photostabilities of Novel Heptamethine 3H-Indolenine Cyanine Dyes with Different N-Substituents ». *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 181 (1): 79-85. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2005.11.004>.
- Chen, Yun-Sheng, Wolfgang Frey, Seungsoo Kim, Kimberly Homan, Pieter Kruizinga, Konstantin Sokolov, et Stanislav Emelianov. 2010. « Enhanced Thermal Stability of Silica-Coated Gold Nanorods for Photoacoustic Imaging and Image-Guided Therapy ». *Optics Express* 18 (9): 8867-78. <https://doi.org/10.1364/OE.18.008867>.
- Chen, Yun-Sheng, Wolfgang Frey, Seungsoo Kim, Pieter Kruizinga, Kimberly Homan, et Stanislav Emelianov. 2011. « Silica-Coated Gold Nanorods as Photoacoustic Signal Nanoamplifiers ». *Nano Letters* 11 (2): 348-54. <https://doi.org/10.1021/nl1042006>.
- Cheng, Kai, Sri-Rajasekhar Kothapalli, Hongguang Liu, Ai Leen Koh, Jesse V. Jokerst, Han Jiang, Meng Yang, et al. 2014. « Construction and Validation of Nano Gold Tripods for Molecular Imaging of Living Subjects ». *Journal of the American Chemical Society* 136 (9): 3560-71. <https://doi.org/10.1021/ja412001e>.
- « Cholesterol in Liposomes ». s. d. Avanti Polar Lipids. Consulté le 24 mars 2022. <https://avantilipids.com/news/cholesterol-in-liposomes>.
- Cole, Joseph R., Nikolay A. Mirin, Mark W. Knight, Glenn P. Goodrich, et Naomi J. Halas. 2009. « Photothermal Efficiencies of Nanoshells and Nanorods for Clinical Therapeutic Applications ». *The Journal of Physical Chemistry C* 113 (28): 12090-94. <https://doi.org/10.1021/jp9003592>.
- Colliez, Florence, Bernard Gallez, et Bénédicte F. Jordan. 2017. « Assessing Tumor Oxygenation for Predicting Outcome in Radiation Oncology: A Review of Studies Correlating Tumor Hypoxic Status and Outcome in the Preclinical and Clinical Settings ». *Frontiers in Oncology* 7. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2017.00010>.
- Couvreur, Patrick. 2021. « Chapitre 4: Nanomédicaments pour le traitement du cancer et des maladies du système nerveux ». In *Chapitre 4: Nanomédicaments pour le*

- traitement du cancer et des maladies du système nerveux*, 67-92. EDP Sciences.
<https://doi.org/10.1051/978-2-7598-2316-1-007>.
- « Cyanine dyes ». s. d. Consulté le 25 février 2022.
<https://www.lumiprobe.com/tech/cyanine-dyes>.
- De Gasperi, Andrea, Ernestina Mazza, et Manlio Prosperi. 2016. « Indocyanine Green Kinetics to Assess Liver Function: Ready for a Clinical Dynamic Assessment in Major Liver Surgery? » *World Journal of Hepatology* 8 (7): 355-67.
<https://doi.org/10.4254/wjh.v8.i7.355>.
- Deán-Ben, X. Luís, Thomas F. Fehm, Steven J. Ford, Sven Gottschalk, et Daniel Razansky. 2017. « Spiral Volumetric Optoacoustic Tomography Visualizes Multi-Scale Dynamics in Mice ». *Light: Science & Applications* 6 (4): e16247-e16247.
<https://doi.org/10.1038/lsa.2016.247>.
- « Definition of Indocyanine Green Solution - NCI Drug Dictionary - National Cancer Institute ». 2011. NciAppModulePage. Nciglobal,ncicenterprise. 2 février 2011.
<https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-drug/def/indocyanine-green-solution>.
- Delaire, Jacques, Jonathan Piard, Rachel Méallet-Renault, et Gilles Clavier. 2017. *Photophysique et photochimie: Des fondements aux applications*. EDP Sciences.
- Diez-Cabanes, Valentin, Antonio Monari, et Mariachiara Pastore. 2021. « Competition between the Photothermal Effect and Emission in Potential Phototherapy Agents ». *The Journal of Physical Chemistry B* 125 (31): 8733-41.
<https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.1c03977>.
- « Drugs@FDA: FDA-Approved Drugs ». s. d. Consulté le 24 février 2022.
<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm?event=overview.process&ApplNo=011525>.
- Duck, Francis A. 2013. *Physical Properties of Tissues: A Comprehensive Reference Book*. Academic Press.
- Elbasuney, Sherif, et Yasser H. El-Sharkawy. 2018. « Instant Identification of Explosive Material: Laser Induced Photoacoustic Spectroscopy versus Fourier Transform Infrared ». *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 108 (novembre): 269-77.
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.09.012>.
- Espinosa-Cano, Eva, María Rosa Aguilar, Blanca Vázquez, et Julio San Román. 2019. « Chapter 7 - Inflammation-Responsive Polymers ». In *Smart Polymers and Their Applications (Second Edition)*, édité par Maria Rosa Aguilar et Julio San Román, 219-54. Woodhead Publishing in Materials. Woodhead Publishing.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102416-4.00007-7>.
- Fainchtein, R., B. Stoyanov, J. Murphy, D. Wilson, et D. Hanley. 2000. « Local determination of hemoglobin concentration and degree of oxygenation in tissue by pulsed photoacoustic spectroscopy ». In *BiOS*.
<https://doi.org/10.1117/12.386335>.

- Fattal, Elias, Hervé Hillaireau, Simona Mura, Julien Nicolas, et Nicolas Tsapis. 2012. « Targeted Delivery Using Biodegradable Polymeric Nanoparticles ». In *Fundamentals and Applications of Controlled Release Drug Delivery*, édité par Juergen Siepmann, Ronald A. Siegel, et Michael J. Rathbone, 255-88. Advances in Delivery Science and Technology. Boston, MA: Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0881-9_10.
- Feng, Lan, et Russell Mumper. 2012. « A Critical Review of Lipid-based Nanoparticles for Taxane Delivery ». *Cancer letters* 334 (juillet). <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.07.006>.
- Filatov, Mikhail A., Safakath Karuthedath, Pavel M. Polestshuk, Huguette Savoie, Keith J. Flanagan, Cindy Sy, Elisabeth Sitte, et al. 2017. « Generation of Triplet Excited States via Photoinduced Electron Transfer in meso-anthra-BODIPY: Fluorogenic Response toward Singlet Oxygen in Solution and in Vitro ». *Journal of the American Chemical Society* 139 (18): 6282-85. <https://doi.org/10.1021/jacs.7b00551>.
- Fink, Mathias. 2014. « Images sonores et ultrasonores du corps humain ». 2014. <https://culturesciencesphysique.ens-lyon.fr/video-html5/pp2009/fink/images-sonores-et-ultrasonores-du-corps-humain#diapo99>.
- Fontez, Mathilde. 2021. « JWST », décembre 2021.
- Fornaguera, Cristina, et Maria José García-Celma. 2017. « Personalized Nanomedicine: A Revolution at the Nanoscale ». *Journal of Personalized Medicine* 7 (4): E12. <https://doi.org/10.3390/jpm7040012>.
- Freitas, Camila Fabiano de, Maiara Camotti Montanha, Diogo Silva Pellosi, Elza Kimura, Wilker Caetano, et Noboru Hioka. 2019. « "Biotin-Targeted Mixed Liposomes: A Smart Strategy for Selective Release of a Photosensitizer Agent in Cancer Cells" ». *Materials Science and Engineering: C* 104 (novembre): 109923. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109923>.
- Fuenzalida Werner, Juan Pablo, Yuanhui Huang, Kanuj Mishra, Robert Janowski, Paul Vetschera, Christina Heichler, Andriy Chmyrov, et al. 2020. « Challenging a Preconception: Optoacoustic Spectrum Differs from the Optical Absorption Spectrum of Proteins and Dyes for Molecular Imaging ». *Analytical Chemistry* 92 (15): 10717-24. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c01902>.
- Fuenzalida Werner, Juan Pablo, Kanuj Mishra, Yuanhui Huang, Paul Vetschera, Sarah Glasl, Andriy Chmyrov, Klaus Richter, Vasilis Ntziachristos, et Andre C. Stiel. 2019. « Structure-Based Mutagenesis of Phycobiliprotein smURFP for Optoacoustic Imaging ». *ACS Chemical Biology* 14 (9): 1896-1903. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.9b00299>.
- Funabiki, Kazumasa, Kazutaka Yagi, Masato Ueta, Mitsuru Nakajima, Masako Horiuchi, Yasuhiro Kubota, et Masaki Mastui. 2016. « Rational Molecular Design and Synthesis of Highly Thermo- and Photostable Near-Infrared-Absorbing Heptamethine Cyanine Dyes with the Use of Fluorine Atoms ». *Chemistry*

- (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany) 22 (35): 12282-85.
<https://doi.org/10.1002/chem.201602955>.
- Gabizon, Alberto A. 2001. « Pegylated Liposomal Doxorubicin: Metamorphosis of an Old Drug into a New Form of Chemotherapy ». *Cancer Investigation* 19 (4): 424-36. <https://doi.org/10.1081/CNV-100103136>.
- Gao, Heqi, Xingchen Duan, Di Jiao, Yi Zeng, Xiaoyan Zheng, Jingtian Zhang, Hanlin Ou, Ji Qi, et Dan Ding. 2021. « Boosting Photoacoustic Effect via Intramolecular Motions Amplifying Thermal-to-Acoustic Conversion Efficiency for Adaptive Image-Guided Cancer Surgery ». *Angewandte Chemie International Edition* 60 (38): 21047-55. <https://doi.org/10.1002/anie.202109048>.
- Guo, Bing, Zonghai Sheng, Dehong Hu, Anran Li, Shidang Xu, Purnima Manghnani, Chengbo Liu, Lin Guo, Hairong Zheng, et Bin Liu. 2017. « Molecular Engineering of Conjugated Polymers for Biocompatible Organic Nanoparticles with Highly Efficient Photoacoustic and Photothermal Performance in Cancer Theranostics ». *ACS Nano* 11 (septembre). <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b04685>.
- Hatamimoslehabadi, Maryam, Stephanie Bellinger, Jeffrey La, Esraa Ahmad, Mathieu Frenette, Chandra Yelleswarapu, et Jonathan Rochford. 2017. « Correlation of Photophysical Properties with the Photoacoustic Emission for a Selection of Established Chromophores ». *The Journal of Physical Chemistry C* 121 (43): 24168-78. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.7b07598>.
- Hu, Wenbo, Xiaofei Miao, Haojie Tao, Alexander Baev, Can Ren, Quli Fan, Tingchao He, Wei Huang, et Paras N. Prasad. 2019. « Manipulating Nonradiative Decay Channel by Intermolecular Charge Transfer for Exceptionally Improved Photothermal Conversion ». *ACS Nano* 13 (10): 12006-14. <https://doi.org/10.1021/acsnano.9b06208>.
- Huang, Shuo, Paul Kumar Upputuri, Hui Liu, Manojit Pramanik, et Mingfeng Wang. 2016. « A Dual-Functional Benzobisthiadiazole Derivative as an Effective Theranostic Agent for near-Infrared Photoacoustic Imaging and Photothermal Therapy ». *Journal of Materials Chemistry B* 4 (9): 1696-1703. <https://doi.org/10.1039/C5TB02367J>.
- « Indocyanine green | 3599-32-4 ». s.d. Consulté le 25 février 2022. https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB8478418.htm.
- « ISO/TS 80004-1:2010, Nanotechnologies — Vocabulary — Part 1: Core terms ». 2010.
- Jain, Prashant K., Kyeong Seok Lee, Ivan H. El-Sayed, et Mostafa A. El-Sayed. 2006. « Calculated Absorption and Scattering Properties of Gold Nanoparticles of Different Size, Shape, and Composition: Applications in Biological Imaging and Biomedicine ». *The Journal of Physical Chemistry. B* 110 (14): 7238-48. <https://doi.org/10.1021/jp057170o>.
- Jokerst, Jesse, Adam Cole, Dominique Van de Sompel, et Shweta Gambhir. 2012. « Gold Nanorods for Ovarian Cancer Detection with Photoacoustic Imaging and

- Resection Guidance via Raman Imaging in Living Mice ». *ACS nano* 6 (octobre). <https://doi.org/10.1021/nn304347g>.
- Kahraman, Emine, Sevgi Güngör, et Yıldız Özsoy. 2017. « Potential enhancement and targeting strategies of polymeric and lipid-based nanocarriers in dermal drug delivery ». *Therapeutic Delivery* 8 (11): 967-85. <https://doi.org/10.4155/tde-2017-0075>.
- Kasha, Michael. 1950. « Characterization of Electronic Transitions in Complex Molecules ». *Discussions of the Faraday Society* 9 (0): 14-19. <https://doi.org/10.1039/DF9500900014>.
- Kierlik, Edouard, et Jean-Michel Courty. 2021. « Écouter la lumière », août 2021.
- Kim, Chulhong, Eun Chul Cho, Jingyi Chen, Kwang Hyun Song, Leslie Au, Christopher Favazza, Qiang Zhang, et al. 2010. « In Vivo Molecular Photoacoustic Tomography of Melanomas Targeted by Bioconjugated Gold Nanocages ». *ACS Nano* 4 (8): 4559-64. <https://doi.org/10.1021/nn100736c>.
- Kim, Chulhong, Kwang Hyun Song, Feng Gao, et Lihong V. Wang. 2010. « Sentinel Lymph Nodes and Lymphatic Vessels: Noninvasive Dual-Modality in Vivo Mapping by Using Indocyanine Green in Rats--Volumetric Spectroscopic Photoacoustic Imaging and Planar Fluorescence Imaging ». *Radiology* 255 (2): 442-50. <https://doi.org/10.1148/radiol.10090281>.
- Kim, Gwangseong, Sheng-Wen Huang, Kathleen C. Day, Matthew O'Donnell, Rodney R. Agayan, Mark A. Day, Raoul Kopelman, et Shai Ashkenazi. 2007. « Indocyanine-green-embedded PEBBLEs as a contrast agent for photoacoustic imaging ». *Journal of Biomedical Optics* 12 (4): 044020. <https://doi.org/10.1117/1.2771530>.
- Kovar, Joy L., William Volcheck, Eva Sevick-Muraca, Melanie A. Simpson, et D. Michael Olive. 2009. « Characterization and Performance of a Near-Infrared 2-Deoxyglucose Optical Imaging Agent for Mouse Cancer Models ». *Analytical Biochemistry* 384 (2): 254-62. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2008.09.050>.
- Kurian, E., F. G. Prendergast, et J. R. Small. 1997. « Photoacoustic Analysis of Proteins: Volumetric Signals and Fluorescence Quantum Yields ». *Biophysical Journal* 73 (1): 466-76. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(97\)78085-8](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(97)78085-8).
- « La physique par les objets quotidiens ». 2016. Belin Editeur. 17 mai 2016. <https://www.belin-editeur.com/la-physique-par-les-objets-quotidiens-0>.
- Lakowicz, Joseph R. 2007. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer Science & Business Media.
- Laramie, Matt D., Mary K. Smith, Fahad Marmarchi, Lacey R. McNally, et Maged Henary. 2018. « Small Molecule Optoacoustic Contrast Agents: An Unexplored Avenue for Enhancing In Vivo Imaging ». *Molecules* 23 (11): 2766. <https://doi.org/10.3390/molecules23112766>.
- Laufer, Jan, Amit Jathoul, Martin Pule, et Paul Beard. 2013. « In Vitro Characterization of Genetically Expressed Absorbing Proteins Using Photoacoustic

- Spectroscopy ». *Biomedical Optics Express* 4 (11): 2477-90. <https://doi.org/10.1364/BOE.4.002477>.
- Laufer, Jan, Edward Zhang, et Paul Beard. 2010. « Evaluation of Absorbing Chromophores Used in Tissue Phantoms for Quantitative Photoacoustic Spectroscopy and Imaging ». *Selected Topics in Quantum Electronics, IEEE Journal of* 16 (juillet): 600-607. <https://doi.org/10.1109/JSTQE.2009.2032513>.
- Lavaud, Jonathan, Maxime Henry, Jean Luc Coll, et Veronique Josserand. 2017. « Exploration of Melanoma Metastases in Mice Brains Using Endogenous Contrast Photoacoustic Imaging ». *International Journal of Pharmaceutics, SFNano 2016 meeting*, 532 (2): 704-9. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.08.104>.
- Le Droumaguet, Benjamin, Julien Nicolas, Davide Brambilla, Simona Mura, Andrei Maksimenko, Line De Kimpe, Elisa Salvati, et al. 2012. « Versatile and Efficient Targeting Using a Single Nanoparticulate Platform: Application to Cancer and Alzheimer's Disease ». *ACS Nano* 6 (7): 5866-79. <https://doi.org/10.1021/nn3004372>.
- Lee, Soo Hong, Ok Kyu Park, Jonghoon Kim, Kwangsoo Shin, Chan Gi Pack, Kang Kim, Giho Ko, Nohyun Lee, Seung-Hae Kwon, et Taeghwan Hyeon. 2019. « Deep Tumor Penetration of Drug-Loaded Nanoparticles by Click Reaction-Assisted Immune Cell Targeting Strategy ». *Journal of the American Chemical Society*, août. <https://doi.org/10.1021/jacs.9b04621>.
- Lemaster, Jeanne E., et Jesse V. Jokerst. 2017. « What Is New in Nanoparticle-Based Photoacoustic Imaging?: What Is New in Nanoparticle-Based Photoacoustic Imaging? » *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* 9 (1): e1404. <https://doi.org/10.1002/wnan.1404>.
- Levi, Jelena, Sri-Rajashekar Kothapalli, Sarah Bohndiek, Joon-Kee Yoon, Anca Dragulescu-Andrasi, Carsten Nielsen, Aleksandra Tisma, et al. 2013. « Molecular Photoacoustic Imaging of Follicular Thyroid Carcinoma ». *Clinical Cancer Research* 19 (6): 1494-1502. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-3061>.
- Li, Changhui, et Lihong V. Wang. 2009. « Photoacoustic tomography and sensing in biomedicine ». *Physics in medicine and biology* 54 (19): R59-97. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/54/19/R01>.
- Li, Kai, et Bin Liu. 2014. « Polymer-Encapsulated Organic Nanoparticles for Fluorescence and Photoacoustic Imaging ». *Chemical Society Reviews* 43 (18): 6570-97. <https://doi.org/10.1039/C4CS00014E>.
- Li, Xiaozhen, Lu Liu, Shengliang Li, Yingpeng Wan, Jia-Xiong Chen, Shuang Tian, Zhongming Huang, et al. 2019. « Biodegradable π -Conjugated Oligomer Nanoparticles with High Photothermal Conversion Efficiency for Cancer Theranostics ». *ACS Nano* 13 (11): 12901-11. <https://doi.org/10.1021/acsnano.9b05383>.

- Link, S., C. Burda, B. Nikoobakht, et M. A. El-Sayed. 2000. « Laser-Induced Shape Changes of Colloidal Gold Nanorods Using Femtosecond and Nanosecond Laser Pulses ». *The Journal of Physical Chemistry B* 104 (26): 6152-63. <https://doi.org/10.1021/jp000679t>.
- Liu, Chao, Yizhi Liang, et Lidai Wang. 2020. « Single-Shot Photoacoustic Microscopy of Hemoglobin Concentration, Oxygen Saturation, and Blood Flow in Sub-Microseconds ». *Photoacoustics* 17 (mars): 100156. <https://doi.org/10.1016/j.pacs.2019.100156>.
- Liu, Huihui, Yibo Zhao, Jiasheng Zhou, Ping Li, Shou-Hang Bo, et Sung-Liang Chen. 2020. « Photoacoustic Imaging of Lithium Metal Batteries ». *ACS Applied Energy Materials* 3 (2): 1260-64. <https://doi.org/10.1021/acsaem.9b01791>.
- Liu, Shunjie, Xin Zhou, Haoke Zhang, Hanlin Ou, Wu Jacky, Yang Liu, Linqi Shi, Dan Ding, et Ben Tang. 2019. « Molecular Motion in Aggregates: Manipulating TICT for Boosting Photothermal Theranostics ». *Journal of the American Chemical Society* 141 (mars). <https://doi.org/10.1021/jacs.8b13889>.
- Liu, Xiong, Mark Atwater, Jinhai Wang, et Qun Huo. 2007. « Extinction Coefficient of Gold Nanoparticles with Different Sizes and Different Capping Ligands ». *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, Supramolecular Chemistry Applied to Interfaces*, 58 (1): 3-7. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2006.08.005>.
- Liu, Yijing, Pravin Bhattarai, Zhifei Dai, et Xiaoyuan Chen. 2019. « Photothermal Therapy and Photoacoustic Imaging via Nanotheranostics in Fighting Cancer ». *Chemical Society Reviews* 48 (7): 2053-2108. <https://doi.org/10.1039/C8CS00618K>.
- López Arbeloa, F., T. López Arbeloa, I. López Arbeloa, I. García-Moreno, A. Costela, R. Sastre, et F. Amat-Guerri. 1998. « Photophysical and Lasing Properties of Pyrromethene567 Dye in Liquid Solution.: Environment Effects ». *Chemical Physics* 236 (1): 331-41. [https://doi.org/10.1016/S0301-0104\(98\)00215-8](https://doi.org/10.1016/S0301-0104(98)00215-8).
- Lorscheider, Mathilde, Nicolas Tsapis, Mujeeb Ur-Rehman, Françoise Gaudin, Ivana Stolfá, Sonia Abreu, Simona Mura, Pierre Chaminade, Marion Espeli, et Elias Fattal. 2019. « Dexamethasone Palmitate Nanoparticles: An Efficient Treatment for Rheumatoid Arthritis ». *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* 296 (février): 179-89. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.01.015>.
- Loudet, Aureole, et Kevin Burgess. 2007. « BODIPY Dyes and Their Derivatives: Syntheses and Spectroscopic Properties ». *Chemical Reviews* 107 (11): 4891-4932. <https://doi.org/10.1021/cr078381n>.
- Lovell, Jonathan F., Cheng S. Jin, Elizabeth Huynh, Honglin Jin, Chulhong Kim, John L. Rubinstein, Warren C. W. Chan, Weiguo Cao, Lihong V. Wang, et Gang Zheng. 2011. « Porphysome Nanovesicles Generated by Porphyrin Bilayers for Use as Multimodal Biophotonic Contrast Agents ». *Nature Materials* 10 (4): 324-32. <https://doi.org/10.1038/nmat2986>.

- Lurton, Xavier. 1998. *Acoustique sous-marine: présentation et applications*. Editions Quae.
- Lyu, Yan, Yuan Fang, Qingqing Miao, Xu Zhen, Dan Ding, et Kanyi Pu. 2016. « Intraparticle Molecular Orbital Engineering of Semiconducting Polymer Nanoparticles as Amplified Theranostics for in Vivo Photoacoustic Imaging and Photothermal Therapy ». *ACS Nano* 10 (4): 4472-81. <https://doi.org/10.1021/acsnano.6b00168>.
- Marques, A. C., P. J. Costa, S. Velho, et M. H. Amaral. 2020. « Functionalizing Nanoparticles with Cancer-Targeting Antibodies: A Comparison of Strategies ». *Journal of Controlled Release* 320 (avril): 180-200. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.01.035>.
- « MetaPULSE® - Machine de mesure d'épaisseur stationnaire by Onto Innovation Inc. | DirectIndustry ». s. d. Consulté le 19 février 2022. <https://www.directindustry.fr/prod/onto-innovation-inc/product-34476-348423.html>.
- Mura, Simona, et Patrick Couvreur. 2012. « Nanotheranostics for Personalized Medicine ». *Advanced Drug Delivery Reviews* 64 (13): 1394-1416. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.06.006>.
- Nehl, Colleen L., Nathaniel K. Grady, Glenn P. Goodrich, Felicia Tam, Naomi J. Halas, et Jason H. Hafner. 2004. « Scattering Spectra of Single Gold Nanoshells ». *Nano Letters* 4 (12): 2355-59. <https://doi.org/10.1021/nl048610a>.
- Ni, Jen-Shyang, Xun Zhang, Guang Yang, Tianyi Kang, Xiangwei Lin, Menglei Zha, Yaxi Li, Lidai Wang, et Kai Li. 2020. « A Photoinduced Nonadiabatic Decay-Guided Molecular Motor Triggers Effective Photothermal Conversion for Cancer Therapy ». *Angewandte Chemie International Edition* 59 (28): 11298-302. <https://doi.org/10.1002/anie.202002516>.
- Ni, Yong, Ravi Kumar Kannadorai, Sidney W.-K. Yu, Young-Tae Chang, et Jishan Wu. 2017. « Push-Pull Type Meso-Ester Substituted BODIPY near-Infrared Dyes as Contrast Agents for Photoacoustic Imaging ». *Organic & Biomolecular Chemistry* 15 (21): 4531-35. <https://doi.org/10.1039/C7OB00965H>.
- Nicolas, Julien, et Patrick Couvreur. 2017. « Les nanoparticules polymères pour la délivrance de principes actifs anticancéreux ». *médecine/sciences* 33 (1): 11-17. <https://doi.org/10.1051/medsci/20173301003>.
- Onoe, Satoru, Takashi Temma, Kengo Kanazaki, Masahiro Ono, et Hideo Saji. 2015. « Development of photostabilized asymmetrical cyanine dyes for in vivo photoacoustic imaging of tumors ». *Journal of Biomedical Optics* 20 (9): 096006. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.20.9.096006>.
- « OrbiMol 4.1 (LCT Sorbonne Université) ». s. d. Consulté le 12 mars 2022. <https://www.lct.jussieu.fr/pagesperso/orbimol/fr/index-fr.shtml#>.

- Owens, Donald E., et Nicholas A. Peppas. 2006. « Opsonization, Biodistribution, and Pharmacokinetics of Polymeric Nanoparticles ». *International Journal of Pharmaceutics* 307 (1): 93-102. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.10.010>.
- Palzer, Stefan. 2020. « Photoacoustic-Based Gas Sensing: A Review ». *Sensors (Basel, Switzerland)* 20 (9): 2745. <https://doi.org/10.3390/s20092745>.
- Park, Joon, et R. S. Lakes. 2007. *Biomaterials: An Introduction*. Springer Science & Business Media.
- Paschotta, Dr Rüdiger. s. d. « Fluence ». Consulté le 2 avril 2022. <https://www.rp-photonics.com/fluence.html>.
- Patel, C. K.N. 2008. « Laser Photoacoustic Spectroscopy Helps Fight Terrorism: High Sensitivity Detection of Chemical Warfare Agent and Explosives ». *The European Physical Journal Special Topics* 153 (1): 1-18. <https://doi.org/10.1140/epjst/e2008-00383-x>.
- Podymova, N., et A. Karabutov. 2010. « Laser Optoacoustic Non-Destructive Method of Thickness Measurement of Subsurface Damaged Layer in Machined Silicon Wafers ». *Journal of Physics: Conference Series* 214 (mars): 012054. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/214/1/012054>.
- Poirier-Quinot, Marie. 2019. « L'imagerie médicale, quand la Physique rencontre la médecine », juillet 2019.
- Pu, Kanyi, Adam J. Shuhendler, Jesse V. Jokerst, Jianguo Mei, Sanjiv S. Gambhir, Zhenan Bao, et Jianghong Rao. 2014. « Semiconducting Polymer Nanoparticles as Photoacoustic Molecular Imaging Probes in Living Mice ». *Nature Nanotechnology* 9 (3): 233-39. <https://doi.org/10.1038/nnano.2013.302>.
- Qi, Ji, Chao Chen, Xiaoyan Zhang, Xianglong Hu, Shenglu Ji, Ryan T. K. Kwok, Jacky W. Y. Lam, Dan Ding, et Ben Zhong Tang. 2018. « Light-Driven Transformable Optical Agent with Adaptive Functions for Boosting Cancer Surgery Outcomes ». *Nature Communications* 9 (1): 1848. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04222-8>.
- Qi, Ji, Leyan Feng, Xiaoyan Zhang, Haoke Zhang, Liwen Huang, Yutong Zhou, Zheng Zhao, et al. 2021. « Facilitation of Molecular Motion to Develop Turn-on Photoacoustic Bioprobe for Detecting Nitric Oxide in Encephalitis ». *Nature Communications* 12 (1): 960. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21208-1>.
- Qi, Ji, Wenqiang Qiao, et Zhi Yuan Wang. 2016. « Advances in Organic Near-Infrared Materials and Emerging Applications ». *Chemical Record (New York, N.Y.)* 16 (3): 1531-48. <https://doi.org/10.1002/tcr.201600013>.
- Qian, Gang, et Zhi Yuan Wang. 2010. « Near-Infrared Organic Compounds and Emerging Applications ». *Chemistry – An Asian Journal* 5 (5): 1006-29. <https://doi.org/10.1002/asia.200900596>.
- Raybaut, Myriam, Margaux Barbier, Jean-Michel Melkonian, Jean-Baptiste Dherbecourt, Antoine Godard, et Michel Lefebvre. 2011. « Détection d'espèces

- par spectroscopie photoacoustique: principe et applications ». *Photoniques*, n° 54 (juillet): 39-43. <https://doi.org/10.1051/photon/20115439>.
- Reisch, Andreas, Pascal Didier, Ludovic Richert, Sule Oncul, Youri Arntz, Yves Mély, et Andrey S. Klymchenko. 2014. « Collective Fluorescence Switching of Counterion-Assembled Dyes in Polymer Nanoparticles ». *Nature Communications* 5 (1): 1-9. <https://doi.org/10.1038/ncomms5089>.
- Sano, Kohei, Manami Ohashi, Kengo Kanazaki, Ning Ding, Jun Deguchi, Yuko Kanada, Masahiro Ono, et Hideo Saji. 2015. « In Vivo Photoacoustic Imaging of Cancer Using Indocyanine Green-Labeled Monoclonal Antibody Targeting the Epidermal Growth Factor Receptor ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 464 (3): 820-25. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.07.042>.
- Sano, Kohei, Manami Ohashi, Kengo Kanazaki, Akira Makino, Ning Ding, Jun Deguchi, Yuko Kanada, Masahiro Ono, et Hideo Saji. 2017. « Indocyanine Green-Labeled Polysarcosine for in Vivo Photoacoustic Tumor Imaging ». *Bioconjugate Chemistry* 28 (4): 1024-30. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00715>.
- Sarkar, Mitradeep, Théotim Lucas, Yoann Atlas, Gilles Renault, Florence Gazeau, et Jérôme Gateau. 2021. « Calibrated Photoacoustic Spectrometer for in Vitro Characterization of Contrast Agents Based on a Standard Imaging System ». <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-02509232>.
- Sawant, Rupa R., et Vladimir P. Torchilin. 2010. « Liposomes as 'Smart' Pharmaceutical Nanocarriers ». *Soft Matter* 6 (17): 4026-44. <https://doi.org/10.1039/B923535N>.
- Schmid, T., C. Helmbrecht, C. Haisch, U. Panne, et R. Niessner. 2003. « On-Line Monitoring of Opaque Liquids by Photoacoustic Spectroscopy ». *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 375 (8): 1130-35. <https://doi.org/10.1007/s00216-003-1758-8>.
- Schmidt, Elena, Nadezhda Zorina, Marina Dvorko, Nadezhda Protsuk, Kseniya Belyaeva, Gilles Clavier, Rachel Méallet-Renault, Thanh Vu, Al'bina Mikhaleva, et Boris Trofimov. 2011. « A General Synthetic Strategy for the Design of New BODIPY Fluorophores Based on Pyrroles with Polycondensed Aromatic and Metallocene Substituents ». *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* 17 (février): 3069-73. <https://doi.org/10.1002/chem.201003242>.
- Sobenina, Lyubov, Alexander Vasil'tsov, Olga Petrova, K. Petrushenko, Igor Ushakov, Gilles Clavier, Rachel Méallet-Renault, Albina Mikhaleva, et Boris Trofimov. 2011. « ChemInform Abstract: General Route to Symmetric and Asymmetric meso-CF₃-3(5)-Aryl(hetaryl)- and 3,5-Diaryl(dihetaryl)-BODIPY Dyes. » *Organic letters* 13 (mai): 2524-27. <https://doi.org/10.1021/ol200360f>.
- Sofias, Alexandros Marios, Michael Dunne, Gert Storm, et Christine Allen. 2017. « The Battle of "Nano" Paclitaxel ». *Advanced Drug Delivery Reviews*, Editors' Collection 2017, 122 (décembre): 20-30. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.02.003>.
- Song, Fengling, Xiaojun Peng, Erhu Lu, Rong Zhang, Xiuying Chen, et Bo Song. 2004. « Syntheses, Spectral Properties and Photostabilities of Novel Water-Soluble

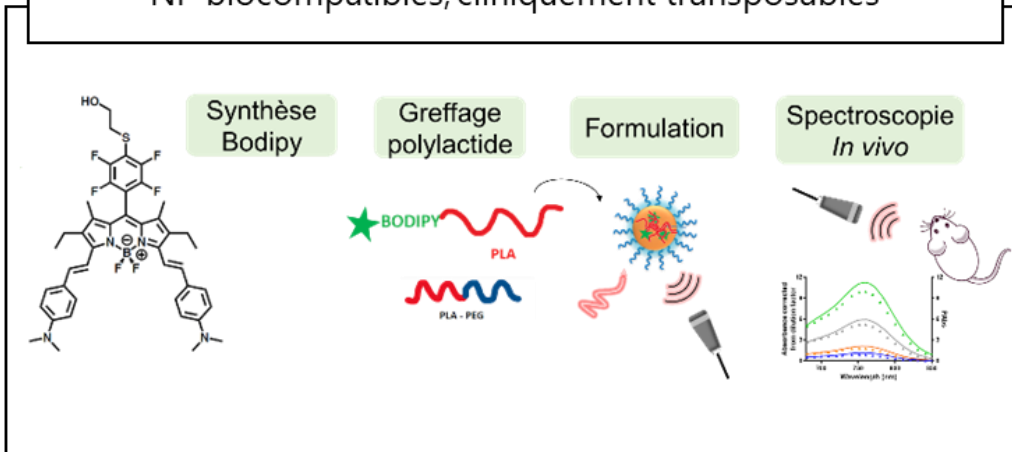
- near-Infrared Cyanine Dyes ». *Journal of Photochemistry & Photobiology, A: Chemistry* 1-2 (168): 53-57. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2004.05.012>.
- « Sons et lumière ». 2016. Belin Editeur. 17 mai 2016. <https://www.belin-editeur.com/sons-et-lumiere>.
- Srivatsan, Avinash, Samir V. Jenkins, Mansik Jeon, Zhijin Wu, Chulhong Kim, Jingyi Chen, et Ravindra K. Pandey. 2014. « Gold Nanocage-Photosensitizer Conjugates for Dual-Modal Image-Guided Enhanced Photodynamic Therapy ». *Theranostics* 4 (2): 163-74. <https://doi.org/10.7150/thno.7064>.
- Temma, Takashi, Satoru Onoe, Kengo Kanazaki, Masahiro Ono, et Hideo Saji. 2014. « Preclinical evaluation of a novel cyanine dye for tumor imaging with in vivo photoacoustic imaging ». *Journal of Biomedical Optics* 19 (9): 090501. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.19.9.090501>.
- Tenchov, Rumiana, Robert Bird, Allison E. Curtze, et Qiongqiong Zhou. 2021. « Lipid Nanoparticles—From Liposomes to mRNA Vaccine Delivery, a Landscape of Research Diversity and Advancement ». *ACS Nano* 15 (11): 16982-15. <https://doi.org/10.1021/acsnano.1c04996>.
- Torrice, Michael. 2016. « Does Nanomedicine Have a Delivery Problem? » *ACS Central Science* 2 (7): 434-37. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.6b00190>.
- Tserevelakis, George J., Margarita Tsagkaraki, et Giannis Zacharakis. 2016. « Hybrid photoacoustic and optical imaging of pigments in vegetative tissues ». *Journal of Microscopy* 263 (3): 300-306. <https://doi.org/10.1111/jmi.12396>.
- Ulrich, Gilles, Raymond Ziessel, et Anthony Harriman. 2008. « The Chemistry of Fluorescent Bodipy Dyes: Versatility Unsurpassed ». *Angewandte Chemie International Edition* 47 (7): 1184-1201. <https://doi.org/10.1002/anie.200702070>.
- Valeur, Bernard, et Mário Nuno Berberan-Santos. 2013. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. John Wiley & Sons.
- Vijayalakshmi, M. A. 2002. *Biochromatography: Theory and Practice*. CRC Press.
- Vu, Thanh, Gilles Clavier, Boris Trofimov, Rachel Méallet-Renault, et Marina Kuimova. 2015. « Tuning BODIPY molecular rotors into the red: Sensitivity to viscosity: Vs. temperature ». *J. Mater. Chem. C* 4 (novembre). <https://doi.org/10.1039/C5TC02954F>.
- Vu, Thanh Truc, Marina Dvorko, Elena Y. Schmidt, Jean-Frédéric Audibert, Pascal Retailleau, Boris A. Trofimov, Robert B. Pansu, Gilles Clavier, et Rachel Méallet-Renault. 2013. « Understanding the Spectroscopic Properties and Aggregation Process of a New Emitting Boron Dipyrromethene (BODIPY) ». *The Journal of Physical Chemistry C* 117 (10): 5373-85. <https://doi.org/10.1021/jp3097555>.
- Wang, Dong, Michelle M. S. Lee, Wenhan Xu, Guogang Shan, Xiaoyan Zheng, Ryan T. K. Kwok, Jacky W. Y. Lam, Xianglong Hu, et Ben Zhong Tang. 2019. « Boosting Non-Radiative Decay to Do Useful Work: Development of a Multi-Modality Theranostic System from an AIEgen ». *Angewandte Chemie International Edition* 58 (17): 5628-32. <https://doi.org/10.1002/anie.201900366>.

- Wang, Qin, Hao Jiang, Yan Li, Wenfei Chen, Hanmei Li, Ke Peng, Zhirong Zhang, et Xun Sun. 2017. « Targeting NF- κ B Signaling with Polymeric Hybrid Micelles That Co-Deliver siRNA and Dexamethasone for Arthritis Therapy ». *Biomaterials* 122 (avril): 10-22. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.01.008>.
- Wang, Qin, et Xun Sun. 2017. « Recent Advances in Nanomedicines for the Treatment of Rheumatoid Arthritis ». *Biomaterials Science* 5 (8): 1407-20. <https://doi.org/10.1039/C7BM00254H>.
- Wang, Shichao, Zhi Li, Yubin Liu, Gang Feng, Jun Zheng, Zhen Yuan, et Xuanjun Zhang. 2018. « Activatable Photoacoustic and Fluorescent Probe of Nitric Oxide for Cellular and in Vivo Imaging ». *Sensors and Actuators B: Chemical* 267 (août): 403-11. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.04.052>.
- Weber, Judith, Paul C. Beard, et Sarah E. Bohndiek. 2016. « Contrast Agents for Molecular Photoacoustic Imaging ». *Nature Methods* 13 (8): 639-50. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3929>.
- Wilchek, Meir, et Edward A. Bayer. 1990. « [2] Introduction to Avidin-Biotin Technology ». In *Methods in Enzymology*, édité par Meir Wilchek et Edward A. Bayer, 184:5-13. Avidin-Biotin Technology. Academic Press. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)84256-G](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)84256-G).
- Wood, Cayla A., Sangheon Han, Chang Soo Kim, Yunfei Wen, Diego R. T. Sampaio, Justin T. Harris, Kimberly A. Homan, et al. 2021. « Clinically Translatable Quantitative Molecular Photoacoustic Imaging with Liposome-Encapsulated ICG J-Aggregates ». *Nature Communications* 12 (1): 5410. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25452-3>.
- Wu, Dan, Lin Huang, Max S. Jiang, et Huabei Jiang. 2014. « Contrast Agents for Photoacoustic and Thermoacoustic Imaging: A Review ». *International Journal of Molecular Sciences* 15 (12): 23616-39. <https://doi.org/10.3390/ijms151223616>.
- Wu, Xumeng, et Weihong Zhu. 2015. « Stability Enhancement of Fluorophores for Lighting up Practical Application in Bioimaging ». *Chemical Society Reviews* 44 (13): 4179-84. <https://doi.org/10.1039/C4CS00152D>.
- Xi, Dongmei, Ming Xiao, Jianfang Cao, Luyang Zhao, Ning Xu, Saran Long, Jiangli Fan, et al. 2020. « NIR Light-Driving Barrier-Free Group Rotation in Nanoparticles with an 88.3% Photothermal Conversion Efficiency for Photothermal Therapy ». *Advanced Materials* 32 (mars): 1907855. <https://doi.org/10.1002/adma.201907855>.
- Xu, Zhun, Qing Zhu, et Lihong V. Wang. 2011. « In vivo photoacoustic tomography of mouse cerebral edema induced by cold injury ». *Journal of Biomedical Optics* 16 (6): 066020. <https://doi.org/10.1117/1.3584847>.
- Yang, Kai, Lei Zhu, Liming Nie, Xiaolian Sun, Liang Cheng, Chenxi Wu, Gang Niu, Xiaoyuan Chen, et Zhuang Liu. 2014. « Visualization of Protease Activity In Vivo Using an Activatable Photo-Acoustic Imaging Probe Based on CuS Nanoparticles ». *Theranostics* 4 (2): 134-41. <https://doi.org/10.7150/thno.7217>.

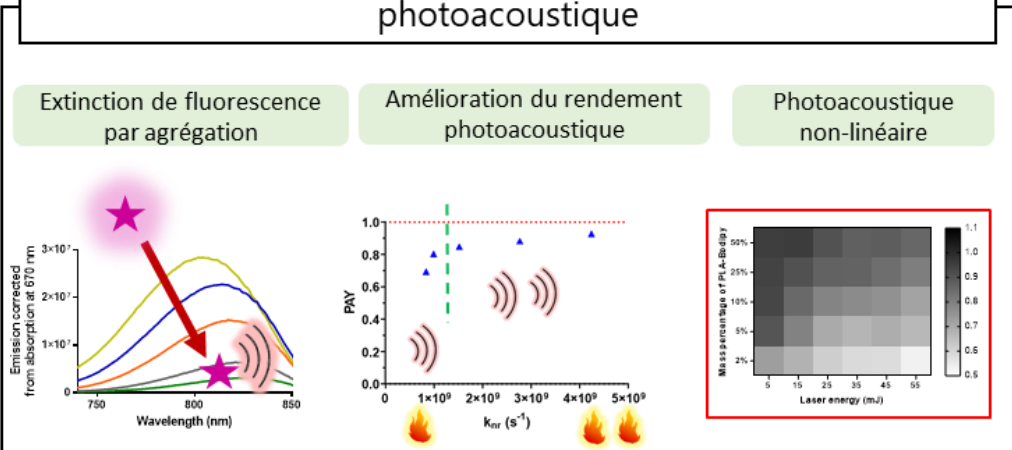
- Yao, Junjie, Andrii A. Kaberniuk, Lei Li, Daria M. Shcherbakova, Ruiying Zhang, Lidai Wang, Guo Li, Vladislav V. Verkhusha, et Lihong V. Wang. 2016. « Multiscale Photoacoustic Tomography Using Reversibly Switchable Bacterial Phytochrome as a Near-Infrared Photochromic Probe ». *Nature Methods* 13 (1): 67-73. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3656>.
- Yavuz, Mustafa S., Yiyun Cheng, Jingyi Chen, Claire M. Cobley, Qiang Zhang, Matthew Rycenga, Jingwei Xie, et al. 2009. « Gold Nanocages Covered by Smart Polymers for Controlled Release with Near-Infrared Light ». *Nature Materials* 8 (12): 935-39. <https://doi.org/10.1038/nmat2564>.
- Yoo, Jihye, Changhee Park, Gawon Yi, Donghyun Lee, et Heebeom Koo. 2019. « Active Targeting Strategies Using Biological Ligands for Nanoparticle Drug Delivery Systems ». *Cancers* 11 (5): 640. <https://doi.org/10.3390/cancers11050640>.
- Yuan, Fang, Ling-dong Quan, Liao Cui, Steven R. Goldring, et Dong Wang. 2012. « Development of Macromolecular Prodrug for Rheumatoid Arthritis ». *Advanced Drug Delivery Reviews*, Targeted delivery of therapeutics to bone and connective tissues, 64 (12): 1205-19. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.03.006>.
- Zhang, Yanbing, Shane A. Autry, Louis E. McNamara, Suong T. Nguyen, Ngoc Le, Phillip Brogdon, Davita L. Watkins, Nathan I. Hammer, et Jared H. Delcamp. 2017. « Near-Infrared Fluorescent Thienothiadiazole Dyes with Large Stokes Shifts and High Photostability ». *The Journal of Organic Chemistry* 82 (11): 5597-5606. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.7b00422>.
- Zhao, Yunfei, Mingfeng Cao, John F. McClelland, Zengyi Shao, et Meng Lu. 2016. « A Photoacoustic Immunoassay for Biomarker Detection ». *Biosensors and Bioelectronics* 85 (novembre): 261-66. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.05.028>.
- Zhao, Zheng, Chao Chen, Wenting Wu, Fenfen Wang, Lili Du, Xiaoyan Zhang, Yu Xiong, et al. 2019. « Highly Efficient Photothermal Nanoagent Achieved by Harvesting Energy via Excited-State Intramolecular Motion within Nanoparticles ». *Nature Communications* 10 (1): 768. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08722-z>.
- Zhen, Xu, Kanyi Pu, et Xiqun Jiang. 2021. « Photoacoustic Imaging and Photothermal Therapy of Semiconducting Polymer Nanoparticles: Signal Amplification and Second Near-Infrared Construction ». *Small* 17 (6): 2004723. <https://doi.org/10.1002/sml.202004723>.
- Zhou, Effie Y., Hailey J. Knox, Chang Liu, Weili Zhao, et Jefferson Chan. 2019. « A Conformationally Restricted Aza-BODIPY Platform for Stimulus-Responsive Probes with Enhanced Photoacoustic Properties ». *Journal of the American Chemical Society* 141 (44): 17601-9. <https://doi.org/10.1021/jacs.9b06694>.
- Zielińska, Aleksandra, Filipa Carreiró, Ana M. Oliveira, Andreia Neves, Bárbara Pires, D. Nagasamy Venkatesh, Alessandra Durazzo, et al. 2020. « Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology ». *Molecules* 25 (16): 3731. <https://doi.org/10.3390/molecules25163731>.

TRAVAUX EXPÉRIMENTAUX

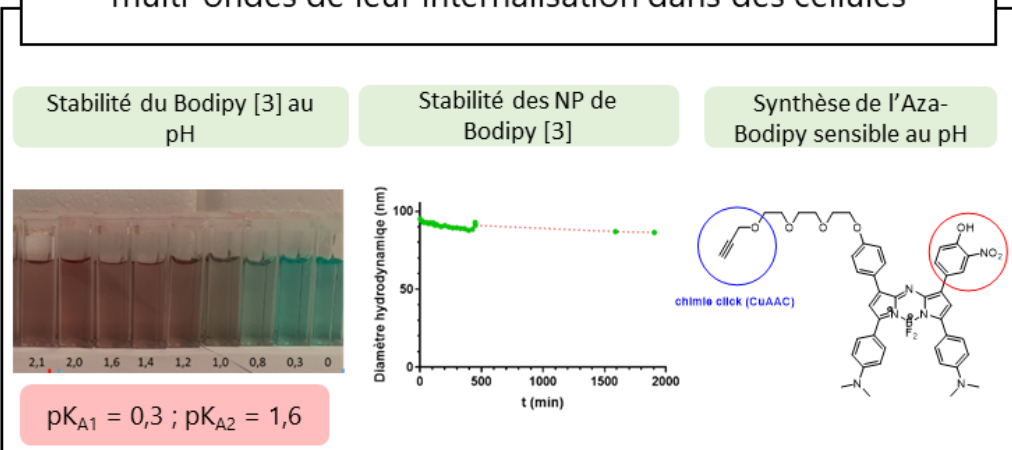
Chapitre 2 : Observer le signal photoacoustique *in vivo* de NP biocompatibles, cliniquement transposables



Chapitre 3 : Comprendre comment favoriser les voies de désexcitation non-radiatives pour augmenter l'efficacité photoacoustique



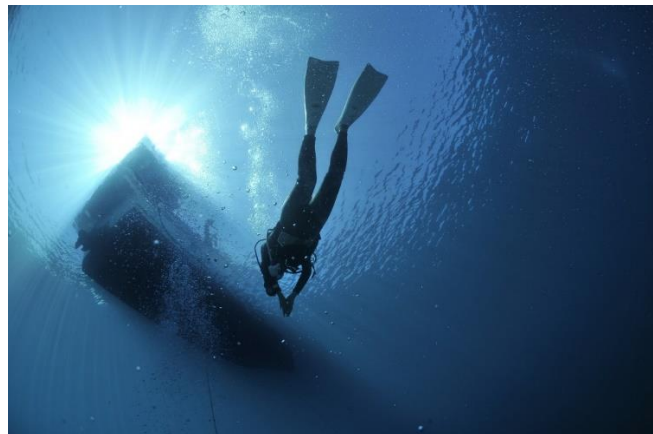
Chapitre 4 : Synthétiser des NP sensibles au pH pour le suivi multi-ondes de leur internalisation dans des cellules



2 CHAPITRE 2 : BIOCOMPATIBLE AND PHOTOSTABLE PHOTOACOUSTIC CONTRAST AGENTS AS NANOPARTICLES BASED ON BODIPY-SCAFFOLD AND POLYLACTIDE POLYMERS: SYNTHESIS, FORMULATION AND *IN VIVO* EVALUATION

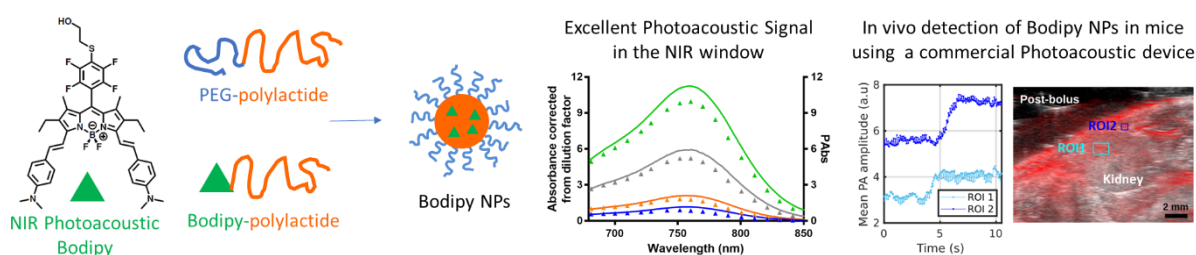


Dans un orchestre, il est facile de localiser avec la vue l'emplacement d'un instrument, mais beaucoup plus difficile de déterminer à l'oreille d'où provient le son.



En plongée sous-marine, pour communiquer à distance avec les plongeurs depuis le bateau, des pétards sont utilisés en tant qu'avertisseur sonore. Dans l'eau, les avertisseurs lumineux ne sont pas beaucoup utilisés.

Nous avons synthétisé un nouveau type de Bodipy pour faire de l'imagerie photoacoustique efficace (PA) *in vivo* de nanoparticules couramment utilisées comme nanovecteurs de médicaments. Le nouveau colorant possède une bande d'absorption optimisée pour les tissus biologiques, dans la fenêtre du proche infrarouge et un faible rendement quantique de fluorescence qui conduit à une bonne efficacité de génération photoacoustique. Après la polymérisation par ouverture de cycle du lactide initiée par le Bodipy, le polylactide-Bodipy a été formulé en nanoparticules (NP) PEGylées en le mélangeant avec du PLA-PEG à différentes concentrations. Les NP formulées, d'environ 100 nm, présentent d'excellentes propriétés de PA : une bande d'absorption à 760 nm et coefficient d'absorption molaire compris entre les absorbeurs moléculaires de PA et les NP d'or. Une photostabilité très améliorée - par rapport aux NPs de PLA marquées à la cyanine - ainsi qu'une innocuité vis à vis des macrophages en culture ont été démontrées. Après injection intraveineuse chez des animaux sains, les NP ont été facilement détectées à l'aide d'un système d'imagerie PA commercial et d'une séparation spectrale, ouvrant la voie à leur utilisation comme agents théranostiques.



2 **Chapitre 2 : Biocompatible and photostable photoacoustic contrast agents as nanoparticles based on bodipy-scaffold and polylactide polymers: synthesis, formulation and *in vivo* evaluation** 99

 2.1 Introduction..... 102

 2.2 Results and discussion..... 104

 2.3 Conclusion 115

 2.4 Materials and methods 116

 2.4.1 Materials 116

 2.4.2 Methods..... 117

 2.5 Acknowledgements..... 126

 2.6 References..... 127

 2.7 Supporting Information 133

Biocompatible and photostable photoacoustic contrast agents as nanoparticles based on Bodipy-scaffold and polylactide polymers: synthesis, formulation and in vivo evaluation

Jean-Baptiste Bodin^{1,2}, Jérôme Gateau³, Justine Coïs⁴, Théotim Lucas³, Flora Lefebvre², Laurence Moine², Magali Noiray², Catherine Cailleau², Stéphanie Denis², Gilles Clavier⁴, Nicolas Tsapis^{2}, Rachel Méallet-Renault^{1*}*

J-B. Bodin, R. Méallet-Renault

Université Paris-Saclay, CNRS, Institut des Sciences Moléculaires d'Orsay, 91405, Orsay, France.

E-mail: rachel.meallet-renault@universite-paris-saclay.fr

F. Lefebvre, L. Moine, M. Noiray, C. Cailleau, S. Denis, N. Tsapis

Université Paris-Saclay, CNRS, Institut Galien Paris-Saclay, 92296, Châtenay-Malabry, France

E-mail: nicolas.tsapis@universite-paris-saclay.fr

J. Gateau, T. Lucas

Sorbonne Université, CNRS, INSERM, Laboratoire d'Imagerie Biomédicale, LIB, F-75006, Paris, France

J. Coïs, G. Clavier

Université Paris-Saclay, ENS Paris-Saclay, CNRS, PPSM, 91190, Gif-sur-Yvette, France

Keywords: Photoacoustic imaging, nanoparticles, Bodipy, contrast agents, polylactide

Abstract

We have designed a new Bodipy scaffold for efficient in vivo photoacoustic (PA) imaging of nanoparticles commonly used as drug nanovectors. The new dye has an optimized absorption band in the near-infrared window in biological tissue and a low fluorescence quantum yield that leads to a good photoacoustic generation efficiency. After Bodipy-initiated ring opening polymerization of lactide, the polylactide-Bodipy was formulated into PEGylated nanoparticles (NPs) by mixing with PLA-PEG at different concentrations. Formulated NPs around 100 nm exhibit excellent PA properties: absorption band at 760 nm and molar absorption coefficient in between molecular PA absorbers and gold NPs. Highly improved photostability -compared to cyanine-labelled PLA NPs as well as innocuity in cultured macrophages were demonstrated. After intravenous injection in healthy animals, NPs were easily detected using a

commercial PA imaging system and spectral unmixing, opening the way to their use as theranostic agents.

2.1 INTRODUCTION

Nanoparticles as drug nanovectors (NVs) are expected to profoundly change therapeutic treatments in the next years and specifically benefit highly prevalent diseases such as rheumatoid arthritis and cancer (Wang and Sun 2017; Zhang and al. 2018; Hui and al. 2019). However, huge heterogeneities of NV accumulation between patients were reported and raised the need to develop personalized nanomedicine (Crommelin and Florence 2013; Lammers and al. 2012). For a selection of patients with efficient NV accumulation at the target site prior to treatments, the accumulation of unloaded-NVs needs to be imaged and quantified with a precise and noninvasive *in vivo* imaging modality. Clinical imaging modalities such as X-ray computed tomography, positron emission tomography (PET) and magnetic resonance imaging (MRI) benefit from a significant penetration depth. However, their lack of a precise spatial resolution (< 1 mm), and other specific modality problems such as limited availability, cost and exposure to radiation or ionizing agent, limit their use for a fine assessment of the NV distribution. Photoacoustic imaging (PAI) is an emerging biomedical imaging modality combining optical excitation in the near infrared (NIR) and ultrasound detection in the MHz range to map optical-absorption contrast at centimetric depth with sub-millimeter resolution (Beard 2011). The key is the photoacoustic (PA) effect: optically absorbing structures emit ultrasound waves when excited with a nanosecond pulse laser. Photoacoustic imaging benefits from a molecular contrast combined with a fine spatial resolution at high penetration depths, is noninvasive, non-ionizing, and can be used at the bedside. Many photoacoustic contrast agents (PACA) have been developed to reveal biological or physiological processes not associated with endogenous chromophores (Weber, Beard, Bohndiek 2016; Lemaster and Jokerst 2017). Exogenous contrast agent could be either molecular or particulate agents, with a low toxicity and optimized for their optical absorption properties. Small molecule dyes, such as methylene blue, indocyanine green (ICG) are injectable, possess a good tissue penetration, absorb in the NIR and most of them are clinically approved. However, they suffer from low photoacoustic signal, poor photostability, and fast clearance from the body. For example the FDA-approved (Food and Drug Administration) ICG has significant photostability problems (Saxena, Sadoqi, and Shao 2004; Borg and Rochford 2018).

Nanoparticle-based PACA are soaring. They benefit from a strong photoacoustic signal, a good water-solubility, and can be easily functionalized. Gold nanoparticles of different shapes have been used for *in vivo* preclinical photoacoustic imaging (Weber,

Beard, Bohndiek 2016). However, significant toxicity problems and difficulties to use them as NVs still limit their use for drug delivery (Taylor and al. 2014). Another approach is to encapsulate molecular contrast agents in organic nanoparticles (NPs) with a clinical relevance as drug NVs. For instance, liposomes labelled with ICG were reported (Beziere and al. 2015), and some Bodipy dyes were physically encapsulated in bovine serum albumin NPs (Ni and al. 2016; 2017) or in organic NPs (Hu and al. 2016). More recently, NPs based on poly(lactide-co-glycolide) tagged with perfluorooctyl bromide and ICG were applied to improve rheumatoid arthritis diagnosis thanks to fluorescence NIR imaging and ¹⁹F MRI (Vu-Quang and al. 2019). Most of the time, physical encapsulation is considered leading to dye leaking issues and a poor dye loading (Pietzonka and al. 2002). Recently, semiconductive polymer NPs have gain interest for their phototherapeutic (photodynamic and photothermal) properties, near-infra red absorption, and high photostability, but very poor information exists on their biodegradability and long term *in vivo* toxicity (Rejinold, Choi, and Choy 2021; M. Xu and al. 2021; Pu and al. 2014).

Here, we report the development of biocompatible organic NPs based on the chemical encapsulation of a PA-active Bodipy scaffold and on the polylactide polymer. Polylactide is widely employed for drug encapsulation (Di Mascolo and al. 2013; Boissenot and al. 2016; Gómez-Gaete and al. 2007). Its biodegradability, good biocompatibility and low toxicity (Mura, Hillaireau, Nicolas, Kerdine-Römer, and al. 2011; Mura, Hillaireau, Nicolas, Le Droumaguet, and al. 2011; Aragao-Santiago and al. 2016; Grabowski and al. 2013) makes it an ideal material for NVs. Bodipy was chosen to confer polylactide with PA properties. Indeed, Bodipy scaffolds started to be used as effective PA contrast agents, either at a molecular level or in NPs (Hu and al. 2016; Miki and al. 2017; Ni and al. 2016; 2017; Merkes and al. 2020). Bodipys are very popular dyes, well known to be photostable and easily tunable, with a high molar extinction coefficient, and a straightforward synthesis (Galangau and al. 2010; Dumas-Verdes and al. 2010). Bodipy dyes are most of the time fluorescent but chemical modifications allow to tune the luminescence quantum yield to favor non-radiative deactivation, and to shift absorption and emission maxima to the NIR region (Loudet and Burgess 2007; Boens, Verbelen, and Dehaen 2015). Chemical grafting of the Bodipy on the polymer will prevent dye leakage (Pietzonka and al. 2002; Reul and al. 2012; P. Xu and al. 2009). It will also promote photostability, (Amat-Guerri and al. 2003; García-Moreno and al. 2004) which is of paramount importance. Indeed, in PAI, contrast agents are repeatedly excited with nanosecond pulsed light and photobleaching could lead to signal loss issues.

In this article, we synthesized a new Bodipy scaffold with the following properties: 1) absorption in the NIR region, 700-900 nm, where biological tissues'

autofluorescence is reduced and more importantly where their absorption and scattering are minimized favoring the penetration depth for PAI, 2) a high molar absorption coefficient, 3) a low fluorescence quantum yield to increase the photoacoustic generation efficiency (PGE) (Fuenzalida Werner and al. 2019; Werner and al. 2020a) and 4) an alcohol function to initiate lactide polymerization. After Bodipy-initiated ring opening polymerization of lactide, the PLA-Bodipy was formulated into NPs by mixing with PLA-PEG at different mass ratios. Formulated NPs were extensively characterized in terms of PA properties and photostability. They were compared with NPs grafted with a commercial cyanine 7 dye which has a similar absorption band. Bodipy-labelled NPs innocuity was evaluated on cell cultures. Finally, NPs were injected in healthy animals where they were easily detected using a commercial PA imaging system followed by spectral unmixing.

2.2 RESULTS AND DISCUSSION

Bodipy **[1]** was obtained, with 48% yield, with the well-known three step one pot protocol to obtain the main core of the Bodipy with the desired pentafluorophenyl ring (Figure 2.1). The presence of fluorine atoms facilitates the Knoevenagel-like reaction (Galangau and al. 2010). The pentafluorophenyl ring is a click chemistry intermediate that can react quantitatively and rapidly with thiols (Vives and al. 2011). This was exploited to introduce the alcohol function by reacting Bodipy **[1]** with 2-mercaptoethan-1-ol to obtain Bodipy **[2]** with 52% yield. The conjugation of Bodipy **[2]** was finally extended with two strongly electron donating 4-(*N,N*-dimethylamino)styryl groups on the 3,5 positions to shift the absorption band to the NIR region. To this purpose, Bodipy **[2]** was reacted with 4-(*N,N*-dimethylamino)benzaldehyde by a Knoevenagel-like reaction to obtain Bodipy **[3]** in 57% yield. Bodipy **[3]** synthesis is summarized on Figure 2.1. The new Bodipy dye absorbs in the NIR region, with a maximum at 753 nm (Figure 2.1b and Table S2) and a shoulder around 680 nm (corresponding to a vibronic feature (Chibani and al. 2013; Fortino and al. 2020)). The band maximum corresponds to the $S_0 \rightarrow S_1$ ($\pi-\pi^*$) electronic transition. Bodipy **[3]** possesses a strong absorption, highlighted by its high molar extinction coefficient ($80\,000\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, 757 nm, dichloromethane (DCM) Supplementary Information Figure S1). Bodipy dyes usually have low to very low intersystem crossing quantum yield and are not phosphorescent. (Filatov 2019; Schmitt and al. 2009) Bodipy **[3]** exhibits a low fluorescence efficiency. The introduction of a two 4-(*N,N*-dimethylamino)styryl groups reduces drastically the fluorescence quantum yield from 0.99 for Bodipy **[1]** (Galangau and al. 2010) and 0.85 for Bodipy **[2]**, to 0.007 (for Bodipy **[3]**). The amino group acts as an electron donor and the Bodipy core as an electron acceptor, leading to an intramolecular charge transfer (ICT) which quenches fluorescence, (Galangau and al. 2010) and may improve the PGE (Fuenzalida Werner and al. 2019; Werner and al. 2020b). A more than doubled Stokes shift appears

(Supplementary information Table S2) from Bodipy **[2]** to Bodipy **[3]** is also noticeable, relevant of the intramolecular charge transfer in the Bodipy. Fluorescence experimental lifetime of the Bodipy **[3]** was measured. The relatively low value, 1.03 ns compared with Bodipy **[1]** (6.74 ns) and Bodipy **[2]** (6.03 ns) is consistent with a favored non-radiative decay. The very low fluorescence quantum yield and fluorescence lifetime of Bodipy **[3]** are therefore promising for a high PA signal.

The PLA-Bodipy **[4]** was obtained by ring-opening polymerization using Bodipy as an initiator. After purification, the polymer was fully characterized by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) and Size Exclusion Chromatography (SEC) (Supplementary information Figure S4b, Table S1). It was obtained with 56% yield, a molecular weight of 14 500 g.mol⁻¹ and about 190 repeat units, with a narrow dispersity of 1.6. A low molecular weight was preferred to promote a high Bodipy loading in the NPs. PLA-Bodipy **[4]** absorption properties were found to be very close to the Bodipy **[3]** ones (Figure 2.1b and Supplementary information Table S2). The position of the absorption band remains at 753 nm, the fluorescence quantum yield remains very low (0.052) and the PLA-Bodipy fluorescence lifetime is identical to Bodipy **[3]**: 1.05 ns. As expected, the polymer grafting does not modify the Bodipy photophysical parameters since the conjugation, rigidity or planarity of the Bodipy core was not affected by the polymer. Figure 2.1b highlights the perfect match between PLA-Bodipy **[4]** and Bodipy **[3]** absorption spectra. The grafted Bodipy keeps its great absorption properties which is promising for a high PA signal. The Bodipy **[3]** and PLA-Bodipy **[4]** molar extinction coefficients were determined, thanks to calibration curves. The 757 nm absorbance was plotted as a function of **[4]** and **[3]** molar concentrations (Supplementary information Figure S1). PLA-Bodipy **[4]** and Bodipy **[3]** calibration curves have very close slope values leading to PLA-Bodipy **[4]** molar extinction coefficient of 78 000 L.mol⁻¹.cm⁻¹ (757 nm, DCM) while it was 80 000 L.mol⁻¹.cm⁻¹ for Bodipy **[3]** (757 nm, DCM). This finding emphasizes that almost every Bodipy properly initiated the polymerization and every polylactide chain ends with a Bodipy (about 97.5%, Supplementary information Table S1).

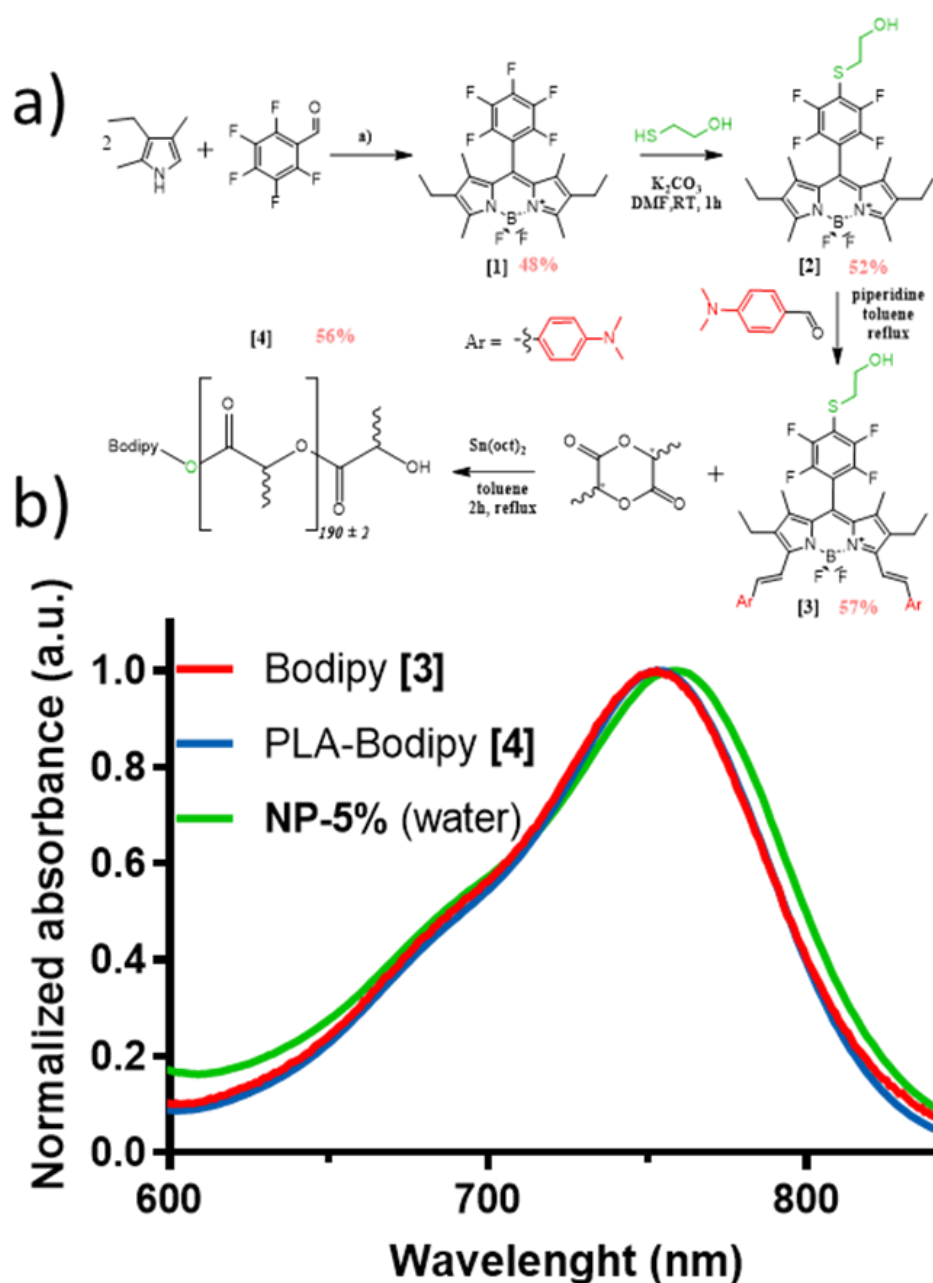


Figure 2.1 : (a) Synthesis of the Bodipy [3] and ring opening polymerization to obtain Bodipy grafted polylactic acid [4]. a) i) *Trifluoroacetic acid (TFA)*, DCM, 3h RT. ii) *Chloranil*. iii) *N,N*-diisopropylethylamine (DIPEA), $\text{BF}_3\text{-Et}_2\text{O}$. (b) Absorption spectra of the Bodipy [3] in DCM (red), PLA-Bodipy [4] in DCM (blue) and NP-5% in water (green).

The ROP synthesis was also applied to obtain PLA-PEG₅₀₀₀ polymer [5] and [6] (Supplementary information Figure S4a), with HO-PEG₅₀₀₀-OCH₃ as initiator. The polymer [5] PLA-PEG₅₀₀₀ was obtained with 73% yield. PLA-PEG₅₀₀₀ [5] and [6] were

fully characterized by NMR (Supplementary information Figure S4c, Table S1). As desired, PLA-Bodipy **[4]** and PLA-PEG₅₀₀₀ **[5]** have molecular weight of the same order of magnitude (14 500 g.mol⁻¹ for **[4]** and 12 000 g.mol⁻¹ for **[5]**) which will favor their blending when formulated into nanoparticles.

Nanoparticles were then formulated by mixing different mass percentages of PLA-Bodipy **[4]** compared to PLA-PEG₅₀₀₀ **[5]**, **NP-0%**, **NP-5%**, **NP-10%**, **NP-25%** and **NP-50%**. As PLA-Bodipy percentage increases, suspensions appear darker (Supplementary information Figure S5). NP batches were fully characterized by DLS, Nanoparticle Tracking Analysis NTA, zeta potential and Transmission Electron Microscopy TEM (Figure 2.2 and Supplementary information Figure S6). Figure 2.2a shows the NP hydrodynamic diameter determined by NTA and DLS as a function of mass percentage of PLA-Bodipy **[4]** introduced. NPs were rather monodisperse with PDIs of about 0.10. The NP hydrodynamic diameter determined by DLS increases with the PLA-Bodipy percentage from 87 nm for **NP-0%** up to 138 nm for **NP-50%** (Figure 2.2a). Both DLS and NTA size measurements were in a very good agreement. The important error bars for the NTA experiments arise from the full width at half maximum (FWHM) of the NTA profile (Figure S8a), while DLS error bar corresponds to standard deviation for n-plicate batches ($3 \leq n \leq 5$). TEM pictures show spherical to elongated particles for each polymer percentage (Figure 2.2c and Supplementary information Figure S7) and confirmed the rather good dispersity of NPs. TEM pictures highlighted the NP size increase with the PLA-Bodipy amount. The zeta potential of all NPs was negative (around -7mV, Figure 2.2b) and independent on the PLA-Bodipy percentage. After purification to eliminate sodium cholate, a change of zeta potential was observed (Supplementary information Figure S6). With no surfactant, the zeta potential is slightly more negative (-10.8mV for **NP-0%** and -13.3 mV for **NP-50%**). No significant change of the NP size was observed after the purification step, proving the good redispersion properties of NPs (Supplementary information Figure S6).

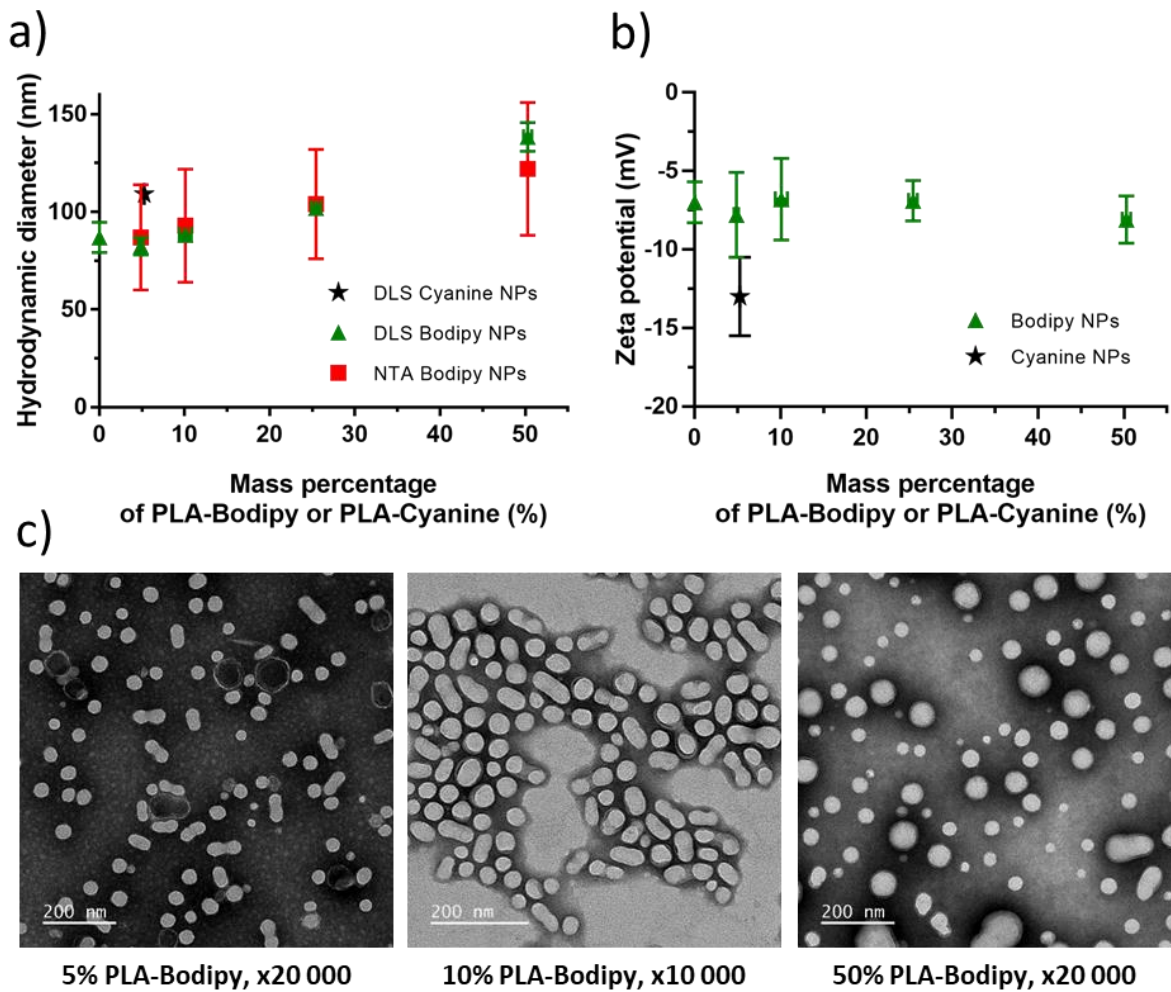


Figure 2.2 : (a) NP hydrodynamic diameter measured by DLS (green) and NTA (red) as a function of the mass percentage of PLA-Bodipy [4] or PLA-Cyanine [8]. PDI were all between 0.11 and 0.09. (b) NP zeta-potential measured in 1mM sodium chloride. Mean values and standard deviation were obtained for DLS and zeta potential for: (**NP-0%**, n=5 batches, PDI 0.11); (**NP-5%**, n=5 batches, PDI 0.11); (**NP-10%**, n=4 batches, PDI 0.11); (**NP-25%**, n=4 batches, PDI 0.11); (**NP-50%**, n=3 batches, PDI 0.09) (Cyanine **NP-5%**, PDI 0.10). (c) NP TEM images.

NP sizes are in a range favorable to their accumulation in solid tumors by the so-called Enhanced Permeation and Retention effect (Veronese and Pasut 2005) or at inflammatory sites by the ELVIS mechanism (Extravasation through Leaky Vasculature and subsequent Inflammatory cell-mediated Sequestration) (Wang and Sun 2017; Yuan and al. 2012). The good monodispersity is of paramount importance, as in photophysics and photoacoustics, mean collective values are measured. Since PLA-Bodipy is hydrophobic, and the PEG part of the PLA-PEG₅₀₀₀ [5] is more hydrophilic,

most probably, PLA-Bodipy **[4]** forms NP core by hydrophobic interactions and PEG of PLA-PEG₅₀₀₀ **[5]** covers NP surface and extends in water, acting as a steric stabilizer. The observed size increase is probably due to steric hindrance of the rigid Bodipy moieties leading to less compact conformations of the polymer chains (Figure 2.2a and Figure S8b). The constant zeta potential, indifferent of PLA-Bodipy content (about -7 mV), arises from a shielding effect from the anionic surfactant (sodium cholate). The change of the zeta potential when surfactant is removed (Supplementary information Figure S6b), further confirms this hypothesis (Israelachvili 2011). Altogether, the negative zeta potential and the PEG coverage favor NP stabilization by electrostatic and steric repulsions: when stored at 4°C, suspensions were stable for at least a month.

The absorption spectrum of **NP-5%** in water was compared with those of Bodipy **[3]** and PLA-Bodipy **[4]** in DCM (Figure 2.1b). All spectra were very similar. The band shape was the same, with a 750 nm band maximum and a vibronic shoulder at 680 nm (Supplementary information Table S2). NPs absorb, as expected, in the NIR region and no significant change of the absorption properties was observed after PLA-Bodipy **[4]** formulation into NPs (Table S2). The position of the maximum is just slightly red-shifted for NPs (759 nm for **NP-5%**) as compared with Bodipy **[3]** (753 nm). This small red shift could arise from aggregation of Bodipy scaffold in NPs. Similarly, Bodipy **[3]**, Bodipy **[4]** and **NP-5%** fluorescence spectra were very close (Figure S9). Similar findings were observed for higher PLA-Bodipy contents (Figure 2.4).

Bodipy yields for the NP synthesis were very good: 82-87% and 75-78% after purification and surfactant elimination (Table S4). Such high Bodipy yields for the NP synthesis are promising and show the robustness of the synthesis pathway. No Bodipy leakage issues were observed. Assuming a homogenous distribution of Bodipy in each nanoparticle, we can deduce the average Bodipy number per NP (Table 1) by calculating the ratio of experimental Bodipy concentration (C_{Bodipy} , Table S4) and C_{NP} obtained by NTA (Table S3). The average Bodipy number per particle and the NP molar extinction coefficient ($\epsilon_{\text{NP}}^{757}$) are shown (Figure 2.3).

The Bodipy amount in each NP was quite important, from about 160 Bodipy for **NP-5%** to 3,100 Bodipy per particles (**NP-50%**) (table 1). We can observe a nonlinear increase of Bodipy per NP with the initially introduced PLA-Bodipy amount probably arising from the larger NP size. The more PLA-Bodipy were introduced, the more are likely to gather in the NPs core, the higher the NP molar extinction coefficient is. The significant concentration of Bodipy inside NP (about several thousand micromole per liter) could lead to aggregation induced effect, like self-quenching, aggregation caused quenching or excitation energy transfer (Reisch and al. 2014). Those aggregations

effects could favor non-radiative decay and increase the photoacoustic generation efficiency.

NPs exhibit increasing molar extinction coefficient at 757 nm ϵ_{NP}^{757} in water as the percentage of PLA-Bodipy increases: 1.5×10^7 L.mol⁻¹.cm⁻¹ for **NP-5%**, 2.9×10^7 L.mol⁻¹.cm⁻¹ for **NP-10%**, 9.0×10^7 L.mol⁻¹.cm⁻¹ for **NP-25%** and 2.4×10^8 L.mol⁻¹.cm⁻¹ for **NP-50%**. This increase is directly related to the Bodipy increase per NP ($\epsilon_{NP}^{757} \sim \epsilon_{PLA-Bodipy}^{757} N_{Bodipy \text{ per NP}}$). PLA-Bodipy NPs seem to be outperformed by gold nanostructures like gold nanorods or gold nanopopcorns ($4-5 \times 10^9$ L.mol⁻¹.cm⁻¹) (Weber, Beard, and Bohndiek 2016) but to work better than gold nanospheres and single wall nanotubes (10^6-10^7 L.mol⁻¹.cm⁻¹) – all used for PAI . Despite the actual weight percentage of Bodipy in NPs is below 10%, by adjusting the percentage of PLA-Bodipy above 15%, one can reach extinction coefficient higher than semiconducting polymer NPs which are considered interesting candidates for PA contrast agents (Pu and al. 2014). It should be mentioned that PLA-Bodipy NPs possess higher molar extinction coefficients than well-known PAI molecular chromophores, such as cyanine and methylene blue: 10^5-10^6 L.mol⁻¹.cm⁻¹ (Weber, Beard, and Bohndiek 2016). A high molar extinction coefficient is a good compromise to yield signal while limiting the quantity of exogenous agent introduced in the body.

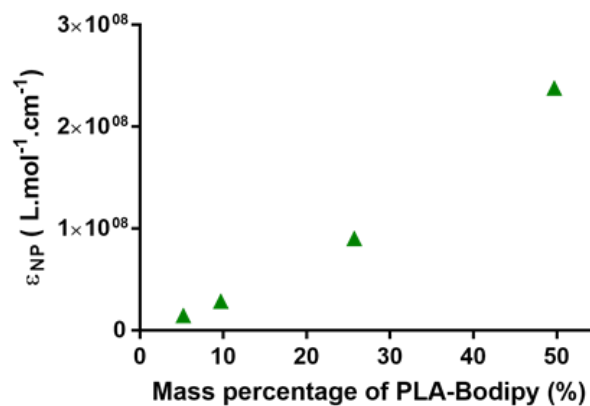


Figure 2.3 : Nanoparticles' molar extinction coefficient as a function of mass percentage of PLA-Bodipy and corresponding number of Bodipy molecules per NP.

PLA-Bodipy	Bodipy per NP [part]
5%	1.6×10^2
10%	3.8×10^2
25%	1.0×10^3
50%	3.1×10^3

Table 2.1 : PLA-Bodipy number per nanoparticles for each NP batch.

To obtain strong PA signal for imaging, agents need to exhibit good optical absorption properties (amplitude and spectrum) but also good conversion of the absorbed optical energy into heat and subsequently into acoustic pressure. Acoustic emission was recorded as described in the method part. For each sample, photoacoustic excitation spectra (PES) were obtained considering that the conversion efficiency of the heat energy to ultrasound waves (Grüneisen coefficient) is that given by the solvent: water. If NPs possess 100% photoacoustic efficiency a perfect match between absorption spectra and PES should be observed, meaning that all the absorbed energy is converted into heat of the solvent and then into pressure. Comparison between PES (triangles) and absorption spectra (continuous lines) are presented in Figure 2.4a. No noticeable change in the measured PES was observed over the 15 successive scans. First, one can notice, very close spectral shape between PES and absorption. Similar to absorption spectra, PES present a peak maximum and a vibronic shoulder around 680 nm. For each NP batch, we were able to detect a nice and clear photoacoustic signal, even for the **NP-5%** batch the sample could be measured with a good photoacoustic signal to noise ratio.

To the best of our knowledge, it is the first report of quantitative measurement of the photoacoustic absorbance showing both close values and spectral shapes compared to absorption for nanoparticles. Figure 2.4b shows the absorbance and Photoacoustic Absorbance (PABs) at 760 nm as a function of the PLA-Bodipy amount initially introduced. Both optical absorbance and PABs are linearly increasing with the PLA-Bodipy percentage, in agreement with the Beer's law. The close value of the slope (0.23 for absorption and 0.20 for PES) shows that 87% of the absorbed energy is converted into pressure. The 12% energy loss might come from fluorescence deactivation and from the conversion efficiency of heat energy into pressure in the NP solution. Highly efficient photoacoustic emitters were obtained.

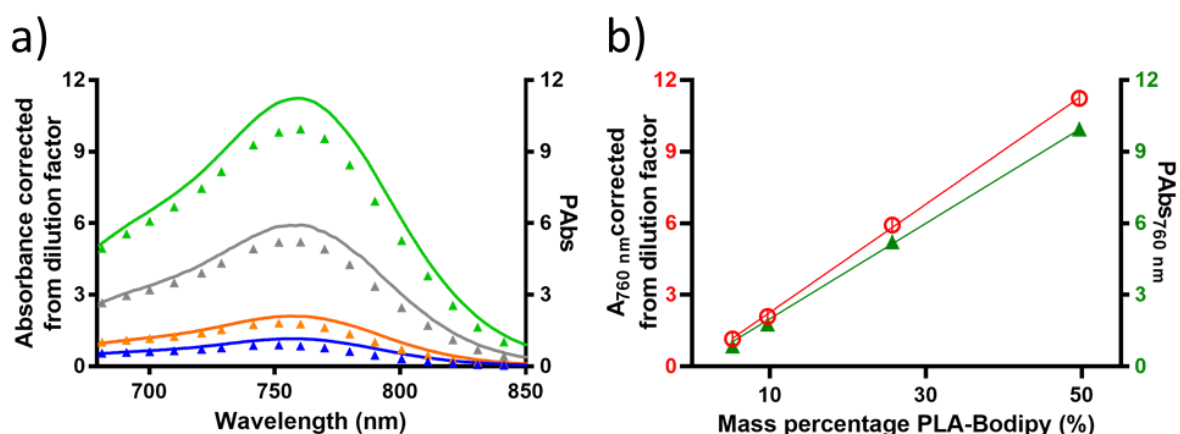


Figure 2.4 (a) Absorption spectra (continuous line) and photoacoustic excitation spectra (triangle) for each nanoparticles' batch (green NP Bodipy **NP-50%**), (grey NP Bodipy **NP-25%**), (orange NP Bodipy **NP-10%**), (blue NP Bodipy **NP-5%**). Area under the curve: (**NP-5%** PES 90.35 nm); (**NP-10%** PES 182.5 nm); (**NP-25%** PES 541.4 nm); (**NP-50%** PES 1062 nm); (**NP-5%** absorption 115nm); (**NP-10%** absorption 211nm); (**NP-25%** absorption 605nm); (**NP-50%** absorption 1177nm). (b) Absorbance and photoacoustic absorbance values at 760 nm for each nanoparticles' batch and their linear fit. Optical absorbance values were corrected from dilution factor: no dilution for **NP-5%** and **NP-10%**, 63.8 times dilution for **NP-25%** and 12.5 times dilution for **NP-50%**. Absorbance linear fit: $R^2 = 0.9997$ and slope 0.23. Photoacoustic linear fit: $R^2 = 0.9987$ and slope 0.20. Linear fitting were forced to pass through (0; 0).

The photostability of PLA-Bodipy NPs was investigated and compared with Cyanine based NPs. Cyanine dyes are popular in PAI as they can absorb in the NIR. In particular, ICG has been used for clinical PAI in cancer research (Kim and al. 2010). To compare spectrally close molecules, Cyanine 7-NH₂ was chosen here for grafting on PLA (Figure S3, Table S2). First, no successful polymerization by ROP was obtained with a hydroxylated Cyanine 7-NH₂ as initiator. The high temperature of synthesis (130°C) led to Cyanine 7-NH₂ degradation during the reaction. Therefore Cyanine 7-NH₂ **[7]** was grafted directly on a polylactide by dicyclohexylcarbodiimide/N-hydroxysuccinimide DCC/NHS coupling reaction (Reul and al. 2012). The significant steric hindrance of the polymer led to a much worse labelling efficiency than for the PLA-Bodipy, with only 10.5% of labeled polymer chains for PLA-Cyanine **[8]** as compared with 97.5% for PLA-Bodipy **[4]** (Supplementary information Table S1). PLA-Cyanine **[8]** and cyanine 7-NH₂ **[7]** have similar fluorescence quantum yield (0.033 and 0.019 respectively) and have the same fluorescence lifetime (1.50ns). NPs with about 5% PLA-Bodipy in weight and about 5% in weight of actual grafted PLA-Cyanine (10.5% of PLA-Cyanine **[8]** total weight) were obtained by the emulsion/evaporation NP

synthesis. Cyanine NP size, PDI, zeta potential and shape were close to Bodipy NPs (Figure 2, S5 and S6c). Photostability results are shown in Figure 2.5a. PLA-Bodipy NPs were really stable. During the 801 minutes under desk lamp irradiation no change of the absorption feature was observed. For Cyanine NPs we observed a 65% loss of the initial optical density that could be fitted by an exponential decay. The half-time of Cyanine NPs photodegradation was estimated to be about 470 min under a desk lamp.

The photostability of the Cyanine based NPs and PLA-Bodipy NPs was also evaluated on the PA setup (Figure 2.5b). For PLA-Bodipy NPs no change of PABs was observed over the 900 lasers shots at 750 nm. On the contrary, Cyanine NPs exhibited a 26% loss of initial PABs (900 lasers shots at 760 nm). If used in vivo, Cyanine NPS would exhibit an important loss of PA signal while PLA-Bodipy NPs signal would be much more stable.

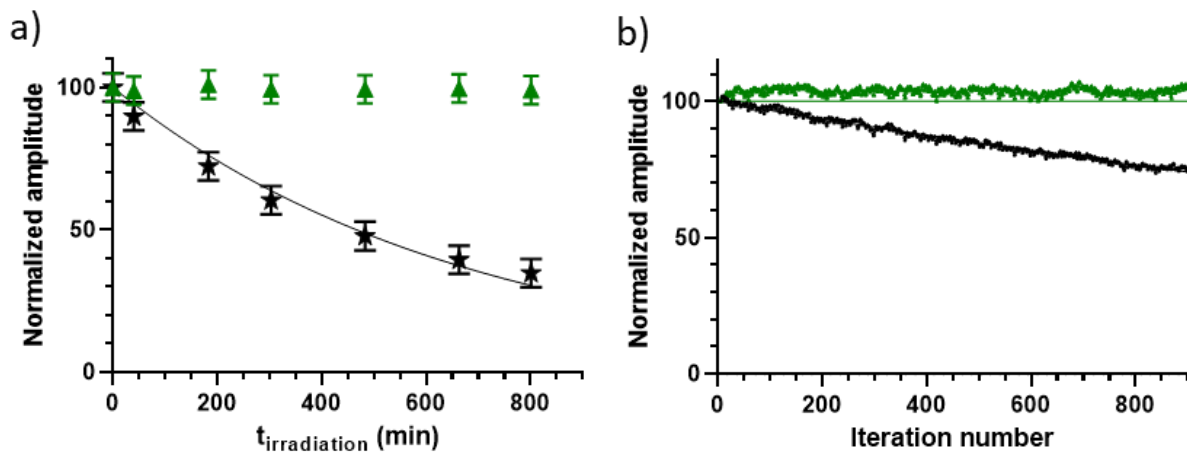


Figure 2.5 (a) Photostability under continuous desk light irradiation of PLA-Bodipy NP-5% (green triangles) and Cyanine NP-5% (black stars). The continuous black curve is the exponential decay fit for Cyanine NP-5%: $y = 100e^{-0.001485t}$; $R^2 = 0.9811$ and $t_{1/2} = 467$ min. Normalized amplitude corresponds to $100 \frac{A_{max}(t)}{A_{max}(t_0)}$. (b) Photostability of the nanoparticles' batch after 900 laser shots at a fluence of about $2.5\text{mJ}\cdot\text{cm}^{-2}$ on the PA setup, moving average on 9 points. Green triangles: PLA-Bodipy **NP-5%**. Black stars: cyanine **NP-5%**. Normalized amplitude corresponds to $100 \frac{PAbs_{max}(t)}{PAbs_{max}(t_0)}$.

The innocuity of Bodipy-labeled NPs was evaluated on macrophage cell culture by measuring the mitochondrial activity. Both unlabeled and PLA-Bodipy NPs (**NP-25%** PLA-Bodipy) exhibited very similar behavior with a rather stable viability above 80% up to 0.1 mg/mL polymer concentration. Above 0.1 mg/mL polymer concentration, the viability decreased slightly down to 60% at a polymer concentration of 1 mg/mL. These

results are in good agreement with those previously obtained with similar NPs (Reul and al. 2012; Grabowski and al. 2013; 2015).

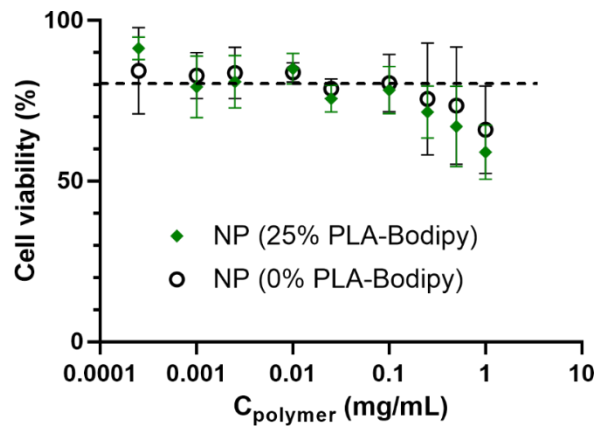


Figure 2.6 Cell viability determined by the MTT assay on J774.1 macrophages as a function of polymer concentration for unlabeled (black circles) and Bodipy-labeled (green squares) NPs. The dotted line corresponds to 80% viability. Experiments were performed in triplicate.

Finally, Bodipy-labeled NPs were evaluated *in vivo* in mice. Ultrasound and PA images were acquired in the vicinity of the kidney, and two regions of interest (ROI) were selected for quantification. One can see that the mean PA amplitude increases abruptly in both regions during the bolus injection of NPs (Figure 2.7b). Similar observations were obtained in the vicinity of the tail (Supplementary Information VS1). To ensure that the signal increase was originating from Bodipy-labeled NPs, multispectral acquisitions were performed before and around 5 min after the injection. The mean amplitude in a ROI as a function of the wavelength is displayed for ROI1 (Figure 2.7d) and ROI2 (Figure 2.7e), respectively. An increase in PA amplitude around 750 nm can be observed confirming the ability to detect Bodipy-NPs *in vivo*. Unmixing from experimental signals was performed (Figure 2.7d and e) and results demonstrate the absence of the labeled NPs pre-injection and their detection with a high contrast post-injection. PA imaging was also performed several hours after NPs injection and Bodipy signal was still detectable (data not shown). Altogether, these *in vivo* results are very promising. To the best of our knowledge this is the first report of *in vivo* PA detection of covalently Bodipy-labeled polymer NPs.

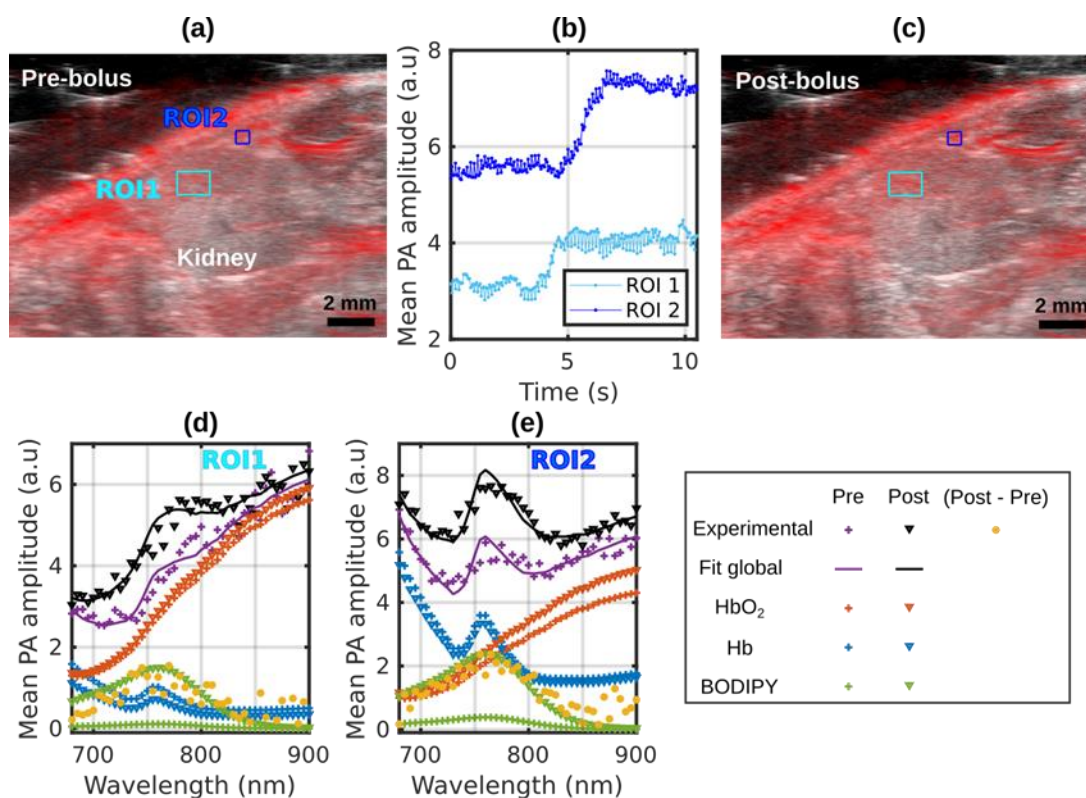


Figure 2.7 *In vivo* detection of the Bodipy-labeled NPs. NPs were injected intravenously in the tail vein and the photoacoustic images were acquired in the left kidney region with the mouse in prone position (left). A bolus of 200 μL was injected. PA images acquired at 750 nm are displayed with a red scale and -45 dB dynamic range over the B-mode ultrasound images displayed with a gray scale in (a) and (c). Two regions-of-interest (ROI1 and ROI2) have been identified. (a) Image before the injection, the PA signal is linked to an endogenous chromophore: the hemoglobin. (b) Mean amplitude of the PA image in each ROI as a function of time during the injection of the bolus. (c) Image after the injection of the bolus. Multispectral acquisitions before and around 5 min after injection. The mean amplitude in a ROI as a function of the wavelength is displayed for ROI1 (d) and ROI2 (e), respectively. The results of the unmixing process are presented by the individual contribution of each chromophore.

2.3 CONCLUSION

We have synthesized a new Bodipy scaffold for photoacoustic (PA) imaging with the following properties: 1) absorption in the NIR region, 700-900 nm, where biological tissues absorb and scatter the less favoring the penetration depth for PA imaging, 2) a high molar extinction coefficient, 3) a low fluorescence quantum yield to increase the photoacoustic generation efficiency and 4) an alcohol function to initiate lactide

polymerization. After Bodipy-initiated ring opening polymerization of lactide, the polylactide-Bodipy (PLA-Bodipy) was formulated into PEGylated nanoparticles (NPs) by mixing with PLA-PEG at different mass ratios. Formulated NPs of 100 nm exhibit excellent PA properties with absorption around 760 nm. Their PA efficiency allows to position them in between molecular PA absorbers and gold NPs. Bodipy-labelled NPs also present a much better photostability than cyanine-labelled PLA NPs. Bodipy-labelled NPs innocuity was verified in cultured macrophages. Finally, NPs were injected in healthy mice: they were easily detected using a commercial PA imaging system and spectral unmixing. This work opens the way to Bodipy-NPs as drug nanovectors. Further and deeper photophysical studies are under investigation to accurately correlate Bodipy aggregation and PA properties.

2.4 MATERIALS AND METHODS

2.4.1 Materials

DL-lactide was purchased from Biovalley, Polysciences Inc. (USA). Poly(ethylene glycol) methyl ether (OH-PEG-OCH₃, average Mn = 5000 g.mol⁻¹) was obtained from Iris Biotech GmbH (Germany). Anhydrous toluene, stannous 2-ethyl hexanoate (stannous octoate, Sn(Oct)₂), sodium cholate, deuterated chloroform, acid terminated (PLA-CO₂H Resomer R202H, Mn = 12 100 g.mol⁻¹), *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) and all the reagents for the Bodipy synthesis were purchased from Sigma-Aldrich (France) or TCI and were used as received. Spectroscopic experiments were conducted in spectroscopic grade dichloromethane from Sigma-Aldrich (France). The cyanine 7-NH₂ was purchased from Lumiprobe (Germany). Milli-Q water was used (Reference system Merck-Millipore, France).

Reactions were conducted in solvent purified with a MBraun solvent purification system (SPS-800). Crude Bodipys were purified by a Reveleris® X2 flash chromatography. Molecular Bodipys were characterized by NMR on a JEOL ECS 400 MHz spectrometer. Spectra were taken with TMS as a proton standard reference (0 ppm). For ¹³C spectra, central peak of the residual solvent multiplet was used as a chemical shift reference (CDCl₃: 77.16 ppm). For the polymer, NMR spectroscopy was performed in CDCl₃ in 5 mm diameter tubes at 25°C. ¹H spectroscopy was performed on a Bruker Avance spectrometer at 300 MHz and Bruker Avance 3 HD 400 MHz. The chemical shifts are reported in ppm (δ units), and internal solvent signal (δ = 7.26 ppm) was used as reference. The abbreviations used to designate the multiplicities are s = singlet, d = doublet, t = triplet, m = multiplet.

2.4.2 Methods

2.4.2.1 Bodipys and polymer synthesis

Bodipy [1]: the Bodipy [1] was synthesized according to a reported three steps one pot protocol (Galangau and al. 2010). Briefly, 2,4-dimethyl-3-ethylpyrrole (2.51 g, 20.40 mmol, 2.0 eq) and 2,3,4,5,6-pentafluorobenzaldehyde (2.00 g, 10.20 mmol, 1.0 eq) were dissolved in dry dichloromethane in a round bottom flask and then degassed for 10 minutes. The solution was stirred in the presence of a catalytic amount of trifluoroacetic acid (3 drops) for 3 hours at room temperature. Chloranil (2.51 g, 10.20 mmol, 1.0 eq) was then added to the mixture and stirred for 5 minutes. *N,N*-diisopropylethylamine (DIPEA) (9.23 g, 71.40 mmol, 7.0 eq) was added at once and the solution was stirred for 15 min. Finally, boron trifluoride diethyl etherate (15.92 g, 112.20 mmol, 11.0 eq) was introduced dropwise and the mixture was stirred for an additional 1 hour. The solvent was evaporated under reduced pressure and the product purified by flash chromatography (petroleum ether (PE): dichloromethane (DCM) 0 to 25%) to obtain product [1] (2.309 g, 48%). The NMR was identical to the one published by (Galangau et al. 2010)

^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 2.54 (s, 6H, CH_3), 2.34 (q, 4H, $J=7.5$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 1.51 (s, 6H, CH_3), 1.03 (t, 6H, $J=7.6$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$) ppm.

^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 156.3, 136.7, 134.1, 130.5, 121.3, 17.2, 14.7, 12.9, 11.0 ppm.

^{19}F (376 MHz, CDCl_3) δ : -139.2 (m, 2F), -145.7 (q, 2F, $^1J(^{19}\text{F}\text{-}^{11}\text{B}) = 32.3$ Hz), -151.0 (m, 1F), -159.8 (m, 2F) ppm.

^{11}B (128 MHz, CDCl_3) δ : -0.3 (t, $^1J(^{11}\text{B}\text{-}^{19}\text{F}) = 32.0$ Hz) ppm.

Bodipy [2]: Bodipy [1] (1.00 g, 2.13 mmol, 1.0 eq) was dissolved in *N,N*-dimethylformamide (100 mL). 2-mercaptoethanol (0.99 g, 12.76 mmol, 6.0 eq) and potassium carbonate (0.47 g, 3.40 mmol, 1.6 eq) were added and the solution was stirred for 30 min at room temperature. Water (100mL) was then poured to the solution and the aqueous phase was extracted with diethyl ether ($3 \times 75\text{mL}$). The organic phases were combined, washed with water ($2 \times 50\text{mL}$), dried over magnesium sulfate and filtered. The solvent was evaporated under reduced pressure and the product was purified by flash chromatography (PE: DCM 0 to 100%) to obtain product [2] (0.582 g, 52%).

^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 3.75 (t, 2H, $J=5.5$ Hz, $\text{CH}_2\text{-OH}$), 3.18 (t, 2H, $J=5.7$ Hz, $\text{CH}_2\text{-S}$), 2.54 (s, 6H, CH_3), 2.33 (q, 4H, $J=7.5$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 2.20 (bs, 1H, OH), 1.52 (s, 6H, CH_3), 1.01 (t, 6H, $J=7.6$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$) ppm.

^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 156.0, 148.9 (C-F), 146.4 (C-F), 142.1 (C-F), 142.6 (C-F), 136.8, 133.9, 130.2, 122.1, 115.5, 61.2, 37.7, 17.2, 14.6, 12.8, 10.9 ppm.

^{19}F (376 MHz, CDCl_3) δ : -131.9 (q, 2F, $J=12.0$ Hz), -139.2 (q, 2F, $J=12.0$ Hz), -145.6 (q, 2F, $^1J(^{19}\text{F}\text{-}^{11}\text{B}) = 32.8$ Hz) ppm.

^{11}B (128 MHz, CDCl_3) δ : -0.3 (t, $^1J(^{11}\text{B}\text{-}^{19}\text{F}) = 33.2$ Hz) ppm.

HRMS (ESI) m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculated for $\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{BF}_6\text{N}_2\text{OS}$, 529.1820; found 529.1915.

Bodipy [3]: Bodipy [2] (0.54 g, 1.02 mmol, 1.0 eq), 4-(*N,N*-dimethylamino)benzaldehyde (0.45 g, 3.05 mmol, 3.0 eq) and piperidine (0.26 g, 3.05 mmol, 3.0 eq) were dissolved in toluene (30 mL) in a flask equipped with a Dean-Stark apparatus and the mixture was stirred under reflux for 48 hours. The crude mixture was cooled to room temperature, washed with an acidic solution (20 mL 0.1 M HCl) and then water (20 mL). The organic phase was dried over magnesium sulfate and filtered. The solid was purified by flash chromatography (PE: ethyl acetate 20 to 80%) to obtain product [3]: distyryl-Bodipy (0.459 g, 57%).

^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.63 (d, 2H, $J=16.5$ Hz, CH=), 7.55 (d, 4H, $J=9.2$ Hz, CH_{Ar}), 7.25 (d, 2H, $J=16.5$ Hz, CH=), 6.74 (d, 4H, $J=9.2$ Hz, CH_{Ar}), 3.76 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-OH}$), 3.19 (t, 2H, $J=5.7$ Hz, $\text{CH}_2\text{-S}$), 3.02 (s, 12H, $\text{CH}_3\text{-N}$), 2.64 (q, 4H, $J=7.5$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 1.53 (s, 6H, CH_3), 1.19 (t, 6H, $J=7.6$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$) ppm.

^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 151.8, 151.1, 137.3 (CH_{Ar}), 135.8, 134.4, 132.4, 129.2 (CH=), 125.9, 115.7 (CH=), 112.3 (CH_{Ar}), 61.1 (CH_2), 40.5 (CH_3), 37.9 (CH_2), 18.7 (CH_2), 14.2 (CH_3), 10.7 (CH_3) ppm.

^{19}F (376 MHz, CDCl_3) δ : -132.3 (q, 2F, $J=12.5$ Hz), -138.6 (q, 2F, $J=12.5$ Hz), -139.3 (q, 2F, $^1J(^{19}\text{F}\text{-}^{11}\text{B}) = 33.2$ Hz) ppm.

^{11}B (128 MHz, CDCl_3) δ : 0.3 (t, $^1J(^{11}\text{B}\text{-}^{19}\text{F}) = 33.2$ Hz) ppm.

HRMS (ESI) m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculated for $\text{C}_{43}\text{H}_{45}\text{BF}_6\text{N}_4\text{OS}$, 791.3390; found 791.3406.

Bodipy and PEG polylactide polymers were synthesized by ring-opening polymerization (ROP) of DL-lactide (Houvenagel et al. 2017) using either Bodipy [3] or PEG as initiators. For polylactide-Bodipy synthesis (PLA-Bodipy), racemic DL-lactide (0.754 g, 5.23×10^{-3} mol, $144 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) and the initiator Bodipy [3] (0.0608 g, 7.7×10^{-5} mol, $790 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) were introduced into a Schlenk under argon atmosphere. For

polylactide-poly(ethylene glycol) polymer synthesis (PLA-PEG₅₀₀₀), OH-PEG-OCH₃ as initiator (0.900 g, 0.18 mmol, 5000 g.mol⁻¹) and racemic DL-lactide (2 g, 1.4×10⁻² mol, 144 g.mol⁻¹) were introduced. In another Schlenk two drops of stannous octoate (0,052 g, 1.28×10⁻⁴ mol, 405 g.mol⁻¹) and 2.7 mL of anhydrous toluene were added. 0.5 mL of the stannous octoate solution was then introduced in the reagent flask. The Schlenk was heated in an oil bath at 130°C for 2 hours under argon. The reaction was then stopped with an ice bath and toluene was evaporated during 30 min. The solid obtained was dissolved in the strict minimum of chloroform and the solute was precipitated in 80 mL cold diethyl ether under vigorous agitation. The supernatant was removed by centrifugation (5000 rpm, 4°C) and the solid dissolved in a minimum of tetrahydrofuran. The solute was once more precipitated in 80 mL distilled water under vigorous agitation. The supernatant was removed by centrifugation (5000 rpm, 4°C), and the solid was freeze-dried (3 or 4 days) to obtain the final polymer PLA-Bodipy **[4]** (625.3 mg, 14500 g.mol⁻¹, 56%, labelling efficiency 97.5%) and final polymer PLA-PEG₅₀₀₀ **[5]** (2.13 g, 12000 g.mol⁻¹, 73%) and polymer PLA-PEG₅₀₀₀ **[6]** (1.526 g, 17100 g.mol⁻¹, 68%). The labelling efficiency was evaluated by NMR and by the maximum peak absorbance of PLA-Bodipy **[4]** and compared to the Bodipy **[3]** calibration curve in DCM (Supplementary information Figure S1 and Table S1).

PLA-Cyanine [8]: cyanine 7-NH₂ (**[7]**) was grafted on an acid terminated polylactide by dicyclohexylcarbodiimide/N-hydroxysuccinimide DCC/NHS coupling. Briefly, 133mg of PLA-CO₂H (133 mg, 0.011 mmol, 12 100 g.mol⁻¹) were introduced with 800 µL DCM into a Schlenk under argon atmosphere. In another Schlenk, DCC (16.6 mg, 0.08 mmol, 206.33 g.mol⁻¹) and NHS (10.2 mg, 0.089 mmol, 115.09 g.mol⁻¹) were dissolved in 600 µL DCM. The two Schlenk mixtures were gathered and stirred at room temperature. After 4 hours, a filtration through a pipette filled with cotton was performed to eliminate the precipitate (dicyclohexylurea). After polylactide activation, the coupling reaction was conducted. Cyanine 7-NH₂ (18 mg, 0.025 mmol, 719.88 g.mol⁻¹) was introduced into a dry Schlenk under inert atmosphere with 900 µL of dry N,N-Dimethylformamide (DMF). The Schlenk was protected from light with aluminum foil. Into another dry Schlenk under argon, 77 µL of DIPEA and 1mL of dry DMF were introduced (0.44 mmol/mL). All the filtered activated PLA from the first step, was introduced with 1.5 mL of dry DCM, into the cyanine Schlenk. 100 µL of the 0.44 M DIPEA solution were introduced into the cyanine Schlenk (0.1 mL, 0.044 mmol, 129.25 g.mol⁻¹). The mixture was stirred during 67 hours at room temperature. The purification was performed by precipitation in cold methanol with a 1: 20 volume ratio and a centrifugation 1 h, 4°C, 20 000 rpm. The operation was repeated 8 times. PLA-cyanine was obtained (36.6 mg, 11 900 g.mol⁻¹, 26% yield and labelling efficiency 22%). The same synthesis was repeated with PLA-CO₂H (386.66 mg, 0.032 mmol, 12 100 g.mol⁻¹), DCC (40 mg, 0.19 mmol, 206.33 g.mol⁻¹) and NHS (21 mg, 0.18mmol, 115.09 g.mol⁻¹). Cyanine 7-NH₂ (47 mg, 0.065 mmol, 719.88 g.mol⁻¹), DIPEA (0.3 mL of 0.43 M, 0.129

mmol, 129.25 g.mol⁻¹). PLA-Cyanine was obtained (145.05 mg, 11 900 g.mol⁻¹, 36% yield, and labelling efficiency 8.4%). The two PLA-Cyanine obtained, were gathered to obtain PLA-Cyanine **[8]** (181.65 mg, 11 700 g.mol⁻¹, labelling efficiency 10.5%, $\bar{M}_n = 1.122$). The labelling efficiency was evaluated by NMR and by the maximum absorption band of PLA-Cyanine and compared to the cyanine 7-NH₂ calibration curve in DCM (Supplementary information Table S1).

2.4.2.2 NMR characterization of polymers

The degrees of polymerization were determined by integration of the NMR signal. For PLA-Bodipy **[4]**, we compared the integration for the 1H at 4.4 ppm, next to the hydroxyl end group to the methine group 5.2 ppm in the PLA repeat unit. (Lei 2005; Inkinen et al. 2011) For PLA-PEG₅₀₀₀ **[5]**, the integration of the 3.64 ppm signal (CH₂ main chain proton of PEG) was compared with the 5.15 ppm signal (CH of the lactyl part). (Liu et al. 2018) The polymer molecular weight was deduced from the degree of polymerization.

PLA-Bodipy [4]: ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.75 (d, 4H_{Ar} Bodipy), 7.56 (d, 2H_{trans} alkene Bodipy), 7.23 (d, 4H_{Ar} Bodipy), 7.04 (d, 2H_{trans} alkene Bodipy), 5.21(m, 192H, CH_{PLA}), 4.39 (q, 1H, CH_{PLA}, linked to OH end group), 3.79 (q, 4H, CH₂ Bodipy), 1.61 (m, 654H, CH₃ PLA), 0.98 (t, 6H, CH₃).

PLA-PEG₅₀₀₀ [6]: ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 5.16 (m, 1H, CH), 4.36 (q, 1H, CH), 3.64 (s, 2,68H, CH₂CH₂), 1.56 (m, 3,27, CH₃).

PLA-Cyanine [8]: ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 5.17 (m, 1H, CH_{PLA}), **1.57** (m, 3H, CH₃ PLA).

2.4.2.3 Mass spectroscopy

High-resolution mass spectrometry data (HRMS) were obtained from the ICSN-CNRS mass spectrometry laboratory at Gif-sur-Yvette (France).

2.4.2.4 Size-exclusion chromatography (SEC)

SEC was performed with two columns from Polymer Laboratories (PL-gel MIXED-D 300 × 7.5 mm, bead diameter 5 μ m; linear part 200 to 4000 00 0 g.mol⁻¹). Analyses were performed at 34 °C in chloroform (HPLC grade) at a flowrate of 1 mL.min⁻¹. Toluene was used as flow-rate marker. Samples were filtered with a 0.2 μ m PTFE filter before analysis. A differential refractive index detector (Spectrasystem RI-150, Thermo Electron Corp.) and a UV-visible detector were used. The calibration curve was based on poly(methyl methacrylate) (PMMA) (range 625-625 500 g.mol⁻¹) standards from

Polymer Laboratories. The Analysis software enabled the determination of the number-average molecular weight M_n , the weight-average molecular weight M_w and the dispersity ($\mathcal{D} = M_w/M_n$).

2.4.2.5 Nanoparticle formulation

Nanoparticles were prepared by the solvent emulsion-evaporation technique (O'Donnell et McGinity 1997; Mura, Hillaireau, Nicolas, Le Droumaguet, et al. 2011) using PLA-PEG₅₀₀₀ mixed either with PLA-Bodipy or PLA-Cyanine at different weight percentages (0, 5, 10, 25, 50% for PLA-Bodipy and 5% for PLA-Cyanine). 100 mg of total polymer were dissolved in 4 mL of DCM. The organic solution was poured in a 20 mL cold solution of sodium cholate (15 g.L⁻¹) and formed, after 30 s vortexing, a pre-emulsion. The pre-emulsion was sonicated 1 minute at 30% of maximum amplitude in an ice bath with a Vibra cell sonicator (Bioblock Scientific, France). The organic solvent was then evaporated during three hours at room temperature, upon magnetic stirring (600 rpm). The nanoparticles suspension was then completed to 20mL to yield a final polymer concentration of 5 mg/mL. The suspensions were stocked in amber vial to avoid photodegradation. Sodium cholate was optionally removed by ultracentrifugation for 1h at 4°C 40 000 rpm (Optima LE-80K Ultracentrifuge Beckman Coulter). The obtained solid was re-suspended in water to a final polymer concentration of 5 mg/mL.

2.4.2.6 Nanoparticle characterization

All nanoparticles' characterizations were done with batches containing sodium cholate, except for Transmission Electron Microscopy (TEM). The hydrodynamic diameter (dynamic light scattering (DLS)), polydispersity index (PDI) and zeta potential were measured using a Zetasizer Nano ZS with a backscatter angle of 173°, a 632.8 nm laser, and at a temperature of 25°C (Malvern, France). Size measurements were performed in triplicate with a 11 times dilution in water. Zeta measurements were done in triplicate after a 10 times dilution in 1mM sodium chloride.

TEM was performed at I2BC (Gif-sur-Yvette, France). Nanoparticle suspensions, exempt of sodium cholate, were diluted ten times. Five microliters of the suspension were first dried on glow-discharged copper grids covered with Formvar-carbon film for one minute. Then a 2% solution of phosphotungstic acid (pH = 7) was deposited on the grid for negative staining. Images were acquired using a JEOL JEM-1400 at 80kV and an Orius camera (Gatan Inc., U.S.A.).

Nanoparticle tracking analysis (NTA) using the NanoSight LM10 instrument (NanoSight, Amesbury, UK) was performed to assess the number of nanoparticles per mL after a 10000-fold dilution in water. The signal was collected using a sCMOS camera and a 405 nm monochromatic laser. For all the experiments, the following parameters were defined in the acquisition software: a camera level of 5 and a detection threshold of 16. Measurements were done in triplicate; mean value and standard deviation are indicated.

2.4.2.7 Photophysical measurements

Measurements were performed in 10 mm path length quartz cuvettes. Absorption spectra were recorded using a Shimadzu UV-visible spectrophotometer UV-2600 with an integrating sphere coated with barium sulfate ISR-2600PLUS to get rid of scattering signal. Transmission measurements were done, with a direct acquisition of the absorbance signal. Fluorescence emission spectra were recorded using a Fluoromax-4 spectrofluorimeter (Jobin-Yvon; Horiba). Intensity signals corrected from the lamp fluctuations and the instrument response function (IRF) were recorded. Solutions were diluted to avoid inner filter effects: absorbance below 0.1 over the whole wavelength range. Moreover, to ensure an accurate comparison of the emission spectra, measured intensities were normalized to account for the absorbance at the excitation wavelength using the formula: $I_{corr} = \frac{I}{1-10^{-A}}$ with A the absorbance at the excitation wavelength. The fluorescence quantum yield for Bodipy **[2]** was determined using Rhodamine-6G in ethanol as a reference (298 K, $\Phi_F = 0.91$ (Magde, Wong, et Seybold 2002) and the equation: $\Phi_F^x = \Phi_F^0 \frac{1-10^{-A_0} S_x}{1-10^{-A_x} S_0} \left(\frac{n_x}{n_0}\right)^2$ where the index and exponent 0 and x correspond to the reference and the Bodipy molecules respectively, Φ_F is the fluorescence quantum yield, A is the absorbance at the excitation wavelength 520 nm, S is the integral of the emission curve and n the refractive index. $n_x = 1.4242$ corresponds to DCM at 25°C and $n_0 = 1.3611$ to ethanol at 25°C. For the Bodipy **[3]** and cyanine dyes (**[7]** and **[8]**), fluorescence absolute quantum yields were determined using an integrating K-sphere from Jobin-Yvon; Horiba. Neutral density filter (Thorlabs) were used to stay in the linear range of the detector. Excitation at 730 nm for Bodipy **[3]** and at 700 nm for cyanine **[7]** and **[8]**.

The lifetime for the Bodipy molecules were measured on a homemade time-correlated single photon counting setup with a titanium-sapphire laser (Tsunami, Spectra Physics) pumped by a doubled Nd:YVO₄ laser (Millenia Xs, Spectra Physics). Light pulses are selected by an acousto-optic crystal and lowered to a repetition rate of 4 MHz. Excitation wavelengths (350-500nm and 300-330nm) are obtained via a second or third harmonic. Samples were studied in solution (standard 1cm quartz

cuvettes) at room temperature. Fluorescence was detected at 90° by a monochromator and a MCP-PMT detector (R3809U-50, Hamamatsu) connected to a TCSPC module from Becker & Hickl (SPC 630). The instrumental response was recorded with a colloidal silica solution 40% in weight (Ludox® HS-40) from Sigma Aldrich and had a typical full width at half-maximum of ~25 ps.

The lifetime for the cyanine dyes (**[7]** and **[8]**) were measured with the Horiba Scientific NanoLED-785L (950 V, 781 nm, <200 ps, serial number 16601) in a 10 mm path length quartz cuvette on the Fluoromax-4 (Jobin-Yvon; Horiba). The emission was collected at 800 nm, with slits width 6 nm and a preset peak of 12 000 counts. For both, cyanine and Bodipy, the lamp signal was collected with a colloidal silica solution 40% in weight (Ludox® HS-40) from Sigma Aldrich to diffuse the excitation light.

All fluorescence decays were fitted using the Levenberg–Marquardt algorithm, a mono-exponential function and a non-linear least-squares fit. Fit quality was estimated thanks to the variance of weight residuals χ^2 . Good fit quality was estimated with $\chi^2 < 1.2$. The cyanine dyes were dissolved in DCM and absorbance value adjusted to be lower than 0.1.

2.4.2.8 Molar extinction coefficient of NPs and Bodipy titration in NPs

The amount of Bodipy per nanoparticle was calculated after determining the nanoparticles concentration (C_{NP}) (part/mL) using NTA and the total amount of Bodipy in the suspension. For this, 2 mL of the suspension was freeze-dried, the solid obtained was dissolved in DCM in a 25 mL volumetric flask and the absorption at 757 nm was measured. We obtained a PLA-Bodipy solution in DCM, as NPs dissolved in this solvent. The PLA-Bodipy concentration (C_{Bodipy}) was then determined with a calibration curve (Beer-Lambert's law) of PLA-Bodipy absorption at 757 nm in DCM as a function of its concentration (slope: $\epsilon_{PLA-Bodipy} = 78\,000\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, DCM, 757 nm). A calibration curve was also obtained for Bodipy **[3]** in DCM (slope: $\epsilon_{Bodipy} = 80\,000\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, DCM, 757 nm). Assuming a homogenous distribution of Bodipy in each nanoparticle, we can deduce the average Bodipy number per NP (Figure 2.3) from the ratio of experimental Bodipy concentration C_{Bodipy} and C_{NP} .

2.4.2.9 Photostability

Samples were irradiated with a desk lamp (Philips eco classic 4B, 42 W, 230 V, 2800 K, 630 lumens) at 30cm distance, in 10 mm path length quartz cuvettes. The fluence was measured in two different ways: one with SP Lite2 pyranometer and one

with a Thorlabs power meter at 633 nm, microscope slide photodiode power sensor S170C, PD100D consol, 18 mm x 18 mm. The mean fluence, on three values, was determined for each irradiation time. The desk lamp fluence was constant during all the irradiation experiment, $31.1 \pm 1.5 \text{ W.m}^{-2}$. The desk lamp emission spectrum was measured with an Ocean-HDX-VIS-NIR VIS-NIR spectrometer 350-1000 nm with 10 μm slit and a UV/vis 2 meters 1000 μm premium fiber. A continuous emission spectrum was obtained from 340-920nm, with a maximum around 670-750 nm (Figure S3). Before irradiation, each sample was diluted to fix the optical density close to 0.06-0.07. Samples were then continuously irradiated for 801 minutes, except during spectral measurements.

2.4.2.10 Photoacoustic spectrum measurements

Photoacoustic (PA) spectra of NP suspensions were measured with a calibrated PA spectrometer described in detail in (Sarkar et al. 2021). Briefly, optical excitation was generated with a tunable (680-980 nm) nanosecond Laser (pulse repetition rate: 20Hz, pulse width <8ns, SpitLight 600 OPO, Innolas, Germany). The optical wavelength was scanned from 680 nm to 970 nm in 10 nm steps. To measure potential photodegradation, the per-pulse tunability of the laser was used and successive laser pulses had a different optical wavelength. A total of 15 scans were performed (450 successive laser pulses). Ultrasound (US) detection was performed with an US array (L7-4, ATL, USA) driven by a programmable US machine (Vantage, Verasonics, USA). Samples (15 μL) were injected in PTFE tubes (inner diameter: 0.3 mm, Bola, Germany) with a 50 μL glass syringe. Excitation light on the sample had a maximum fluence of 4.5mJ.cm^{-2} and 1.5 cm of the tube was illuminated. The tube and the US detector were immersed in a water tank at room temperature for acoustic coupling. The PA spectrometer was calibrated with a solution of $\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$ at a concentration of 0.25M. Following this calibration, samples were injected successively in the same tube. We verified that no detectable absorption remained in the tube between 2 samples by systematically measuring a background reference (water). No noticeable change in the measured spectra was observed over the 15 scans, and the iterations were then used to increase the signal to noise ratio. Photostability to PA excitation was also tested by acquiring PA images at 757 nm for 900 successive pulses. The PA spectra were computed and converted in spectroscopic units (photoacoustic absorbance: PABs). The photoacoustic generation efficiency (PGE) is a measure of the conversion efficiency of optical energy into pressure (Werner et al. 2020b). Here, we use a dimensionless PGE equal to 1.0 for a sample for which the absorbed optical energy is fully converted into pressure in a medium with the Grüneisen coefficient of the water. The conversion of the measured spectra in PABs was performed using a PGE of 1.2 for the solution of $\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$ used for the calibration, due to the Grüneisen coefficient of the solution. For the measured samples, their PGE was measured as the slope of the linear relation

between absorbance and Photoacoustic Absorbance (PAbs). PAbs was plotted as a function of the absorbance for different sample concentration. A linear fit of the curve gives access to PGE. PA spectrum measurements were performed at the Life Imaging Facility of Paris Descartes University (Plateforme Imageries du Vivant – PIV).

2.4.2.11 Cell viability

The murine macrophage cell line J774.1 was obtained from American Type Culture Collection and cultured in high glucose - Dulbecco's Modified Eagle's Medium medium (Sigma), supplemented and 10 % fetal bovin serum (FBS) (Gibco) and with 50 U mL⁻¹ penicillin and 50 µg mL⁻¹ streptomycin (Sigma). The cell line was maintained at 37°C in a 5% CO₂ humid atmosphere. Twice a week, cells were divided by scrapping at a ratio ranging from 1:4 to 1:6. Cells were used at low passages after thawing, between 3 to 15, and harvested at a maximum confluence of 70-80%. The MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] assay was used to evaluate the cytotoxicity of the different treatments (unlabeled NPs, Bodipy-labeled NPs (**NP-25%** PLA-Bodipy)). This colorimetric test measures the mitochondrial dehydrogenase cell activity, an indicator of cell viability. The assay is based on the reduction, by living cells, of the tetrazolium salt, MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), which forms a blue formazan product. Cells were seeded into 96-well plates (TPP) with 100 µL of complete medium per well at a density of 3000 cells per well. After 24 hours incubation, a series of increasing concentrations of treatments was prepared in complete growth media. Cells were exposed to 100 µL of the treatment for 48 hours. Afterwards, 20 µL of a 5 mg.mL⁻¹ MTT solution (Sigma) prepared in PBS (Sigma) were then added in each well and incubated at 37°C for 1 hour. The medium was then discarded and 200 µL of dimethyl sulfoxide (DMSO) were added to dissolve formazan crystals. The absorbance was measured at 570 nm with a microplate reader (Labsystems Multiskan MS). The percentage of viable cells was calculated as the absorbance ratio of treated to untreated cells. All measurements were performed in 6 replicates (6 wells) at each experiment. All experiments were repeated three times (n=3) to determine mean and standard deviation.

2.4.2.12 In vivo evaluation

In vivo experimental procedures using BALB/c mice were approved by the ethical committee No 026 and by the French ministry of education and research (Accepted protocol No 2842-2015110914248481_v5). Male BALB/c mice, 10-12 weeks old, 15-22g, were purchased from Envigo (Gannat, France) and let for one week after shipping for adaptation before starting experiments. Mice were housed with access to water and food *ad libitum* and maintained at a constant temperature (19-22°C) and relative

humidity (45-65%). Mice were shaven prior to positioning on a stand maintained at 42°C. 200 µL of Bodipy-labeled NPs (**NP-50%** at a concentration of 25 mg/mL polymer) were injected intravenously in the tail vein as a bolus and mice were imaged by two-dimensional (2D) ultrasonography for organ detection and 2D photoacoustic images were acquired using the LAZR system (Visualsonics, Fujifilm, The Netherlands) and a 25 MHz ultrasound probe (MX250). Series of PAI images at single-wavelength (750 nm) were acquired during the bolus injection in the kidney region or at the base of the tail in the prone position. During the bolus injection, the image acquisition rate was 20 frame.s⁻¹. This image sequence was acquired to verify that NPs could be detected *in vivo* from the additional optical absorption that they provide. Additionally, spectral measurements were performed by sequentially acquiring PA images at optical wavelengths between 680 nm and 900 nm by steps of 5 nm (total of 45 wavelengths). This spectral image sequence was performed before, just after (5 min) and 4 hours after injection of the bolus to check if NPs were still circulating. Regions-of-interest (ROIs) were selected on the spectral image sequence and experimental PA spectra were obtained by averaging the pixel values over each ROIs at each optical wavelength. This spatial averaging was used to mitigate artifacts caused by the breathing motion of the animal. The obtained PA spectra were then processed to discriminate the signal of the NPs from the signal of the oxyhemoglobin and deoxyhemoglobin based on their respective absorption spectra. More specifically, unmixing of the experimental PA spectra was performed with a least squares (*LSQR*) algorithm with a non-negative constrain assuming three different absorbers (even for the acquisition before the injection to avoid a bias): oxyhemoglobin, deoxyhemoglobin and the labelled NPs. We used tabulated absorption spectra of the oxy and deoxy hemoglobin (HbO₂ and Hb) (<https://omlc.org/spectra/hemoglobin/>) and the absorption spectrum of the labeled NPs as an input of the unmixing algorithm and we obtained the weight of each absorption spectrum in the experimental spectrum.

2.5 ACKNOWLEDGEMENTS

We sincerely thank Ludivine Houel-Renault and the "Centre de Photonique pour la biologie et les matériaux" (CPBM) for the loan of the Thorlab powermeter and the Ocean-HDX-VIS-NIR VIS-NIR spectrometer and Elise Michel for assistance in the synthesis of Bodipy. We thank very sincerely IUT Orsay département Mesures physiques and Anne Migan-Dubois and Florian-Rabah Monsef and Claude Frappart for the loan of the pyranometer. This project has received funding by the French National Research Agency under the program ANR-21-CE09-0024-01. RMR thanks the Région Ile-de-France and DIM NanoK for financial support as well as CHARMMMAT LabEx. The University Paris-Saclay and the CNRS are acknowledged for funding as well as Région Ile de France for the LAZR photoacoustic set-up (Sésame).

This work was supported by a grant from the Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, Contrat Doctoral Spécifique Normalien, for Jean-Baptiste BODIN's Ph.D. thesis (ED 2MIB N°571).

This project has received financial support from the CNRS through the MITI interdisciplinary programs (Defi Imag'IN).

2.6 REFERENCES

- Amat-Guerri, Francisco, Marta Liras, María Luisa Carrascoso, et Roberto Sastre. 2003. « Methacrylate-tethered Analogs of the Laser Dye PM567—Synthesis, Copolymerization with Methyl Methacrylate and Photostability of the Copolymers†† ». *Photochemistry and Photobiology* 77 (6): 577-84. [https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2003\)0770577MAOTLD2.0.CO2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2003)0770577MAOTLD2.0.CO2).
- Aragao-Santiago, Leticia, Hervé Hillaireau, Nadège Grabowski, Simona Mura, Thais L. Nascimento, Sandrine Dufort, Jean-Luc Coll, Nicolas Tsapis, et Elias Fattal. 2016. « Compared in Vivo Toxicity in Mice of Lung Delivered Biodegradable and Non-Biodegradable Nanoparticles ». *Nanotoxicology* 10 (3): 292-302. <https://doi.org/10.3109/17435390.2015.1054908>.
- Beard, Paul. 2011. « Biomedical Photoacoustic Imaging ». *Interface Focus* 1 (4): 602-31. <https://doi.org/10.1098/rsfs.2011.0028>.
- Beziere, Nicolas, Neus Lozano, Antonio Nunes, Juan Salichs, Daniel Queiros, Kostas Kostarelos, et Vasilis Ntziachristos. 2015. « Dynamic Imaging of PEGylated Indocyanine Green (ICG) Liposomes within the Tumor Microenvironment Using Multi-Spectral Optoacoustic Tomography (MSOT) ». *Biomaterials* 37 (janvier): 415-24. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.10.014>.
- Boens, Noël, Bram Verbelen, et Wim Dehaen. 2015. « Postfunctionalization of the BODIPY Core: Synthesis and Spectroscopy ». *European Journal of Organic Chemistry* 2015 (30): 6577-95. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201500682>.
- Boissenot, Tanguy, Elias Fattal, Alexandre Bordat, Sophie Houvenagel, Julien Valette, Hélène Chacun, Claire Gueutin, et Nicolas Tsapis. 2016. « Paclitaxel-Loaded PEGylated Nanocapsules of Perfluorooctyl Bromide as Theranostic Agents ». *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 108 (novembre): 136-44. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.08.017>.
- Borg, Raymond E., et Jonathan Rochford. 2018. « Molecular Photoacoustic Contrast Agents: Design Principles & Applications ». *Photochemistry and Photobiology* 94 (6): 1175-1209. <https://doi.org/10.1111/php.12967>.
- Chibani, Siwar, Boris Le Guennic, Azzam Charaf-Eddin, Adèle D. Laurent, et Denis Jacquemin. 2013. « Revisiting the Optical Signatures of BODIPY with Ab Initio Tools ». *Chemical Science* 4 (5): 1950-63. <https://doi.org/10.1039/C3SC22265A>.

- Crommelin, Daan J. A., et Alexander T. Florence. 2013. « Towards More Effective Advanced Drug Delivery Systems ». *International Journal of Pharmaceutics* 454 (1): 496-511. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.02.020>.
- Di Mascolo, Daniele, Christopher J. Lyon, Santosh Aryal, Maricela R. Ramirez, Jun Wang, Patrizio Candeloro, Michele Guindani, Willa A. Hsueh, et Paolo Decuzzi. 2013. « Rosiglitazone-Loaded Nanospheres for Modulating Macrophage-Specific Inflammation in Obesity ». *Journal of Controlled Release* 170 (3): 460-68. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.06.012>.
- Dumas-Verdes, Cécile, Fabien Miomandre, Eve Lépiciér, Olivier Galangau, Thanh Truc Vu, Gilles Clavier, Rachel Méallet-Renault, et Pierre Audebert. 2010. « BODIPY-Tetrazine Multichromophoric Derivatives ». *European Journal of Organic Chemistry* 2010 (13): 2525-35. <https://doi.org/10.1002/ejoc.200900874>.
- Filatov, Mikhail A. 2019. « Heavy-Atom-Free BODIPY Photosensitizers with Intersystem Crossing Mediated by Intramolecular Photoinduced Electron Transfer ». *Organic & Biomolecular Chemistry* 18 (1): 10-27. <https://doi.org/10.1039/C9OB02170A>.
- Fortino, Mariagrazia, Elisabetta Collini, Alfonso Pedone, et Julien Bloino. 2020. « Role of Specific Solute–Solvent Interactions on the Photophysical Properties of Distyryl Substituted BODIPY Derivatives ». *Physical Chemistry Chemical Physics* 22 (19): 10981-94. <https://doi.org/10.1039/D0CP00034E>.
- Fuenzalida Werner, Juan Pablo, Kanuj Mishra, Yuanhui Huang, Paul Vetschera, Sarah Glasl, Andriy Chmyrov, Klaus Richter, Vasilis Ntziachristos, et Andre C. Stiel. 2019. « Structure-Based Mutagenesis of Phycobiliprotein smURFP for Optoacoustic Imaging ». *ACS Chemical Biology* 14 (9): 1896-1903. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.9b00299>.
- Galangau, Olivier, Cécile Dumas-Verdes, Rachel Méallet-Renault, et Gilles Clavier. 2010. « Rational Design of Visible and NIR Distyryl-BODIPY Dyes from a Novel Fluorinated Platform ». *Organic & Biomolecular Chemistry* 8 (20): 4546-53. <https://doi.org/10.1039/C004812G>.
- García-Moreno, I., A. Costela, L. Campo, R. Sastre, F. Amat-Guerri, M. Liras, F. López Arbeloa, J. Bañuelos Prieto, et I. López Arbeloa. 2004. « 8-Phenyl-Substituted Dipyrromethene-BF₂ Complexes as Highly Efficient and Photostable Laser Dyes ». *The Journal of Physical Chemistry A* 108 (16): 3315-23. <https://doi.org/10.1021/jp0312464>.
- Gómez-Gaete, Carolina, Nicolas Tsapis, Madeleine Besnard, Amélie Bochot, et Elias Fattal. 2007. « Encapsulation of Dexamethasone into Biodegradable Polymeric Nanoparticles ». *International Journal of Pharmaceutics* 331 (2): 153-59. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.11.028>.
- Grabowski, Nadège, Hervé Hillaireau, Juliette Vergnaud, Letícia Aragão Santiago, Saadia Kerdine-Romer, Marc Pallardy, Nicolas Tsapis, et Elias Fattal. 2013. « Toxicity of Surface-Modified PLGA Nanoparticles toward Lung Alveolar

- Epithelial Cells ». *International Journal of Pharmaceutics* 454 (2): 686-94. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.05.025>.
- Grabowski, Nadège, Hervé Hillaireau, Juliette Vergnaud, Nicolas Tsapis, Marc Pallardy, Saadia Kerdine-Römer, et Elias Fattal. 2015. « Surface Coating Mediates the Toxicity of Polymeric Nanoparticles towards Human-like Macrophages ». *International Journal of Pharmaceutics* 482 (1-2): 75-83. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.11.042>.
- Houvenagel, Sophie, Guilherme Picheth, Camille Dejean, Annie Brûlet, Alexis Chennevière, Olivier Couture, Nicolas Huang, Laurence Moine, et Nicolas Tsapis. 2017. « End-Chain Fluorination of Polyesters Favors Perfluorooctyl Bromide Encapsulation into Echogenic PEGylated Nanocapsules ». *Polymer Chemistry* 8 (16): 2559-70. <https://doi.org/10.1039/C7PY00400A>.
- Hu, Wenbo, Hengheng Ma, Bing Hou, Hui Zhao, Yu Ji, Rongcui Jiang, Xiaoming Hu, et al. 2016. « Engineering Lysosome-Targeting BODIPY Nanoparticles for Photoacoustic Imaging and Photodynamic Therapy under Near-Infrared Light ». *ACS Applied Materials & Interfaces* 8 (19): 12039-47. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b02721>.
- Hui, Yue, Xin Yi, Fei Hou, David Wibowo, Fan Zhang, Dongyuan Zhao, Huajian Gao, et Chun-Xia Zhao. 2019. « Role of Nanoparticle Mechanical Properties in Cancer Drug Delivery ». *ACS Nano* 13 (7): 7410-24. <https://doi.org/10.1021/acsnano.9b03924>.
- Inkinen, Saara, Minna Hakkarainen, Ann-Christine Albertsson, et Anders Södergård. 2011. « From Lactic Acid to Poly(Lactic Acid) (PLA): Characterization and Analysis of PLA and Its Precursors ». *Biomacromolecules* 12 (3): 523-32. <https://doi.org/10.1021/bm101302t>.
- Israelachvili, Jacob N. 2011. *Intermolecular and Surface Forces*. Elsevier Science.
- Kim, Chulhong, Kwang Hyun Song, Feng Gao, et Lihong V. Wang. 2010. « Sentinel Lymph Nodes and Lymphatic Vessels: Noninvasive Dual-Modality in Vivo Mapping by Using Indocyanine Green in Rats--Volumetric Spectroscopic Photoacoustic Imaging and Planar Fluorescence Imaging ». *Radiology* 255 (2): 442-50. <https://doi.org/10.1148/radiol.10090281>.
- Lammers, T., L. Y. Rizzo, G. Storm, et F. Kiessling. 2012. « Personalized Nanomedicine ». *Clinical Cancer Research* 18 (18): 4889-94. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-1414>.
- Lei, Ziqiang. 2005. « Synthesis of High Molecular Weight Polylactic Acid from Aqueous Lactic Acid Co-Catalyzed by Tin(II)Chloride Dihydrate and Succinic Anhydride ». *Chinese Science Bulletin* 50 (20): 2390. <https://doi.org/10.1360/982005-1208>.
- Lemaster, Jeanne E., et Jesse V. Jokerst. 2017. « What Is New in Nanoparticle-Based Photoacoustic Imaging?: What Is New in Nanoparticle-Based Photoacoustic Imaging? » *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* 9 (1): e1404. <https://doi.org/10.1002/wnan.1404>.

- Liu, Xue, Yanxiang Wang, Peng Yun, Xin Shen, Feng Su, Yangsheng Chen, Suming Li, et Danqing Song. 2018. « Self-Assembled Filomicelles Prepared from Polylactide-Poly(Ethylene Glycol) Diblock Copolymers for Sustained Delivery of Cycloprotoberberine Derivatives ». *Saudi Pharmaceutical Journal* 26 (3): 342-48. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2018.01.008>.
- Loudet, Aureole, et Kevin Burgess. 2007. « BODIPY Dyes and Their Derivatives: Syntheses and Spectroscopic Properties ». *Chemical Reviews* 107 (11): 4891-4932. <https://doi.org/10.1021/cr078381n>.
- Magde, Douglas, Roger Wong, et Paul G. Seybold. 2002. « Fluorescence Quantum Yields and Their Relation to Lifetimes of Rhodamine 6G and Fluorescein in Nine Solvents: Improved Absolute Standards for Quantum Yields† ». *Photochemistry and Photobiology* 75 (4): 327-34. [https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2002\)0750327FQYATR2.0.CO2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2002)0750327FQYATR2.0.CO2).
- Merkes, Jean Michél, Twan Lammers, Rajesh Kancherla, Magnus Rueping, Fabian Kiessling, et Srinivas Banala. 2020. « Tuning Optical Properties of BODIPY Dyes by Pyrrole Conjugation for Photoacoustic Imaging ». *Advanced Optical Materials* 8 (11): 1902115. <https://doi.org/10.1002/adom.201902115>.
- Miki, Koji, Akane Enomoto, Tatsuhiro Inoue, Tatsuya Nabeshima, Sousuke Saino, Soji Shimizu, Hideki Matsuoka, et Kouichi Ohe. 2017. « Polymeric Self-Assemblies with Boron-Containing Near-Infrared Dye Dimers for Photoacoustic Imaging Probes ». *Biomacromolecules* 18 (1): 249-56. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.6b01568>.
- Mura, Simona, Hervé Hillaireau, Julien Nicolas, Saadia Kerdine-Römer, Benjamin Le Droumaguet, Claudine Deloménie, Valérie Nicolas, Marc Pallardy, Nicolas Tsapis, et Elias Fattal. 2011. « Biodegradable Nanoparticles Meet the Bronchial Airway Barrier: How Surface Properties Affect Their Interaction with Mucus and Epithelial Cells ». *Biomacromolecules* 12 (11): 4136-43. <https://doi.org/10.1021/bm201226x>.
- Mura, Simona, Herve Hillaireau, Julien Nicolas, Benjamin Le Droumaguet, Claire Gueutin, Sandrine Zanna, Nicolas Tsapis, et Elias Fattal. 2011. « Influence of Surface Charge on the Potential Toxicity of PLGA Nanoparticles towards Calu-3 Cells ». *International Journal of Nanomedicine* 6: 2591-2605. <https://doi.org/10.2147/IJN.S24552>.
- Ni, Yong, Ravi K. Kannadorai, Juanjuan Peng, Sidney W.-K. Yu, Young-Tae Chang, et Jishan Wu. 2016. « Naphthalene-Fused BODIPY near-Infrared Dye as a Stable Contrast Agent for in Vivo Photoacoustic Imaging ». *Chemical Communications* 52 (77): 11504-7. <https://doi.org/10.1039/C6CC05126J>.
- Ni, Yong, Ravi Kumar Kannadorai, Sidney W.-K. Yu, Young-Tae Chang, et Jishan Wu. 2017. « Push-Pull Type Meso-Ester Substituted BODIPY near-Infrared Dyes as Contrast Agents for Photoacoustic Imaging ». *Organic & Biomolecular Chemistry* 15 (21): 4531-35. <https://doi.org/10.1039/C7OB00965H>.

- O'Donnell, Patrick B, et James W McGinity. 1997. « Preparation of Microspheres by the Solvent Evaporation Technique ». *Advanced Drug Delivery Reviews*, Biodegradable Microspheres/Therapeutic Peptide Delivery, 28 (1): 25-42. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(97\)00049-5](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(97)00049-5).
- Pietzonka, Peter, Barbara Rothen-Rutishauser, Peter Langguth, Heidi Wunderli-Allenspach, Elke Walter, et Hans P. Merkle. 2002. « Transfer of Lipophilic Markers from PLGA and Polystyrene Nanoparticles to Caco-2 Monolayers Mimics Particle Uptake ». *Pharmaceutical Research* 19 (5): 595-601. <https://doi.org/10.1023/a:1015393710253>.
- Pu, Kanyi, Adam J. Shuhendler, Jesse V. Jokerst, Jianguo Mei, Sanjiv S. Gambhir, Zhenan Bao, et Jianghong Rao. 2014. « Semiconducting Polymer Nanoparticles as Photoacoustic Molecular Imaging Probes in Living Mice ». *Nature Nanotechnology* 9 (3): 233-39. <https://doi.org/10.1038/nnano.2013.302>.
- Reisch, Andreas, Pascal Didier, Ludovic Richert, Sule Oncul, Youri Arntz, Yves Mély, et Andrey S. Klymchenko. 2014. « Collective Fluorescence Switching of Counterion-Assembled Dyes in Polymer Nanoparticles ». *Nature Communications* 5 (1): 1-9. <https://doi.org/10.1038/ncomms5089>.
- Rejinold, N. Sanoj, Goeun Choi, et Jin-Ho Choy. 2021. « Recent Developments on Semiconducting Polymer Nanoparticles as Smart Photo-Therapeutic Agents for Cancer Treatments—A Review ». *Polymers* 13 (6): 981. <https://doi.org/10.3390/polym13060981>.
- Reul, Regina, Nicolas Tsapis, Hervé Hillaireau, Lucie Sancey, Simona Mura, Marion Recher, Julien Nicolas, Jean-Luc Coll, et Elias Fattal. 2012. « Near Infrared Labeling of PLGA for in Vivo Imaging of Nanoparticles ». *Polymer Chemistry* 3 (3): 694-702. <https://doi.org/10.1039/C2PY00520D>.
- Sarkar, Mitradeep, Théotim Lucas, Yoann Atlas, Gilles Renault, Florence Gazeau, et Jérôme Gateau. 2021. « Calibrated Photoacoustic Spectrometer for in Vitro Characterization of Contrast Agents Based on a Standard Imaging System ». <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-02509232>.
- Saxena, Vishal, Mostafa Sadoqi, et Jun Shao. 2004. « Enhanced Photo-Stability, Thermal-Stability and Aqueous-Stability of Indocyanine Green in Polymeric Nanoparticulate Systems ». *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 74 (1): 29-38. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2004.01.002>.
- Schmitt, Alexander, Babette Hinkeldey, Mandy Wild, et Gregor Jung. 2009. « Synthesis of the Core Compound of the BODIPY Dye Class: 4,4'-Difluoro-4-Bora-(3a,4a)-Diaza-s-Indacene ». *Journal of Fluorescence* 19 (4): 755-58. <https://doi.org/10.1007/s10895-008-0446-7>.
- Taylor, Ulrike, Christoph Rehbock, Carmen Streich, Detlef Rath, et Stephan Barcikowski. 2014. « Rational Design of Gold Nanoparticle Toxicology Assays: A Question of Exposure Scenario, Dose and Experimental Setup ». *Nanomedicine (London, England)* 9 (13): 1971-89. <https://doi.org/10.2217/nnm.14.139>.

- Veronese, Francesco M., et Gianfranco Pasut. 2005. « PEGylation, Successful Approach to Drug Delivery ». *Drug Discovery Today* 10 (21): 1451-58. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(05\)03575-0](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(05)03575-0).
- Vives, Guillaume, Carlo Giansante, Robin Bofinger, Guillaume Raffy, André Del Guerzo, Brice Kauffmann, Pinar Batat, Gediminas Jonusauskas, et Nathan D. McClenaghan. 2011. « Facile Functionalization of a Fully Fluorescent Perfluorophenyl BODIPY: Photostable Thiol and Amine Conjugates ». *Chemical Communications* 47 (37): 10425-27. <https://doi.org/10.1039/C1CC13778F>.
- Vu-Quang, Hieu, Mads Sloth Vinding, Maria Jakobsen, Ping Song, Frederik Dagnaes-Hansen, Niels Chr Nielsen, et Jørgen Kjems. 2019. « Imaging Rheumatoid Arthritis in Mice Using Combined Near Infrared and ¹⁹F Magnetic Resonance Modalities ». *Scientific Reports* 9 (1): 14314. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50043-0>.
- Wang, Qin, et Xun Sun. 2017. « Recent Advances in Nanomedicines for the Treatment of Rheumatoid Arthritis ». *Biomaterials Science* 5 (8): 1407-20. <https://doi.org/10.1039/C7BM00254H>.
- Weber, Judith, Paul C. Beard, et Sarah E. Bohndiek. 2016. « Contrast Agents for Molecular Photoacoustic Imaging ». *Nature Methods* 13 (8): 639-50. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3929>.
- Werner, Juan Pablo Fuenzalida, Yuanhui Huang, Kanuj Mishra, Robert Janowski, Paul Vetschera, Andriy Chmyrov, Dierk Niessing, Vasilis Ntziachristos, et Andre C. Stiel. 2020a. « Challenging a Preconception: Optoacoustic Spectrum Differs from the Absorption Spectrum of Proteins and Dyes for Molecular Imaging ». *BioRxiv*, février, 2020.02.01.930230. <https://doi.org/10.1101/2020.02.01.930230>.
- Xu, Mengke, Chi Zhang, Ziling Zeng, et Kanyi Pu. 2021. « Semiconducting Polymer Nanoparticles as Activatable Nanomedicines for Combinational Phototherapy ». *ACS Applied Polymer Materials* 3 (9): 4375-89. <https://doi.org/10.1021/acsp.1c00695>.
- Xu, Peisheng, Emily Gullotti, Ling Tong, Christopher B. Highley, Divya R. Errabelli, Tayyaba Hasan, Ji-Xin Cheng, Daniel S. Kohane, et Yoon Yeo. 2009. « Intracellular Drug Delivery by Poly(lactic-co-glycolic acid) Nanoparticles, Revisited ». *Molecular Pharmaceutics* 6 (1): 190-201. <https://doi.org/10.1021/mp800137z>.
- Yuan, Fang, Ling-dong Quan, Liao Cui, Steven R. Goldring, et Dong Wang. 2012. « Development of Macromolecular Prodrug for Rheumatoid Arthritis ». *Advanced Drug Delivery Reviews*, Targeted delivery of therapeutics to bone and connective tissues, 64 (12): 1205-19. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.03.006>.
- Zhang, Qiangzhe, Diana Dehaini, Yue Zhang, Julia Zhou, Xiangyu Chen, Lifan Zhang, Ronnie H. Fang, Weiwei Gao, et Liangfang Zhang. 2018. « Neutrophil Membrane-Coated Nanoparticles Inhibit Synovial Inflammation and Alleviate Joint Damage in Inflammatory Arthritis ». *Nature Nanotechnology* 13 (12): 1182-90. <https://doi.org/10.1038/s41565-018-0254-4>.

2.7 SUPPORTING INFORMATION

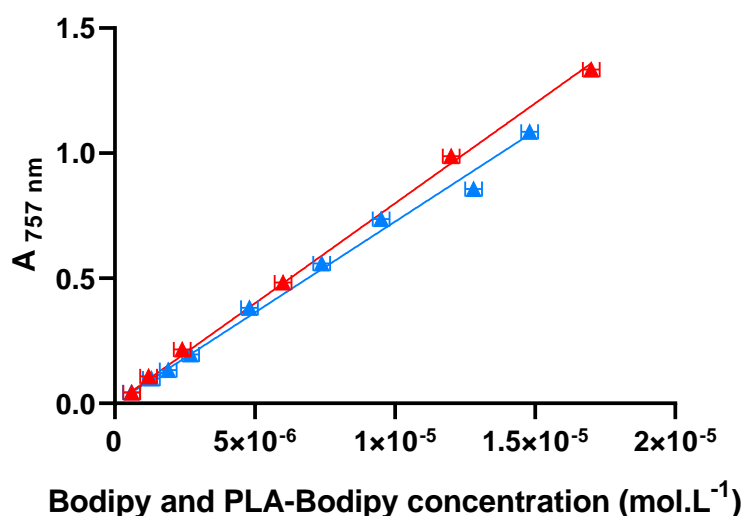


Figure S1 Calibration curve for PLA-Bodipy **[4]** (Blue) and Bodipy **[3]** (red). Absorbance was measured at 757 nm in DCM. Linear fit was forced to pass through the (0;0) origin point. $\epsilon_{\text{Bodipy [3]}} = 80\,000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ $R^2 = 0,998$; $\epsilon_{\text{PLA-Bodipy}} = 78\,000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ $R^2 = 0,9985$.

Type	Mn [g.mol ⁻¹]	\bar{D}	Mw [g.mol ⁻¹]	Labelling efficiency [%]
[4] PLA-Bodipy	14 500 ± 600	1.60 ± 0.05	22 500 ± 200	97.5%
[5] PLA-PEG ₅₀₀₀	12 000	-	-	-
[6] PLA-PEG ₅₀₀₀	17 100	1.20	12 900	-
[8] PLA-Cyanine	11 700	1.122	13 140	10.5%

Table S1 Polymer characteristics. Mn (number-average molecular weight), Mw (weight-average molecular weight), dispersity ($\bar{D} = \text{Mw}/\text{Mn}$) were determined thanks to SEC. The labelling efficiency was determined by UV-visible spectroscopy.

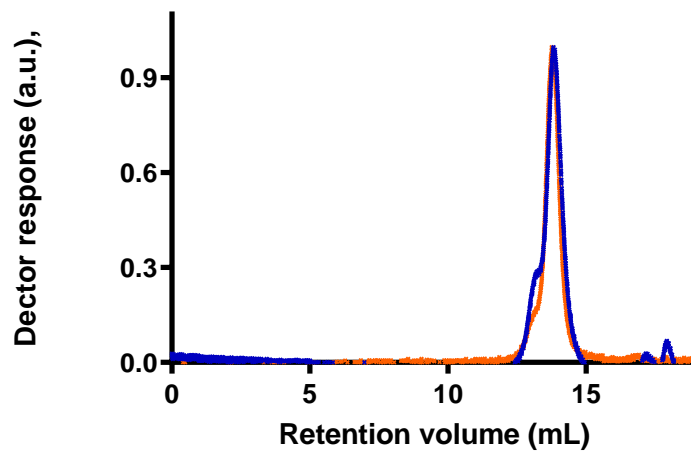


Figure S2 Size exclusion chromatogram of PLA-Bodipy [4]. Refractive index detector in blue. Absorption signal at 370 nm in Orange.

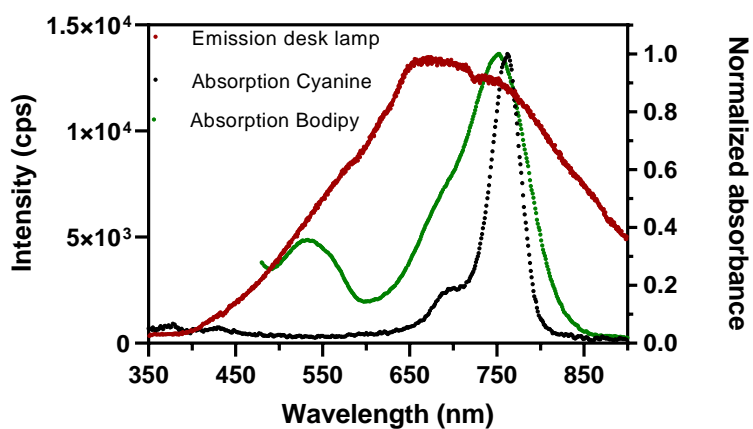


Figure S3 Desk lamp emission spectrum in red. Bodipy [3] absorption spectrum in DCM in green and Cyanine 7-NH₂ DCM absorption spectrum in dark black.

	$\lambda_{\max\text{abs}}$ [nm]	$\lambda_{\max\text{em}}^{\ddagger}$ [nm]	D_{Stokes} [cm ⁻¹]	$\lambda_{\max\text{PA}}$ [nm]
[1]	544	559*	493	-
[2]	544	559*	493	-
[3]	753	818	1055	745 ± 5 nm
PLA-Bodipy [4]	753	821	1100	749 ± 5 nm
Bodipy NP-5%	757	814	925	749 ± 5 nm
Bodipy NP-10%	756	817	988	752 ± 5 nm
Bodipy NP-25%	761	821	960	756 ± 5 nm
Bodipy NP-50%	760	826	1051	758 ± 5 nm
Cyanine 7-NH2 [7]	762	778	270	-
PLA-Cyanine [8]	762	780	303	759 ± 5 nm
Cyanine NP-5%	761	779	304	759 ± 5 nm

Table S2 Summary of spectroscopic properties. The NPs were studied in water, the molecules and polymers were studied in DCM. † Excitation at 670 nm, slits width 10 nm.

* Excitation 520 nm, slit width 2 nm.

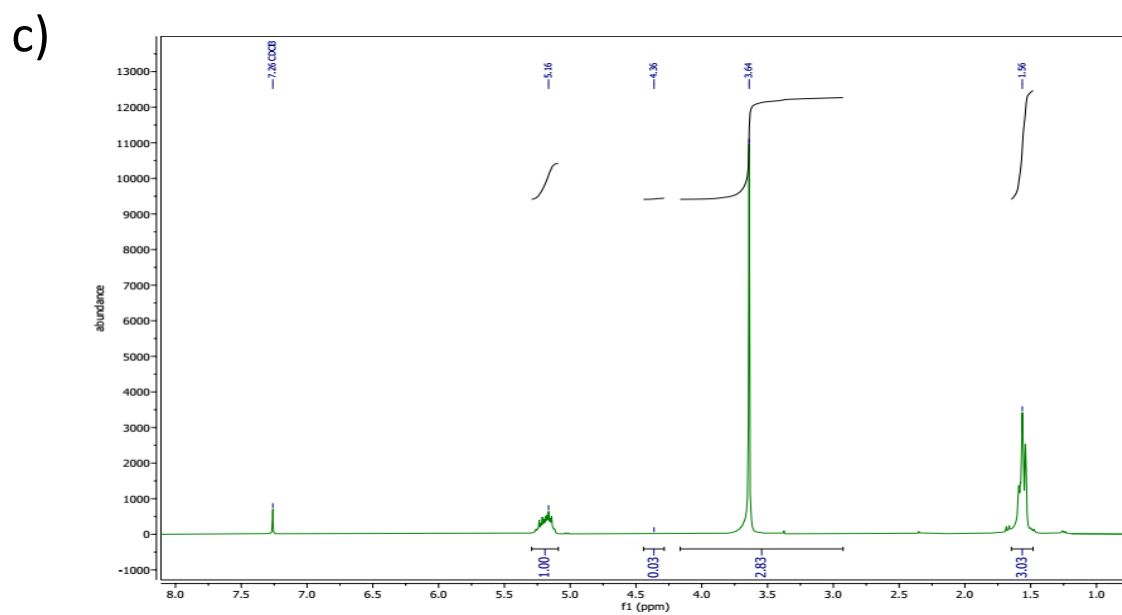
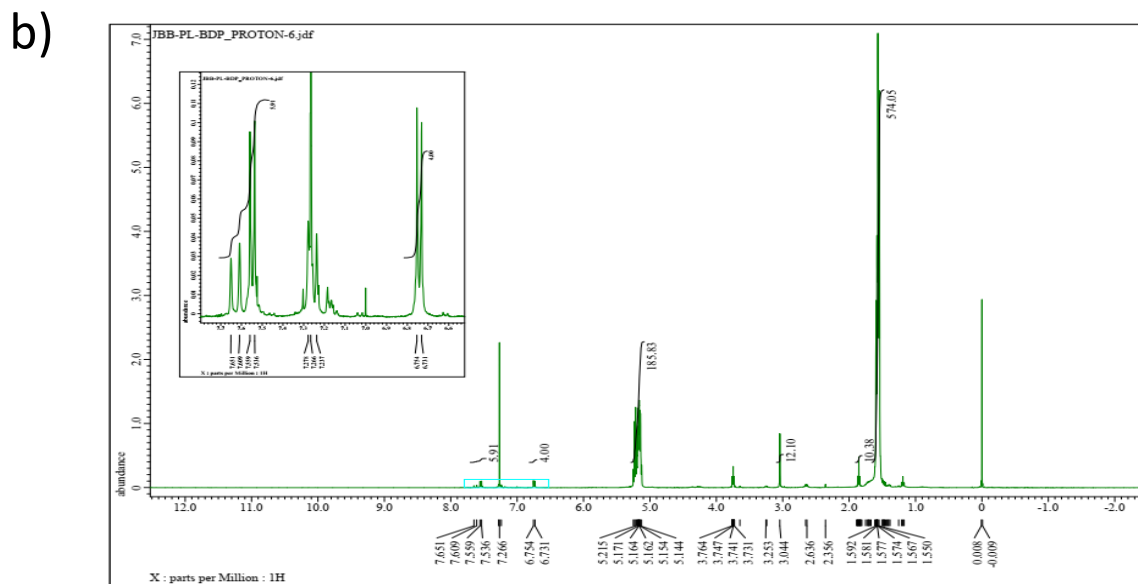
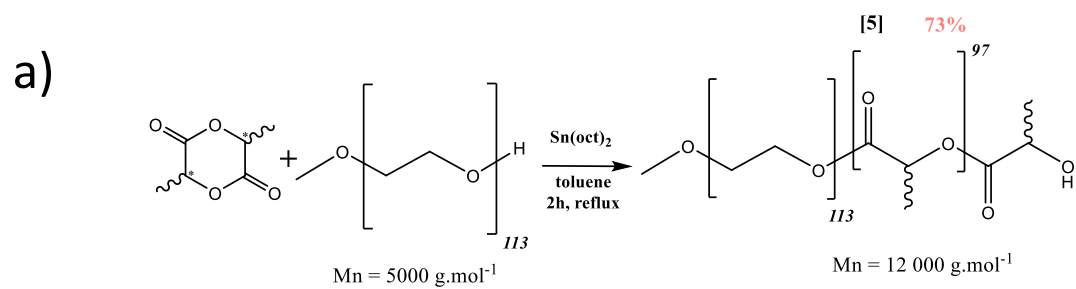


Figure S4 (a) PLA-PEG₅₀₀₀ [5] and [6] synthesis. (b) NMR ^1H spectra (400 MHz, CDCl₃) of polymer PLA-Bodipy [4]. (c) NMR ^1H spectra (400 MHz, CDCl₃) of polymer PLA-PEG₅₀₀₀ [6].

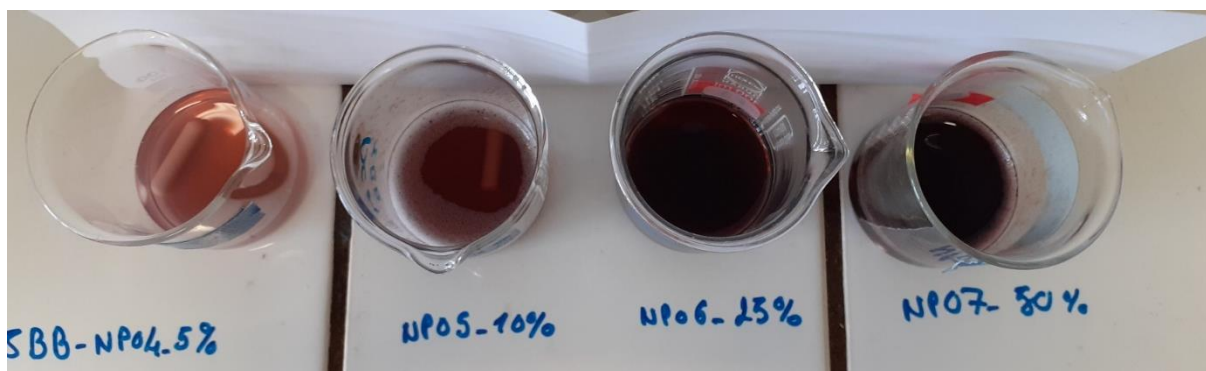


Figure S5 Nanoparticles' suspensions with different percentage of the PLA-Bodipy polymer, from left to right: **NP-5%**, **NP-10%**, **NP-25%**, **NP-50%**.

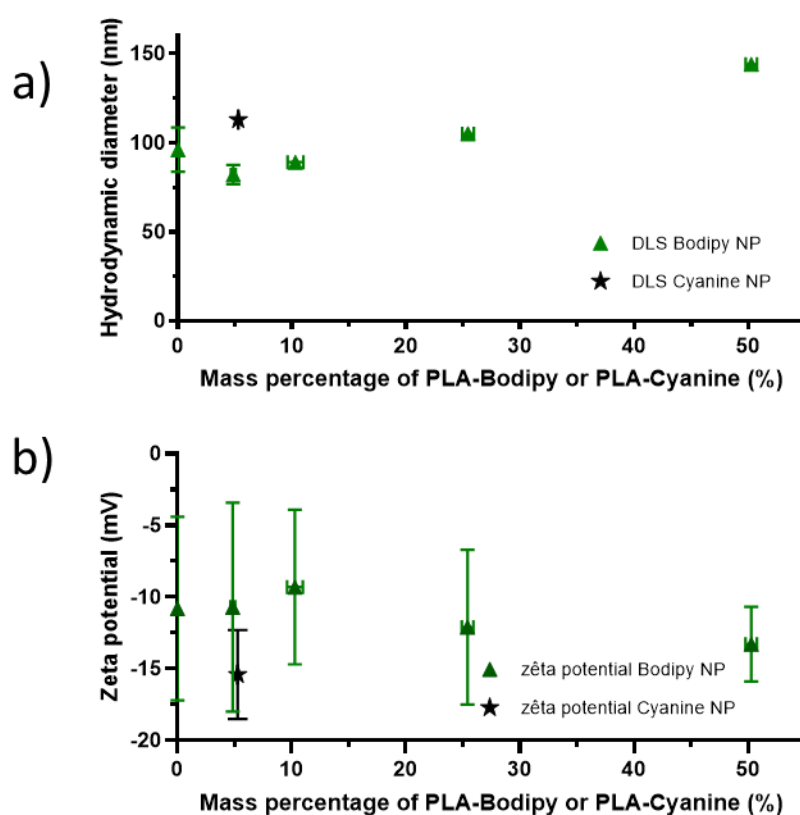


Figure S6 (a) Nanoparticles' hydrodynamic diameter obtained by DLS (green) and NTA (red) as a function of the mass percentage of PLA-Bodipy or PLA-Cyanine. Particles with no sodium cholate. Measurements were done in n-plicate (b) Nanoparticles' zeta-potential, without sodium cholate. Measurements were done in n-plicate. Mean values and standard deviation (DLS and zeta potential) were obtained for: (**NP-0%**, n=5 batches, PDI 0.10); (Bodipy **NP-5%**, n=4 batches, PDI 0.10); (Bodipy **NP-10%**, n=3 batches, PDI 0.09); (Bodipy **NP-25%**, n=3 batches, PDI 0.10); (Bodipy **NP-50%**, n=3 batches, PDI 0.15); (Cyanine **NP-5%**, n=1 batch, PDI 0.10).

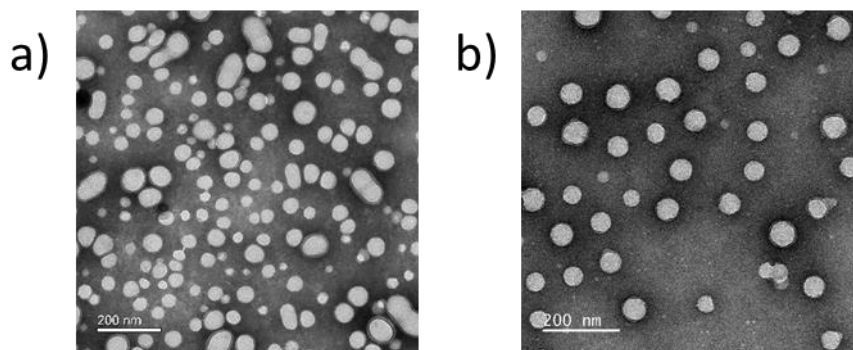


Figure S7 (a) TEM picture of **NP-25%** in weight PLA-Bodipy, 80kV, x20 000, (b) TEM picture of **NP-5%** PLA-Cyanine 120 kV, x20 000.

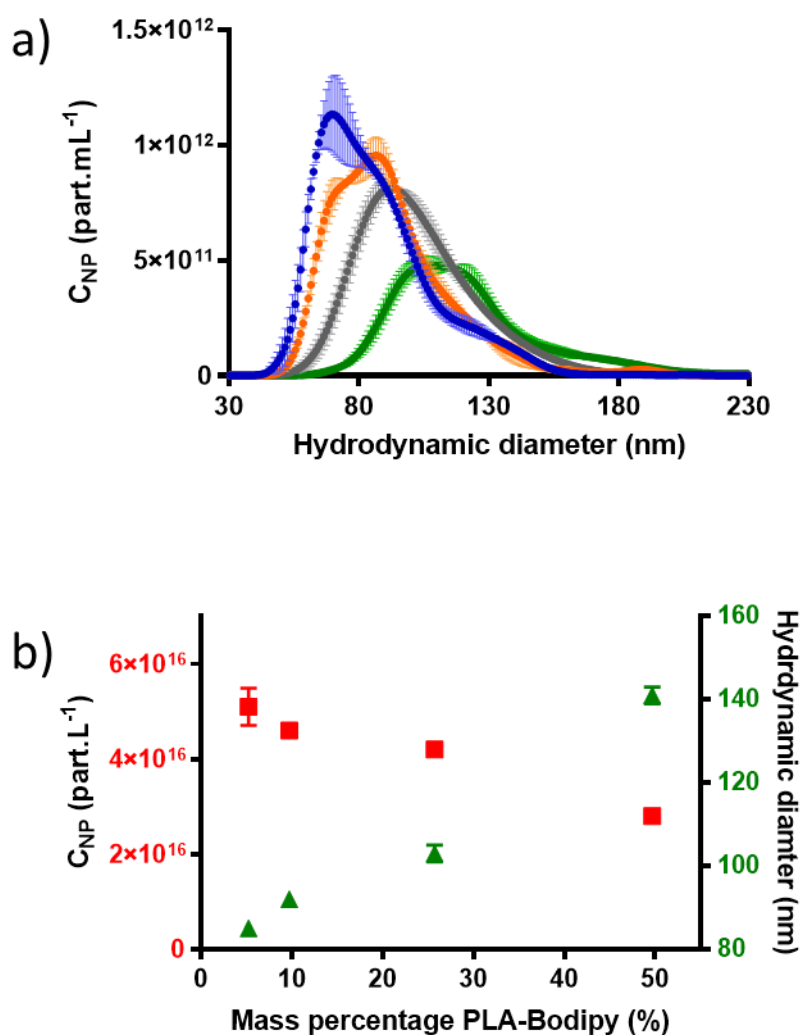


Figure S8 (a) Nanoparticles tracking analysis experiment, standard deviation is indicated in light, mean values are indicated in dark. (Blue Bodipy **NP-5%**), (orange, Bodipy **NP-10%**), (Grey, Bodipy **NP-25%**), (Green, Bodipy **NP-50%**). (b) Evolution of the nanoparticles' concentration (red squares) and DLS size (green triangles).

NP batch	C_{NP} [part.L ⁻¹]
5.2%	$5.1 \times 10^{16} \pm 3.9 \times 10^{15}$
9.7%	$4.6 \times 10^{16} \pm 4.8 \times 10^{14}$
25.7%	$4.2 \times 10^{16} \pm 1.6 \times 10^{15}$
49.7%	$2.8 \times 10^{16} \pm 4.2 \times 10^{14}$

Table S3 Nanoparticles' concentration in the 20 mL suspension, obtained by the NTA setup. The concentration was measured, integrating the NTA Graph.

a)

Dismanteled NP batch	$A_{757 \text{ nm}}$ 25 mL flask	C_{Bodipy} in the suspension [mol.L ⁻¹]	C_{Bodipy} introduced [mol.L ⁻¹]	NP labelling efficiency
4.8%	0.084	1.36×10^{-5}	1.66×10^{-5}	82 %
9.7%	0.179	2.91×10^{-5}	3.34×10^{-5}	87 %
25.1%	0.436	7.05×10^{-5}	8.59×10^{-5}	82 %
50.6%	0.886	1.43×10^{-4}	1.75×10^{-4}	82 %

b)

Dismanteled NP batch	$A_{757 \text{ nm}}$ 25 mL flask	C_{Bodipy} in the suspension [mol.L ⁻¹]	C_{Bodipy} introduced [mol.L ⁻¹]	NP labelling efficiency
4.8%	0.079	1.27×10^{-5}	1.66×10^{-5}	76 %
25.1%	0.403	6.46×10^{-5}	8.59×10^{-5}	75 %
50.6%	0.816	1.33×10^{-4}	1.75×10^{-4}	76 %

Table S4 Titration of the Bodipy in the nanoparticle's suspension. (a) In the top table are represented the batches with sodium cholate, (b) down table the particles after a purification step.

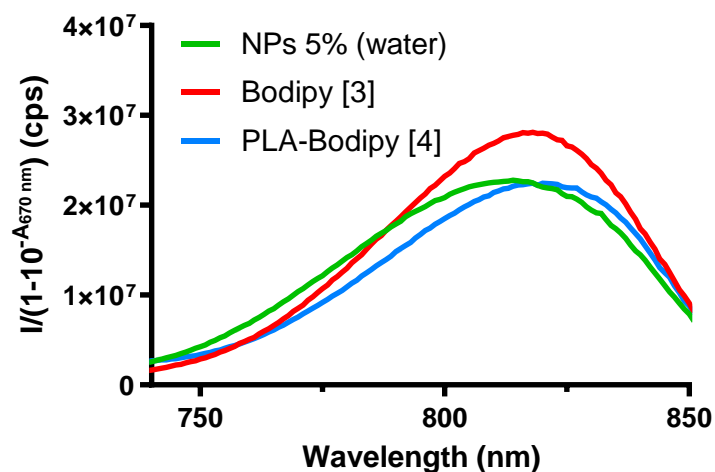


Figure S9 Fluorescence emission spectra corrected from the absorption at the excitation wavelength. Excitation at 670 nm, slit width 10 nm and $A < 0.1$. (Red, Bodipy **[3]** DCM), (blue, PLA-Bodipy **[4]** DCM), (green, Bodipy **NP-5%**).

NMR spectra

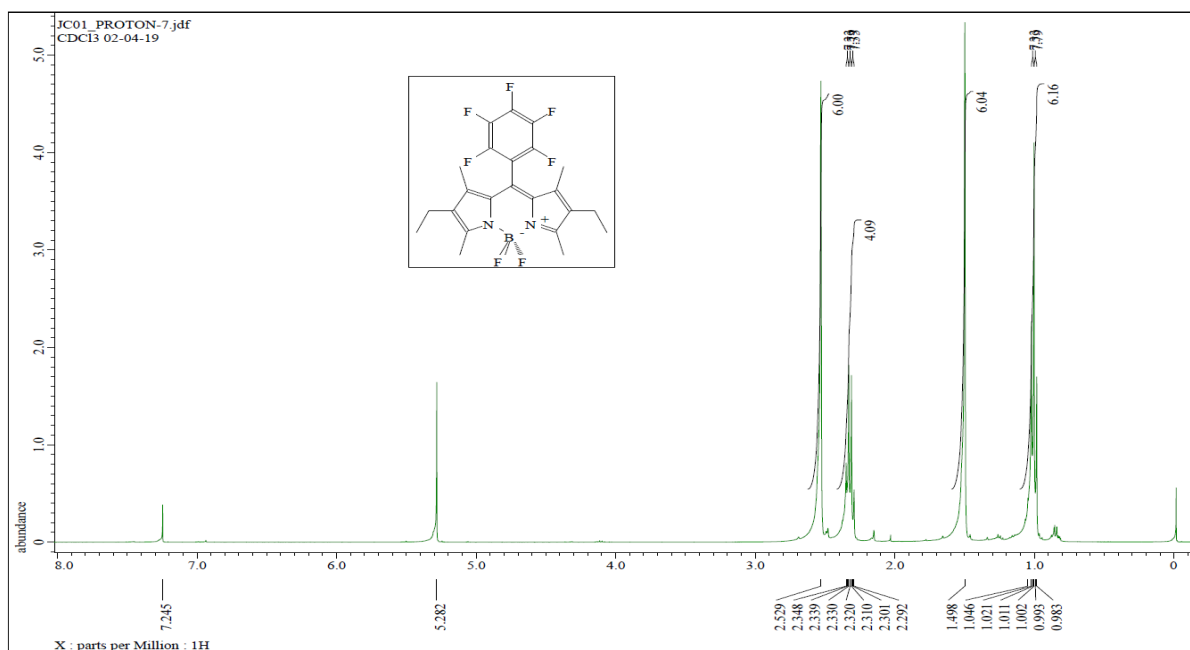


Figure S10 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) spectrum of Bodipy **[1]**.

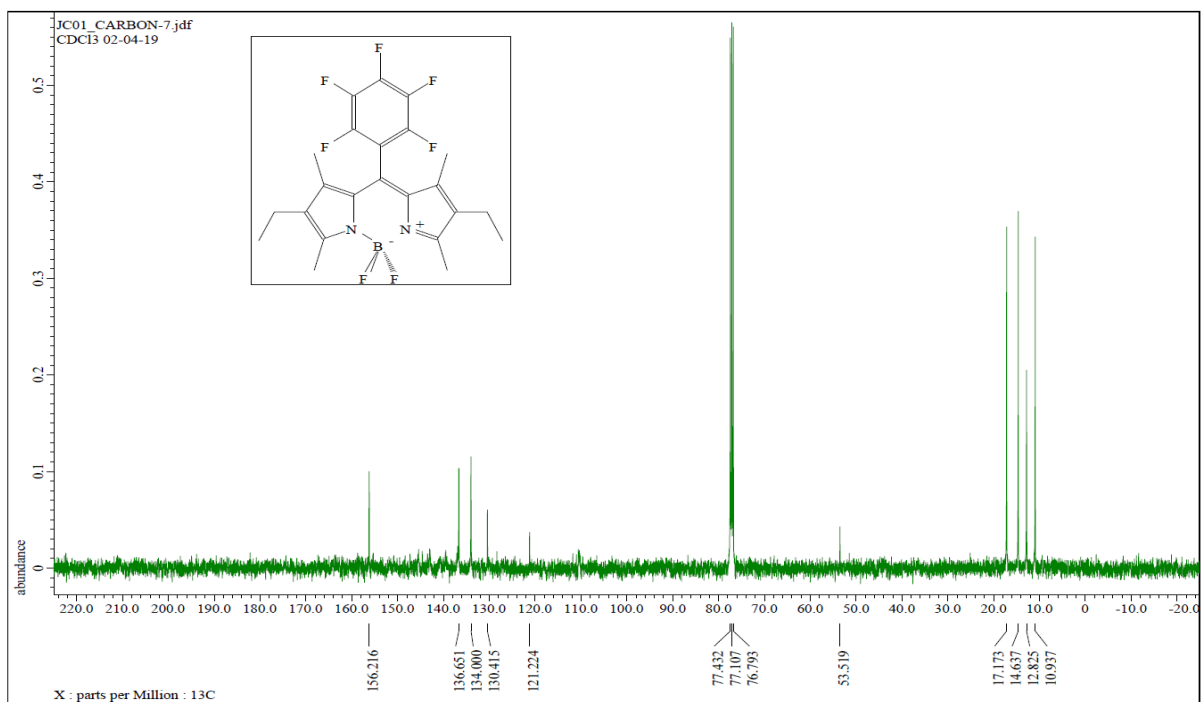


Figure S11 ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) spectrum of Bodipy **[1]**.

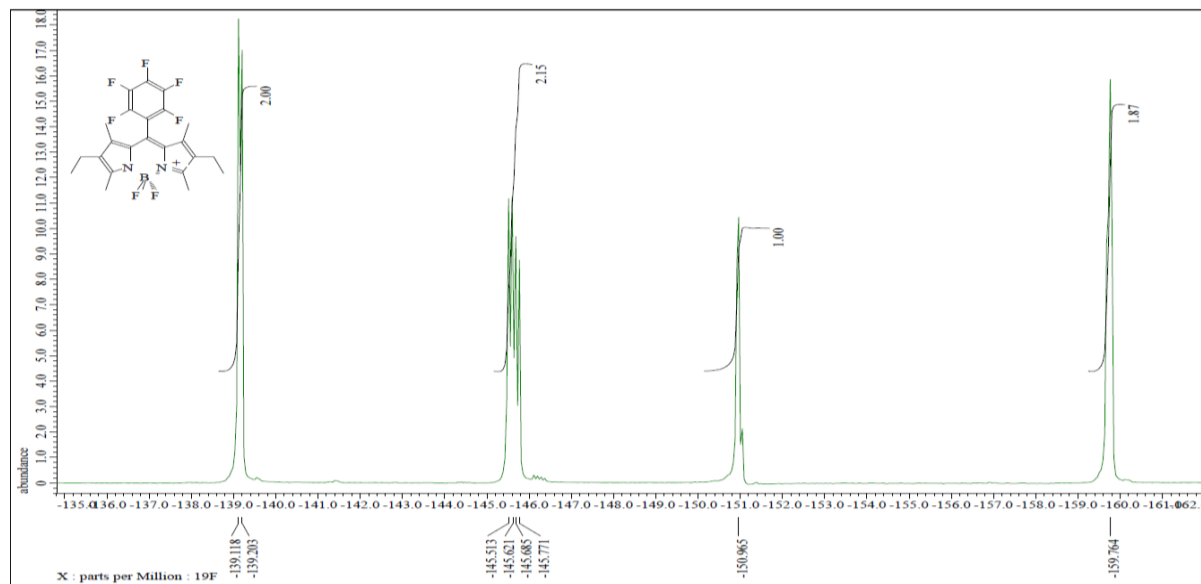


Figure S12 ^{19}F (376 MHz, CDCl_3) spectrum of Bodipy **[1]**.

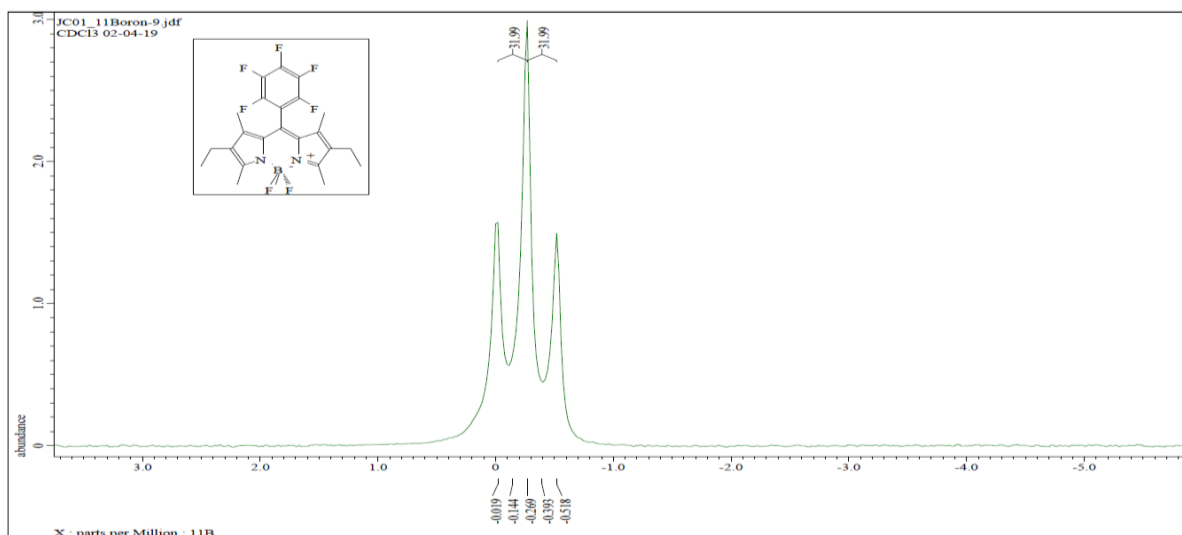


Figure S13 ¹¹B (128 MHz, CDCl₃) spectrum of Bodipy **[1]**.

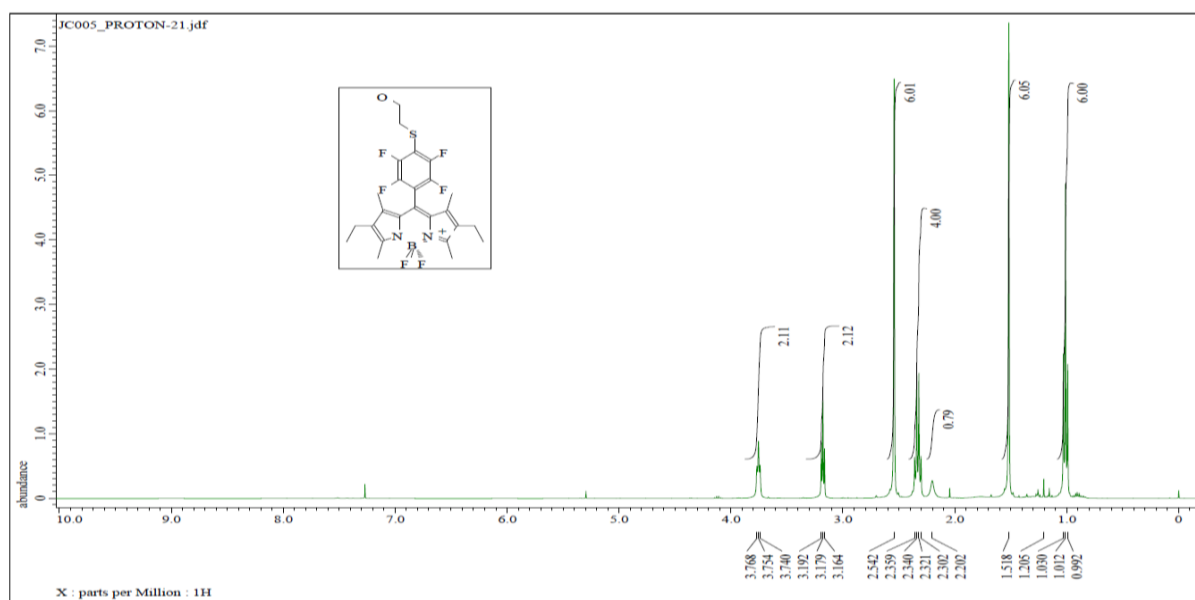


Figure S14 ¹H (400 MHz, CDCl₃) spectrum of Bodipy **[2]**.

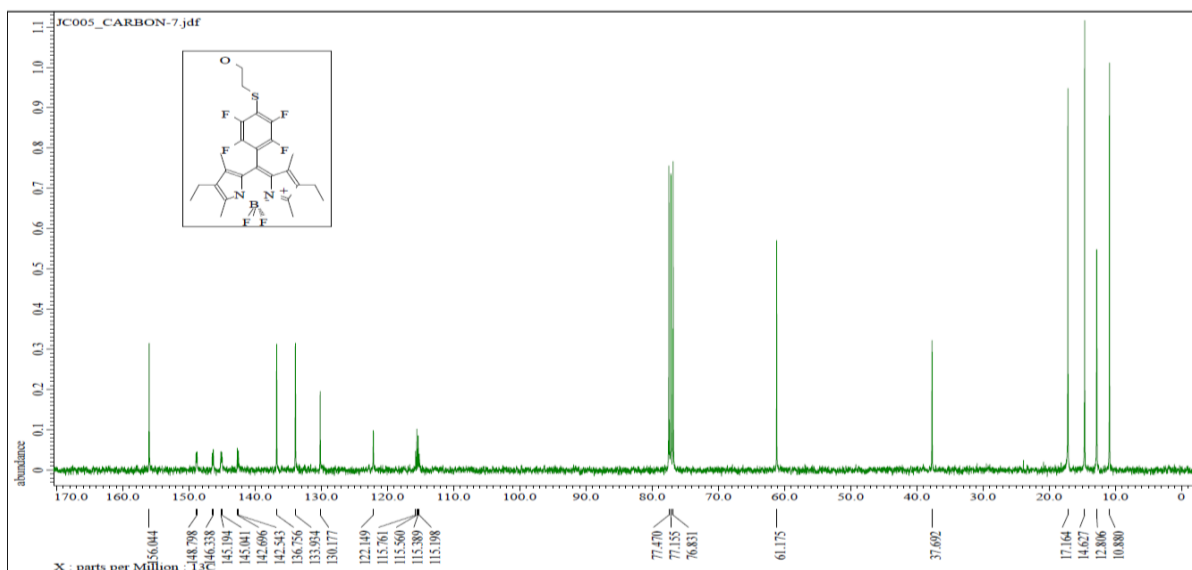


Figure S15 ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) spectrum of Bodipy [2].

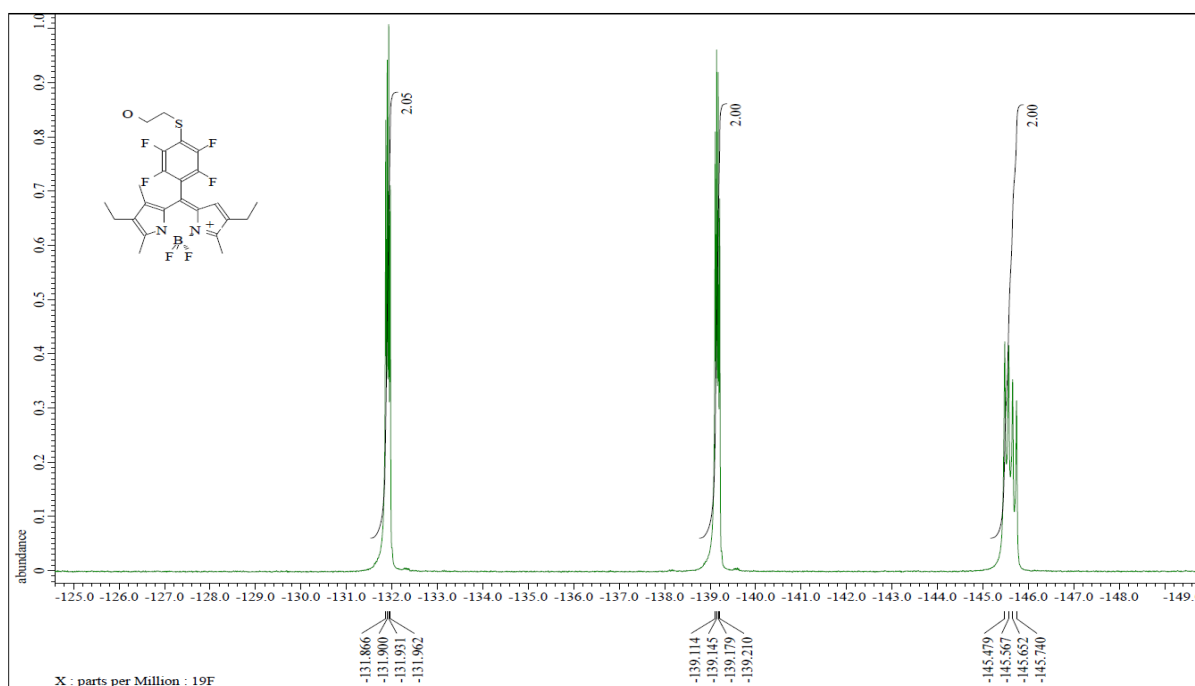


Figure S16 ^{19}F (376 MHz, CDCl_3) spectrum of Bodipy [2].

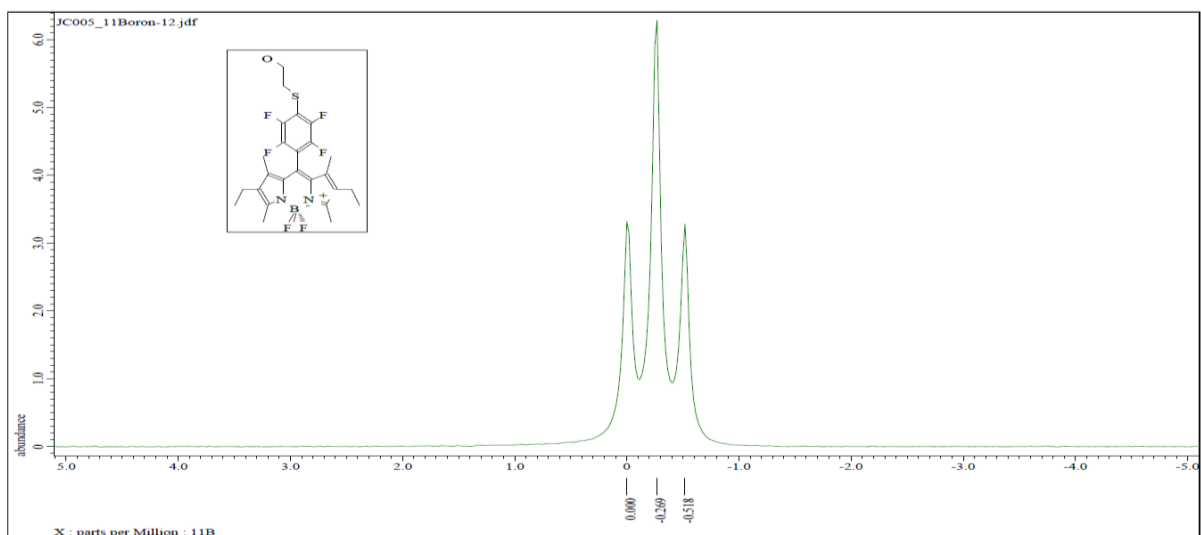


Figure S17 ^{11}B (128 MHz, CDCl_3) spectrum of Bodipy [2].

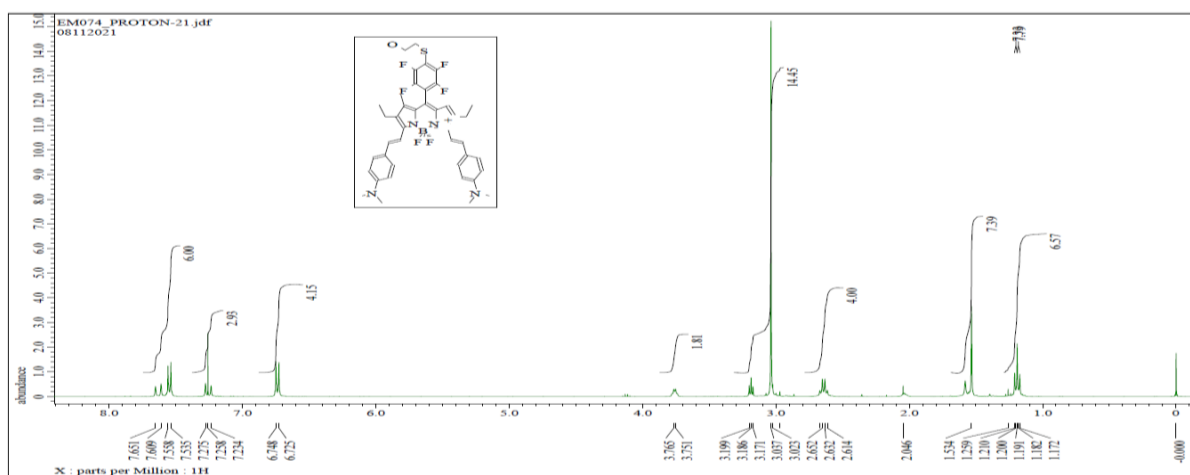


Figure S18 ^1H (400 MHz, CDCl_3) spectrum of Bodipy [3].

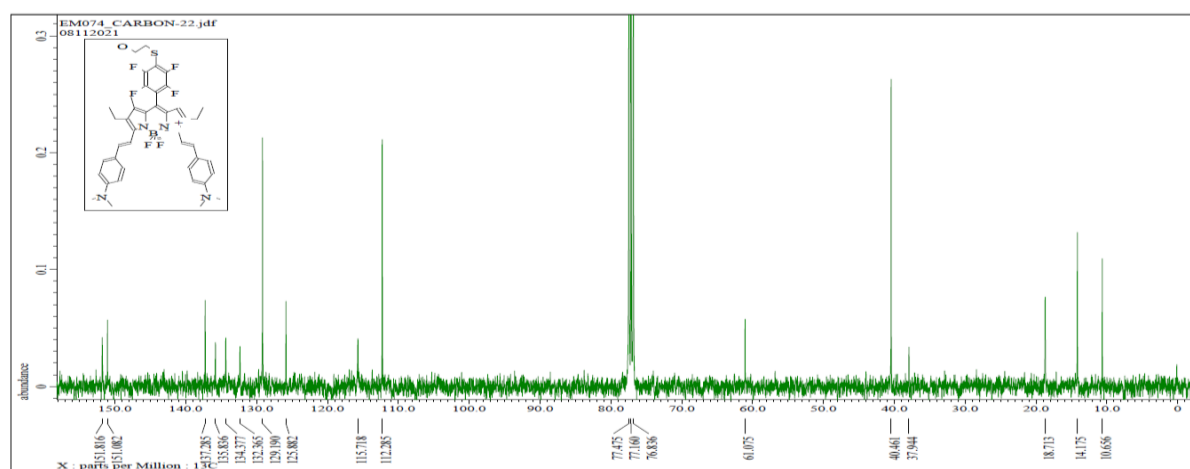


Figure S19 ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) spectrum of Bodipy [3].

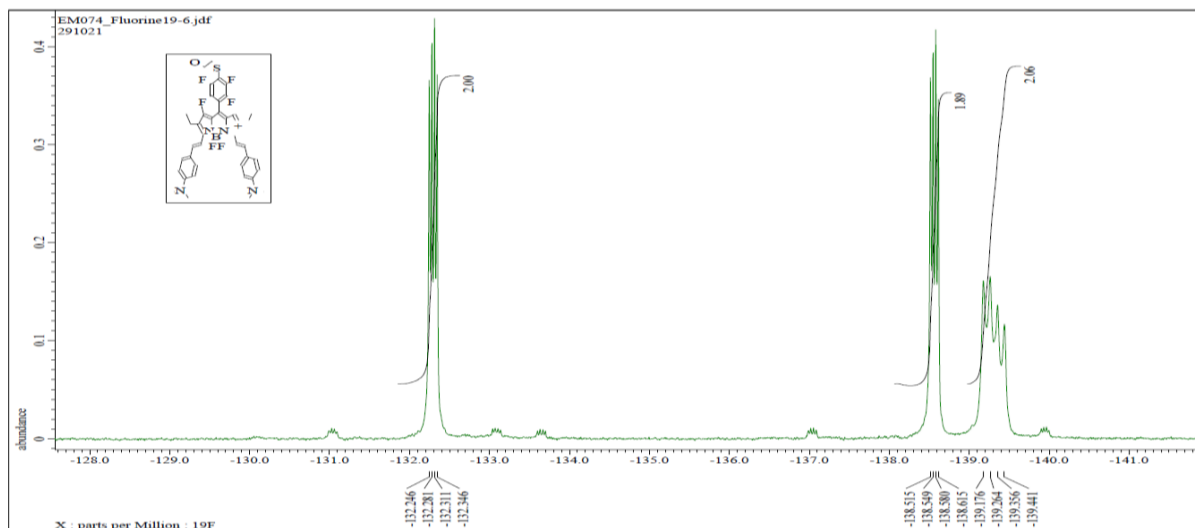


Figure S20 ^{19}F (376 MHz, CDCl_3) spectrum of Bodipy **[3]**.

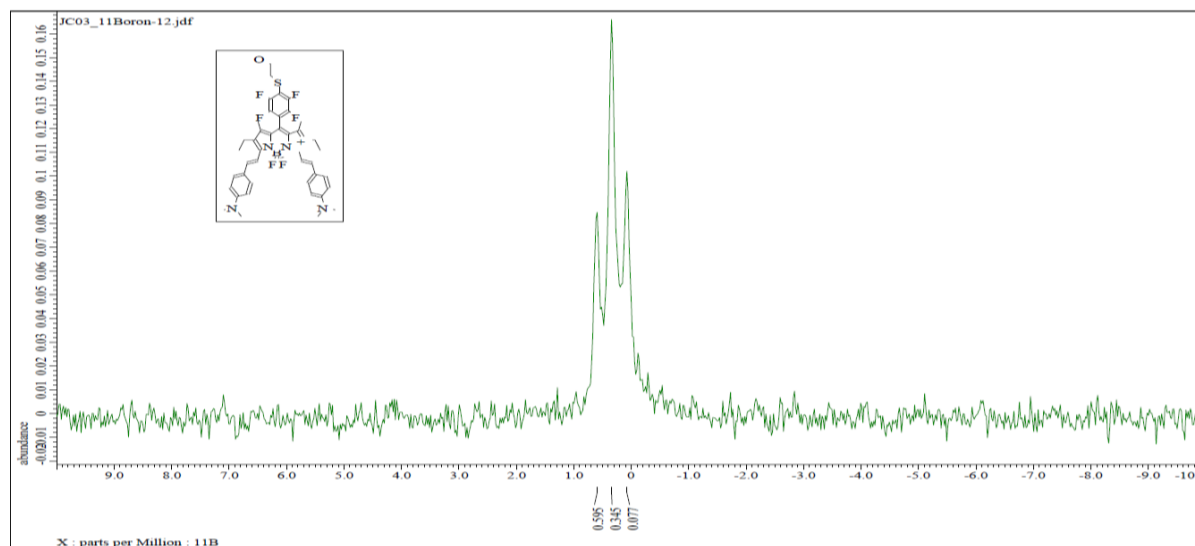


Figure S21 ^{11}B (128 MHz, CDCl_3) spectrum of Bodipy **[3]**.

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions
 248 formula(e) evaluated with 1 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)
 Elements Used:
 C: 1-120 H: 1-150 B: 1-1 N: 0-5 O: 0-10 F: 6-6 S: 1-1
 PPSM_EM073 23 (0.608) Cm (21.31)
 1: TOF MS ES+

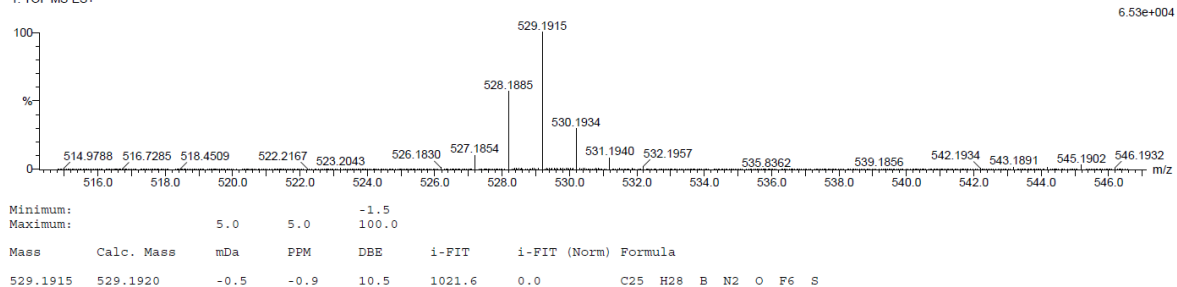


Figure S22 HRMS BODIPY [2].

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions
 448 formula(e) evaluated with 3 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)
 Elements Used:
 C: 1-120 H: 1-150 N: 0-5 O: 0-10 S: 1-1 F: 6-6 B: 1-1
 PPSM_EM074 27 (0.699) Cm (22.34)
 1: TOF MS ES+

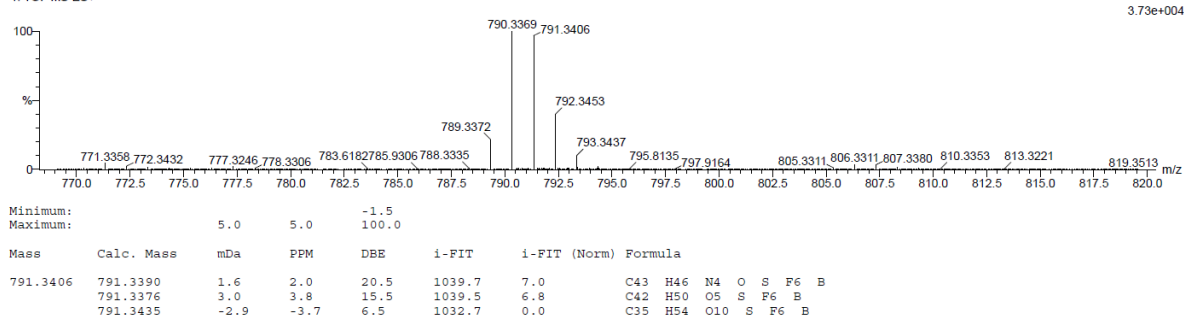


Figure S23 HRMS BODIPY [2].

Video VS1 : Injection of a bolus of NP-25% imaged in the lower back region in the vicinity of the tail. The mouse was in the prone position and the injection was performed intravenously in the tail vein. (Top) Movie composed of images acquired at a frame rate of 20 Frames /s. PA images acquired at 750 nm are displayed with a red scale over the B-mode ultrasound images displayed with a gray scale. The PA images were displayed with a constant color scale corresponding to a - 35 dB dynamic range over the entire image stack. Three ROI were identified. (Bottom) Mean PA amplitude as a function of time of the three ROIs. The arrival of the bolus and its subsequent dilution in the blood is clearly visible in the two large vessels in ROI1 and ROI2. The amplitude of ROI3 increased but over a longer time scale.

Video available at: <https://cirrus.universite-paris-saclay.fr/s/kA5PwXi7rE46a9e>

3 CHAPITRE 3 : HOW AGGREGATION CAUSED QUENCHING ALLOWS TO FINELY TUNE PHOTOACOUSTIC GENERATION EFFICIENCY ?

"Hello darkness, my old friend

I've come to talk with you again"

The Sound of Silence, Simon and Garfunkel 1964.

La relation entre la diminution de la fluorescence par Aggregation-Caused Quenching (ACQ) et l'efficacité photoacoustique dans les nanoparticules (NPs) de polylactide-Bodipy a été évaluée. Des NPs de PLA avec différents taux de chargement en PLA-Bodipy (de 5% à 50% en masse) ont été étudiées en utilisant un spectrophotomètre photoacoustique calibré. Par analogie avec la fluorescence, un rendement photoacoustique (PAY) peut être défini : il représente la conversion énergétique entre la lumière absorbée et le signal acoustique. Nous avons démontré la présence de deux régimes d'émission photoacoustique : un régime monomère et un régime d'extinction causée par l'agrégation. Dans le régime monomère, en dessous de 10% en masse de PLA-Bodipy, l'émission de fluorescence du monomère Bodipy limite le rendement photoacoustique. Au-dessus de 10% de PLA-Bodipy, dans le régime ACQ, les désactivations non-radiatives des agrégats sont prédominantes et le rendement photoacoustique atteint une valeur élevée de 93%. Pour quantifier la performance photoacoustique des NP, nous avons introduit le concept de brillance photoacoustique B_{PA} , comme le produit du rendement photoacoustique PAY par le coefficient d'extinction molaire des NP. Nous avons obtenu des NP ultra-brillantes ($22 \times 10^7 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) lorsque Bodipy est agrégé (valeur élevée de PAY : 0,93 pour **NP-50%**) et des coefficients d'extinction molaire des NP élevés ($2,4 \times 10^8 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ pour **NP-50%**). Enfin, nous montrons que des fluences laser élevées ($1-3,5 \text{ mJ.cm}^{-2}$), à l'excitation maximale de la bande, peuvent réduire significativement le signal photoacoustique par dépopulation de l'état fondamental (-20% pour **NP-2,5%**). Cet effet non-linéaire peut être fortement réduit avec des NP dans le régime ACQ. Au-dessus de 10% de PLA-Bodipy, les NP présentent une brillance photoacoustique intense et une faible perte de signal par effets non linéaires. Nous avons développé un ajustement mathématique des spectres d'absorption et d'excitation photoacoustique pour différencier spectralement l'efficacité photoacoustique au maximum de la bande \overline{PGE}_{rouge} et dans l'épaulemement vibrationnel \overline{PGE}_{bleu} . Nous avons démontré que le \overline{PGE}_{rouge} dépend fortement des fluences laser en raison d'une forte dépopulation de l'état fondamental, alors que le \overline{PGE}_{bleu} ne change pas avec la fluence grâce à une saturation plus faible de la fluence laser.

3	Chapitre 3 : How aggregation caused quenching allows to finely tune photoacoustic generation efficiency ?	147
	3.1 Introduction.....	151
	3.2 Materials and methods	153
	3.2.1 Materials	153
	3.2.2 Bodipy and polymer synthesis.....	154
	3.2.3 Nanoparticles synthesis.....	154
	3.2.4 Nanoparticle characterization.....	154
	3.2.5 Bodipy Reprecipitation experiments	155
	3.2.6 Photophysical measurements.....	155
	3.2.7 Fluorescence anisotropy	156
	3.2.8 Solvatochromism	157
	3.2.9 Transient absorption spectroscopy.....	157
	3.2.10 Photoacoustic spectrum measurements	158
	3.2.11 PES and UV-spectra fitting	160
	3.3 Results	161
	3.4 Conclusion	178
	3.5 Supplementary	179
	3.6 References.....	200

Fine tuning of the photoacoustic generation efficiency by aggregation-caused quenching and excitation energy transfer in Bodipy-labeled polylactide nanoparticles

Jean-Baptiste Bodin^{1,2}, Clément Linger^{2,3}, Jérôme Gateau³, Théo Beguin¹, Théotim Lucas³, Laurence Moine², David Chapron², Ha Thi Minh Huong¹, Anam Fatima¹, Gilles Clavier⁴, Nicolas Tsapis^{2*}, Rachel Méallet-Renault^{1*}

¹ Université Paris-Saclay, CNRS, Institut des Sciences Moléculaires d'Orsay, 91405, Orsay, France.

² Université Paris-Saclay, CNRS, Institut Galien Paris-Saclay, 92296, Châtenay-Malabry, France.

³ Sorbonne Université, CNRS, INSERM, Laboratoire d'Imagerie Biomédicale, LIB, F-75006, Paris, France

⁴ Université Paris-Saclay, ENS Paris-Saclay, CNRS, PPSM, 91190, Gif-sur-Yvette, France.

Abstract

The relationship between fluorescence decrease by Aggregation-Caused Quenching (ACQ) and the photoacoustic efficiency in polylactide-Bodipy nanoparticles (NPs) is demonstrated. PLA NPs with different PLA-Bodipy loading (from 5% to 50% by weight) were studied using a calibrated photoacoustic spectrophotometer. By analogy with fluorescence a Photoacoustic Yield (PAY) can be defined: it represents the energy conversion between the absorbed light to the acoustic signal. We demonstrate the presence of two photoacoustic emission regimes: a monomer regime and an Aggregation Caused Quenching regime. In the monomer regime, below 10% by weight of PLA-Bodipy, the fluorescence emission from the Bodipy monomer limits the photoacoustic yield. Above 10% of PLA-Bodipy, in the ACQ regime, non-radiative deactivations from the aggregates, are predominant and the photoacoustic yield reaches a high value of 93%. To quantify NP photoacoustic performance, we introduced the photoacoustic brightness B_{PA} , as the product of the photoacoustic yield PAY by the molar extinction coefficient of NPs. We obtained ultrabright NPs ($22 \times 10^7 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) when Bodipy is aggregated (high value of PAY: 0.93 for **NP-50%**) and high NP molar extinction coefficients ($2.4 \times 10^8 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ for **NP-50%**). Finally, we show that high laser fluences ($1\text{-}3.5 \text{ mJ.cm}^{-2}$), at the band maximum excitation, can

significantly reduce the photoacoustic signal by ground state depopulation (-20% for **NP-2.5%**). This non-linear effect can be highly reduced with NPs in the ACQ regime. Above 10% PLA-Bodipy, NPs exhibit intense photoacoustic brightness and low signal loss by nonlinear effects. We have developed a mathematical fit of the absorption and photoacoustic excitation spectra to spectrally differentiate the photoacoustic efficiency at the band maximum \overline{PGE}_{red} and in the vibrational shoulder \overline{PGE}_{blue} . We demonstrate that the \overline{PGE}_{red} highly depends on the laser fluences due to high ground state depopulation, when the does not change with the fluence thanks to a lower laser fluence saturation.

3.1 INTRODUCTION

In medicine, nanoparticles (NPs) are promising to treat pathologies like cancer, autoimmune and inflammatory diseases, diabetes and neurodegenerative diseases (Mura et Couvreur 2012) and recently to reduce the SARS-coV-2 pandemic (2020-2022) (Tenchov et al. 2021). However, despite significant development of active and passive targeting, the actual proportion of NPs reaching the diseased tissue remains low (Torrice 2016). To address this limitation, the concept of nanotheranostics has emerged (Mura et Couvreur 2012). The idea is to quantify the accumulation of therapeutic NPs by an imaging modality before deciding to treat or not the patient with these NPs. To this purpose, the development of clinically transposable NPs co-encapsulating a therapeutic agent and an imaging agent is needed (Mura et Couvreur 2012; Fornaguera et García-Celma 2017). Among imaging modalities, fluorescence imaging in the near infrared region is promising as several fluorescent dyes have been developed and tested *in vivo* in animal models. Dye-loaded luminescent polymer nanoparticles are excellent candidates as they have very good biocompatibility and biodegradability (based on polylactide, chitosan, collagen, poly(lactic-co-glycolic acid),...), they can be functionalized on the surface, they are stable in biological medium, and a control drug release can be carried out (Fattal et al. 2012; Zielińska et al. 2020). Recently, the development of prodrug polymer nanoparticle, with a covalent grafting of the dye or drug to the polymer, helps to highly increase the encapsulation rate (up to more than 30% in weight) and reduce burst release problem (Delplace, Couvreur, et Nicolas 2014; Nicolas 2016; P. Gao, Nicolas, et Ha-Duong 2021).

Despite all these NPs' advantages, fluorescence imaging of polymer NPs faces several significant problems. The low spatial resolution of fluorescence imaging, makes any fine mapping of NP accumulation difficult. Moreover usually a high dye loading is required for easier detection, but high dye loading leads to fluorescence loss, detrimental to detection. Indeed at high NP's encapsulation rate, dyes with planar backbones and aromatic rings are likely to create intermolecular π - π interactions and other interactions like excimer, exciplex, energy hetero-transfer or charge transfers and

excited states reactions. (Huang et al. 2019; Leduskrasts et Suna 2018; Z. Liu et al. 2019; « Ein Konzentrationsumschlag Der Fluoreszenz. » 1954). All these interactions are often referred as Aggregation Caused Quenching effect (ACQ) or self-quenching. Additionally, high dye loading in NPs are also likely to favor homo-Excitation Energy Transfer (EET, or exciton diffusion): due to the dyes' close proximity inside the polymer matrix, the energy can be transferred among several emitters before finally being quenched by non-fluorescent aggregates or a trap (Reisch et al. 2014; Vu et al. 2013; Caponetti et al. 2019; B. Chen et Wang 2019). Thus if luminescent imaging is still a powerful tool new imaging technics exploiting the high encapsulation rate of organic chromophores in NPs are needed. Photoacoustic imaging shall be one of them.

Photoacoustic imaging is a cheap biomedical imaging modality that combines optical excitation and acoustic wave detection and benefits from a high contrast and a great spatial resolution (submillimeter at centimeter depth) (Beard 2011). Molecules are excited by a pulsed nanosecond excitation, and an acoustic wave can be generated by vibrations and collisions of the excited dye with the solvent, or matrix, to create a local heating of the media and generate an acoustic wave by thermo-elastic expansion. In literature, high non-radiative rate constant k_{nr} , low fluorescent quantum yield ΦF and a low inter-system crossing rate constant k_{cis} , are often considered to increase the photoacoustic signal [30–33]. Thus, different strategies are used to quench the fluorescence signal and favor non-radiative decays such as quencher encapsulation (Qin et al. 2015), photoinduced electron transfer (Lyu et al. 2016; Merkes et al. 2020), intramolecular charge transfer (Qi et al. 2018; B. Guo et al. 2017; S. Wang et al. 2018; X. Li et al. 2019), molecular rotors (Qi et al. 2021; Zhao et al. 2019; Cai et al. 2017), and long backbone spacers to conserve intramolecular motion in the solid state (Qi et al. 2021; Zhao et al. 2019; S. Liu et al. 2019; Diez-Cabanes, Monari, et Pastore 2021; H. Gao et al. 2021). Therefore, the fluorescence loss with high dye-loaded polymer NPs is a very promising strategy to favor non-radiative decays and enhance the photoacoustic signal. If some papers mentioned the ACQ effect in dye-loaded NPs, to improve the photoacoustic signal (Lyu et al. 2016; J. Zhang et al. 2017; 2018), it is rarely seen as a real strategy for photoacoustic enhancement and no proper quantification of the photoacoustic efficiency increase in relation with the fluorescence loss has ever been performed.

Herein, we want to better understand the relationship between the photophysical properties of the dye-loaded NPs and the generated photoacoustic signal. The objective is to give clues to enhance the efficiency of the energy conversion between light absorption and acoustic emission. The initial pressure signal (p_0) can be written as (Sarkar et al. 2021):

$$p_0(\lambda) = PGE_{sample}(\lambda) \cdot \varepsilon(\lambda) \cdot C \cdot \Phi(\lambda) \cdot \Gamma \quad (1)$$

Where PGE is the Photoacoustic Generation Efficiency, a dimensionless parameter, which represents the efficiency of conversion of absorbed light energy into an acoustic energy, Γ is the Grüneisen coefficient of the solvent, ε is the molar

absorptivity of the dye in $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ at the excitation wavelength, C is the dye concentration ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and Φ is the laser fluence ($\text{J}\cdot\text{m}^{-2}$).

For clinical applications, it is important to limit the fluence to avoid tissues damage (Paschotta s. d.). Moreover, the dye concentration should also be restrained to avoid toxicity concerns and to minimally modify NP characteristics. Thus, two main parameters can be tuned to enhance the photoacoustic signal: the PGE and the molar absorptivity. Both parameters can be strongly enhanced thanks to high dye loading in polymer NPs.

To this attempt, we exploit a calibrated photoacoustic spectrophotometer (Sarkar et al. 2021) and a robust Bodipy loaded polylactide NP synthetic pathway developed in chapter 2. Absorption, steady-state and time resolved emission, as well as calibrated photoacoustic spectra were studied on polylactide-Bodipy (PLA-Bodipy) NPs with different PLA-Bodipy loadings: from 2.5% to 50% in weight. By analogy with the fluorescence quantum yield, we define and introduce a new photoacoustic parameter: the PhotoAcoustic Yield (PAY), which represents the overall efficiency of energy conversion between absorption and photoacoustic emission over the whole studied band (680-870 nm). By studying the PAY and the non-radiative rate constant of the Bodipy NPs, we demonstrate the presence of two photoacoustic emission regimes: a monomer regime and an aggregation caused quenching regime. In the monomer regime, below 10% by weight of PLA-Bodipy, the fluorescence emission from the Bodipy monomer limits the photoacoustic yield. Above 10% of PLA-Bodipy, in the aggregation caused quenching regime, non-radiative deactivations are predominant and PAY reaches a high value of 93%. We propose a mathematical model to predict the minimum dye loading for polymer NP to reach the aggregation caused quenching regime, simply by exploiting the absorption and emission spectra, the molar absorptivity and the Strickler-Berg relation (Strickler et Berg 1962).

Finally, we demonstrate the loss of photoacoustic signal at high laser fluence ($3.5 \text{ mJ}\cdot\text{cm}^{-2}$) at the band maximum by ground state depopulation. This non-linear effect is detrimental for photoacoustic imaging and can be suppressed with NPs in the aggregation caused quenching regime. Above 10% of PLA-Bodipy, NPs exhibit high photoacoustic generation efficiency, high photoacoustic brightness and poor signal loss by nonlinear effect.

3.2 MATERIALS AND METHODS

3.2.1 Materials

DL-lactide was purchased from Biovalley, Polysciences Inc. (USA). Poly(ethylene glycol) methyl ether (OH-PEG-OCH₃, average $M_n = 5000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) was obtained from Iris Biotech GmbH (Germany). Anhydrous toluene, stannous 2-ethyl hexanoate (stannous octoate, $\text{Sn}(\text{Oct})_2$), sodium cholate, tetrahydrofuran (THF) spectroscopic

grade, all the reagents for the Bodipy synthesis were purchased from Sigma-Aldrich (France) or TCI (France) and used as received. Spectroscopic experiments were conducted in spectroscopic grade dichloromethane (DCM) from Sigma-Aldrich (France). Milli-Q water was used (Reference system Merck-Millipore, France).

3.2.2 Bodipy and polymer synthesis

Bodipy **[3]**, polylactide-Bodipy (PLA-Bodipy), polylactide-b-polyethylene glycol (PLA-PEG₅₀₀₀) were obtained as described in chapter 2. Briefly, Bodipy **[3]** was chemically grafted on a polylactide polymer by a ring opening polymerization of a DL-Lactide catalyzed by stannous octoate, and initiated by Bodipy **[3]** alcohol function. Polymer characteristics were the followings: PLA-Bodipy ($M_n = 14500 \text{ g.mol}^{-1}$, $\bar{D} = 1.60 \pm 0.05$, dye labelling efficiency 97.5%) and PLA-PEG₅₀₀₀ (17100 g.mol^{-1} , $\bar{D} = 1.20 \pm 0.05$).

3.2.3 Nanoparticles synthesis

Nanoparticles were formulated with the solvent emulsion-evaporation technique described in chapter 2. Different NP batches were obtained by changing the weight percentage of PLA-Bodipy compared to PLA-PEG₅₀₀₀: **NP-2.5%**, **NP-5%**, **NP-10%**, **NP-25%** and **NP-50%**.

3.2.4 Nanoparticle characterization

NP hydrodynamic diameter (Dynamic light scattering (DLS)), zeta potential and polydispersity index (PDI) were determined with a Zetasizer Nano ZS (Malvern, France) at 25°C, with a 632.8 nm laser (backscatter angle of 173°). The Bodipy encapsulation efficiencies were evaluated as described in chapter 2 thanks to a calibration curve (Beer-Lambert's law) of PLA-Bodipy absorption at 757 nm in DCM as a function of the concentration (slope: $\epsilon_{\text{PLA-Bodipy}} = 78\,000 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, DCM, 757 nm). The mean Bodipy number per NP ($N_{\text{PLA-Bodipy}}$) was determined in chapter 2 by computing the ratio of the experimental Bodipy concentration C_{Bodipy} to the nanoparticle concentration C_{NP} (determined by Nanoparticle Tracking Analysis). The nanoparticle molar extinction coefficient was evaluated in chapter 2 thanks to $\epsilon_{\text{NP}} = N_{\text{PLA-Bodipy}} \times \epsilon_{\text{PLA-Bodipy}}$.

The Bodipy distance to the nearest neighbor $\langle R \rangle$ (nm) was determined thanks to

$$\langle R \rangle = 0.554 \times \frac{1}{N_{\text{PLA-Bodipy}}^{1/3}}$$

with $N_{\text{PLA-Bodipy}}$ the number of Bodipy per particle per nm^3 (Santos 1986). Differential Scanning Calorimetry experiments were performed on Bodipy NP (50 mg.mL^{-1} of polymer in water) with a VP-DSC microcalorimeter (Perkin-Elmer DSC Diamond), 1°C per min, from 5°C to 70°C, 3 repeated scans.

3.2.5 Bodipy Reprecipitation experiments

Solutions were prepared from a stock solution of Bodipy **[3]** in 100% THF. Different volume percentages of water/THF solutions were obtained. To yield the same Bodipy concentration for each water fraction, two dilutions from the stock solution were carried out. A first dilution in THF and a second one in water. The dilution factors were adjusted to obtain the same final concentration $C_{\text{Bodipy}} = 9.0 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$ and a water volume fraction from 0% to 70% compared with THF.

3.2.6 Photophysical measurements

Spectra were obtained in 10 mm path length quartz cuvettes. For UV-visible spectra a Shimadzu UV-visible spectrophotometer UV-2600 was used. Fluorescence emission spectra were recorded on a Fluoromax-4 spectrofluorimeter (Jobin-Yvon; Horiba). Signals were corrected from the instrument response and from the lamp fluctuations. The absorption was checked to be lower than 0.1 to avoid inner filter effects and fluorescence signals were normalized to account for the absorbance at the excitation wavelength $I_{\text{corr}} = \frac{I}{1-10^{-A}}$. The nanoparticles' fluorescence quantum yield was determined using the Bodipy **[3]** in DCM at 25°C as a reference and $\frac{\Phi_F^x}{\Phi_F^0} = \frac{1-10^{-A_0}}{1-10^{-A_x}} \frac{S_x}{S_0} \left(\frac{n_x}{n_0}\right)^2$ where the index and exponent 0 and x correspond to the reference and the Bodipy NP, respectively, Φ_F is the fluorescence quantum yield, A is the absorbance at the excitation wavelength 670 nm (or 540 nm), S is the integral of the emission curve and n the refractive index. $n_x = 1.4242$ corresponds to DCM at 25°C and $n_0 = 1.33$ to water at 25°C. $\Phi_F^0 = 0.007$ was determined in chapter 2.

Time-resolved fluorescence was measured with the Horiba Scientific NanoLED-785L (950 V, 781 nm, <200 ps), the deltaHub™ controller and the DeltaDiode™ controller (Jobin-Yvon; Horiba), in a 10 mm path length quartz cuvette on the Fluoromax-4 (Jobin-Yvon; Horiba). The emission was collected at 820 nm and a preset peak of 12 000 counts. The lamp signal was collected with a colloidal silica solution 40% by weight (Ludox® HS-40) from Sigma Aldrich to scatter the excitation light. All fluorescence decays were fitted using the Levenberg–Marquardt algorithm and a non-linear least-squares fit. The fitted functions were either a bi-exponential function $y = A + B_1 e^{-\frac{t}{T_1}} + B_2 e^{-\frac{t}{T_2}}$ or a sum of a monoexponential and a Kohlrausch function (stretched exponential) $y = A + B_1 e^{-\left(\frac{t}{T_1}\right)^\beta} + B_2 e^{-\frac{t}{T_2}}$ (Berberan-Santos, Bodunov, et Valeur 2005). Fit quality was estimated thanks to the variance of weight residuals χ^2 . Good fit quality was estimated with $\chi^2 < 1.2$. The average lifetime was estimated for a bi-exponential fit $\bar{\tau} = \frac{B_1 T_1^2 + B_2 T_2^2}{B_1 T_1 + B_2 T_2}$ with B_i the pre-exponential factors and T_i the associated lifetimes. The contribution of each species (species 1 and species 2 associated

respectively with T_1 and T_2) was estimated thanks to $\%1 = \frac{B_1 T_1}{B_1 T_1 + B_2 T_2}$ (relative amplitude). For the Kohlrausch function, the distribution function, $H(k)$, was determined thanks to the inverse Laplace transformation and described in detail in supplementary information.

The radiative rate constant k_r was evaluated using the Strickler-Berg equation (Valeur et Berberan-Santos 2013), $k_r = 2.88 \times 10^{-9} n^2 \frac{\int F(\bar{\nu}_F) d\bar{\nu}_F}{\int \bar{\nu}_F^{-3} F(\bar{\nu}_F) d\bar{\nu}_F} \int \frac{\varepsilon(\bar{\nu}_A) d\bar{\nu}_A}{\bar{\nu}_A}$. The non-radiative rate constant was estimated from $\bar{\tau}$ and k_r values: $k_{nr} = \frac{1}{\bar{\tau}} - k_r$. The Bodipy NPs' Förster radii R_0 were calculated as described in (Wu et Brand 1994) with an orientation factor of 0.476 (for molecules randomly oriented in a rigid matrix) (Valeur et Berberan-Santos 2013), water refractive index of 1.33, and the molecular Bodipy extinction coefficient (80 000 L.mol⁻¹.cm⁻¹ at 757 nm). The Bodipy NPs' QY in absence of acceptor was supposed to be the **NP-2.5% QY** (0.009), as for **NP-2.5%** the Bodipy is the most dispersed in the polymer matrix.

3.2.7 Fluorescence anisotropy

Steady state anisotropy was measured with the Fluoromax-4 spectrofluorimeter (Jobin-Yvon; Horiba), excitation at 670 nm, emission between 700-850 nm, slits width 12 nm and polarizers L-format FM4-2000 from Horiba aligned with a Ludox® HS-40 solution. Four signals were collected: S1_hh, S1_hv, S1_vv and S1_vh and the G-factor was calculated at each emission wavelength $G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}}$. The mean steady state anisotropy \bar{r} was estimated over the range 780-850 nm: $\bar{r} = \frac{I_{VV} - G \times I_{VH}}{I_{VV} + G \times I_{VH}}$. Time resolved anisotropy experiments were performed with a titanium sapphire Ti:Sa oscillator (Spectra Physics, Mai Tai HP) (80 MHz, 100 fs pulse duration) with excitation at 690 nm, and a fluorescence detection at 820 nm (10 000 hits, 1.2 nm slits width). Time-correlated single-photon counting (TCSPC) method was used to measure the fluorescence decay curves. The repetition rate was reduced at 4 MHz thanks to a pulse picker (GWU Lasertechnik, UHG-23-PSK). Beam power and polarization were modulated with respectively an intensity attenuator filter wheel and a Fresnel rotator. Fluorescence was observed at 90° through a monochromator (CVI Laser Corporation, Digikröm CM110), a long pass filter (Schott, RG9), and a polarizer by means of a micro channel plate photomultiplier (Hamamatsu, MCP-PMT R3809U-50), connected to a TCSPC module (Becker & Hickl, SPC-630). The G-factor was determined at 820 nm $= \frac{\int I_{HV}(t) dt}{\int I_{HH}(t) dt}$, and time resolved anisotropy was calculated with $r(t) = \frac{I_{VV}(t) - G \times I_{VH}(t)}{I_{VV}(t) + G \times I_{VH}(t)}$. r_0 and r_∞ are respectively the anisotropy values at $t = 0$ and at infinite time. The number of energy homo-transfer was evaluated thanks to: $N_{aggregates} = r_0 / r_\infty$ (Chan, Kaminski, et Kaminski Schierle 2011; Reisch et al. 2014; Bader et al. 2007), with r_0 the anisotropy value for a monomer in the absence of rotation ($r_0 = r_{mono} = 0.4$) (Valeur et Berberan-Santos 2013)

and r_{∞} the anisotropy of the NP at infinite time. Rotational diffusion times were estimated with the Stokes-Einstein equation for spherical NP: $\tau_R = \frac{4\pi R^3 \eta}{3kT}$ with R the NP radius in meter, η the water viscosity in Pa.s, k the Boltzmann constant, and T the temperature (298.15 K).

3.2.8 Solvatochromism

A stock solution of Bodipy **[3]**, S_0 , was prepared for each solvent in a 20 mL volumetric flask by dissolution of 3-5 mg of Bodipy **[3]**. Five different concentrations were obtained for each solvent, by successive dilution from the stock solution (successive dilution factors x20, x2, x5, x2, x2). For methanol, ethanol and cyclohexane, Bodipy **[3]** was not soluble in S_0 . To favor the solvation, the stock solution was prepared with 5% volume of chloroform. Absorption spectra were obtained with the same experimental protocol as described above. The Bodipy **[3]** extinction coefficient was obtained for each solvent, from the slope of the curve $A_{757nm} = f(C_{Bodipy})$. Solutions with an absorbance value lower than 0.1 at the maximum were selected to measure the fluorescence spectra. For methanol, ethanol, and cyclohexane, solutions without chloroform were studied. The fluorescence spectra were obtained by the same method as described above. For the emission spectra were measured with an excitation wavelength in the vibronic shoulder. The absolute fluorescence quantum yield was determined for each solvent with the Horiba K-sphere. The fluorescence spectra and the excitation spectra were compared to a diffusive blank colloidal silica solution (Ludox® HS-40). The Fluorescence lifetime experiments were conducted as described above, excitation at 781 nm with Horiba Scientific NanoLED-785L (950 V, 781 nm, <200 ps, serial number 16601), emission detected at the maximum. For cyclohexane the excitation was done at 667 nm with the Horiba Nanoled-670L (950 V, 667 nm, <200ps, serial number 14482). Toluene, chloroform and DCM fluorescence decays were fitted with a mono exponential function. A biexponential function was used for cyclohexane, dioxane and DMSO and a triexponential one for EtOH and MeOH. For biexponential and triexponential, average lifetime was estimated: $\bar{\tau} = \frac{\sum_i B_i \tau_i^2}{\sum_i B_i \tau_i}$ with B_i the pre-exponential factors and τ_i the associated lifetimes.

3.2.9 Transient absorption spectroscopy

Transient absorption spectroscopy experiments were performed with a home-built setup (Mendes Marinho et al. 2017). A Nd YAG laser (4 ns, 10 Hz, 8 mW) with an optical parametric oscillator was used as a pump at 680 nm. A ns pulse with light continuum laser (LEUKOS) (20Hz) was used as a probe. The probe beam was separated into two different pathways, one used as a reference to correct the pulse to pulse energy fluctuation (detection with a Princeton Instrument CCD (ICCD) detector PIMAX 4) and the other to probe the Bodipy NP (detection with Jobin–Yvon spectrograph

SPEX 270 M). The measured differential absorbance is defined as: $\Delta A(\lambda, t) = -\log \left[\frac{I_{probe}^{on}}{I_{ref}^{on}} \right] + \log \left[\frac{I_{probe}^{off}}{I_{ref}^{off}} \right]$ with I_{probe}^{on} and I_{ref}^{on} the probe and reference signal when the pump laser is activated. I_{probe}^{off} and I_{ref}^{off} the probe and reference signal when the pump is not activated. Spectra were obtained in 10 mm path length quartz cuvettes with a volume of 1 mL. All the solutions were purged with argon and the absorbance values, at the band maximum, were fixed at 0.4 for all the solutions. Dilution factors for NPs were: x2, x10.7, x15.4 for **NP-5%**, **NP-25%** and **NP-50%**, respectively. For Bodipy in DCM the concentration was $C_{Bodipy} = 5.0 \times 10^{-6}$ mol.L⁻¹. For all samples, absorbance spectra were checked before and after the purge. To compare Bodipy NPs and Bodipy solution in DCM, the transient absorption spectra were observed at the same fixed delay between pump and probe: 0 μ s.

3.2.10 Photoacoustic spectrum measurements

Photoacoustic excitation spectra (PES) were obtained on a home-built calibrated photoacoustic spectrometer (Sarkar et al. 2021). The setup is composed of a tunable nanosecond laser to excite the sample (680-970 nm, pulse width <8ns, pulse repetition rate: 20Hz, SpitLight 600 OPO, Innolas, Germany). Photoacoustic excitation spectra (PES) 680-970 nm were obtained with 10 nm steps. Ultrasound (US) detection was performed with an US linear array (L7-4, ATL, USA) driven by a programmable US machine (Vantage, Verasonics, USA) used in receive-only mode. Samples (15 μ L) were injected in PTFE tubes (inner diameter: 0.2 mm, Bola, Germany) using 33-gauge needles and a 50 μ L glass syringe (Hamilton). Tubes were placed at a distance of 2.5 cm from the detector surface and perpendicular to the imaging plane. For acoustic coupling, the tubes and the US detector were immersed in a thermostatic water tank. The temperature was maintained at 25°C for the stability of thermodynamic parameters implied in the photoacoustic process such as the speed of sound and the Grüneisen coefficient. Excitation light was guided in a fiber bundle with two outputs arranged in lines, placed on each side of the US detector, immersed in water, and oriented toward the imaging plane. The illumination surface was evaluated in air to be rectangular with a width of 1 cm along the direction of the tube and a length of 5.5 cm. With this illumination surface and the total energy at the fiber outputs (Thor LabOphir Photonics power meter), the fluence at the location of the tube was evaluated to have a maximum value of 3.5 mJ.cm⁻² at 760 nm. With polarizing optics between the output of the laser and the input of the fiber bundle, the fluence at 760 nm was varied between 3.5 mJ.cm⁻² and 0.3 mJ.cm⁻², by steps of 0.63 mJ.cm⁻². This fluence does not account for the light propagation in water (about 3 cm from the fiber output to the tubes) which is expected to reduce the angular divergence of light and also the light energy due to absorption. Moreover, the laser energy was not constant over the whole spectral range and had a maximum around 730 nm (figure S1). For each fluence, the PA spectrometer was calibrated with a solution of CuSO₄, 5H₂O at a concentration of 0.25M. Following this

calibration, samples were injected successively. For each laser fluence, five Bodipy NPs were studied: **NP-2.5%**, **NP-5%**, **NP-10%**, **NP-25%** and **NP-50%**. **NP-50%** were diluted 3 times and **NP-25%** were diluted 2 times, no dilution was done for **NP-2.5%**, **NP-5%** and **NP-10%**. We verified that no detectable absorption remained in the tubes between 2 samples by systematically measuring a background reference (water). The photoacoustic excitation spectra (PES) were computed and converted in spectroscopic units (photoacoustic absorbance: PAbs). A total of 15 spectra were measured by samples (30 spectra for the lowest fluence 0.35 mJ.cm^{-2}). The median values and the Median Absolute Deviation (MAD) $MAD = 1.4826 \cdot \text{median}(|PAbs_i - \text{median}(PAbs_i)|)$ were computed. To check that the photoacoustic signal variations with the laser fluence do not arise from experimental artifacts, photoacoustic excitation spectra of a nigrosin (CAS 8005-03-6) solution (water, $C = 4.84 \times 10^{-4}$ or $9.51 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) were determined at 25°C with the same laser fluences used for Bodipy NPs and compared to the absorption spectra.

The theoretical fluence saturation at 680 nm and 760 nm, was calculated thanks to $F_{saturation}^\lambda = \frac{1}{0.38 \times 10^{-20} \times \epsilon_{Bodipy}(\lambda)} \cdot \frac{hc}{\lambda}$ (Paschotta s. d.), h the Planck constant, c the light speed in vacuum in m.s^{-1} , λ the wavelength of the laser in m, and ϵ_{Bodipy} the Bodipy extinction coefficient ($\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) and F the saturation fluence (J.cm^{-2}). ϵ_{Bodipy} (757 nm) = $80\,000 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ and ϵ_{Bodipy} (680 nm) = $33\,200 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. By definition at $F_{laser} = F_{saturation}$, 37% of the initial absorbance signal is lost.

The photoacoustic generation efficiency (PGE) quantifies the conversion efficiency of optical energy into pressure (Werner et al. 2020). Here, we use a dimensionless PGE equal to 1.0 for a sample for which the absorbed optical energy is fully converted into pressure in a medium with the Grüneisen coefficient of the water. The conversion of the measured spectra in PAbs was performed using a PGE of 1.107 for the solution of $\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$ used for the calibration, due to the Grüneisen coefficient of the solution. By analogy with the fluorescence quantum yield that takes into account the whole range of emitted photons divided by the whole range of absorbed photons, we have defined the PhotoAcoustic Yield (PAY). It is the ratio of the contributing photons to the acoustic signal, to the absorbed photons:

$$PAY = \frac{\int_{\lambda_1}^{\lambda_2} PAbs \, d\lambda}{\int_{\lambda_1}^{\lambda_2} A \, d\lambda}. \text{ With } \lambda_1 = 680 \text{ nm}, \lambda_2 = 870 \text{ nm}, \text{ the experimental spectral}$$

range studied. The integrals were calculated on the experimental spectral range thanks to the Origin software (OriginLab) and the trapezoidal rule. The PAY corresponds to the acoustic yield over the whole spectral range. The PAY was calculated, for each NP batch, from photoacoustic excitation spectrum measured with a low fluence (0.98 mJ.cm^{-2}), to avoid non-linear effects. We have also calculated the acoustic efficiency at the maximum band: Photoacoustic generation efficiency $PGE_{max}(\lambda) = \frac{PAbs_{max}(\lambda)}{A_{max}(\lambda)}$.

By comparison with the fluorescence brightness, we defined a photoacoustic brightness $B_{PA}(\lambda)$:

$B_{PA}(\lambda) = N_{PLA-Bodipy} \times \epsilon_{PLA-Bodipy}(\lambda) \times PAY = \epsilon_{NP}(\lambda) \times PAY$, with N the number of PLA-Bodipy per NP, $\epsilon_{PLA-Bodipy}$ the polymer extinction coefficient ($\text{mol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) and ϵ_{NP} the NP extinction coefficient. NP photoacoustic brightness was calculated, for each NP batch, from PAY value calculated with a low laser fluence (0.98 mJ.cm^{-2}), to avoid non-linear effects.

3.2.11 PES and UV-spectra fitting

Gaussian peak fitting was found to adequately model the spectral shape of the absorption spectrum of indocyanine green (ICG) (Jaiswal et al. 2021). As for ICG modeled by a sum of two Gaussian functions, the absorption spectrum of Bodipy comprises a dominant peak (at 760 nm) and a vibronic shoulder (680-700 nm). Therefore, we implemented a decomposition of the absorption and PA spectra into Gaussian functions. We used a fitting algorithm based on a nonlinear least-squares solver (trust-region-reflective method) to determine the amplitude a_i , the central wavelength λ_i and the Gaussian Root Mean Square (RMS) width ω_i of each Gaussian function of the sum. $S(\lambda) = \sum_i a_i \exp(-\frac{(\lambda-\lambda_i)^2}{2\omega_i^2})$. We found that for the spectral range covered by the PA spectra, the spectra could be fitted by the sum of two Gaussian functions centered around $\lambda_1 \approx 760 \text{ nm}$ (called red Gaussian function) and $\lambda_2 \approx 680 \text{ nm}$ (called blue Gaussian function). However, as the PA spectra starts at 680 nm, the Gaussian fitting leads to a large variability for the second Gaussian function. Therefore, we first implemented the Gaussian peak fitting on the absorption spectra and then used the parameters λ_2 and ω_2 , as well as λ_1 to fit a_1 , a_2 and ω_1 for the different PA spectra.

The absorption spectra were acquired in a broader wavelength range (400 nm – 900 nm) than the PA spectra. However, the absorption did not decrease to almost zero around 610 nm, but increased again to a third peak centered at 540 nm. We chose to restrict the wavelength range from 530 to 870 nm to add a third Gaussian function centered around $\lambda_3 \approx 540 \text{ nm}$. The parameters λ_3 and ω_3 of this third Gaussian function as well as λ_2 and ω_2 of the second Gaussian were found consistent for **NP-10%**, **NP-25%** and **NP-50%** (about 0.1-0.5% standard deviation). For **NP-2.5%** and **NP-5%**, the scattering was no longer negligible, resulting in a wider fitted peak for third Gaussian function with in turns induced some variation on λ_2 . To avoid this effect, we chose to set the parameters λ_2 and ω_2 to the median value over the NP with three highest concentrations in Bodipy (i.e. 10, 25 and 50%): $\lambda_{2, \text{fixed}} = 685.05 \text{ nm}$ and $\omega_{2, \text{fixed}} = 37.04 \text{ nm}$. Then, we performed again a Gaussian peak fitting but with two Gaussian functions only (blue Gaussian at 685.05 nm and red Gaussian around 760 nm) and in the range 670 nm - 870 nm, to determine the parameters a_1 , λ_1 , ω_1 and a_2 for each nanoparticle.

As the absorption spectra, the PA spectra were fitted with the sum of two Gaussian functions (blue Gaussian at 685.05 nm and red Gaussian around 760 nm). For the second Gaussian function $\lambda_{2, \text{fixed}}$ and $\omega_{2, \text{fixed}}$ were used. As the wavelength step of the PA spectra was loose (every 10 nm), we found that λ_1 could be imported from the absorption spectra for each nanoparticle without altering the quality of the fit. This solution facilitated the comparison between the two spectral modalities.

The optimization algorithm could not directly use the uncertainty of the measurements. Therefore, we chose to feed the optimization algorithm not with the median value but with all the spectra to determine a_1 , ω_1 and a_2 for each NP.

By exploiting the fitted curves, a mean photoacoustic generation efficiency of the vibronic shoulder was defined as $\overline{PGE}_{\text{blue}} = \frac{\int_{\text{blue}}^{PAbs}}{\int_{\text{blue}}^A}$, the ratio of the integrated blue Gaussian function for photoacoustic to the integrated blue Gaussian function for absorption. The mean PGE value of the vibronic shoulder was calculated for each NP and each laser fluence and plotted on a heat map. The mean PGE value was calculated for the maximum and red part of the band: $\overline{PGE}_{\text{red}} = \frac{\int_{\text{red}}^{PAbs}}{\int_{\text{red}}^A}$, the ratio of the integrated red Gaussian function for photoacoustic to the integrated red Gaussian function for absorption. The mean PGE value of the red part of the band were calculated for each NP and each laser fluence and plotted on a heat map.

3.3 RESULTS

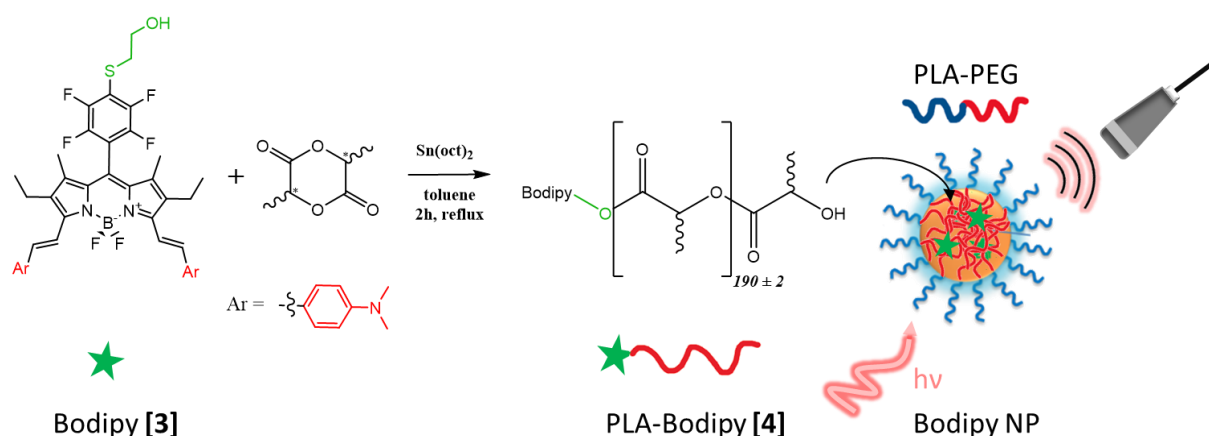
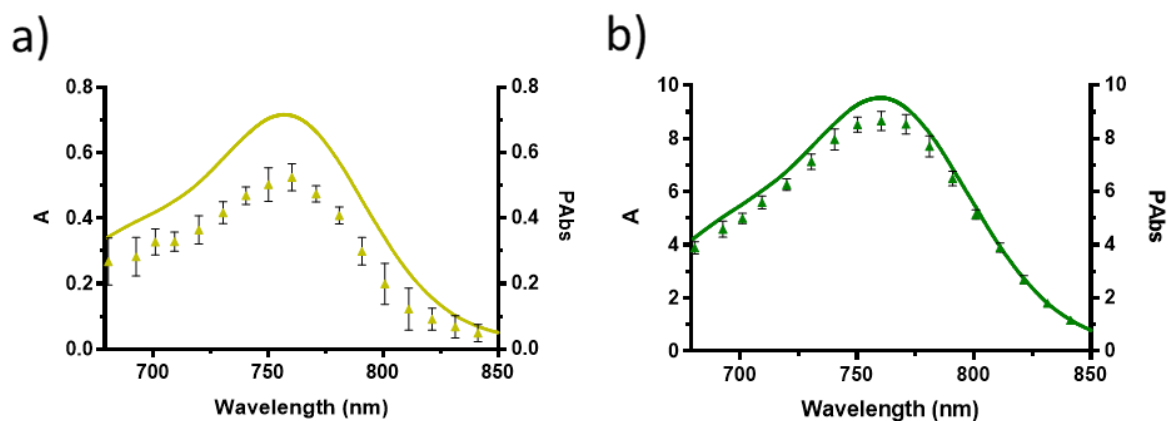


Figure 3.1 : Molecular structure of the Bodipy [3] and PLA-Bodipy [4] and schematic representation of the photoacoustic activated Bodipy NP.

Bodipy [3] was synthesized with the three-steps one pot protocol described in details in chapter 2. As already demonstrated in our previous work (chapter 2), the introduction of two electron-donating groups: 4-(N,N-dimethylamino)styryl, shifts the

maximum of absorption close to the Near Infra-Red region (757 nm) and introduces an Internal Charge Transfer (ICT) that quenches the Bodipy fluorescence (QY = 0.007 in dichloromethane). Bodipy **[3]** exhibits strong absorption properties ϵ (757 nm) = 80 000 L.mol⁻¹.cm⁻¹ in dichloromethane and its low fluorescence favors high Photoacoustic signal. Ring Opening Polymerization (ROP) of DL-lactide was initiated by the Bodipy alcohol function to obtain a PLA-Bodipy **[4]** (14 500 g.mol⁻¹) (figure 3.1). PEGylated Bodipy NPs were formulated by emulsion–evaporation technique by mixing different mass percentage of PLA-Bodipy **[4]** (from 2.5% to 50%) compared to PLA-PEG₅₀₀₀ **[6]**: **NP-2.5%**, **NP-5%**, **NP-10%**, **NP-25%** and **NP-50%**. The synthesized NP are monodispersed with a 100 nm diameter.

The Photoacoustic excitation spectra of the Bodipy NP are presented in figure 3.2 and figure S2. The pressure signal recorded on the photoacoustic setup was converted into spectroscopic units (photoacoustic absorption: PAbs) thanks to a calibration step with copper sulfate pentahydrate described in details in (Sarkar et al. 2021). PAbs represents part of the absorption that contributes to the acoustic emission. With a 100% Photoacoustic Yield (PAY) a perfect match between the Photoacoustic excitation spectra (PES) and the absorption spectra should be observed since all the absorbed energy would be converted into an acoustic wave. PES (triangle) and absorption spectra (continuous line) were compared (figure 3.2a, 3.2b and figure S2). Absorption spectra and PES for **NP-2.5%** and **NP-50%** have very close spectral shapes. The maximum of absorption is around 760 nm and the vibronic shoulder at 680 nm. Similar results are observed for all the batches (**NP-2.5%**, **NP-5%**, **NP-10%**, **NP-25%**, **NP-50%** figure S2). A slight red shift is observed on the absorption spectra and PES as the PLA-Bodipy amount increases. For **NP-2.5%** we can observe, at any excitation wavelength, a lower PAbs compared to absorption. The relative gap (R_g) between absorption and photoacoustic absorption is about 27% at the maximum of absorption. This relative gap is reduced when PLA-Bodipy increases. For instance, only a 9.1% relative gap is observed for **NP-50%**. Thus, PES and absorption spectra are getting closer with higher PLA-Bodipy amount. By analogy with the fluorescence quantum yield, the PhotoAcoustic Yield (PAY) was defined as the ratio of the integrated PAbs to the integrated absorption over 680-870 nm range (whole studied spectral range). It represents the overall efficiency of energy conversion between the absorbed light and the emitted acoustic wave. **NP-2.5%** exhibits a 69.3% PAY and PAY is increasing up to 92.8% as PLA-Bodipy increases to 50%. **NP-10%**, **NP-25%** and **NP-50%** all display PAYs higher than 85%. Thus, PAY seems to increase a lot between 2.5% and 5% of PLA-Bodipy, and changes only slightly above 10% of PLA-Bodipy. It appears that the photoacoustic efficiency is correlated with percentage of PLA-Bodipy in NPs.



	NP-2.5%	NP-5%	NP-10%	NP-25%	NP-50%
PAY (%)	69.3	80.4	84.8	88.3	92.8
Rg max (%)	26.7	20.4	16.2	12.4	9.1

Figure 3.2 : Absorption spectra (continuous line) and photoacoustic excitation spectra (PES) (triangle) for nanoparticles batch. (a) **NP-2.5%** (yellow), (b) **NP-50%** (green). Laser fluence 0.98 mJ.cm^{-2} . PhotoAcoustic Yield (PAY) was obtained by doing the area ratio of PES and absorption spectra for each NP batch (680-870 nm). Rg: relative gap $Rg_{max} = 100 \frac{A_{max} - PAb_{s_{max}}}{A_{max}}$. Absorbance values were corrected from dilution factor: no dilution for **NP-2.5%** and 10 times dilution for NP-50%. PAbs values were corrected from dilution factor: no dilution for **NP-2.5%** and 3 times dilution for **NP-50%**.

To better understand NP photophysical properties and how they may be related to the PAY, NP fluorescence properties were investigated. Figure 3.3a represents the NP fluorescence emission spectra, from **NP-2.5%** to **NP-50%**, with a 670nm excitation. A fluorescence intensity decrease is observed as PLA-Bodipy amount increases. The highest fluorescence signal is obtained for **NP-2.5%** and the lowest for **NP-50%**. The maximum band position is red-shifted as PLA-Bodipy increases. NP fluorescence QY relative to the Bodipy **[3]** QY (Φ_F/Φ_F^0) was calculated (figure 3.3b and table S1). The NP QY is decreasing with the increase of PLA-Bodipy percentage. **NP-2.5%** have a 125% relative QY, when **NP-50%** have a 12% relative QY. We observed a 113% loss of the fluorescence QY. As Bodipy **[3]** is a charge transfer Bodipy, matrix effect may influence the QY and the spectral shift (Valeur et Berberan-Santos 2013). On the other hand, high dye-loaded polymer NPs are well known to enhance fluorescence Aggregation Caused

Quenching (ACQ) and red-shift behavior (Wagh, Qian, et al. 2012; Andreiuk et al. 2019; Grazon et al. 2014; Saxena, Sadoqi, et al. 2004).

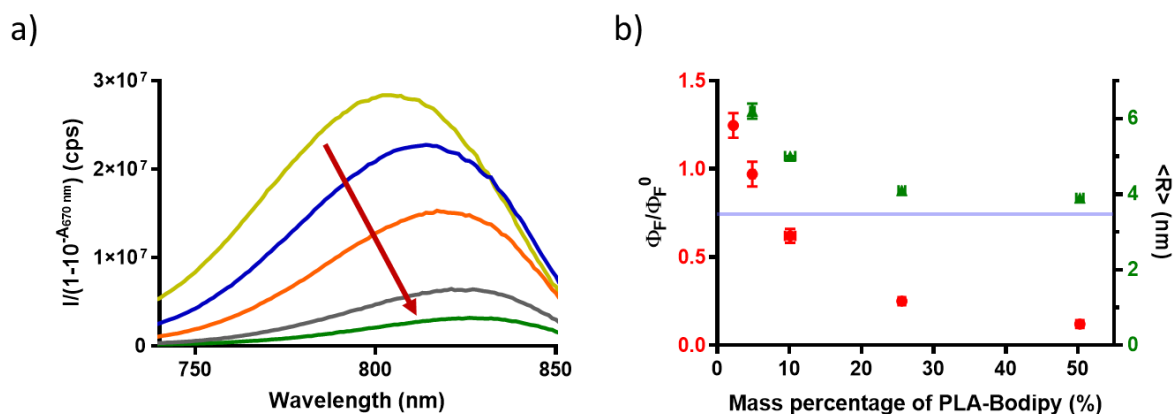


Figure 3.3 : (a) Emission spectra of the nanoparticles ($\lambda_{\text{ex}} = 670$ nm, slit width 10 nm and $A < 0.1$). (Yellow, Bodipy **NP-2.5%**), (blue, Bodipy **NP-5%**), (orange, Bodipy **NP-10%**), (grey, Bodipy NP-25%), (green, Bodipy NP-50%). (b) Fluorescence quantum yield (red circle) evolution as a function of the PLA-Bodipy mass percentage, excitation at 670 nm. Fluorescence quantum yield (Φ_F) relative to Bodipy **[3]**, 298 K ($\Phi_F^0 = 0.007$). $\langle R \rangle$: distance of the nearest neighbor between Bodipy (green triangles) evolution as a function of PLA-Bodipy mass percentage. $\langle R \rangle$ is obtained with the mean Bodipy number per NP per nm^3 (n_p) and $\langle R \rangle = 0.554 \times \frac{1}{n_p^{1/3}}$ (Santos 1986). The blue line represents R_0 (nm), the Förster Radius for Bodipy NPs.

To discriminate between ACQ or matrix effect, solvatochromism was studied (figure S3, table S2). For absorption, emission and excitation spectra of Bodipy **[3]**, a bathochromic shift was observed with increasing the solvent polarity. The Stokes shift is increasing with the solvent polarity ($E_T(30)$ polarity scale (Reichardt 1994)), from 499 cm^{-1} for cyclohexane to 1294 cm^{-1} for methanol. A positive solvatochromism is noticeable, highlighting a higher excited state dipolar moment compared to ground state for Bodipy **[3]** (Valeur et Berberan-Santos 2013). The charge transfer nature of the electronic transition, from the donor aniline group to the acceptor Bodipy main core, can explain the higher excited state dipole moment. Similar results were obtained in literature with a close Bodipy structure, and the charge transfer nature of the transition was demonstrated by electron density calculations (Galangau et al. 2010). For apolar solvents (cyclohexane, dioxane, toluene, chloroform) a locally excited (LE) emission band was noticeable at low wavelength (700 nm). This emission arises from the Franck-Condon state. At higher wavelength, the solvatochromic main band corresponds to a Twist Intramolecular Charge Transfer (TICT) state where the dimethylamino group may have twisted 90° compared to the aromatic ring (R. Hu et al. 2009; C. Wang et al. 2021). For the different solvents, no change of the fluorescence

spectra was observed with the excitation wavelength. In hydrophobic solvent the Bodipy **[3]** QY was improved, QY = 0.16 in cyclohexane. In polar solvent the Bodipy intramolecular charge transfer is favored and the fluorescence was reduced (QY = 0.009 in methanol). The quenching effect caused by charge transfer was demonstrated in (Galangau et al. 2010), with a close Bodipy structure, and an increased fluorescence when the charge transfer is avoided with a protonated amino group. The increased fluorescence QY in apolar solvent can explain the slightly higher QY value for **NP-2.5%** compared to the Bodipy **[3]** in DCM ($(\Phi_F/\Phi_F^0 = 125\%)$). In **NP-2.5%**, the Bodipy monomer lies in a hydrophobic and rigid polymer matrix which favors fluorescence more than in DCM. For NPs, no trace of a LE state was observed at low wavelength. Moreover NP red-shifted emission and absorption are less marked than what was observed in the solvatochromic experiments. NP fluorescence loss might arise from ACQ effect rather than from matrix effect.

To investigate the presence of several emitters, excitation was changed. Fluorescence emission spectra with a 540 nm excitation were measured (figure S4). The molecular Bodipy **[3]** emission fluorescence spectra (figure S4b) in DCM are unchanged whatever the excitation wavelength (670 or 540nm). However, for the NP batches, the fluorescence spectral shape is changing upon excitation wavelength change (figure S4a, table S3). Spectral deformations are magnified with high PLA-Bodipy amount. The higher PLA-Bodipy percentage, the weaker the blue shoulder (793 nm; -39% from **NP-2.5%** to **NP-50%**) and the higher the red shoulder (840 nm; +49% from **NP-2.5%** to **NP-50%**) (figure S4d emission). On the contrary, no spectral change with the excitation wavelength was observed in the solvatochromic experiments. This is a good clue to highlight the presence of ACQ in Bodipy NPs. NP relative QY measured with a 540 nm excitation is also decreasing (table S1), but values are slightly different from those obtained with a 670 nm excitation. For all NP batches, the fluorescence emission bands with a 540 nm excitation are thinner than those with a 670 nm excitation (table S3). The Full Width at Half Maximum (FWHM) is sharpening with an increased PLA-Bodipy loading from 927 cm^{-1} to 786 cm^{-1} for the emission with a 540 nm excitation. The same sharpening of the band is observed with the emission spectra with a 670 nm excitation (from 1187 cm^{-1} to 907 cm^{-1}). Excitation spectra of the Bodipy NP show an increased red shoulder (815nm; +29% from **NP-2.5%** to **NP-50%**) with the PLA-Bodipy amount, but no change in the blue shoulder (700 nm) was observed (figure S4c and S4d).

Change of the fluorescence emission spectra with the excitation wavelength for Bodipy NPs and not for Bodipy **[3]** in DCM, is characteristic of the apparition of a new species inside NPs. The increased spectral deformation with the PLA-Bodipy content is a strong clue for the appearance of aggregated Bodipy inside NPs. Bodipy aggregation can be explained with the exciton theory and two models of aggregates: sandwich like H-aggregates and head-to-tail or head-head J-aggregates (Kasha, Rawls, et Ashraf El-Bayoumi 1965; Würthner, Kaiser, et Saha-Möller 2011; Büнау 1970; Vu et al. 2013). The

red shoulder increase (emission and excitation spectra) and the red-shift observed in absorption and emission spectra with an increased PLA-Bodipy amount, could arise from red emitters formation: J-aggregates (Gu et al. 2021; K. Li et al. 2021; W. Hu et al. 2019). Moreover, a sharp emission band of about 641 cm^{-1} for Bodipy J-aggregates and about 1061 cm^{-1} for Bodipy monomer can be found in the literature (Vu et al. 2013). The sharpening of NP emission spectra is a good clue for J-aggregates formation. The blue shoulder decrease in the NP fluorescence emission spectra highlights the disappearance of fluorescent Bodipy, which may be attributed to the non-aggregated Bodipy monomer. On the Bodipy **[3]** structure, alkyl chains on the alpha and beta positions of the Bodipy core are known to induce a twisted pentafluorophenyl (meso position) out of the Bodipy plane by steric hindrance. Similar Bodipy structure in literature show dihedral angle between the indacene plane and the phenyl ring between 55° - 88° (Galangau et al. 2010; K. Li et al. 2021; Lempke et al. 2015; Mula et al. 2008; Duan et al. 2019). The bulky and perpendicular pentafluorophenyl ring can favor J-aggregation compared to H-aggregation thanks to lower intermolecular π - π interactions by steric hindrance (K. Li et al. 2021; Descalzo et al. 2019; Tian et al. 2018; Duan et al. 2019). No clues for the formation of non-fluorescent H-aggregates inside the NP were observed on the NP spectra (absorption blue shift, broadening band in absorption). The QY decrease could come either from dark species formation: energy transfer between emitters (EET) down to a trap (J-aggregates could act as traps), the presence of less fluorescent J-aggregates, or formation of poorly fluorescent aggregates with intermolecular charge transfer (Vu et al. 2013; W. Hu et al. 2019).

To better decipher the aggregation behavior, Bodipy **[3]** reprecipitation was studied in different water/THF mixture (figure S5-S7), with THF acting as a good solvent and water a bad solvent. A red shifted absorption and emission are noticeable when the water fraction is increased. First, we observe a decrease of the fluorescence emission with the water fraction increase. Moreover, at high water fraction, very similar spectral distortions (blue and red shoulder) that the one of Bodipy NP can be seen. For fluorescence emission (540 nm excitation), one can highlight a **+48%** red shoulder (**840 nm**) increase and a **-41%** blue shoulder (**793 nm**) decrease (figure S6) between 0% and 70% water. Those band ratio variations are really close to those obtained within Bodipy NPs. Water/THF excitation spectra (figure S7) highlight a huge increase of the red ratio at **815 nm (+150%)** with the water fraction. Red shift in absorption and emission as well as the red shoulder increases are good clues for J-aggregates formation at high water fraction. The blue shoulder decrease in emission might arise from monomer transformation in aggregated species. The nanoprecipitation experiments, with an increased water fraction, were in good agreement with the observed fluorescence evolution of NPs with an increased PLA-Bodipy amount. As already stated above: The fluorescence loss with an increase water fraction could come from energy migration to a trap, the presence of less fluorescent J-aggregates, monomer to less fluorescent J-

aggregates energy transfer, or intermolecular charge transfer state (Vu et al. 2013; W. Hu et al. 2019).

For Bodipy NPs, distances to the nearest neighbor $\langle R \rangle$ (figure 3.3b) were estimated as described in (Santos 1986) thanks to the mean Bodipy number per NP per nm^3 ($N_{\text{PLA-Bodipy}}$) calculated in details in chapter 2. $\langle R \rangle$ is decreasing from 6.2 nm for **NP-5%** to 3.9 nm for **NP-50%** but the values are probably overestimated, as the NP volumes were calculated using NP hydrodynamic diameters. As a matter of fact, Bodipy hydrophobicity is likely to favor aggregation in NP core and not in the hydrophilic polyethylene glycol shell (Grazon et al. 2014; Hamon et al. 2016) (further details in chapter 4, 4.3.3). In literature, some J-aggregated Bodipy with a π - π distance of 0.4-1.7 nm are reported (K. Li et al. 2021; Duan et al. 2019; X. Guo et al. 2020; Y. Zhang et al. 2021; Ozdemir et al. 2009). Those values are close to the over-estimated nearest neighbor $\langle R \rangle$ Bodipy values (6-4 nm). The Bodipy mean distance is reducing with the Bodipy loading, in the same way as the NP QY (figure 3.3b). Spatially close Bodipy in NPs could favor self-energy transfer as well as aggregation. The Förster radius (R_0) were calculated for the Bodipy NPs and indicated table S1 and on figure 3.3b (blue band). $\langle R \rangle$ values are close to NP Förster radius 3.4 nm, and demonstrates the possible existence of energy transfer inside Bodipy NPs. The energy transfer can actually be of two different natures: excitation migration, through Förster Resonance Energy Transfer (FRET) between several identical emitters (such as J-aggregates or monomers) also known as homo-FRET, or energy transfer between different emitters (hetero-FRET eg. Monomer to J-aggregates). The very high fluorescence quenching inside Bodipy NPs could either come from hetero-FRET from monomer to less-fluorescent aggregates, or homo-FRET and energy migration down to a trap or both. Such behavior is consistent with literature, dye loaded polymeric nanoparticles are known to exhibit multi-steps energy transfers between aggregates (homo-FRET or exciton diffusion) (Reisch et al. 2014; Andreiuk et al. 2019; Ho et al. 2013; Wagh et al. 2013).

We have demonstrated that an increased dye loading is likely to favor J-aggregated Bodipy formation in NPs and fluorescence quenching. Time-resolved experiments were performed in order to better decipher deactivation pathways and how they can be connected to acoustic wave generation (figure 3.4a). The fluorescence lifetime of Bodipy NPs is decreasing as PLA-Bodipy content increases. The fastest fluorescence deactivation is observed with **NP-50%** and the longest one with **NP-2.5%**. Mean fluorescence lifetimes ($\overline{\tau}$) were estimated thanks to a bi-exponential fit (Table S4). The mean lifetime decreased from 1.22 ns for **NP-2.5%** to 0.27 ns for **NP-50%**. The excited state lifetime is decreasing as PLA-Bodipy increases, as for the QY values, suggesting a stable radiative rate constant (k_r) and favored non radiative decays. The radiative rate constant k_r was calculated with the Strickler-Berg relation (Strickler et Berg 1962) (table S4). We observe the same value for all NP batches ($k_r \approx 1.4 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$). The non-radiative rate constant k_{nr} was estimated and is linearly increasing with PLA-

Bodipy amount (figure 3.4b, table S4). Excited state lifetime and QY decrease arise from favored non-radiative decay with as PLA-Bodipy content increases and highlight ACQ effect in NPs. The y-intercept of the fit, $k_{nr}^0 = 7.4 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$ (1.1 ns equivalent lifetime), corresponds to a limit situation: isolated Bodipy monomer inside a polylactide matrix. The 1.1 ns lifetime, is close to the one of Bodipy **[3]** in DCM (1.03 ns) (chapter 2). Similar k_{nr} linear increase was obtained on Bodipy-loaded polymer NPs in literature (Grazon et al. 2014). The mathematical fit highlights two terms dependency for k_{nr} : a constant non-radiative deactivation of the Bodipy monomer (y-intercept $k_{nr}^0 = 7.4 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$) and the aggregation caused quenching term, which depends on the PLA-Bodipy percentage: $k_{ACQ} = 7.08 \times 10^7 \times \%PLA - Bodipy$. The overall equation obtained is: $k_{nr} = k_{nr}^0 + k_{ACQ}$, and a similar equation was noticeable in literature (P. Green et R. Buckley 2015). According to the fit, above the calculated value of 10.5% PLA-Bodipy, k_{ACQ} starts to be higher than k_{nr}^0 and aggregation caused quenching becomes the favored deactivation pathway. For PLA-Bodipy below **NP-10%**, the favored deactivation pathway is the Bodipy monomer non-radiative decay (monomer regime). For dye loading above **NP-10%**, the favored deactivation is operated by ACQ (ACQ regime). PAY was plotted as a function of k_{nr} (figure 3.4c). PAY highly depends on the Bodipy aggregation state, it is increasing very fast with k_{nr} for low PLA-Bodipy NP: **NP-2.5%** and **NP-5%**. After 10% PLA-Bodipy (PAY = 84.8%), in the ACQ regime, the PAY increase is slower and further aggregation will poorly change its value. The fit of k_{nr} as a function of the PLA-Bodipy percentage might be used as a highly predictive tool to estimate the minimal PLA-Bodipy content to be in the ACQ regime. Before performing photoacoustic experiments, by measuring fluorescence lifetime, one can therefore predict the minimum PLA-Bodipy content to quickly reach high PAY.

Heterogeneity of the Bodipy aggregates was evaluated by fitting the fluorescence decays with a sum of a mono-exponential function (Bodipy monomer, T_2) and a stretched exponential function (lifetime distribution of the aggregates, T_1) (Berberan-Santos, Bodunov, et Valeur 2005; Grazon et al. 2014). The fitted parameters and the curves are indicated figure S9 and S10, and the mono-exponential lifetime was fixed at $T_2 = 1.1 \text{ ns}$ (Bodipy **[3]** lifetime in DCM). Results show a decrease in the aggregates lifetime (T_1) from 0.5 ns (**NP-5%**) to 0.1 ns (**NP-50%**) with increasing the PLA-Bodipy percentage. The aggregates lifetime is decreasing due to favored non-radiative decay thanks to ACQ. Aggregates relative amplitude (%1) is increasing with the PLA-Bodipy percentage: from 16.3% (**NP-5%**) to 94.8% (**NP-50%**). We can notice that above 10% of PLA-Bodipy, a relative amplitude of the Bodipy aggregates higher than 50% was obtained (68.4%). As seen before, above 10% PLA-Bodipy, the aggregation caused quenching is the favored deactivation pathway (ACQ regime). The beta exponent is decreasing as PLA-Bodipy content increases and highlights an increased inhomogeneity in the NP (Grazon et al. 2014). The distribution of aggregates lifetime, $H(k)$, is plotted figure S11a. We can observe a broadening of lifetime

distribution as PLA-Bodipy content increases that is characteristic of the increased inhomogeneity in Bodipy interactions. The aggregates rate (%1), obtained with the fitted parameter for stretched exponential, is plotted as a function of the PLA-Bodipy percentage and stacked with the Bodipy NP relative QY curve (figure S11b). The aggregate contribution is increasing (+79%) as the Bodipy QY is decreasing (-88%). Fluorescence quenching is then indeed related with the aggregate concentration in the polymer matrix.

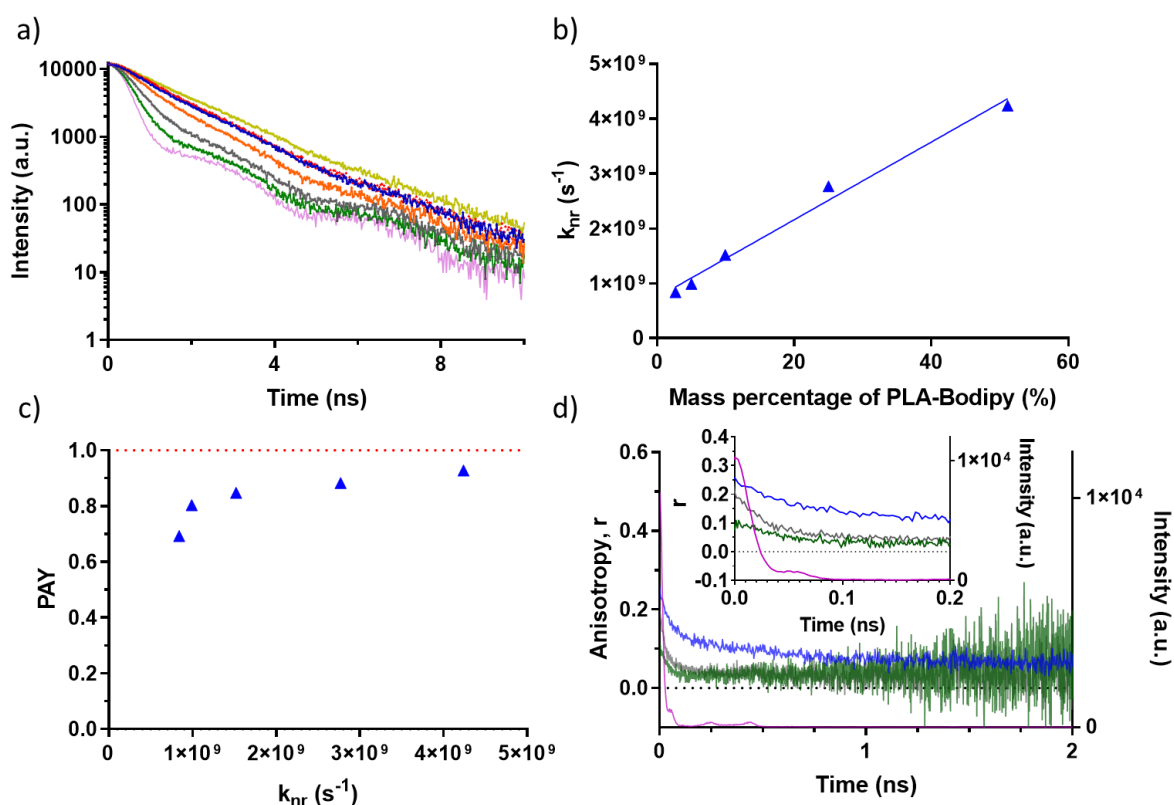


Figure 3.4 (a) Fluorescence decays of NP suspension, excitation at 781 nm with a pulsed diode <200 ps, emission at 820 nm. (Yellow, Bodipy **NP-2.5%**), (Red, Bodipy **[3]** in DCM), (blue, Bodipy **NP-5%**), (orange, Bodipy **NP-10%**), (grey, Bodipy **NP-25%**), (green, Bodipy **NP-50%**), (purple, excitation diode signal). (b) Evolution of the non-radiative rate constant k_{nr} as a function of the introduced mass percentage of PLA-Bodipy. The rate constants were determined thanks to the Strickler-Berg equation. Absorbance linear fit: $R^2 = 0.9869$ and $y = 7.08 \times 10^7 x + 7.44 \times 10^8$. (c) Evolution of the PAY as a function of the non-radiative rate constant. The red line represents the curve $y = 1$. (d) Anisotropy decay of NP suspension, excitation at 690 nm, emission at 820 nm, (blue, Bodipy **NP-5%**), (grey, Bodipy **NP-25%**), (green, Bodipy **NP-50%**), (purple, excitation diode signal). The figure in the inset is a zoom between 0.1 and 0.2 ns and between -0.1 and 0.4 radian.

To decipher eventual excitation energy transfer (homo-FRET) within NPs, both steady-state and time-resolved anisotropy experiments were conducted. Steady state anisotropy (table S4) is very weak and seems to be independent of the PLA-Bodipy content: 0.096, 0.065 and 0.108 for **NP-5%**, **NP-25%** and **NP-50%**, respectively. Such a low value is certainly due to energy transfer between randomly oriented fluorophores. As Bodipy is dispersed in a polymer matrix, it could very poorly depolarize by rotation as demonstrated in literature for dye-loaded polymer NPs (Reisch et al. 2014; Vu et al. 2013; Reisch et al. 2017). The NP glass transition were determined with differential scanning calorimetry experiments: $30.4^{\circ}\text{C} < T_g < 33.4^{\circ}\text{C}$ (table S5). As all spectroscopic experiments were performed at room temperature, we assume there is no fluorescence depolarization by polymer mobility. Moreover, NP rotational correlation time was estimated to be about 60-130 μs (Stokes-Einstein equation), which is too long to depolarize during fluorescence lifetime (about 1 ns). Fluorescence depolarization is thus likely to occur by ultrafast excitation energy transfer inside randomly oriented aggregates: Homo-FRET (Reisch et al. 2014; Ghigginio et al. 2000; Colby et al. 2010; Méallet-Renault et al. 2006). Light depolarization is also a good clue for an amorphous Bodipy structure in NPs. Time resolved-anisotropy experiments were investigated (figure 3.4d). Anisotropy is decreasing faster with a high PLA-Bodipy content: <700 ps, <300 ps and <100 ps for **NP-5%**, **NP-25%** and **NP-50%**, respectively. By increasing the percentage of PLA-Bodipy, the number of Homo-FRET is thus greater and the anisotropy declines more rapidly. The number of energy Homo-transfer is estimated by the ratio of r_0 (Bodipy monomer) to the NP infinite anisotropy r_{∞} (Table S4) (Chan, Kaminski, et Kaminski Schierle 2011; Reisch et al. 2014; Bader et al. 2007). For **NP-5%** there is about 7 Homo-FRET and for **NP-25%** and for **NP-50%** about 12 transfers. As demonstrated with QY and fluorescence lifetime experiments, Bodipy aggregation poorly changes above 10% of PLA-Bodipy. Anisotropy experiments highlight the presence of increased excitation energy transfer homo-FRET in Bodipy NPs as PLA-Bodipy increases. Within NPs, energy transfer between identical fluorophores (J-aggregates or Bodipy monomer): homo-FRET can occur several times before the energy is emitted (or quenched). With homo-FRET only, no spectral change and no fluorescence loss should be observed, as the excited species and the emitter have the same spectral features. Therefore, homo-FRET cannot explain quenching and lifetime decrease. However, multi steps energy transfers can increase the fluorescence quenching, as the excitation energy can migrate, on long distance, to reach dark species (non-fluorescent trap), or less fluorescent J-aggregates (Hetero-FRET), or other kind of aggregates with intermolecular charge transfer (Hennig et al. 2013; B. Chen et Wang 2019; Caponetti et al. 2019; Andreiuk et al. 2019; Vu et al. 2013). All of these processes can be characterized by the generic term ACQ and associated rate constant k_{ACQ} . High PLA-Bodipy loadings favor an increased number of energy migrations as well as quenching. Inspired from literature, 5 different models for energy migration and quenching were considered (figure 3.5) (Vu et al. 2013). In models 1 and 2, homo-FRET

takes place between Bodipy monomers and the fluorescence is quenched by energy migration to a trap. These two models are very unlikely, because spectral deformations observed with reprecipitation and NP spectra indicate a disappearance of monomers in favor of aggregated Bodipy. Moreover, fluorescence lifetime experiments show a huge decrease of the monomer fluorescence contribution at high PLA-Bodipy percentage. Thus, homo-FRET is likely to operate between fluorescent J-aggregates (models 3, 4 and 5). In model 3, fluorescence decrease comes from hetero-FRET between a fluorescent monomer and very poorly fluorescent J-aggregates. However, the beta parameter and lifetimes distributions ($H(k)$ values) obtained with the stretched exponential fit highlight an increased inhomogeneity in Bodipy interactions and thus the probability to form non-fluorescent traps (Dias et al. 2006; R. Chen 2003; Das, Mishra, et Ghosh 2021). Very probably the excitation energy migrates by homo-FRET between J-aggregates and reaches a trap that quenches the fluorescence (models 4 and 5). Two competitive phenomena are then likely to influence the infinite anisotropy values. First, at low PLA-Bodipy loading, the increased PLA-Bodipy percentage is likely to increase the number of energy transfers, and to decrease the infinite anisotropy. Above a certain PLA-Bodipy loading, the molecular density of Bodipy is so large that the formation of non-fluorescent trap is possible. Those traps do not contribute to the fluorescence anisotropy, and limit the number of energy transfers (Hennig et al. 2013). The number of homo-transfers remains constant between 25% and 50% of PLA-Bodipy. At this stage we cannot discriminate between model 4 and model 5.

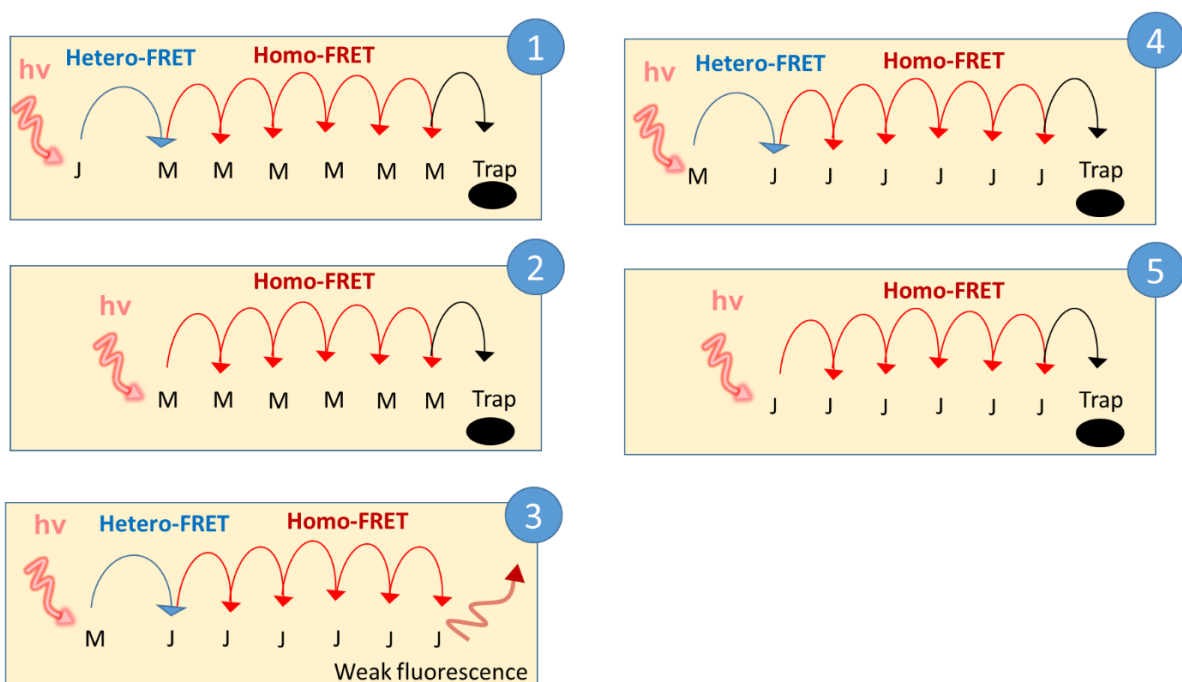


Figure 3.5 : Schematic representation of the different models for excitation energy transfer and fluorescence quenching inside the Bodipy NP. M is for Bodipy monomer, J represents the Bodipy J-aggregates and the dark circle is a non-fluorescent trap.

So far and to summarize we have demonstrated that the fluorescence quenching by ACQ and excitation energy transfer could highly favor non-radiative deactivation and therefore increase the PAY up to 93%. Above 10% of PLA-Bodipy, the ACQ regime is reached with about 12 energy migration steps and a PAY greater than 90%. Higher PLA-Bodipy percentage than **NP-10%** will poorly improve the PAY.

However, the photoacoustic signal not only depends on the PAY, but also on NP absorption coefficient. Higher PLA-Bodipy per NP will favor higher photoacoustic signal because of a greater absorption. For this reason **NP-50%** exhibit a much higher PAbs (8.66 at 760 nm) than **NP-25%** (PAbs = 4.55 at 760 nm) (figure S2), even though their respective PAY are very similar. By comparison with the fluorescence brightness, we can define a photoacoustic brightness

$$B_{PA}(\lambda) = N_{\text{PLA-Bodipy}} \cdot \epsilon_{\text{PLA-Bodipy}}(\lambda) \cdot \text{PAY} = \epsilon_{\text{NP}}(\lambda) \cdot \text{PAY},$$

with $N_{\text{PLA-Bodipy}}$ the number of PLA-Bodipy per NP, $\epsilon_{\text{PLA-Bodipy}}$ the polymer extinction coefficient ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) and ϵ_{NP} the NP extinction coefficient determined in chapter 2. NP brightnesses are indicated in table S6. The brightest NPs are obtained with **NP-50%**, $B_{PA} = 2.2 \times 10^8 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. For **NP-5%**, **NP-10%** and **NP-50%**, the photoacoustic brightness was respectively $1.2 \times 10^7 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, $2.5 \times 10^7 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ and $7.9 \times 10^7 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. To the best of our knowledge, this is the first report of a quantitative determination of the photoacoustic brightness, thanks to a precise determination of the NP photoacoustic yield PAY and not only from an estimation based on $\epsilon_{\text{NP}} \times (1 - \Phi_F)$ (Zhou et al. 2019). By comparison with fluorescence imaging, ultrabright Bodipy polymer NPs exhibit fluorescence brightness of $1.4 \times 10^8 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Grazon et al. 2014) and dye-loaded polymer NPs have fluorescence brightness about 10^6 - $10^7 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ [62, 70, 71]. Herein, we have synthesized NPs with high extinction coefficient (chapter 2) and very high photoacoustic yield that makes them ultrabright photoacoustic emitters.

The Photoacoustic efficiency was studied over the whole absorption band and characterized with the PAY. However, one can notice some spectral differences to compare PAbs and absorbance values. In the blue region, between 680-700 nm, PAbs and Absorbance are very close, even for NPs with low PAY as **NP-2.5%** and **NP-5%** (figure 3.2 and S2). However, the proximity of PES and absorption spectra is lowered at the band maximum. To better visualized the spectral variability, absorption spectra and photoacoustic excitation spectra were superimposed and normalized at 680.6 nm for each NP batch and the fluence was increased up to $3.5 \text{ mJ} \cdot \text{cm}^{-2}$ (figure S12). For low PLA-Bodipy loading, **NP-2.5%** and **NP-5%**, in PES, the maximum of the band is closer to the vibronic shoulder than in absorption spectra. It seems that the maximum band shrivel up for low PLA-Bodipy loading PES. For **NP-25%** and **NP-50%**, a perfect match was observed between normalized absorption and PES. In literature, this band

deformation compared to absorption spectra was also observed on photoacoustic spectra with bis-styryl Bodipy, but never commented nor explained (Ni et al. 2017; W. Hu et al. 2016). It was also noticeable in literature on fluorescent protein (Laufer et al. 2013). The spectral deformation of the band might arise from non-linear effects caused by high fluence irradiation on the sample. To verify this hypothesis, 5 different laser fluence were used, 0.35 mJ.cm^{-2} , 0.98 mJ.cm^{-2} and 1.6 mJ.cm^{-2} , 2.2 mJ.cm^{-2} , 2.9 mJ.cm^{-2} , 3.5 mJ.cm^{-2} and photoacoustic spectra plotted and compared with absorption spectra measured on a classical UV-visible spectrophotometer (with no fluence variation) (figure 3.6). For each NP batch, the photoacoustic absorbance is reduced as fluence increases. The PABs is getting further and further away from the absorption spectra with an increased fluence, a signature of energy conversion decrease between absorbed light and acoustic emission. One can notice that the influence of the laser fluence is higher on low PLA-Bodipy loaded NPs (**NP-2.5%**, **NP-5%** and **NP-10%**) than on aggregated NPs: **NP-50%** and **NP-25%**. Moreover, as seen before on the PES spectra (figure S2 and S12), spectral differences are also visible. For each NP batch, the PABs loss as fluence increase, is higher at the maximum band than in the vibronic shoulder (680-700 nm). Very few PABs variations with the fluence were observed between 680 and 700 nm for all NP batches.

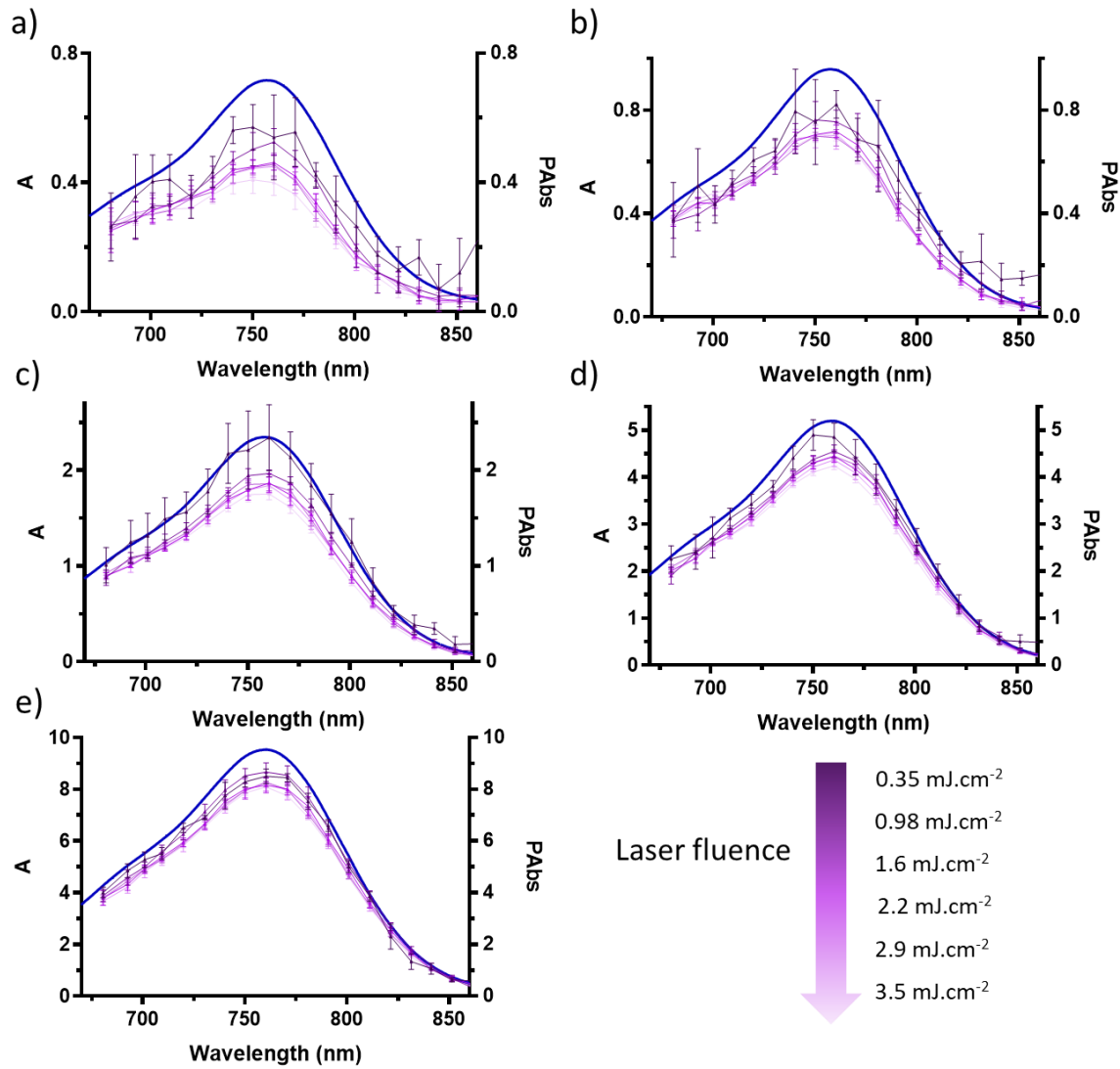


Figure 3.6 Absorption spectra (continuous line) and photoacoustic excitation spectra (dots) of Bodipy NP for different laser fluences. (a) **NP-2.5%**, (b) **NP-5%**, (c) **NP-10%**, (d) **NP-25%**, (e) **NP-50%**. From dark to light violet respectively 0.35 mJ.cm^{-2} , 0.98 mJ.cm^{-2} and 1.6 mJ.cm^{-2} , 2.2 mJ.cm^{-2} , 2.9 mJ.cm^{-2} , 3.5 mJ.cm^{-2} . The arrow indicates the laser fluence increase.

To finely characterized and quantify the photoacoustic signal loss, the Photoacoustic Generation Efficiency PGE was calculated. PGE was already defined in the literature at a given wavelength λ , as the ratio of the photoacoustic signal (PAbs) to the Absorbance:

$$PGE(\lambda) = \frac{PAbs(\lambda)}{A(\lambda)} \quad (\text{Fuenzalida Werner et al. 2020; 2019; Brown et al. 2015; Abbruzzetti et al. 1999; Vetschera et al. 2018; Sarkar et al. 2021}).$$

PGE was calculated for each NP batch and each laser fluence at the band maximum and plotted figure 3.7 (a) $PGE_{max} \frac{PAbs_{max}}{A_{max}}$. Contrary to PAY, which represents the energy conversion over the whole band, PGE_{max} is a measurement of energy conversion at a given wavelength. For each NP batch, an increased fluence leads to lower PGE_{max} . This loss of efficiency is the consequence of the PAbs decrease with laser fluence at the maximum band (figure 3.6). PGE_{max} is rather stable for **NP-50%**, $PGE_{max} = 0.89$ at 0.35 mJ.cm^{-2} and 0.85 at 3.5 mJ.cm^{-2} , close to the calculated **NP-50%** PAY (0.93, figure 3.2). By contrast, low PLA-Bodipy loaded NPs exhibit even lower PGE_{max} as fluence increases: 23% decrease for **NP-2.5%**, from 0.80 at 0.35 mJ.cm^{-2} to 0.57 at 3.5 mJ.cm^{-2} . Aggregation can highly reduce the influence of the laser fluence on the PGE_{max} . The same irradiations fluences were also evaluated on a nigrosin aqueous solution (figure S13). No change of the nigrosine spectra is observed with the laser fluence confirming that PAbs decrease arises from nonlinear effects in Bodipy NPs and not from experimental artefacts.

We were able to evaluate the photoacoustic generation efficiency at the band maximum. However, due to significant spectral shift between absorption spectra and PES, and fewer experimental points for PES (10 nm steps), we were not able to determine PGE at other wavelengths. To evaluate the spectral dependency of the photoacoustic efficiency, PES were fitted with two Gaussian functions, one for the vibronic shoulder at 680 nm (blue curve) and another for the maximum of absorption and the red part (red curve) (730-870 nm). The same fitting procedure was operated on absorption spectra for each NP batch. The fitting accuracy is good and the results are indicated in figure 3.7 (b) and figures S14-S18, for each NP batch and each laser fluence. Fitting allows to differentiate the acoustic efficiency from the vibronic shoulder and from the maximum band. Thus, a mean photoacoustic generation efficiency of the vibronic shoulder was defined as:

$\overline{PGE}_{blue} = \frac{\int_{blue} PAbs}{\int_{blue} A}$, the ratio of the integrated blue Gaussian function for photoacoustic to the integrated blue Gaussian function for absorption.

The mean PGE value was calculated for the maximum and red part of the band:

$\overline{PGE}_{red} = \frac{\int_{red} PAbs}{\int_{red} A}$, the ratio of the integrated red Gaussian function for photoacoustic to the integrated red Gaussian function for absorption. \overline{PGE}_{blue} and \overline{PGE}_{red} are plotted as a heat maps (figure 3.7 (c) and (d)).

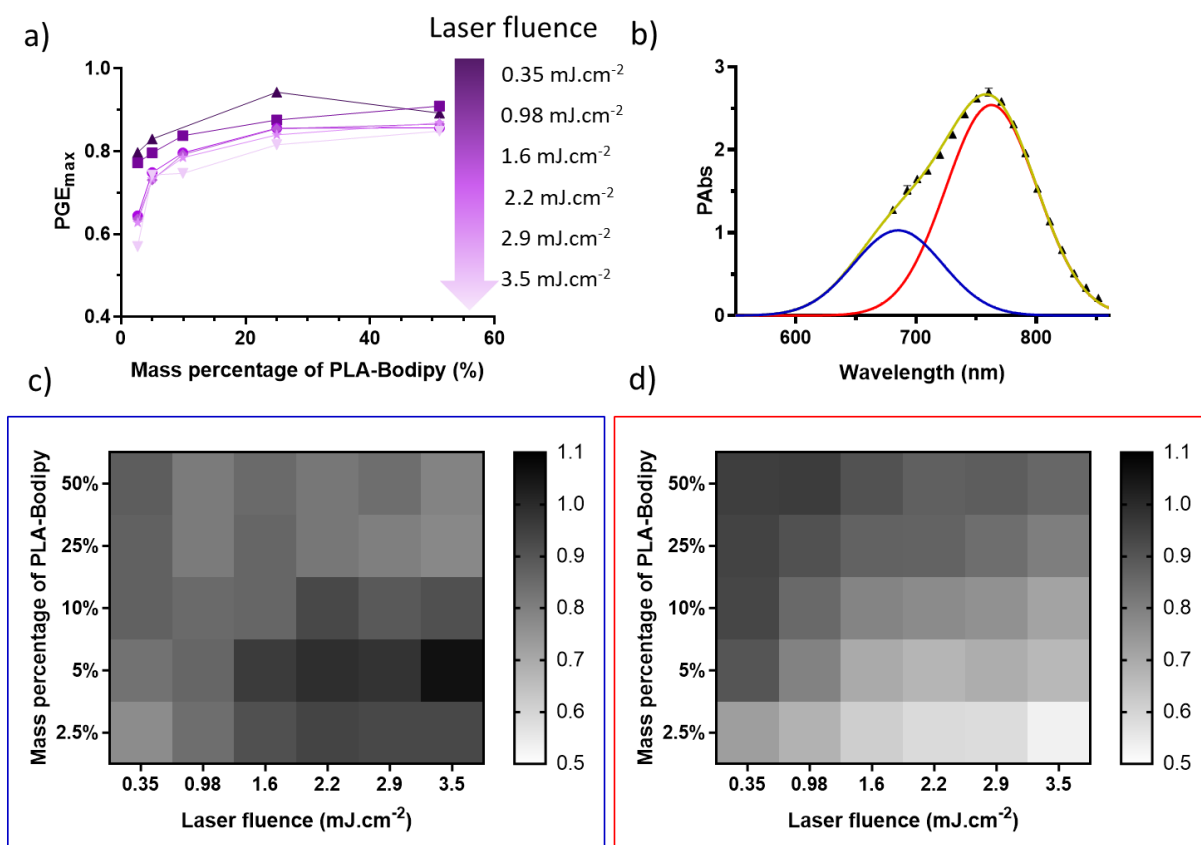


Figure 3.7 (a) Photoacoustic generation efficiency at the maximum of the band (PGE_{max}) as a function of mass percentage of PLA-Bodipy. From dark to light violet respectively 0.35 $mJ.cm^{-2}$ (triangles), 0.98 $mJ.cm^{-2}$ (squares), 1.6 $mJ.cm^{-2}$ (circles), 2.2 $mJ.cm^{-2}$ (rhombus), 2.9 $mJ.cm^{-2}$ (stars), 3.5 $mJ.cm^{-2}$ (upside down triangle). The arrow indicates the laser fluence increase. (b) Photoacoustic excitation spectra of **NP-50%** with a 3.5 $mJ.cm^{-2}$ laser fluence (dark triangles). Total fit curve (yellow) composed of two Gaussian functions (in red and blue). **NP-50%** were diluted three times. (c) Heat map generated from the blue Gaussian function. The grey scale represents the \overline{PGE}_{blue} value, ratio of the integrated blue Gaussian band for photoacoustic to the integrated blue Gaussian band for absorption. (d) Heat map generated from the red Gaussian function. The grey scale represents the \overline{PGE}_{red} value, ratio of the integrated red Gaussian band for photoacoustic to the integrated red Gaussian band for absorption.

\overline{PGE}_{blue} values are very high, between 0.8 and 1 for each NP and each fluence and seem to be randomly distributed, with no clear evolution with the laser fluence, nor the PLA-Bodipy loading. For each NP batch, the standard deviation of \overline{PGE}_{blue} values were between 3 to 7%, which is negligible. The blue vibronic shoulder is very efficient for photoacoustic emission and its photoacoustic generation efficiency does not depend on the laser fluence. By contrast, the red band is highly affected by the laser fluence. For each NP batch, we can observe a decrease of the acoustic efficiency with an increased laser fluence. For **NP-50%** a 9% decrease of \overline{PGE}_{red} between 0.35

mJ.cm⁻² and 3.5 mJ.cm⁻² laser fluence is observed and for **NP-2.5%** a 20% decrease was measured. As seen before, the photoacoustic signal loss is reduced with NPs containing aggregated Bodipy. The lowest photoacoustic efficiency for the maximum band, $\overline{PGE}_{red} = 0.53$, was observed with **NP-2.5%** and 3.5 mJ.cm⁻² irradiation. The highest \overline{PGE}_{red} was measured with **NP-50%** (0.98 mJ.cm⁻²) $\overline{PGE}_{red} = 0.96$. To summarize, on the one hand, the vibronic shoulder shows high photoacoustic generation efficiencies and no variation with the laser fluence nor the PLA-Bodipy loading. On the other hand, the maximum band highly depends on laser fluence and PLA-Bodipy loading decreasing with increased laser fluences and decreased PLA-Bodipy loading. High energy non-linear effect seems to only affect the Bodipy maximum band.

To better understand the nonlinear effect, ns-transient absorption experiments were conducted. The Bodipy **[3]** nanosecond transient absorption spectra in DCM are plotted in figure S20. Bodipy triplet is not observed, and the excited state goes back to the ground state in about a few nanoseconds. The transient absorption spectra of Bodipy highlights the presence of excited state absorption between 550 and 675 nm, the presence of stimulated emission between 790 nm and 850 nm, and the presence of a ground state photobleaching between 680 and 770 nm. In literature, push-pull Bodipys show similar band positions (Miao et al. 2020; W. Hu et al. 2019; Kulyk et al. 2017). Intersystem crossing (k_{cis}) could have reduced the PA signal (Märk et al. 2015), but according to transient absorption spectra, Bodipy does not show any triplet spectral and kinetics signatures. PABs loss by dye degradation (bleaching) are also negligible, as demonstrated in chapter 2. Transient nanoseconds absorption spectra of the NP batches, **NP-5%**, **NP-25%** and **NP-50%** were recorded (figure S21) and no new bands can be observed. In the nanosecond regime, Bodipy NPs have the same excited state spectra as Bodipy **[3]** in DCM. However, the excited state population is decreasing with the PLA-Bodipy loading. Transient absorption values (absolute value $|\Delta A|$) are lower with high PLA-Bodipy percentage. The lowest $|\Delta A|$ signal is obtained with **NP-50%** and the highest is measured on Bodipy **[3]** in DCM. Those results are in good agreement with Bodipy NP excited state lifetime, which is decreasing as PLA-Bodipy loading increases (table S4, figure S8). Aggregation favors very fast non-radiative deactivations to the ground state. **NP-50%** has a very low excited state absorption, a low ground state photobleaching and a weak stimulated emission in the nanosecond regime. On the contrary, **NP-5%** exhibit great signal for excited state absorption, ground state photobleaching and stimulated emission. The short excited state lifetime of **NP-50%** and **NP-25%** makes them less sensitive to nonlinear effects in the excited state. **NP-2.5%** and **NP-5%**, however, have longer excited state lifetimes (about 1 ns).

As seen on the transient absorption spectra, ground state photobleaching is increasing close to the maximum of absorption. For one pulse excitation, with a high fluence and NP with long excited state lifetime, the ground state is so much excited with early incoming photons that there are not enough molecules remaining in the

ground state for later incoming photons. This is ground state depopulation (or ground state photobleaching): excited state is saturated, and absorbance values are decreasing with the laser fluence (Paschotta s. d.). Lower absorption leads to lower photoacoustic emission, and lower PABs. PABs is decreasing with the laser fluence, as shown figure 3.6. NPs containing Bodipy as aggregates, **NP-50%** and **NP-25%**, return very fast to the ground state by non-radiative deactivation, leading to less ground state depletion and lower PABs and PGE loss. Similar results were observed on other chromophores photoacoustic spectra, but no quantification nor justification of the ground state depletion was done (Laufer et al. 2013; Hatamimoslehabadi et al. 2017). On Bodipy NPs, ground state depletion effect is maximum at the maximum of absorption, and causes a 20% loss of the \overline{PGE}_{red} for **NP-2.5%** between 0.35 mJ.cm⁻² and 3.5 mJ.cm⁻². As seen on NP transient absorption spectra, far from the absorption maximum, in the vibronic shoulder, ground state depletion effect is lower, thanks to a lower absorptivity. The laser fluence to reach saturation was calculated for Bodipy as detailed in (Paschotta s. d.). By definition, at the saturation fluence, 37% of the initial absorbance is lost. The theoretical fluence saturation is 0.86 mJ.cm⁻² at 760 nm and 2.3 mJ.cm⁻² at 680 nm. In the vibronic shoulder, around 680 nm, almost all the irradiation energies tested were lower than fluence saturation one (2.3 mJ.cm⁻²): ground state depopulation was not observed and the photoacoustic generation efficiency \overline{PGE}_{blue} remains constant. On the contrary, at the band maximum, some irradiation energies were higher than the saturation fluence (0.86 mJ.cm⁻²) and caused ground state photobleaching and a \overline{PGE}_{red} influenced by laser fluences. Aggregation Caused Quenching is therefore a powerful tool to limit photoacoustic loss by non-linear effects. With **NP-25%** and **NP-50%** very poor PABs variations and high \overline{PGE}_{red} were measured for each laser fluence.

3.4 CONCLUSION

We have studied and quantified the relationship between fluorescence quenching by Aggregation Caused Quenching and photoacoustic generation efficiency enhancement in PLA-Bodipy NPs. PLA NPs with different PLA-Bodipy loading (from 5% to 50% by weight) were studied using a calibrated photoacoustic spectrophotometer. By analogy with the fluorescence quantum yield we can define a Photoacoustic Yield PAY, which represents energy conversion, over the whole band, between the absorbed light to the acoustic signal. The PAY and the non-radiative rate constant (k_{nr}) were determined by the Strickler-Berg relation for each NP batch. We have demonstrated the presence of two regimes for photoacoustic emission: a monomer regime and an Aggregation Caused Quenching Regime. In the monomer regime, below 10% by weight of PLA-Bodipy, fluorescence emission from the Bodipy monomer limits the photoacoustic yield. Above 10% of PLA-Bodipy, in the ACQ regime, non-radiative deactivations from the aggregates, are predominant and the

photoacoustic yield reaches a high asymptotic value of 93%. To quantify the high performance of NPs in photoacoustic imaging, we have defined the photoacoustic brightness B_{PA} , as the product of the photoacoustic efficiency PAY by the molar extinction coefficient of NPs. We obtained ultrabright NPs ($1.2\text{-}22 \times 10^7 \text{ L.mol}^{-1}\text{.cm}^{-1}$) thanks to great photoacoustic efficiency of NPs containing aggregated Bodipy (PAY = 0.93 for **NP-50%**) and high molar extinction coefficients ($1.5 \times 10^7\text{-}2.4 \times 10^8 \text{ L.mol}^{-1}\text{.cm}^{-1}$). Finally, we have shown that at high laser fluences ($1\text{-}3.5 \text{ mJ.cm}^{-2}$), at the maximum of the absorption band, a significant loss of the photoacoustic signal is remarkable by ground state depopulation (-20% for **NP-2.5%**). This non-linear effect can be limited with nanoparticles in the ACQ regime. The use of NPs in which Bodipys are aggregated allows to work at high laser fluence without loss of photoacoustic signal. Above 10% PLA-Bodipy, NPs exhibit great photoacoustic brightness and low signal loss by nonlinear effects. We have developed a fine mathematical fit of the absorption and photoacoustic spectra to calculate an average photoacoustic efficiency at the band maximum \overline{PGE}_{red} and in the vibrational shoulder \overline{PGE}_{blue} . The fit allows us to spectrally differentiate the photoacoustic efficiency in the absorption band and to eliminate band shift problems between absorption and photoacoustic that prevent any calculation of the PGE (λ).

3.5 SUPPLEMENTARY

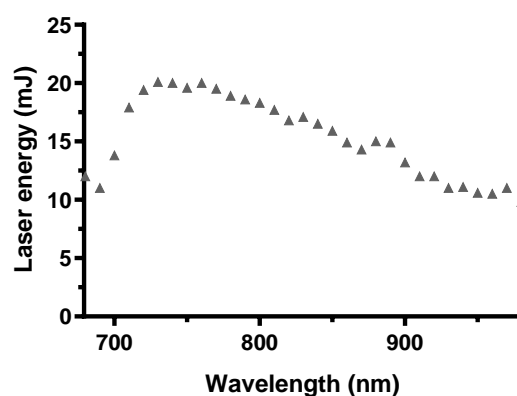


Figure S1 : Laser energy at the output of the optical fiber in function of the excitation wavelength. Laser input energy: 65 mJ.

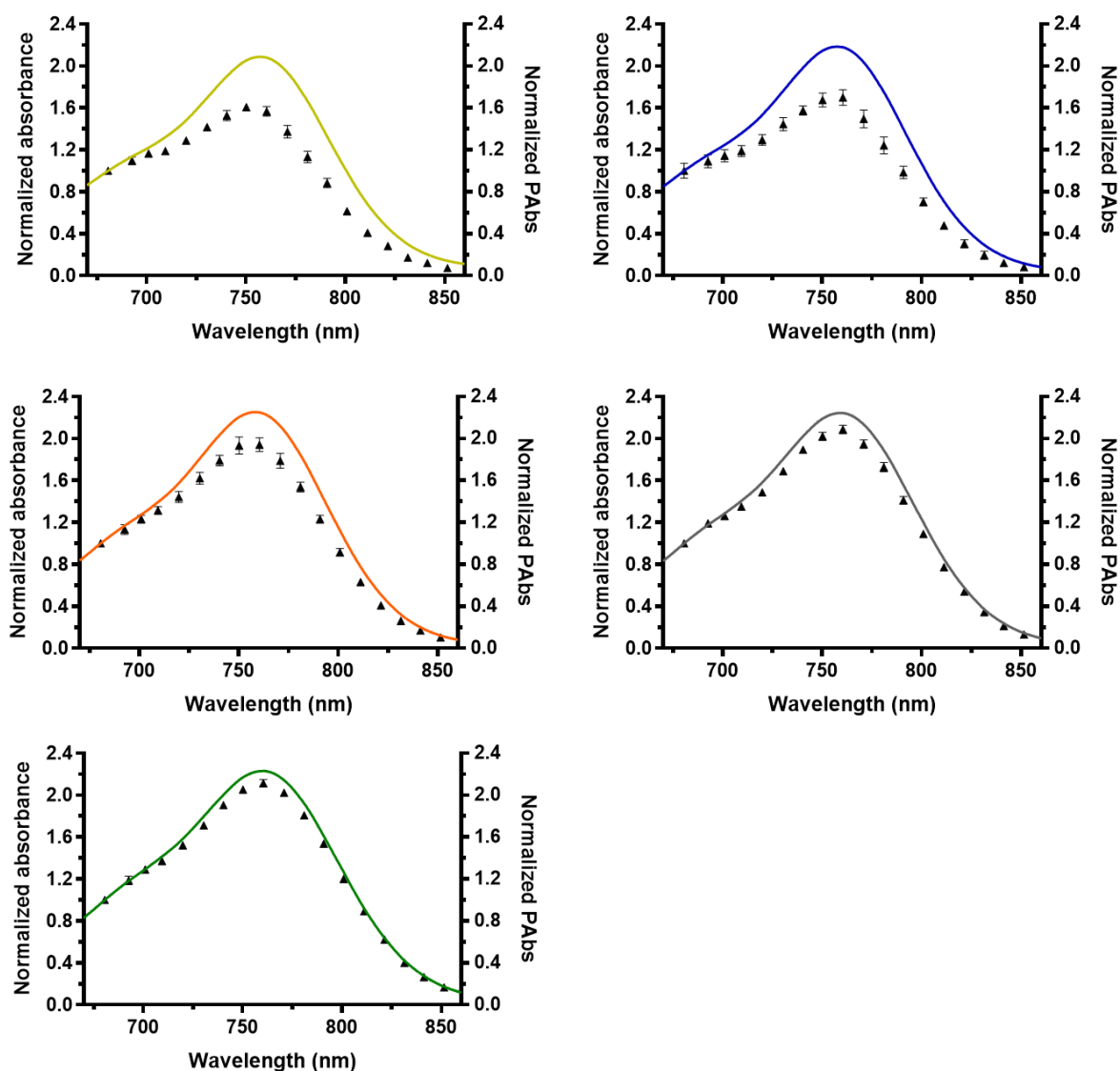


Figure S2 : Absorption spectra (continuous line) and photoacoustic excitation spectra (triangle) for each NP batch (green **NP-50%**), (grey **NP-25%**), (orange **NP-10%**), (blue **NP-5%**), (yellow **NP-2.5%**). Laser fluence 0.98 mJ.cm^{-2} . Absorbance values were corrected from dilution factor: no dilution for **NP-2.5%** and **NP-5%**; 3 times dilution for **NP-10%**; 5 times dilution for **NP-25%** and 10 times dilution for **NP-50%**. PAbs values were corrected from dilution factor: no dilution for NP-2.5%, NP-5% and NP-10%; 2 times dilution for NP-25% and 3 times dilution for NP-50%.

	NP-2.5%	NP-5%	NP-10%	NP-25%	NP-50%
R_0 (nm)	3.5	3.4	3.4	3.4	3.4
Φ_F/Φ_F^0 (%) [‡]	125 ± 7	97 ± 7	62 ± 4	25 ± 2	12 ± 1
Φ_F/Φ_F^0 (%) [‡]	107 ± 11	75 ± 6	49 ± 6	22 ± 1	11 ± 2

Table S1 : NP photophysical properties. ‡ NP QY relative to Bodipy **[3]** in DCM, excitation at 670 nm. ‡ NP QY relative to Bodipy **[3]** in DCM, excitation at 540 nm. R_0 represents the Förster radius in nm for each NP batch.

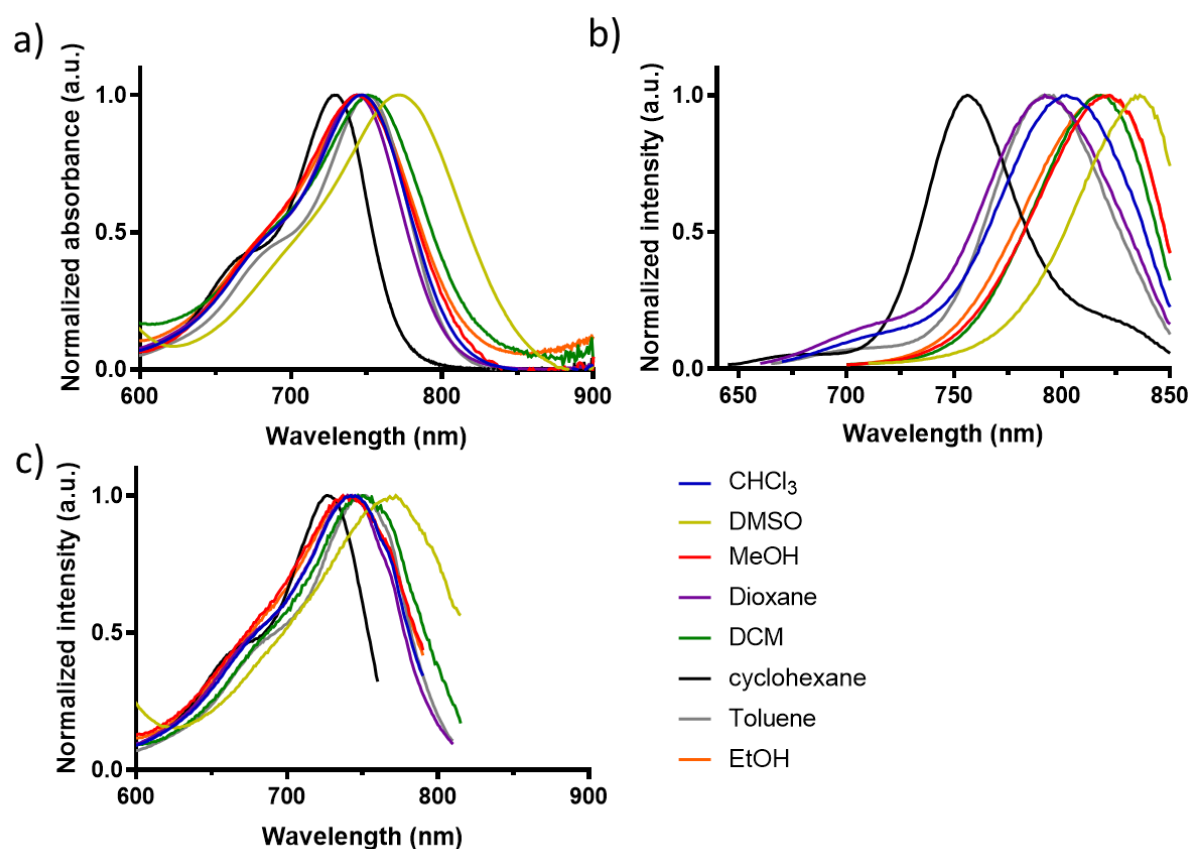


Figure S3 : Solvatochromism experiments. (a) Normalized absorption spectra. (b) Normalized emission spectra. (c) Normalized excitation spectra

solvent	$\lambda_{\text{abs,max}}$	$\lambda_{\text{fluo,max}}$	Stokes shift (cm^{-1})	ϵ		τ (ns)	ET(30)
	(nm)	(nm)		($\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)	QY		
Cyclohexane	728.5	756	499	7.9×10^4 [#]	0.18	2.3*	30.9
Toluene	750	794	739	7.6×10^4	0.05	1.6	33.9
Dioxane	744	792	815	7.8×10^4	0.006	1.4*	36
CHCl ₃	747	802	918	7.0×10^4	0.07	1.5	39.1
DCM	757	818	985	8.0×10^4	0.01	1.0	40.7
DMSO	772	836	992	6.3×10^4	<0.0 01	0.42*	45.1
EtOH	746	816	1150	7.1×10^4 [#]	0.003	0.60 [¥]	51.9
MeOH	743	822	1294	6.9×10^4 [#]	0.009	0.40 [¥]	55.4

Table S2 : Solvatochromism experiments. * Tau average for a biexponential fit. ¥ tau average for a triexponential fit. QY were determined with an integrated sphere. Polarity coefficient ET(30) based on literature values (Reichardt 1994). # Absorption coefficient obtained with successive dilutions from a solution 95/5 (v/v) solvent/chloroform.

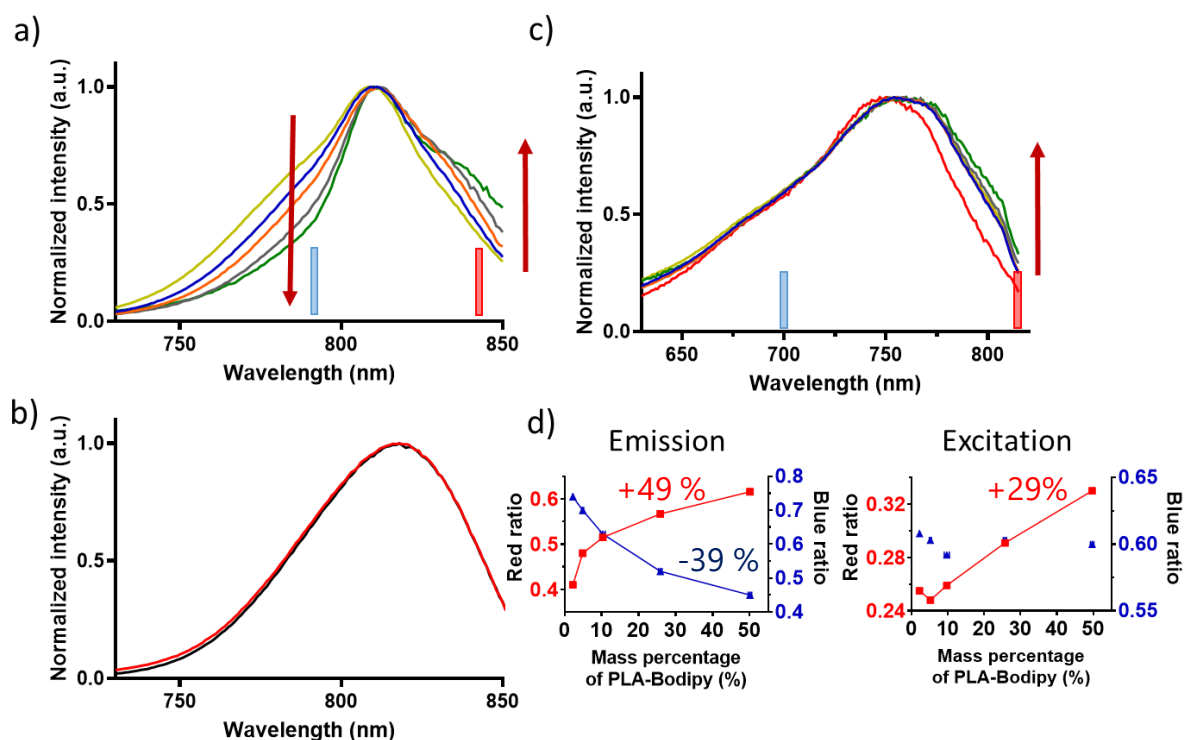


Figure S4 : (a) Emission spectra of NPs (excitation at 540 nm), slit width 9.5 nm and $A < 0.1$. (Yellow, Bodipy **NP-2.5%**), (blue, Bodipy **NP-5%**), (orange, Bodipy **NP-10%**), (grey, Bodipy **NP-25%**), (green, Bodipy **NP-50%**). (b) Emission spectra of Bodipy **[3]** in DCM, $C = 1.5 \times 10^{-6}$ M, $A < 0.1$. Black, excitation at 540 nm, slit width 9.5 nm. Red, excitation 670 nm, slit width 10 nm. (c) Excitation spectra of NPs emission at 845 nm, slit width 15 nm and $A < 0.1$. (Yellow, Bodipy **NP-2.5%**), (blue, Bodipy **NP-5%**), (orange, Bodipy **NP-10%**), (grey, Bodipy **NP-25%**), (green, Bodipy **NP-50%**), (red, Bodipy **[3]** DCM). (d) Evolution of the red ratio ($I_{840\text{nm}}/I_{\text{max}}$) and the blue ratio ($I_{793\text{nm}}/I_{\text{max}}$) as a function of weight percentage of PLA-Bodipy for Emission spectra. Evolution of the red ratio ($I_{815\text{nm}}/I_{\text{max}}$) and the blue ratio ($I_{700\text{nm}}/I_{\text{max}}$) as a function of the weight percentage of PLA-Bodipy for the Excitation spectra.

NP	$\lambda_{\text{abs,max}}$ (nm)	EXCITATION 670 nm			EXCITATION 540 nm		
		$\lambda_{\text{fluo,max}}$ (nm)	σ (cm^{-1})	FWHM (cm^{-1})	$\lambda_{\text{fluo,max}}$ (nm)	σ (cm^{-1})	FWHM (cm^{-1})
NP-2.5%	756	804	790	1187	810	882	927
NP-5%	757	812	895	1119	810	864	873
NP-10%	757	818	985	1028	812	895	818
NP-25%	759	824	1039	930	813	875	764
NP-50%	761	825	1019	907	812	825	786

Table S3 : Spectroscopic properties of NP emission spectra with two different excitation 540 nm and 670 nm. FWHM: Full Width at Half Maximum. σ : Stokes shift. Estimated error for FWHM: ± 15 nm.

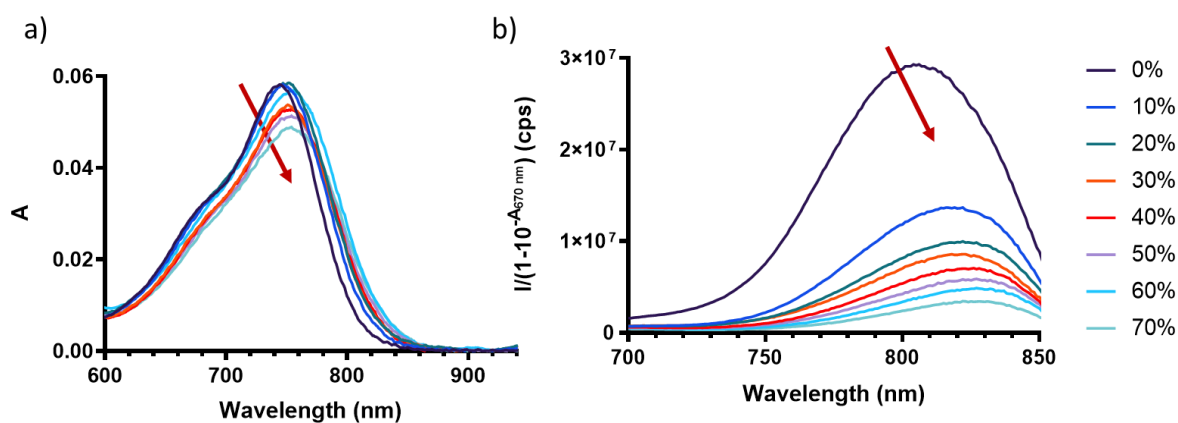


Figure S5 : (a) Absorption spectra of Bodipy **[3]** with different volume percentage of water/THF solution. For each solution $C = 9.0 \times 10^{-7}$ M and the water percentages were indicated from 0% to 70%. (b) Emission spectra of Bodipy **[3]** excitation at 670 nm, slit width 10 nm and $A < 0.1$, in different volumic percentage of water/THF solution. For each solution $C = 9.0 \times 10^{-7}$ M and the water percentage was indicated from 0% to 70%.

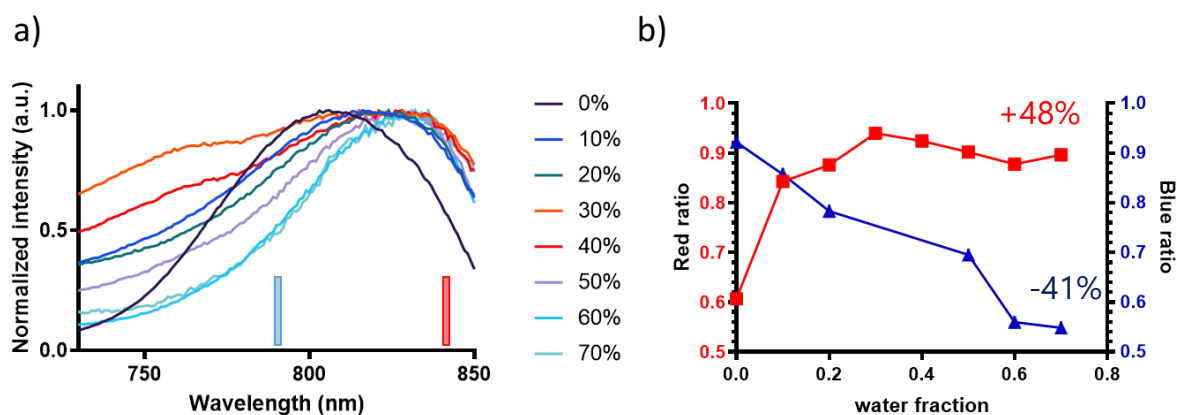


Figure S6 : (a) Emission spectra of Bodipy **[3]** excitation at 540 nm, slit width 9 nm and $A < 0.1$, in different volumic percentage of water/THF solution. For each solutions $C = 9.0 \times 10^{-7}$ M and the water percentage was indicated from 0% to 70%. (b) Evolution of the red ratio ($I_{840\text{nm}}/I_{\text{max}}$) and the blue ratio ($I_{793\text{nm}}/I_{\text{max}}$) of the fluorescence emission spectra, as a function of the water fraction compared to THF.

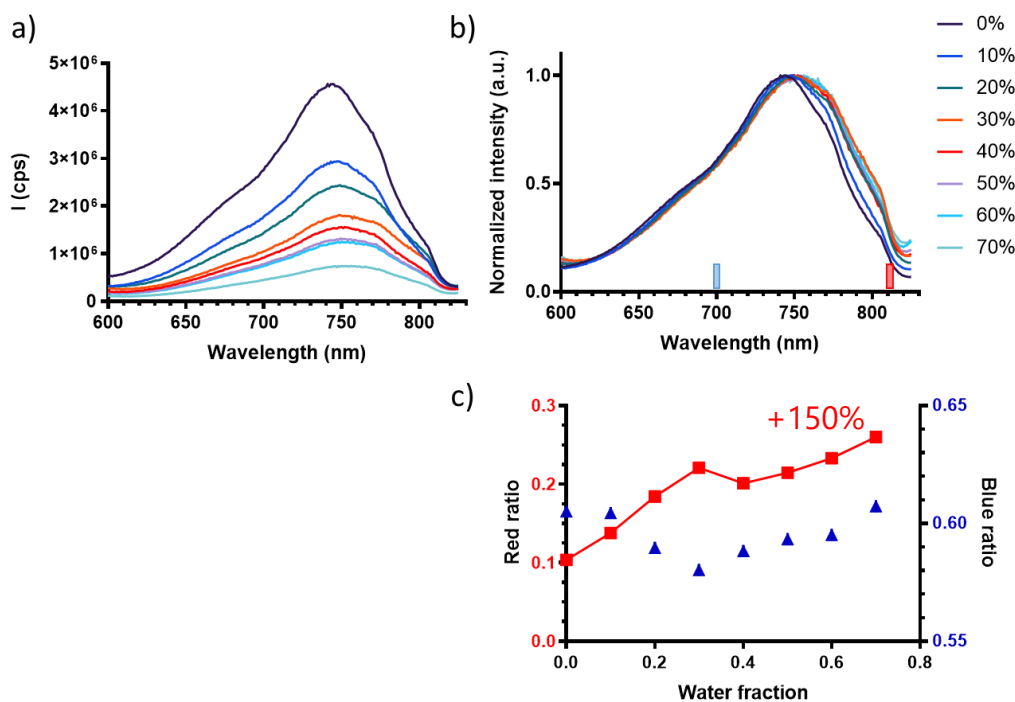


Figure S7. (a) Fluorescence excitation spectra of Bodipy **[3]** emission at 845 nm, slit width 17 nm and $A < 0.1$, in different volume percentage of water/THF solution. For each solution $C = 9.0 \times 10^{-7}$ M and the water percentage was indicated from 0% to 90%. (b) Normalized fluorescence excitation spectra of Bodipy **[3]** emission at 845 nm, slit width 17 nm and $A < 0.1$, in different volume percentage of water/THF solution. For each solution $C = 9.0 \times 10^{-7}$ M and the water percentages was indicated from 0% to 90%. (c) Evolution of the red ratio ($I_{815\text{nm}}/I_{\text{max}}$) and the blue ratio ($I_{700\text{nm}}/I_{\text{max}}$) of the fluorescence excitation spectra as a function of the water fraction compared to THF.

	NP-2.5%	NP-5%	NP-10%	NP-25%	NP-50%
$\bar{\tau}$ (ns) †	1.02	0.89	0.61	0.35	0.23
k_r (s ⁻¹) @	1.4x10 ⁸	1.3x10 ⁸	1.3x10 ⁸	1.3x10 ⁸	1.3x10 ⁸
k_{nr} (s ⁻¹)	8.4x10 ⁸	9.9x10 ⁸	1.5x10 ⁹	2.8x10 ⁹	4.2x10 ⁹
\bar{r}	-	0.096	-	0.065	0.108
r_∞	-	0.057	-	0.031	0.034
$N_{\text{aggregates}}$	-	7	-	13 ± 2	12 ± 2

Table S4 : Spectroscopic parameters of NP batches. † Biexponential fit, excitation at 781nm, emission detected at 820nm, T_1 value fixed at 1.09 ns, $\bar{\tau} = \frac{B_1 T_1^2 + B_2 T_2^2}{B_1 T_1 + B_2 T_2}$. @ k_r calculated with Strickler-Berg relation. \bar{r} is the steady state anisotropy (mean value between 815-825 nm). r_∞ is the anisotropy at infinite time. $N_{\text{aggregates}} = r_0 / r_\infty$ (Chan, Kaminski, et Kaminski Schierle 2011; Reisch et al. 2014; Bader et al. 2007), is the aggregates number per cluster inside the Bodipy NP.

	NP-5%	NP-25%	NP-50%
T_g	30.4°C	32°C	33.4°C

Table S5 : NP's glass temperature measured by differential scanning calorimetry.

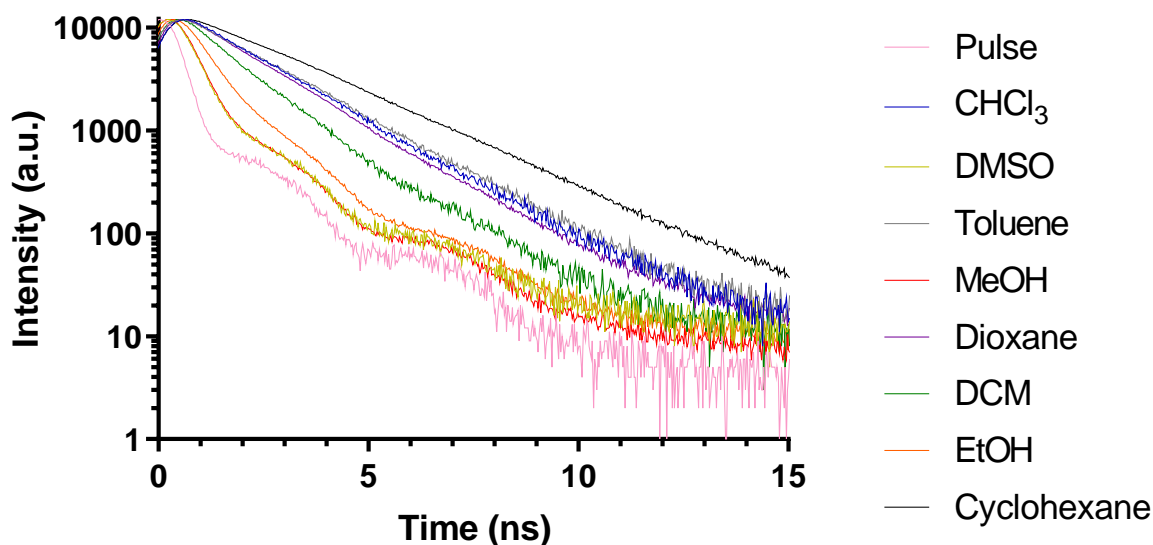


Figure S8 : Solvatochromism experiments. Fluorescence lifetime of Bodipy **[3]** in different solvents, emission detection at the band maximum, excitation at 667 nm for cyclohexane and 781 nm for all the other solvents.

Distribution function of the stretched exponential

The stretched exponential function is defined as:

$$y = B_1 e^{\left(-\frac{t}{T_1}\right)^\beta} = \int_0^\infty H(k) \times \exp(-kt) dt$$

With $0 \leq \beta \leq 1$ and $1/k$ and T_1 lifetimes values. $H(k)$, the distribution function is obtained thanks to the Laplace transformation of y . As no analytical results exist (except for $\beta = 0.5$), the $H(k)$ function can be estimated for $\beta > 0.5$ (Berberan-Santos, Bodunov, et Valeur 2005):

$$H(k) = T_1 \frac{B}{(kT_1)^{\frac{1-\beta}{2}}} (1 + C(kT_1)^\delta) \times \exp\left(-\frac{(1-\beta) \times \beta^{\frac{\beta}{1-\beta}}}{(kT_1)^{\frac{\beta}{1-\beta}}}\right)$$

With $\delta = \frac{\beta(\beta-0.5)}{1-\beta}$, and C and B parameter whose values change with beta.

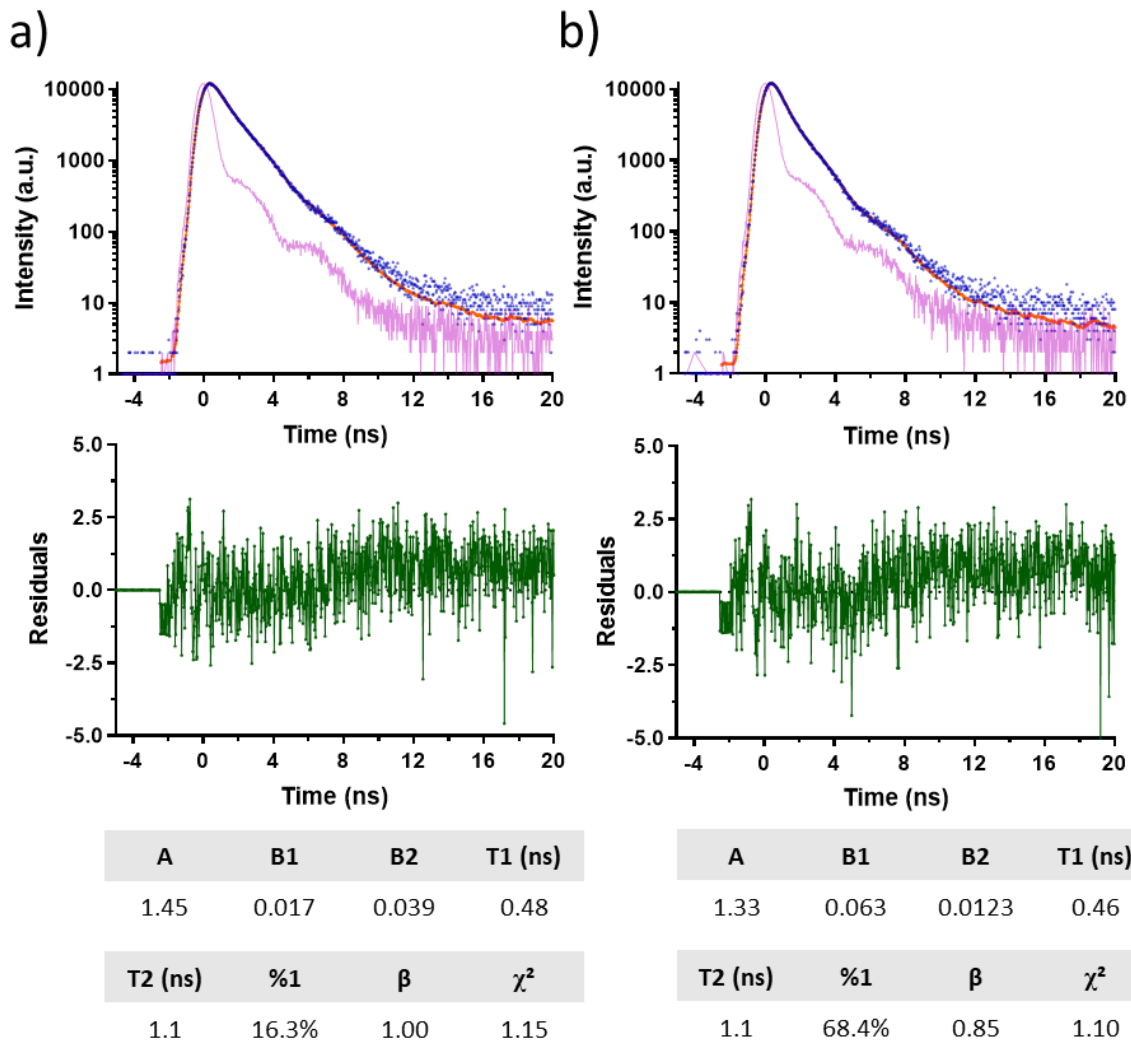


Figure S9 : Fluorescence decays of the NP suspensions. Excitation at 781 nm with a pulsed diode <200 ps, emission at 820 nm, (blue, fluorescence decay), (red, Mathematical fit), (purple, instrument response function), (Green, residuals). The mathematical fit function is a sum of a Kolrausch function and a monoexponential function: $y = A + B_1 e^{\left(-\frac{t}{T_1}\right)^\beta} + B_2 e^{-\frac{t}{T_2}}$. (a) **NP-5%**, (b) **NP-10%**. The fitted parameters were indicated below each graph.

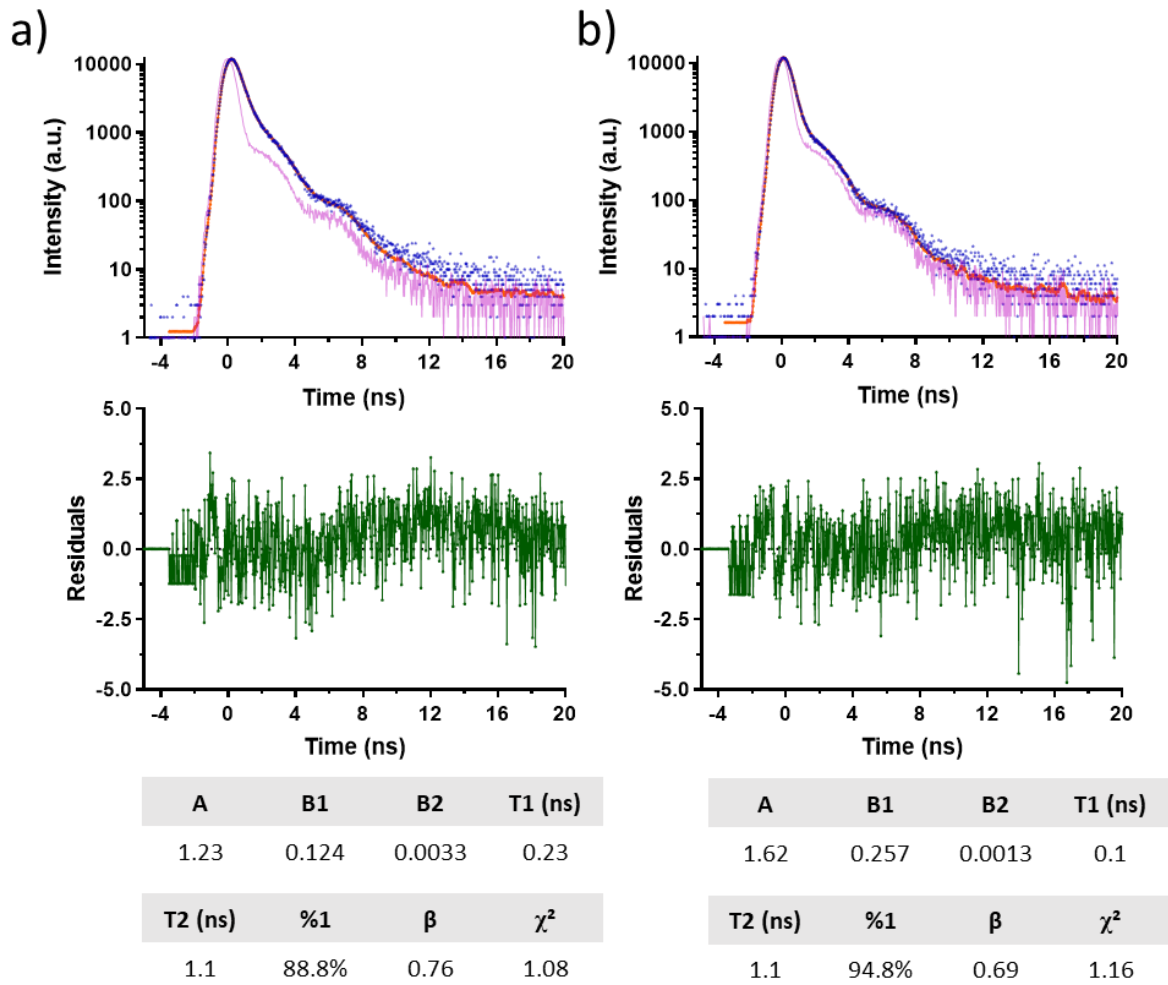


Figure S10 : Fluorescence decays of the NP suspensions. Excitation at 781 nm with a pulsed diode <200 ps, emission at 820 nm, (blue, fluorescence decay), (red, Mathematical fit), (purple, instrument response function), (Green, residuals). The mathematical fit function is a sum of a Kolrausch function and a monoexponential function: $y = A + B_1 e^{\left(-\frac{t}{T_1}\right)^\beta} + B_2 e^{-\frac{t}{T_2}}$. (a) **NP-25%**, (b) **NP-50%**. The fitted parameters were indicated below each graph.

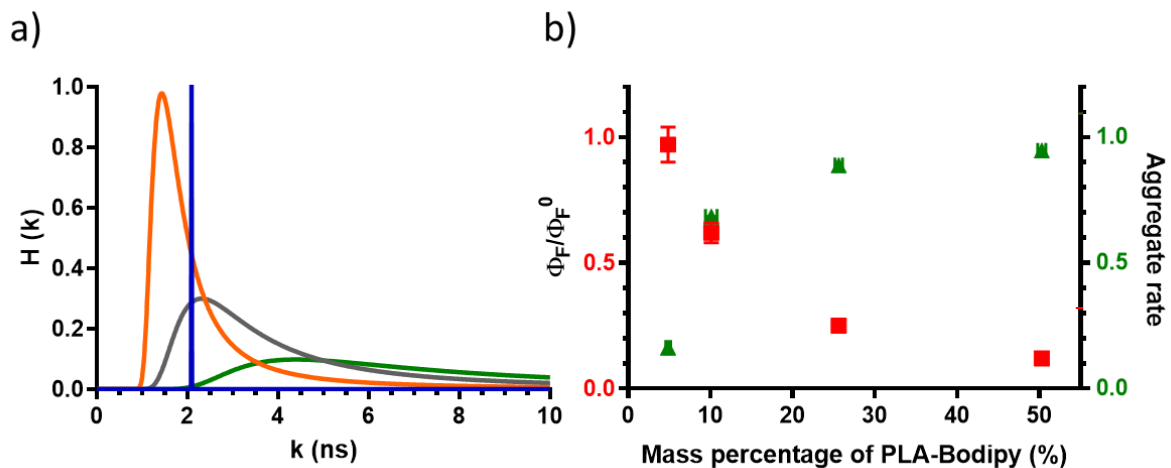


Figure S11 : (a) Lifetime distribution $H(k)$ for the Kolrausch function used for the fluorescence decay, (blue, Bodipy **NP-5%**), (orange, Bodipy **NP-10%**), (grey, Bodipy **NP-25%**), (green, Bodipy **NP-50%**). Fluorescence quantum yield (red squares) evolution and aggregates' proportion (green triangles) evolution as a function of the mass percentage of PLA-Bodipy [4]. (b) Luminescence quantum yield (Φ_F) relative to Bodipy **[3]**, 298 K ($\Phi_F^0 = 0.007$). Mean values and standard deviation were obtained for: (Bodipy NP-5%, $n=4$ batches); (Bodipy NP-10%, $n=3$ batches); (Bodipy **NP-25%**, $n=4$ batches); (Bodipy **NP-50%**, $n=3$ batches). Aggregate rate (%1) comes from the Kolrausch fit of the fluorescence decay.

	NP-5%	NP-10%	NP-25%	NP-50%
$B_{PAB} (\times 10^{-7}) \text{ (L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1})$	1.2	2.5	7.9	22

Table S6 : NP photoacoustic brightness $B_{NP}^{PA} = \varepsilon_{NP}(\lambda) \cdot PAY = \varepsilon_{PLA-BY}(\lambda) \cdot N_{PLA-BY/NP} \cdot PAY$. PAY calculated with experiments with laser fluence of 0.98 mJ.cm^{-2} (figure 3.2). ε_{NP} were determined in our previous work (chapter 2).

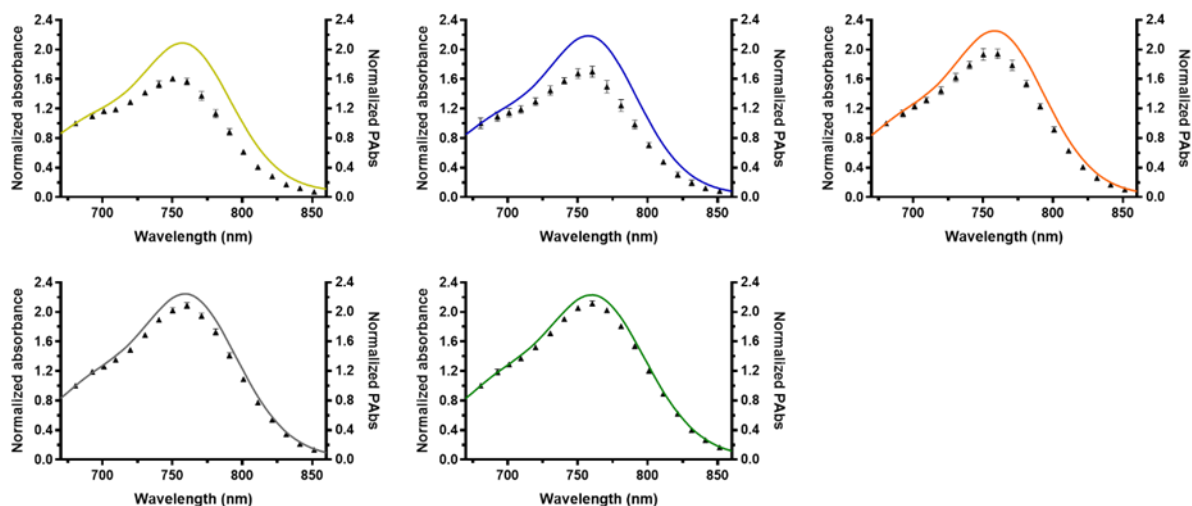


Figure S12 : Normalized absorption spectra (continuous line) at 680.6 nm and normalized photoacoustic excitation spectra (dark triangle) at 680.6 nm for each NP batch (green **NP-50%**), (grey **NP-25%**), (orange **NP-10%**), (blue **NP-5%**), (yellow **NP-2.5%**). Laser fluence 3.5 mJ.cm^{-2} .

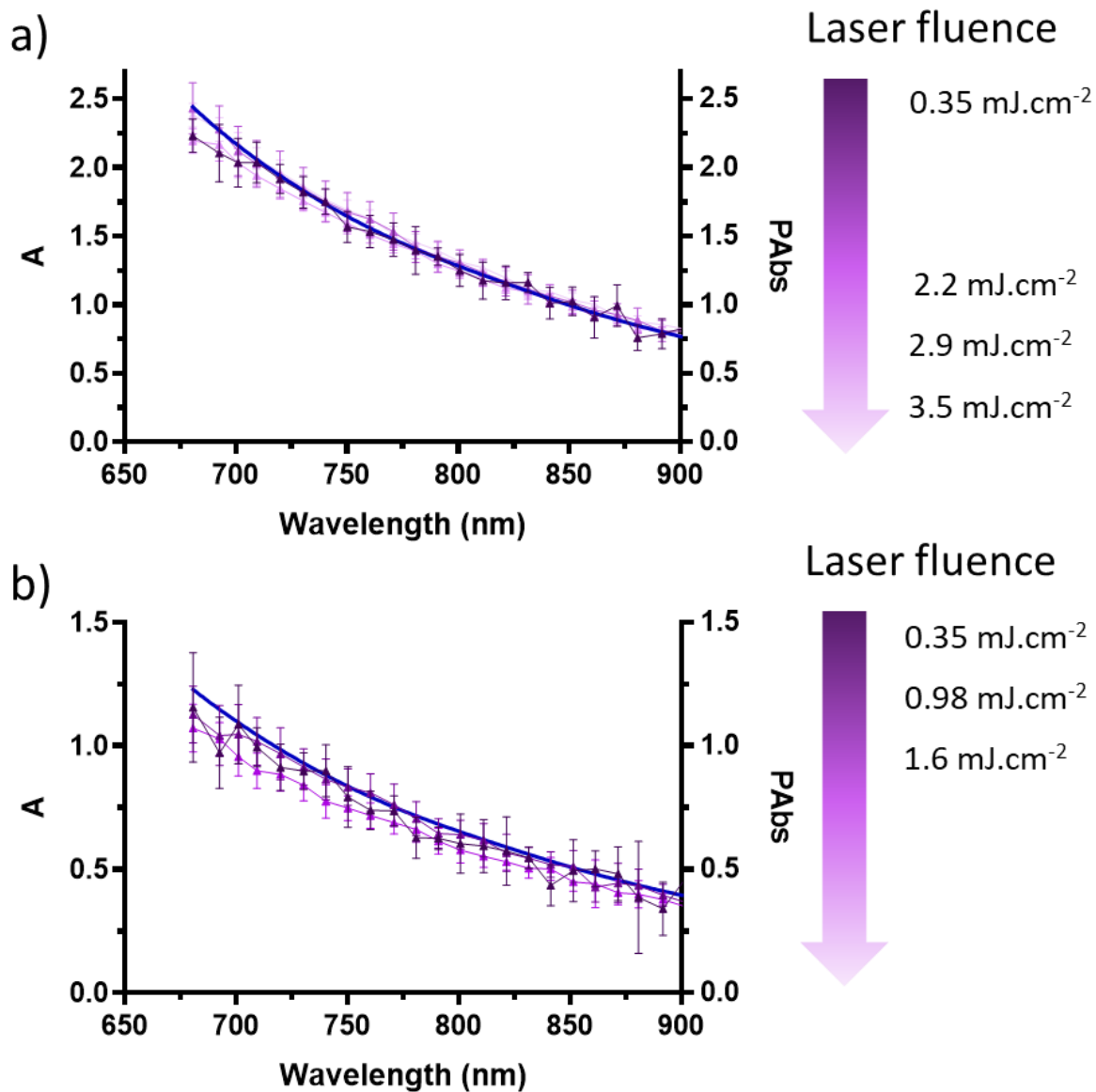


Figure S13 : (a) PES of nigrosine solution measured with 0.35 $\text{mJ}\cdot\text{cm}^{-2}$, 2.2 $\text{mJ}\cdot\text{cm}^{-2}$, 2.9 $\text{mJ}\cdot\text{cm}^{-2}$, 3.5 $\text{mJ}\cdot\text{cm}^{-2}$ laser fluences and absorption spectra of the nigrosine solution (blue line). $C_{\text{Nigrosin}} = 9.5 \times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ in water. (b) PES of nigrosine solution measured with 0.35 $\text{mJ}\cdot\text{cm}^{-2}$, 0.98 $\text{mJ}\cdot\text{cm}^{-2}$, 1.6 $\text{mJ}\cdot\text{cm}^{-2}$ laser fluences and absorption spectra of the nigrosine solution (blue line). $C_{\text{Nigrosin}} = 4.84 \times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ in water.

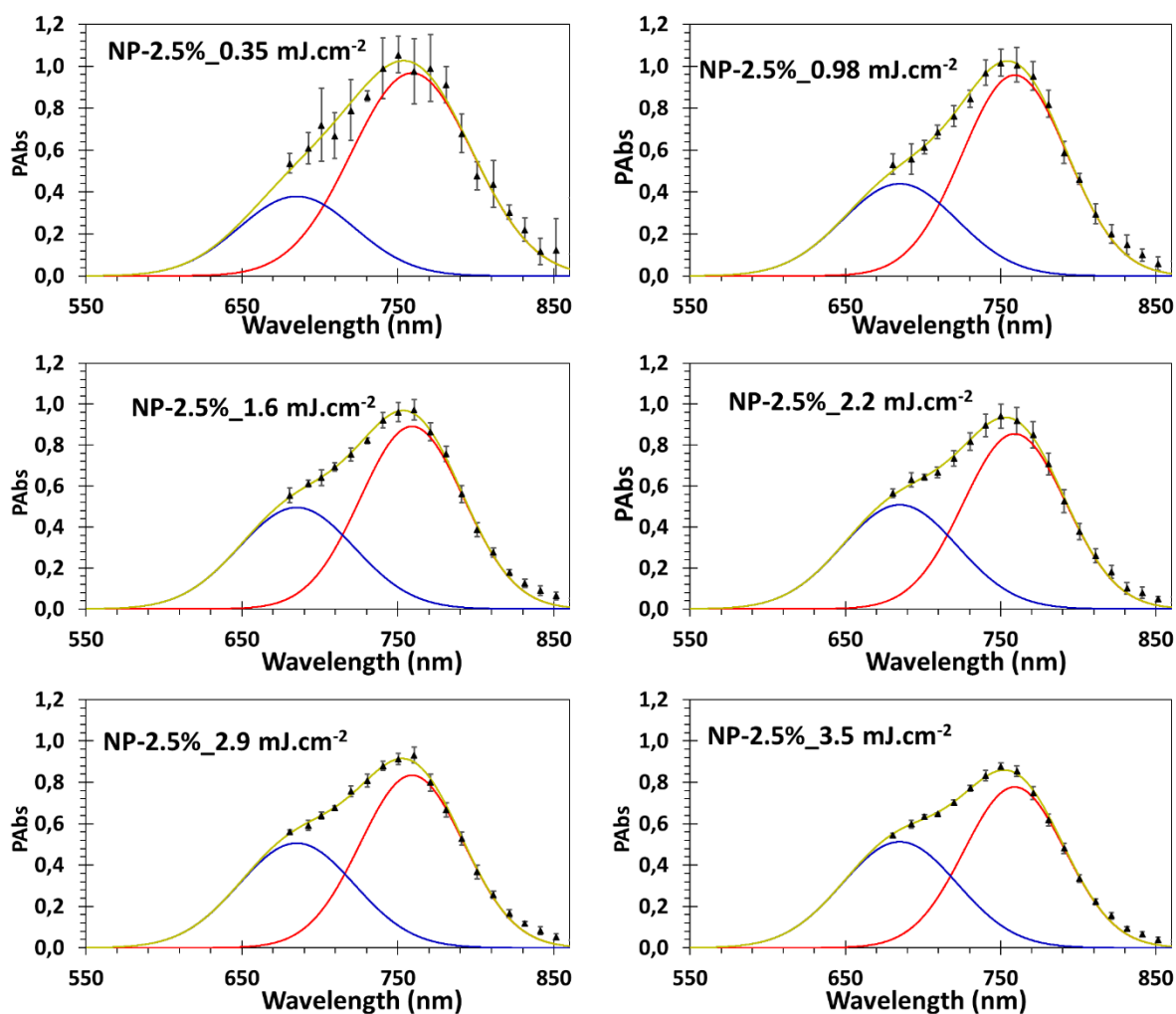


Figure S14 : Photoacoustic excitation spectra of **NP-2.5%** (dark triangles) for every laser fluence: 0.35 mJ.cm^{-2} , 0.98 mJ.cm^{-2} and 1.6 mJ.cm^{-2} , 2.2 mJ.cm^{-2} , 2.9 mJ.cm^{-2} , 3.5 mJ.cm^{-2} . The corresponding laser fluence is indicated on each graph. For each fluence, the total fit curve (yellow) composed of two Gaussian functions (in red and blue) were plotted.

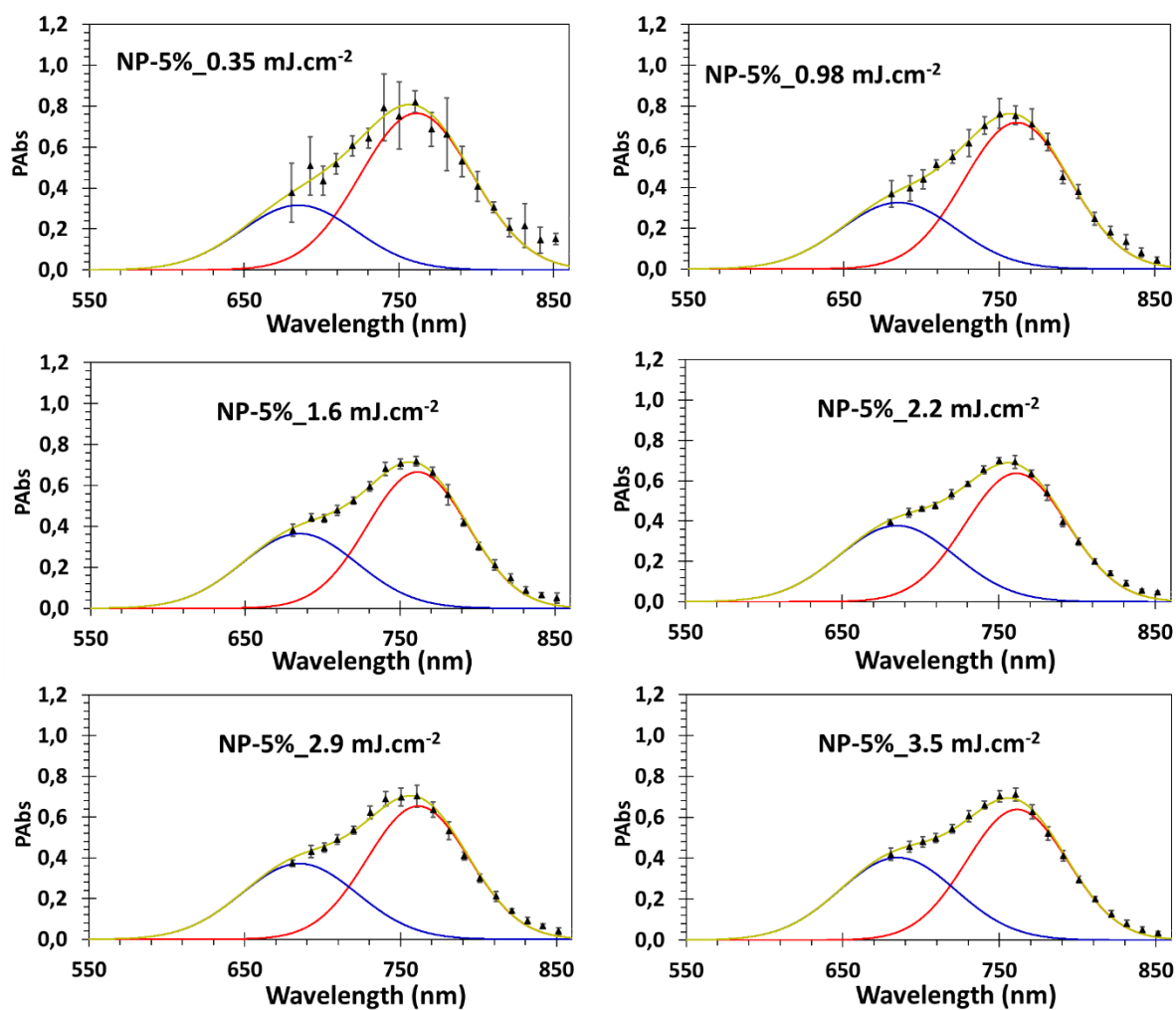


Figure S15 : Photoacoustic excitation spectra of **NP-5%** (dark triangles) for every laser fluence: 0.35 mJ.cm⁻², 0.98 mJ.cm⁻² and 1.6 mJ.cm⁻², 2.2 mJ.cm⁻², 2.9 mJ.cm⁻², 3.5 mJ.cm⁻². The corresponding laser fluence is indicated on each graph. For each fluence, the total fit curve (yellow) composed of two Gaussian functions (in red and blue) were plotted.

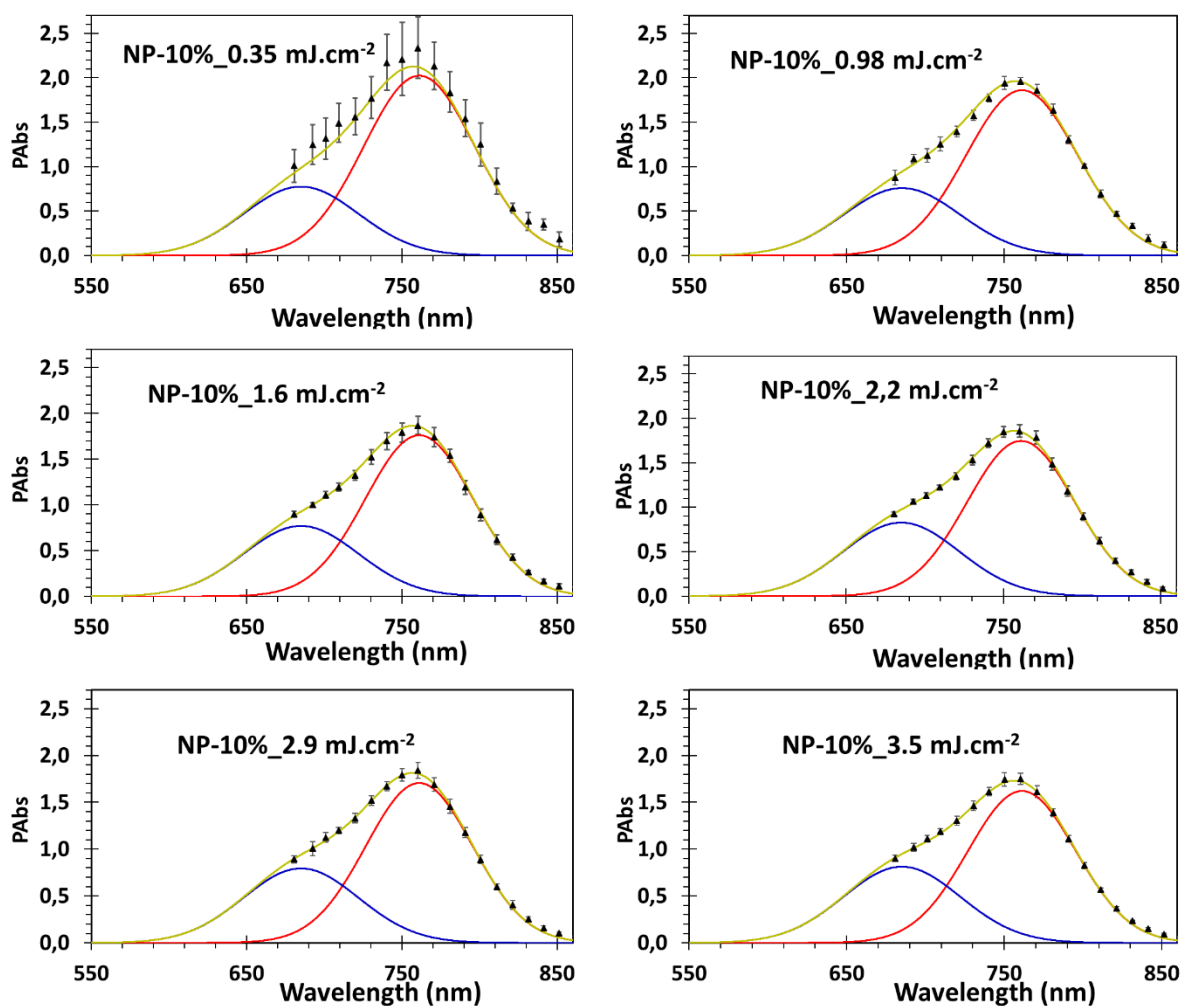


Figure S16 : Photoacoustic excitation spectra of **NP-10%** (dark triangles) for every laser fluence: 0.35 mJ.cm⁻², 0.98 mJ.cm⁻² and 1.6 mJ.cm⁻², 2.2 mJ.cm⁻², 2.9 mJ.cm⁻², 3.5 mJ.cm⁻². The corresponding laser fluence is indicated on each graph. For each fluence, the total fit curve (yellow) composed of two Gaussian functions (in red and blue) were plotted.

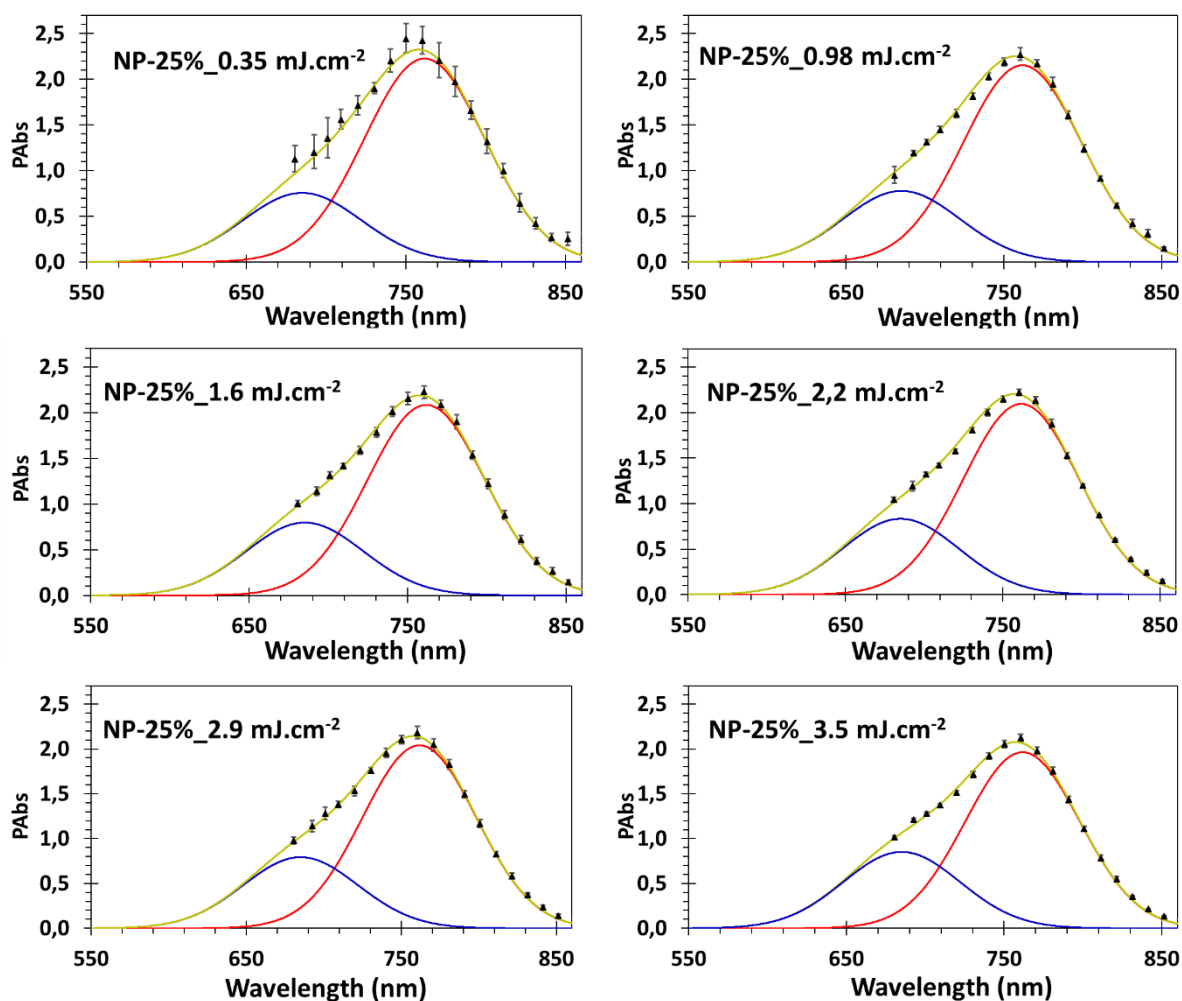


Figure S17 : Photoacoustic excitation spectra of NP-25% (dark triangles) for every laser fluence: $0.35 \text{ mJ}\cdot\text{cm}^{-2}$, $0.98 \text{ mJ}\cdot\text{cm}^{-2}$ and $1.6 \text{ mJ}\cdot\text{cm}^{-2}$, $2.2 \text{ mJ}\cdot\text{cm}^{-2}$, $2.9 \text{ mJ}\cdot\text{cm}^{-2}$, $3.5 \text{ mJ}\cdot\text{cm}^{-2}$. The corresponding laser fluence is indicated on each graph. For each fluence, the total fit curve (yellow) composed of two Gaussian functions (in red and blue) were plotted. NP-25% were diluted 2 times.

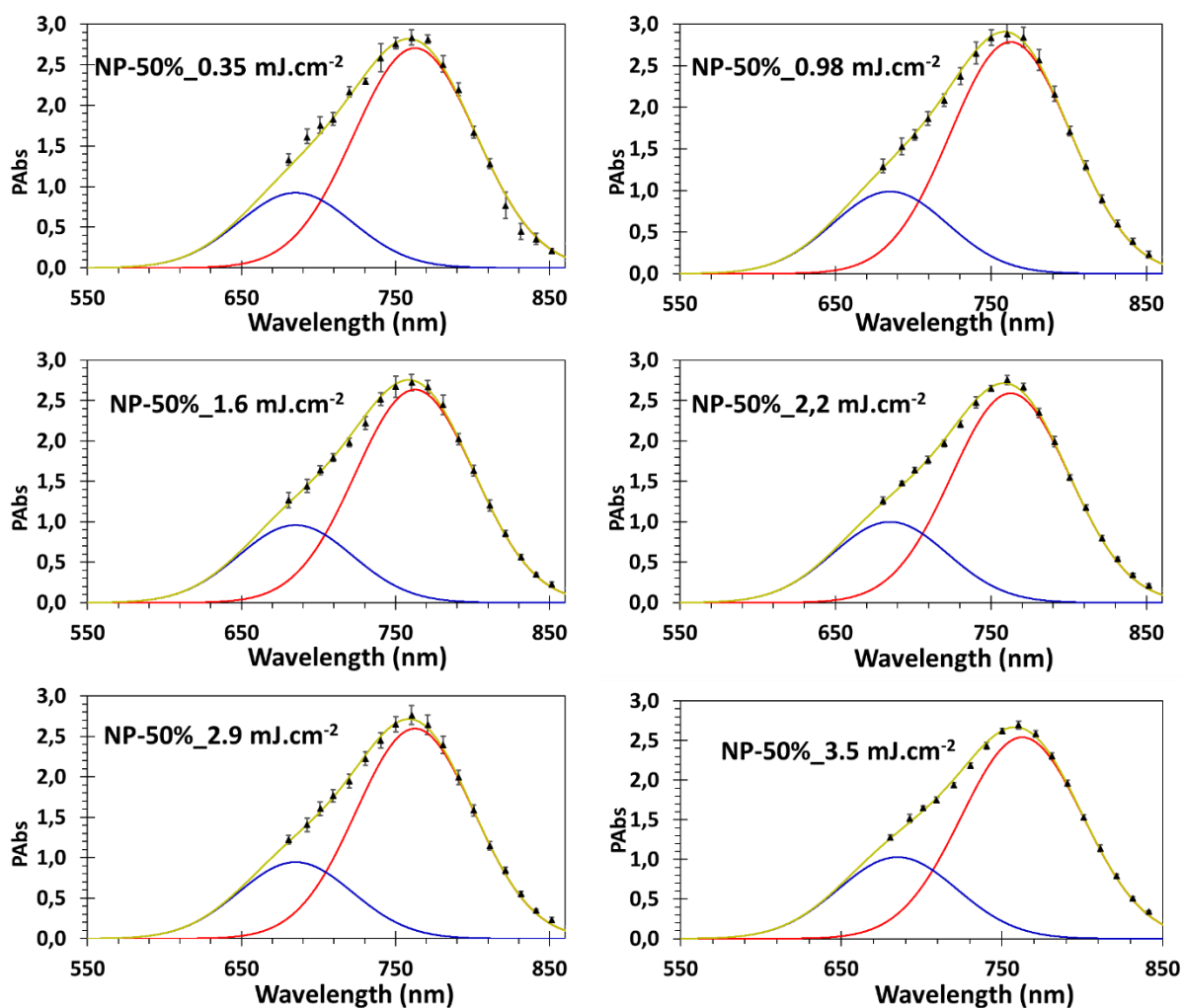


Figure S18 : Photoacoustic excitation spectra of **NP-50%** (dark triangles) for every laser fluence: 0.35 mJ.cm⁻², 0.98 mJ.cm⁻² and 1.6 mJ.cm⁻², 2.2 mJ.cm⁻², 2.9 mJ.cm⁻², 3.5 mJ.cm⁻². The corresponding laser fluence is indicated on each graph. For each fluence, the total fit curve (yellow) composed of two Gaussian functions (in red and blue) were plotted. **NP-50%** were diluted 3 times.

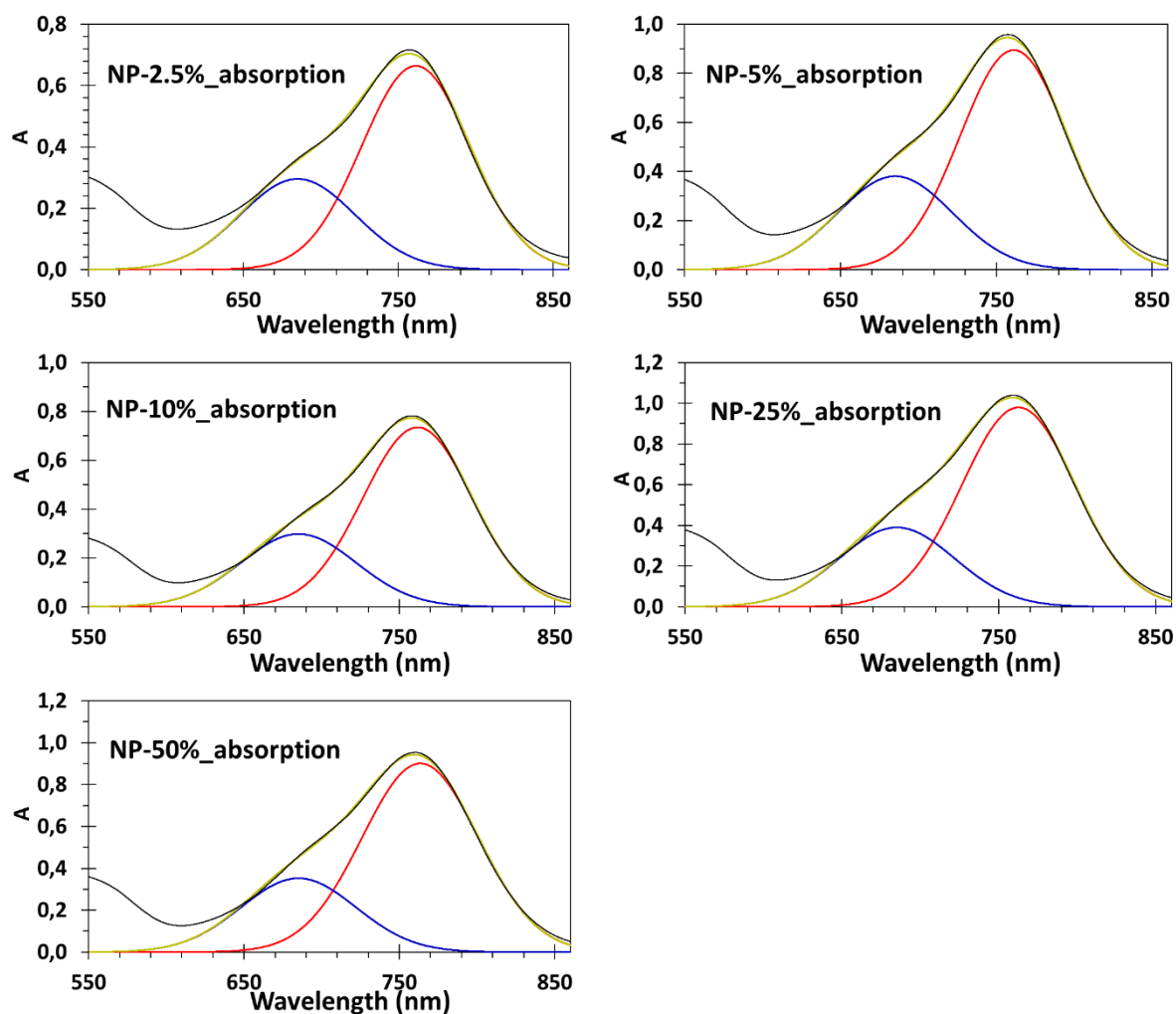


Figure S19 : Absorption spectra of the different NP batches (dark curve). The corresponding NP batch is indicated on each graph. For each NP absorption, the total fit curve (yellow) composed of two Gaussian functions (in red and blue) were plotted. **NP-10%** was diluted 3 times, **NP-25%** was diluted 5 times and **NP-50%** was diluted 10 times.

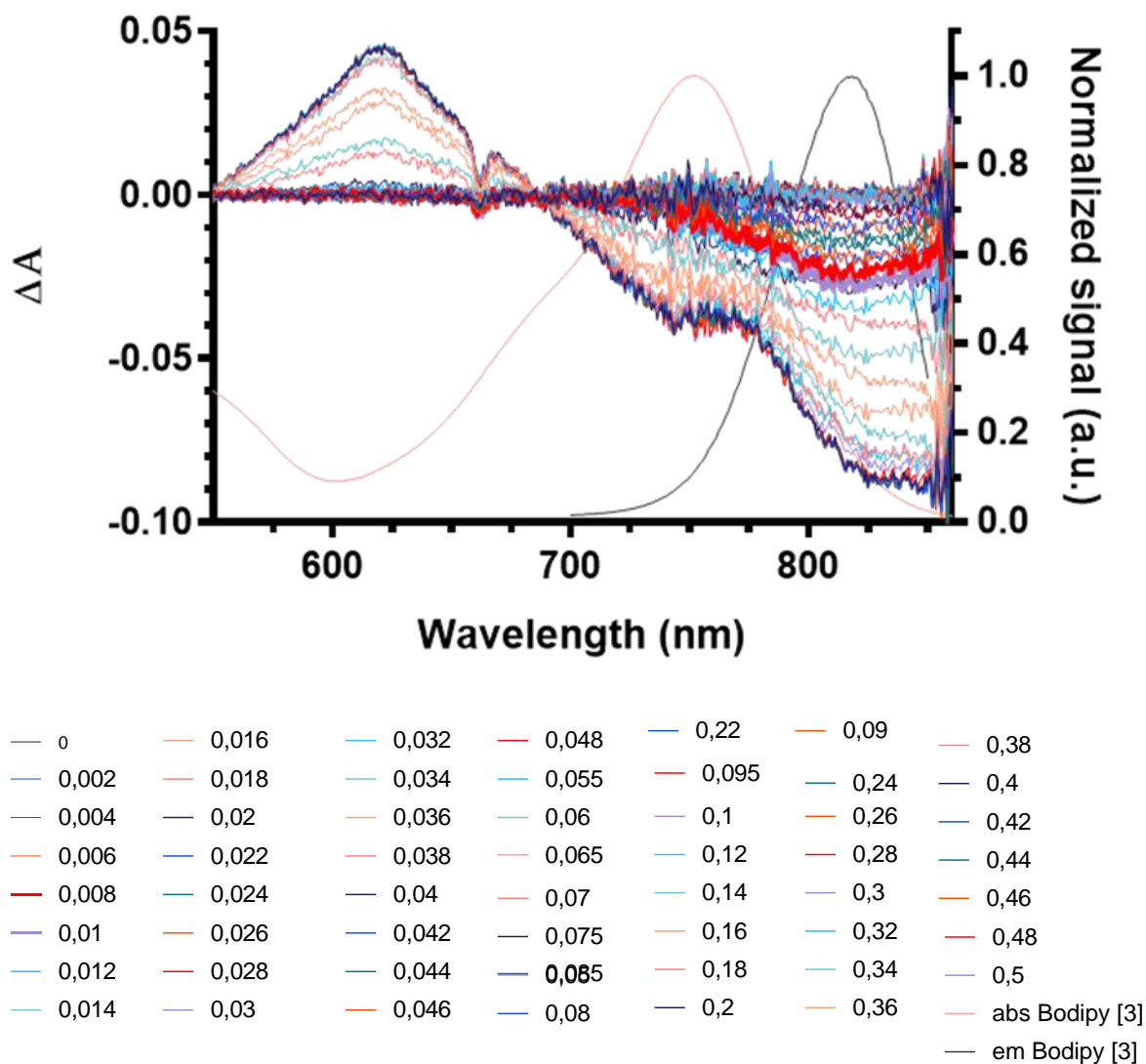


Figure S20. Transient absorption spectra of Bodipy **[3]** in DCM for different time delays between pump and probe. Pump at 680 nm. Normalized Absorption spectra of Bodipy **[3]** (yellow). Normalized fluorescence emission spectra of Bodipy **[3]** (dark). Delays between pump and probe were indicated below in μs .

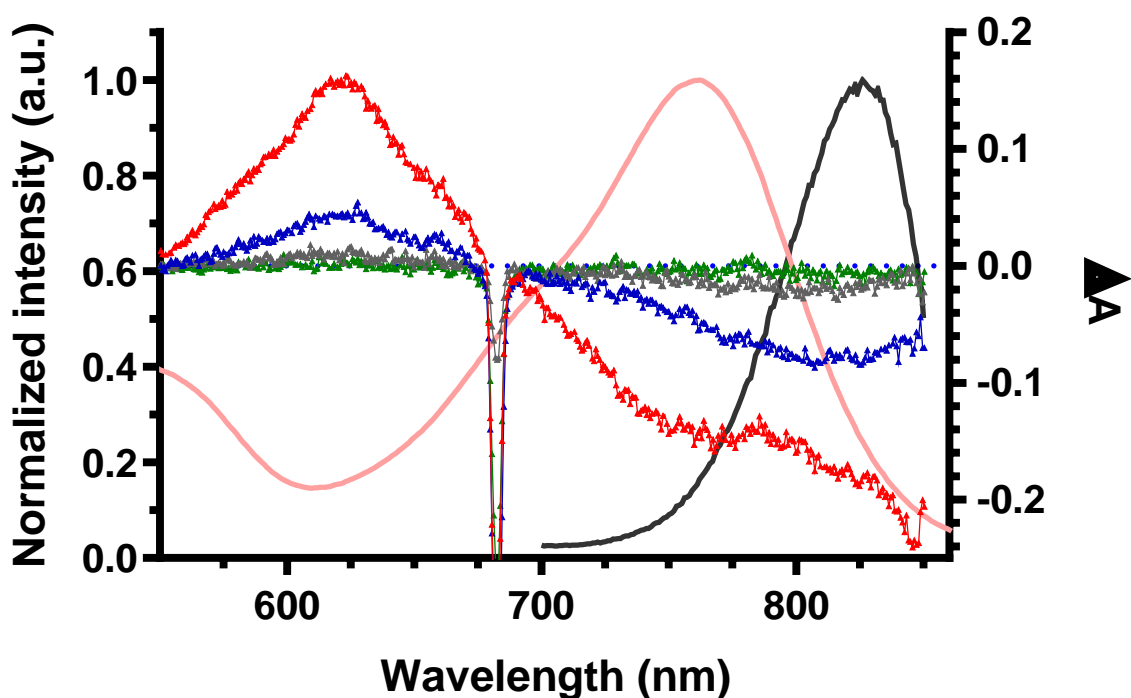


Figure S21 : Transient absorption spectra of Bodipy **[3]** in DCM (red), of **NP-5%** (blue), of **NP-25%** (grey), of **NP-50%** (green). Pump at 680 nm and 0 μ s delay between pump and probe. Normalized Absorption spectra of **NP-50%** (pink). Normalized fluorescence emission spectra of **NP-50%** (light dark), excitation at 670nm. For all sample the maximum absorption value was around 0.4.

3.6 REFERENCES

- Abbruzzetti, Stefania, Cristiano Viappiani, Daniel H. Murgida, Rosa Erra-Balsells, et Gabriel M. Bilmes. 1999. « Non-Toxic, Water-Soluble Photocalorimetric Reference Compounds for UV and Visible Excitation ». *Chemical Physics Letters* 304 (3): 167-72. [https://doi.org/10.1016/S0009-2614\(99\)00306-1](https://doi.org/10.1016/S0009-2614(99)00306-1).
- Andreiuk, Bohdan, Andreas Reisch, Eduard Bernhardt, et Andrey Klymchenko. 2019. « Fighting Aggregation-Caused Quenching and Leakage of Dyes in Fluorescent Polymer Nanoparticles: Universal Role of Counterion ». *Chemistry - An Asian Journal* 14 (janvier). <https://doi.org/10.1002/asia.201801592>.
- Bader, Arjen N., Erik G. Hofman, Paul M. P. van Bergen en Henegouwen, et Hans C. Gerritsen. 2007. « Imaging of Protein Cluster Sizes by Means of Confocal Time-Gated Fluorescence Anisotropy Microscopy ». *Optics Express* 15 (11): 6934-45. <https://doi.org/10.1364/OE.15.006934>.

- Beard, Paul. 2011. « Biomedical Photoacoustic Imaging ». *Interface Focus* 1 (4): 602-31. <https://doi.org/10.1098/rsfs.2011.0028>.
- Berberan-Santos, M. N., E. N. Bodunov, et B. Valeur. 2005. « Mathematical Functions for the Analysis of Luminescence Decays with Underlying Distributions 1. Kohlrausch Decay Function (Stretched Exponential) ». *Chemical Physics* 315 (1): 171-82. <https://doi.org/10.1016/j.chemphys.2005.04.006>.
- Brown, Jordan E., Lilibet Diaz, Ty Christoff-Tempesta, Kathryn M. Nesbitt, Julia Reed-Betts, John Sanchez, et Kevin W. Davies. 2015. « Characterization of Nitrazine Yellow as a Photoacoustically Active pH Reporter Molecule ». *Analytical Chemistry* 87 (7): 3623-30. <https://doi.org/10.1021/ac503515k>.
- Bünau, G. v. 1970. « J. B. Birks: Photophysics of Aromatic Molecules. Wiley-Interscience, London 1970. 704 Seiten. Preis: 210s », décembre. <https://doi.org/10.1002/BBPC.19700741223>.
- Cai, Xiaolei, Jie Liu, Weng Heng Liew, Yukun Duan, Junlong Geng, Nitish Thakor, Kui Yao, Lun-De Liao, et Bin Liu. 2017. « Organic Molecules with Propeller Structures for Efficient Photoacoustic Imaging and Photothermal Ablation of Cancer Cells ». *Materials Chemistry Frontiers* 1 (8): 1556-62. <https://doi.org/10.1039/C7QM00056A>.
- Caponetti, Valeria, Jakub W. Trzcinski, Andrea Cantelli, Regina Tavano, Emanuele Papini, Fabrizio Mancin, et Marco Montalti. 2019. « Self-Assembled Biocompatible Fluorescent Nanoparticles for Bioimaging ». *Frontiers in Chemistry* 7. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fchem.2019.00168>.
- Chan, Fiona T. S., Clemens F. Kaminski, et Gabriele S. Kaminski Schierle. 2011. « HomoFRET Fluorescence Anisotropy Imaging as a Tool to Study Molecular Self-Assembly in Live Cells ». *ChemPhysChem* 12 (3): 500-509. <https://doi.org/10.1002/cphc.201000833>.
- Chen, Bing, et Feng Wang. 2019. « Combating Concentration Quenching in Upconversion Nanoparticles ». *Accounts of Chemical Research* 53 (octobre). <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.9b00453>.
- Chen, Reuven. 2003. « Apparent Stretched-Exponential Luminescence Decay in Crystalline Solids ». *Journal of Luminescence, Proceedings of the 2002 International Conference on Luminescence and Optical Spectroscopy of Condensed Matter, 102-103 (mai)*: 510-18. [https://doi.org/10.1016/S0022-2313\(02\)00601-4](https://doi.org/10.1016/S0022-2313(02)00601-4).
- Colby, Kathryn A., Jonathan J. Burdett, Robert F. Frisbee, Lingyan Zhu, Robert J. Dillon, et Christopher J. Bardeen. 2010. « Electronic Energy Migration on Different Time Scales: Concentration Dependence of the Time-Resolved Anisotropy and Fluorescence Quenching of Lumogen Red in Poly(Methyl Methacrylate) ». *The Journal of Physical Chemistry. A* 114 (10): 3471-82. <https://doi.org/10.1021/jp910277j>.

- Das, Ayendrila, Krishna Mishra, et Subhadip Ghosh. 2021. « Revealing Explicit Microsecond Carrier Diffusion from One Emission Center to Another in an All-Inorganic Perovskite Nanocrystal ». *The Journal of Physical Chemistry Letters* 12 (22): 5413-22. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcllett.1c01154>.
- Delplace, Vianney, Patrick Couvreur, et Julien Nicolas. 2014. « Recent Trends in the Design of Anticancer Polymer Prodrug Nanocarriers ». *Polymer Chemistry* 5 (5): 1529-44. <https://doi.org/10.1039/C3PY01384G>.
- Descalzo, Ana, Pichandi Ashokkumar, Zhen Shen, et Knut Rurack. 2019. « On the Aggregation Behaviour and Spectroscopic Properties of Alkylated and Annelated Boron-Dipyrromethene (BODIPY) Dyes in Aqueous Solution ». *ChemPhotoChem* 4 (octobre). <https://doi.org/10.1002/cptc.201900235>.
- Dias, Fernando B., Matti Knaapila, Andrew P. Monkman, et Hugh D. Burrows. 2006. « Fast and Slow Time Regimes of Fluorescence Quenching in Conjugated Polyfluorene–Fluorenone Random Copolymers: The Role of Exciton Hopping and Dexter Transfer along the Polymer Backbone ». *Macromolecules* 39 (4): 1598-1606. <https://doi.org/10.1021/ma052505l>.
- Diez-Cabanes, Valentin, Antonio Monari, et Mariachiara Pastore. 2021. « Competition between the Photothermal Effect and Emission in Potential Phototherapy Agents ». *The Journal of Physical Chemistry B* 125 (31): 8733-41. <https://doi.org/10.1021/acs.jpccb.1c03977>.
- Duan, Chong, Yibin Zhou, Guo-Gang Shan, Yuncong Chen, Weijun Zhao, Dandan Yuan, Lintao Zeng, Xiaobo Huang, et Guangle Niu. 2019. « Bright Solid-State Red-Emissive BODIPYs: Facile Synthesis and Their High-Contrast Mechanochromic Properties ». *Journal of Materials Chemistry C* 7 (12): 3471-78. <https://doi.org/10.1039/C8TC06421K>.
- « Ein Konzentrationsumschlag Der Fluoreszenz. » 1954. *Zeitschrift Für Physikalische Chemie* 1 (5_6): 275-77. https://doi.org/10.1524/zpch.1954.1.5_6.275.
- Fattal, Elias, Hervé Hillaireau, Simona Mura, Julien Nicolas, et Nicolas Tsapis. 2012. « Targeted Delivery Using Biodegradable Polymeric Nanoparticles ». In *Fundamentals and Applications of Controlled Release Drug Delivery*, édité par Juergen Siepmann, Ronald A. Siegel, et Michael J. Rathbone, 255-88. Advances in Delivery Science and Technology. Boston, MA: Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0881-9_10.
- Fornaguera, Cristina, et Maria José García-Celma. 2017. « Personalized Nanomedicine: A Revolution at the Nanoscale ». *Journal of Personalized Medicine* 7 (4): E12. <https://doi.org/10.3390/jpm7040012>.
- Fuenzalida Werner, Juan Pablo, Yuanhui Huang, Kanuj Mishra, Robert Janowski, Paul Vetschera, Christina Heichler, Andriy Chmyrov, et al. 2020. « Challenging a Preconception: Optoacoustic Spectrum Differs from the Optical Absorption Spectrum of Proteins and Dyes for Molecular Imaging ». *Analytical Chemistry* 92 (15): 10717-24. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c01902>.

- Fuenzalida Werner, Juan Pablo, Kanuj Mishra, Yuanhui Huang, Paul Vetschera, Sarah Glasl, Andriy Chmyrov, Klaus Richter, Vasilis Ntziachristos, et Andre C. Stiel. 2019. « Structure-Based Mutagenesis of Phycobiliprotein smURFP for Optoacoustic Imaging ». *ACS Chemical Biology* 14 (9): 1896-1903. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.9b00299>.
- Galangau, Olivier, Cécile Dumas-Verdes, Rachel Méallet-Renault, et Gilles Clavier. 2010. « Rational Design of Visible and NIR Distyryl-BODIPY Dyes from a Novel Fluorinated Platform ». *Organic & Biomolecular Chemistry* 8 (20): 4546-53. <https://doi.org/10.1039/C004812G>.
- Gao, Heqi, Xingchen Duan, Di Jiao, Yi Zeng, Xiaoyan Zheng, Jingtian Zhang, Hanlin Ou, Ji Qi, et Dan Ding. 2021. « Boosting Photoacoustic Effect via Intramolecular Motions Amplifying Thermal-to-Acoustic Conversion Efficiency for Adaptive Image-Guided Cancer Surgery ». *Angewandte Chemie International Edition* 60 (38): 21047-55. <https://doi.org/10.1002/anie.202109048>.
- Gao, Ping, Julien Nicolas, et Tâp Ha-Duong. 2021. « Supramolecular Organization of Polymer Prodrug Nanoparticles Revealed by Coarse-Grained Simulations ». *Journal of the American Chemical Society* 143 (42): 17412-23. <https://doi.org/10.1021/jacs.1c05332>.
- Ghiggino, Kenneth P., Joost N. H. Reek, Maxwell J. Crossley, Anton W. Bosman, Albert P. H. J. Schenning, et E. W. Meijer. 2000. « The Dynamics of Electronic Energy Transfer in Novel Multiporphyrin Functionalized Dendrimers: A Time-Resolved Fluorescence Anisotropy Study ». *The Journal of Physical Chemistry B* 104 (12): 2596-2606. <https://doi.org/10.1021/jp993116u>.
- Grazon, Chloe, Jutta Rieger, Bernadette Charleux, Gilles Clavier, et Rachel Méallet-Renault. 2014. « Ultrabright BODIPY-Tagged Polystyrene Nanoparticles: Study of Concentration Effect on Photophysical Properties ». *The Journal of Physical Chemistry C* 118 (juin): 13945-52. <https://doi.org/10.1021/jp502790w>.
- Gu, Hua, Weijian Liu, Shijie Zhen, Saran Long, Wen Sun, Jianfang Cao, Xueze Zhao, Jianjun Du, Jiangli Fan, et Xiaojun Peng. 2021. « "Internal and External Combined" Nonradiative Decay-Based Nanoagents for Photoacoustic Image-Guided Highly Efficient Photothermal Therapy ». *ACS Applied Materials & Interfaces* 13 (39): 46353-60. <https://doi.org/10.1021/acsmi.1c14020>.
- Guo, Bing, Zonghai Sheng, Dehong Hu, Anran Li, Shidang Xu, Purnima Manghnani, Chengbo Liu, Lin Guo, Hairong Zheng, et Bin Liu. 2017. « Molecular Engineering of Conjugated Polymers for Biocompatible Organic Nanoparticles with Highly Efficient Photoacoustic and Photothermal Performance in Cancer Theranostics ». *ACS Nano* 11 (septembre). <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b04685>.
- Guo, Xing, Mao Li, Hao Wu, Wanle Sheng, Yuanmei Feng, Changjiang Yu, Lijuan Jiao, et Erhong Hao. 2020. « Near-IR Absorbing J-Aggregates of a Phenanthrene-

- Fused BODIPY as a Highly Efficient Photothermal Nanoagent ». *Chemical Communications* 56 (93): 14709-12. <https://doi.org/10.1039/D0CC06014C>.
- Hamon, Casey L., Christopher L. Dorsey, Tuğba Özel, Eugenia M. Barnes, Todd W. Hudnall, et Tania Betancourt. 2016. « Near-Infrared Fluorescent Aza-BODIPY Dye-Loaded Biodegradable Polymeric Nanoparticles for Optical Cancer Imaging ». *Journal of Nanoparticle Research* 18 (7): 207. <https://doi.org/10.1007/s11051-016-3518-7>.
- Hatamimoslehabadi, Maryam, Stephanie Bellinger, Jeffrey La, Esraa Ahmad, Mathieu Frenette, Chandra Yelleswarapu, et Jonathan Rochford. 2017. « Correlation of Photophysical Properties with the Photoacoustic Emission for a Selection of Established Chromophores ». *The Journal of Physical Chemistry C* 121 (43): 24168-78. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.7b07598>.
- Hennig, Andreas, Soheil Hatami, Monika Spieles, et Ute Resch-Genger. 2013. « Excitation Energy Migration and Trapping on the Surface of Fluorescent Poly(Acrylic Acid)-Grafted Polymer Particles ». *Photochemical & Photobiological Sciences* 12 (5): 729-37. <https://doi.org/10.1039/C2PP25364J>.
- Ho, Lin-Chen, Chung-Mao Ou, Chi-Lin Li, Ssu-Yu Chen, Hung-Wen Li, et Huan-Tsung Chang. 2013. « Sensitive PH Probes of Retro-Self-Quenching Fluorescent Nanoparticles ». *Journal of Materials Chemistry B* 1 (18): 2425-32. <https://doi.org/10.1039/C3TB20146E>.
- Hu, Rongrong, Erik Lager, Angélica Aguilar-Aguilar, Jianzhao Liu, Jacky W. Y. Lam, Herman H. Y. Sung, Ian D. Williams, et al. 2009. « Twisted Intramolecular Charge Transfer and Aggregation-Induced Emission of BODIPY Derivatives ». *The Journal of Physical Chemistry C* 113 (36): 15845-53. <https://doi.org/10.1021/jp902962h>.
- Hu, Wenbo, Hengheng Ma, Bing Hou, Hui Zhao, Yu Ji, Rongcui Jiang, Xiaoming Hu, et al. 2016. « Engineering Lysosome-Targeting BODIPY Nanoparticles for Photoacoustic Imaging and Photodynamic Therapy under Near-Infrared Light ». *ACS Applied Materials & Interfaces* 8 (19): 12039-47. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b02721>.
- Hu, Wenbo, Xiaofei Miao, Haojie Tao, Alexander Baev, Can Ren, Quli Fan, Tingchao He, Wei Huang, et Paras N. Prasad. 2019. « Manipulating Nonradiative Decay Channel by Intermolecular Charge Transfer for Exceptionally Improved Photothermal Conversion ». *ACS Nano* 13 (10): 12006-14. <https://doi.org/10.1021/acsnano.9b06208>.
- Huang, Yinjuan, Jie Xing, Qiuyu Gong, Li-Chuan Chen, Guangfeng Liu, Changjiang Yao, Zongrui Wang, Hao-Li Zhang, Zhong Chen, et Qichun Zhang. 2019. « Reducing Aggregation Caused Quenching Effect through Co-Assembly of PAH Chromophores and Molecular Barriers ». *Nature Communications* 10 (1): 169. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-08092-y>.

- Jaiswal, Saumya, Surjendu Bikash Dutta, Debasis Nayak, et Sharad Gupta. 2021. « Effect of Doxorubicin on the Near-Infrared Optical Properties of Indocyanine Green ». *ACS Omega* 6 (50): 34842-49. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c05500>.
- Kasha, M., H. R. Rawls, et M. Ashraf El-Bayoumi. 1965. « The Exciton Model in Molecular Spectroscopy ». *Pure and Applied Chemistry* 11 (3): 371-92. <https://doi.org/10.1351/pac196511030371>.
- Kulyk, Bohdan, Said Taboukhat, Huriye Akdas-Kilig, Jean-Luc Fillaut, Miroslav Karpierz, et Bouchta Sahraoui. 2017. « Tuning the Nonlinear Optical Properties of BODIPYs by Functionalization with Dimethylaminostyryl Substituents ». *Dyes and Pigments* 137 (février): 507-11. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2016.10.045>.
- Laufer, Jan, Amit Jathoul, Martin Pule, et Paul Beard. 2013. « In Vitro Characterization of Genetically Expressed Absorbing Proteins Using Photoacoustic Spectroscopy ». *Biomedical Optics Express* 4 (11): 2477-90. <https://doi.org/10.1364/BOE.4.002477>.
- Leduskrasts, Kaspars, et Edgars Suna. 2018. « Aggregation Induced Emission by Pyridinium–Pyridinium Interactions ». *RSC Advances* 9 (1): 460-65. <https://doi.org/10.1039/C8RA08771G>.
- Lempke, Linda, Tobias Fischer, Jérémy Bell, Werner Kraus, Knut Rurack, et Norbert Krause. 2015. « Gold-Catalyzed Allene Cycloisomerization for Pyrrole Synthesis: Towards Highly Fluorinated BODIPY Dyes ». *Organic & Biomolecular Chemistry* 13 (12): 3787-91. <https://doi.org/10.1039/C4OB02671C>.
- Li, Kang, Xingchen Duan, Zhiyong Jiang, Dan Ding, Yuncong Chen, Guo-Qiang Zhang, et Zhipeng Liu. 2021. « J-Aggregates of Meso-[2.2]Paracyclophanyl-BODIPY Dye for NIR-II Imaging ». *Nature Communications* 12 (1): 2376. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22686-z>.
- Li, Xiaozhen, Lu Liu, Shengliang Li, Yingpeng Wan, Jia-Xiong Chen, Shuang Tian, Zhongming Huang, et al. 2019. « Biodegradable π -Conjugated Oligomer Nanoparticles with High Photothermal Conversion Efficiency for Cancer Theranostics ». *ACS Nano* 13 (11): 12901-11. <https://doi.org/10.1021/acsnano.9b05383>.
- Liu, Shunjie, Xin Zhou, Haoke Zhang, Hanlin Ou, Wu Jacky, Yang Liu, Linqi Shi, Dan Ding, et Ben Tang. 2019. « Molecular Motion in Aggregates: Manipulating TICT for Boosting Photothermal Theranostics ». *Journal of the American Chemical Society* 141 (mars). <https://doi.org/10.1021/jacs.8b13889>.
- Liu, Zhipeng, Zhiyong Jiang, Ming Yan, et Xiaoqing Wang. 2019. « Recent Progress of BODIPY Dyes With Aggregation-Induced Emission ». *Frontiers in Chemistry* 7. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fchem.2019.00712>.
- Lyu, Yan, Yuan Fang, Qingqing Miao, Xu Zhen, Dan Ding, et Kanyi Pu. 2016. « Intraparticle Molecular Orbital Engineering of Semiconducting Polymer Nanoparticles as Amplified Theranostics for in Vivo Photoacoustic Imaging and

- Photothermal Therapy ». *ACS Nano* 10 (4): 4472-81. <https://doi.org/10.1021/acsnano.6b00168>.
- Märk, Julia, Franz-Josef Schmitt, Christoph Theiss, Hakan Dortay, Thomas Friedrich, et Jan Laufer. 2015. « Photoacoustic Imaging of Fluorophores Using Pump-Probe Excitation ». *Biomedical Optics Express* 6 (7): 2522-35. <https://doi.org/10.1364/BOE.6.002522>.
- Méallet-Renault, Rachel, Alexandre Héroult, Jean-Jacques Vachon, Robert B. Pansu, Sonia Amigoni-Gerbier, et Chantal Larpent. 2006. « Fluorescent Nanoparticles as Selective Cu(II) Sensors ». *Photochemical & Photobiological Sciences* 5 (3): 300-310. <https://doi.org/10.1039/b513215k>.
- Mendes Marinho, Stéphanie, Minh-Huong Ha-Thi, Van-Thai Pham, Annamaria Quaranta, Thomas Pino, Christophe Lefumeux, Thierry Chamailié, Winfried Leibl, et Ally Aukauloo. 2017. « Time-Resolved Interception of Multiple-Charge Accumulation in a Sensitizer-Acceptor Dyad ». *Angewandte Chemie (International Ed. in English)* 56 (50): 15936-40. <https://doi.org/10.1002/anie.201706564>.
- Merkes, Jean Michél, Twan Lammers, Rajesh Kanicherla, Magnus Rueping, Fabian Kiessling, et Srinivas Banala. 2020. « Tuning Optical Properties of BODIPY Dyes by Pyrrole Conjugation for Photoacoustic Imaging ». *Advanced Optical Materials* 8 (11): 1902115. <https://doi.org/10.1002/adom.201902115>.
- Miao, Xiaofei, Haojie Tao, Wenbo Hu, Yonghui Pan, Quli Fan, et Wei Huang. 2020. « Elucidating the Excited-State Dynamics Behavior in near-Infrared Bodipy Dye and Aggregates toward Biophotonics ». *Science China Chemistry* 63 (8): 1075-81. <https://doi.org/10.1007/s11426-020-9731-0>.
- Mula, Soumyaditya, Alok K. Ray, Manas Banerjee, Tandrima Chaudhuri, Kamallesh Dasgupta, et Subrata Chattopadhyay. 2008. « Design and Development of a New Pyrromethene Dye with Improved Photostability and Lasing Efficiency: Theoretical Rationalization of Photophysical and Photochemical Properties ». *The Journal of Organic Chemistry* 73 (6): 2146-54. <https://doi.org/10.1021/jo702346s>.
- Mura, Simona, et Patrick Couvreur. 2012. « Nanotheranostics for Personalized Medicine ». *Advanced Drug Delivery Reviews* 64 (13): 1394-1416. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.06.006>.
- Ni, Yong, Ravi Kumar Kannadorai, Sidney W.-K. Yu, Young-Tae Chang, et Jishan Wu. 2017. « Push-Pull Type Meso-Ester Substituted BODIPY near-Infrared Dyes as Contrast Agents for Photoacoustic Imaging ». *Organic & Biomolecular Chemistry* 15 (21): 4531-35. <https://doi.org/10.1039/C7OB00965H>.
- Nicolas, Julien. 2016. « Drug-Initiated Synthesis of Polymer Prodrugs: Combining Simplicity and Efficacy in Drug Delivery ». *Chemistry of Materials* 28 (6): 1591-1606. <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.5b04281>.

- Ozdemir, Tugba, Serdar Atilgan, Ilker Kutuk, Leyla T. Yildirim, Abdullah Tulek, Mehmet Bayindir, et Engin U. Akkaya. 2009. « Solid-State Emissive BODIPY Dyes with Bulky Substituents As Spacers ». *Organic Letters* 11 (10): 2105-7. <https://doi.org/10.1021/ol9005568>.
- Paschotta, Dr Rüdiger. s. d. « Saturable Absorbers ». Consulté le 28 avril 2022a. https://www.rp-photonics.com/saturable_absorbers.html.
- . s. d. « Saturation Energy ». Consulté le 24 janvier 2022b. https://www.rp-photonics.com/saturation_energy.html.
- P. Green, Adam, et Alastair R. Buckley. 2015. « Solid State Concentration Quenching of Organic Fluorophores in PMMA ». *Physical Chemistry Chemical Physics* 17 (2): 1435-40. <https://doi.org/10.1039/C4CP05244G>.
- Qi, Ji, Chao Chen, Xiaoyan Zhang, Xianglong Hu, Shenglu Ji, Ryan T. K. Kwok, Jacky W. Y. Lam, Dan Ding, et Ben Zhong Tang. 2018. « Light-Driven Transformable Optical Agent with Adaptive Functions for Boosting Cancer Surgery Outcomes ». *Nature Communications* 9 (1): 1848. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04222-8>.
- Qi, Ji, Leyan Feng, Xiaoyan Zhang, Haoke Zhang, Liwen Huang, Yutong Zhou, Zheng Zhao, et al. 2021. « Facilitation of Molecular Motion to Develop Turn-on Photoacoustic Bioprobe for Detecting Nitric Oxide in Encephalitis ». *Nature Communications* 12 (1): 960. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21208-1>.
- Qin, Huan, Ting Zhou, Sihua Yang, et Da Xing. 2015. « Fluorescence Quenching Nanoprobes Dedicated to In Vivo Photoacoustic Imaging and High-Efficient Tumor Therapy in Deep-Seated Tissue ». *Small* 11 (22): 2675-86. <https://doi.org/10.1002/sml.201403395>.
- Reichardt, Christian. 1994. « Solvatochromic Dyes as Solvent Polarity Indicators ». *Chemical Reviews* 94 (8): 2319-58. <https://doi.org/10.1021/cr00032a005>.
- Reisch, Andreas, Pascal Didier, Ludovic Richert, Sule Oncul, Youri Arntz, Yves Mély, et Andrey S. Klymchenko. 2014. « Collective Fluorescence Switching of Counterion-Assembled Dyes in Polymer Nanoparticles ». *Nature Communications* 5 (1): 1-9. <https://doi.org/10.1038/ncomms5089>.
- Reisch, Andreas, Kateryna Trofymchuk, Anne Runser, Guillaume Fleith, Michel Rawiso, et Andrey S. Klymchenko. 2017. « Tailoring Fluorescence Brightness and Switching of Nanoparticles through Dye Organization in the Polymer Matrix ». *ACS Applied Materials & Interfaces* 9 (49): 43030-42. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b12292>.
- Santos, M. Berberan. 1986. « On the distribution of the nearest neighbor ». *American Journal of Physics* 54 (12): 1139-41. <https://doi.org/10.1119/1.14731>.
- Sarkar, Mitradeep, Théotim Lucas, Yoann Atlas, Gilles Renault, Florence Gazeau, et Jérôme Gateau. 2021. « Calibrated Photoacoustic Spectrometer for in Vitro Characterization of Contrast Agents Based on a Standard Imaging System ». <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-02509232>.

- Saxena, Vishal, Mostafa Sadoqi, et Jun Shao. 2004. « Enhanced Photo-Stability, Thermal-Stability and Aqueous-Stability of Indocyanine Green in Polymeric Nanoparticulate Systems ». *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 74 (1): 29-38. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2004.01.002>.
- Strickler, S. J., et Robert A. Berg. 1962. « Relationship between Absorption Intensity and Fluorescence Lifetime of Molecules ». *The Journal of Chemical Physics* 37 (4): 814-22. <https://doi.org/10.1063/1.1733166>.
- Tenchov, Rumiana, Robert Bird, Allison E. Curtze, et Qiongqiong Zhou. 2021. « Lipid Nanoparticles—From Liposomes to mRNA Vaccine Delivery, a Landscape of Research Diversity and Advancement ». *ACS Nano* 15 (11): 16982-15. <https://doi.org/10.1021/acsnano.1c04996>.
- Tian, Dan, Fen Qi, Huili Ma, Xiaoqing Wang, Yue Pan, Runfeng Chen, Zhen Shen, Zhipeng Liu, Ling Huang, et Wei Huang. 2018. « Domino-like Multi-Emissions across Red and near Infrared from Solid-State 2-/2,6-Aryl Substituted BODIPY Dyes ». *Nature Communications* 9 (1): 2688. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05040-8>.
- Torrice, Michael. 2016. « Does Nanomedicine Have a Delivery Problem? » *ACS Central Science* 2 (7): 434-37. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.6b00190>.
- Valeur, Bernard, et Mário Nuno Berberan-Santos. 2013. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. John Wiley & Sons.
- Vetschera, Paul, Kanuj Mishra, Juan Pablo Fuenzalida-Werner, Andriy Chmyrov, Vasilis Ntziachristos, et Andre C. Stiel. 2018. « Characterization of Reversibly Switchable Fluorescent Proteins in Optoacoustic Imaging ». *Analytical Chemistry* 90 (17): 10527-35. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b02599>.
- Vu, Thanh Truc, Marina Dvorko, Elena Y. Schmidt, Jean-Frédéric Audibert, Pascal Retailleau, Boris A. Trofimov, Robert B. Pansu, Gilles Clavier, et Rachel Méallet-Renault. 2013. « Understanding the Spectroscopic Properties and Aggregation Process of a New Emitting Boron Dipyrromethene (BODIPY) ». *The Journal of Physical Chemistry C* 117 (10): 5373-85. <https://doi.org/10.1021/jp3097555>.
- Wagh, Anil, Faidat Jyoti, Sanku Mallik, Steven Qian, Estelle Leclerc, et Benedict Law. 2013. « Polymeric Nanoparticles with Sequential and Multiple FRET Cascade Mechanisms for Multicolor and Multiplexed Imaging ». *Small* 9 (12): 2129-39. <https://doi.org/10.1002/sml.201202655>.
- Wagh, Anil, Steven Y. Qian, et Benedict Law. 2012. « Development of Biocompatible Polymeric Nanoparticles for in Vivo NIR and FRET Imaging ». *Bioconjugate Chemistry* 23 (5): 981-92. <https://doi.org/10.1021/bc200637h>.
- Wang, Chao, Weijie Chi, Qinglong Qiao, Davin Tan, Zhaochao Xu, et Xiaogang Liu. 2021. « Twisted Intramolecular Charge Transfer (TICT) and Twists beyond TICT: From Mechanisms to Rational Designs of Bright and Sensitive Fluorophores ». *Chemical Society Reviews* 50 (22): 12656-78. <https://doi.org/10.1039/D1CS00239B>.

- Wang, Shichao, Zhi Li, Yubin Liu, Gang Feng, Jun Zheng, Zhen Yuan, et Xuanjun Zhang. 2018. « Activatable Photoacoustic and Fluorescent Probe of Nitric Oxide for Cellular and in Vivo Imaging ». *Sensors and Actuators B: Chemical* 267 (août): 403-11. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.04.052>.
- Werner, Juan Pablo Fuenzalida, Yuanhui Huang, Kanuj Mishra, Robert Janowski, Paul Vetschera, Andriy Chmyrov, Dierk Niessing, Vasilis Ntziachristos, et Andre C. Stiel. 2020. « Challenging a Preconception: Optoacoustic Spectrum Differs from the Absorption Spectrum of Proteins and Dyes for Molecular Imaging ». *BioRxiv*, février, 2020.02.01.930230. <https://doi.org/10.1101/2020.02.01.930230>.
- Wu, P., et L. Brand. 1994. « Resonance Energy Transfer: Methods and Applications ». *Analytical Biochemistry* 218 (1): 1-13. <https://doi.org/10.1006/abio.1994.1134>.
- Würthner, Frank, Theo E. Kaiser, et Chantu R. Saha-Möller. 2011. « J-Aggregates: From Serendipitous Discovery to Supramolecular Engineering of Functional Dye Materials ». *Angewandte Chemie (International Ed. in English)* 50 (15): 3376-3410. <https://doi.org/10.1002/anie.201002307>.
- Zhang, Jinfeng, Jing Chen, Jingkun Ren, Weisheng Guo, Xianlei Li, Rui Chen, Jipsa Chelora, et al. 2018. « Biocompatible Semiconducting Polymer Nanoparticles as Robust Photoacoustic and Photothermal Agents Revealing the Effects of Chemical Structure on High Photothermal Conversion Efficiency ». *Biomaterials* 181 (octobre): 92-102. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.07.042>.
- Zhang, Jinfeng, Caixia Yang, Rui Zhang, Rui Chen, Zhenyu Zhang, Wenjun Zhang, Shih-Hao Peng, et al. 2017. « Biocompatible D-A Semiconducting Polymer Nanoparticle with Light-Harvesting Unit for Highly Effective Photoacoustic Imaging Guided Photothermal Therapy ». *Advanced Functional Materials* 27 (13): 1605094. <https://doi.org/10.1002/adfm.201605094>.
- Zhang, Yongjie, Siyuan Yuan, Ping Liu, Lei Jing, Hongfei Pan, Xiang-Kui Ren, et Zhijian Chen. 2021. « J-Aggregation Induced Emission Enhancement of BODIPY Dyes via H-Bonding Directed Supramolecular Polymerization: The Importance of Substituents at Boron ». *Organic Chemistry Frontiers* 8 (15): 4078-85. <https://doi.org/10.1039/D1QO00520K>.
- Zhao, Zheng, Chao Chen, Wenting Wu, Fenfen Wang, Lili Du, Xiaoyan Zhang, Yu Xiong, et al. 2019. « Highly Efficient Photothermal Nanoagent Achieved by Harvesting Energy via Excited-State Intramolecular Motion within Nanoparticles ». *Nature Communications* 10 (1): 768. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08722-z>.
- Zhou, Effie Y., Hailey J. Knox, Chang Liu, Weili Zhao, et Jefferson Chan. 2019. « A Conformationally Restricted Aza-BODIPY Platform for Stimulus-Responsive Probes with Enhanced Photoacoustic Properties ». *Journal of the American Chemical Society* 141 (44): 17601-9. <https://doi.org/10.1021/jacs.9b06694>.
- Zielińska, Aleksandra, Filipa Carreiró, Ana M. Oliveira, Andreia Neves, Bárbara Pires, D. Nagasamy Venkatesh, Alessandra Durazzo, et al. 2020. « Polymeric

Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology ». *Molecules* 25 (16): 3731. <https://doi.org/10.3390/molecules25163731>.

4 CHAPITRE 4 : DES NANOPARTICULES BIOCOMPATIBLES SENSIBLES AU PH

La sensibilité au pH dans la nature

Les anthocyanes, présents dans le chou rouge, les mûres, les raisins, les myrtilles... sont des colorants biocompatibles sensibles au pH. Ils possèdent une couleur rouge en milieu acide et une couleur bleue en milieu neutre et une couleur jaune en milieu basique.

Dans l'industrie alimentaire, les laboratoires sont très intéressés par des colorants bleus, non-synthétiques, pour remplacer le bleu de patenté V suspecté de provoquer hyperactivité et allergies chez les enfants.

Les anthocyanes ne peuvent être utilisés comme colorants alimentaires à cause de leur sensibilité au pH, qui ne permet donc pas de fournir une couleur bleue stable aux aliments.



4	Chapitre 4 : des nanoparticules biocompatibles sensibles au pH.....	211
4.1	Introduction.....	213
4.2	Les Aza-Bodipy sensibles au pH.....	213
4.3	Sensibilité au pH des NP de PLA-Bodipy.....	217
4.3.1	Sensibilité au pH du Bodipy.....	217
4.3.2	Sensibilité au pH des NP de Bodipy [3]	234
4.3.3	Dosage du Bodipy [3] en surface des NP.....	242
4.4	Synthèse des Aza-Bodipy.....	246
4.5	Conclusion.....	249
4.6	Partie expérimentale.....	250
4.6.1	Matériel.....	250
4.6.2	Etude du pH.....	250
4.6.3	Synthèse de l'Aza-Bodipy.....	253
4.6.4	Synthèse du PLA-PEG-N ₃	260
4.7	Annexe.....	261
4.7.1	Annexe 1 : Précipitation du Bodipy [3] en milieu acide.....	261
4.7.2	Annexe 2 : Attribution des bandes d'absorption et d'émission du Bodipy [3] dans le mélange tampon/DMSO.....	263
4.7.3	Annexe 3 : Equations acide base et dosage.....	265
4.7.4	Annexe 4 : suivi du signal de fluorescence du Bodipy [3] à 697 nm dissous dans les solutions tampons.....	268
4.8	Bibliographie.....	268

4.1 INTRODUCTION

L'objectif de ce chapitre est de synthétiser des NP biocompatibles, biodégradables et sensibles au pH. Les fluorophores de type Aza-boradiaindacènes (Aza-Bodipy), ont récemment démontré une fluorescence sensible au pH (Figure 4.1) et une bonne biocompatibilité *in vivo* (Grossi et al. 2016). Un Aza-Bodipy sera greffé de manière covalente à la surface de NP proches de celles décrites dans les chapitres 2 et 3 et le changement des propriétés spectrales (absorption, émission et photoacoustique) des NP avec le pH pourra permettre de suivre la cinétique d'internalisation des NP dans les cellules. Le pK_A des Aza-Bodipy devra être proche de 4, afin de permettre un changement de propriétés spectrales entre le passage du milieu extracellulaire (pH proche de 7) aux endosomes puis aux lysosomes (pH = 4). À terme, nous souhaiterions développer un double marquage des NP avec un Bodipy actif en photoacoustique dans le cœur des NP et un Aza-Bodipy sensible au pH en surface des NP.

Dans un premier temps, nous allons vérifier que le Bodipy [3] étudié dans les chapitres 2 et 3 ainsi que les NP associées ne sont pas sensibles au pH dans les domaines d'acidité étudiées. L'objectif est de conserver les bonnes propriétés spectrales du Bodipy [3] pour la photoacoustique et d'éviter tout recouvrement spectral avec le signal de l'Aza-Bodipy. Les pK_A du Bodipy et des NP de Bodipy seront déterminés. La stabilité dans le temps des NP de PLA-Bodipy sera également étudiée dans des tampons acides.

Enfin, la synthèse de l'Aza-Bodipy sera présentée ainsi que son greffage en surface de NP de polylactide-b-polyéthylène glycol par cycloaddition (chimie click).

4.2 LES AZA-BODIPY SENSIBLES AU PH

Les chromophores de la famille des azaboradiaindacènes (Aza-Bodipy) ont une structure très proche de celle des Bodipy. La différence notable avec les Bodipy vient du remplacement d'un atome de carbone en position méso dans le cœur dipyrrométhène par un atome d'azote (figure 4.1). Tout comme les Bodipy, les Aza-Bodipy sont réputés pour leur facilité à être synthétisés, pour la facilité de moduler leur structure par ajout de substituants, pour leur grande photostabilité et pour leurs absorption et émission dans le proche infra-rouge. L'atome d'azote, à la position méso, permet grâce à un effet électroattracteur de décaler le maximum d'absorption et d'émission dans la région du proche infra-rouge : $\lambda_{\max, \text{abs}} > 650 \text{ nm}$ (Shi *et al.* 2020). Les Aza-Bodipy sont généralement un peu moins émissifs que les Bodipy, avec des rendements quantiques de l'ordre de 0,3 - 0,4 (Pliquet et al. 2019; Shi et al. 2020).

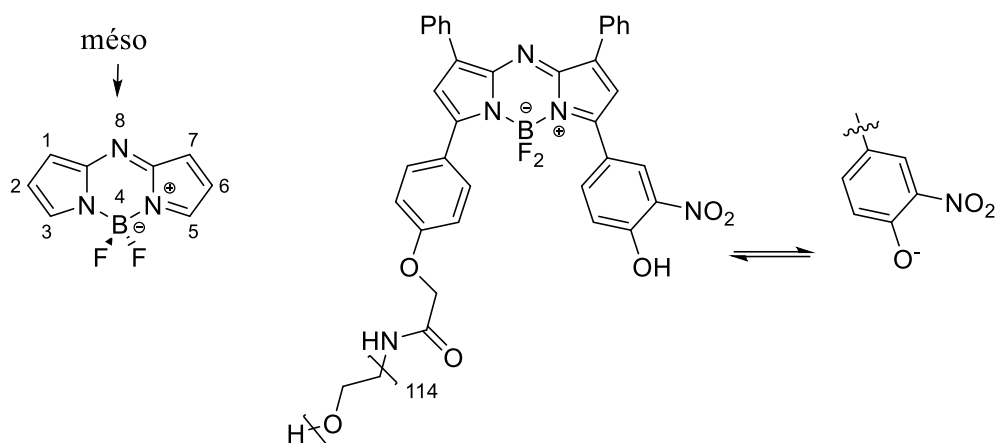


Figure 4.1 : (Gauche) Structure d'un Aza-Bodipy. (Droite) Structure de l'Aza-Bodipy sensible au pH synthétisé par O'Shea et son équipe (Grossi et al. 2016).

En 2016, l'équipe du professeur O'Shea a démontré que la fluorescence d'un composé de la famille des Aza-Bodipy pouvait être modulée grâce à l'introduction d'un groupement phénolate en position 5 (figure 4.1 droite) (Grossi et al. 2016). Sous forme phénolate, l'Aza-Bodipy possède un transfert de charge intramoléculaire important. Comme vu dans le chapitre introductif (paragraphe 1.3.4.3), les transferts de charge intramoléculaires sont néfastes pour la fluorescence et provoquent donc son extinction. La protonation de la fonction phénolate permet de récupérer la fluorescence de l'Aza-Bodipy en supprimant le transfert de charge intramoléculaire. Leur objectif était alors de créer une sonde sensible au pH pour suivre la cinétique d'internalisation *in vivo* de l'Aza-Bodipy dans les cellules. Dans le corps, les biomolécules sont internalisées dans les cellules par endocytose ou phagocytose (Hillaireau et Couvreur 2009). Au cours de l'endocytose, le pH va diminuer de 7,2 dans le milieu extracellulaire, à 5,5 dans les endosomes puis 4,5, dans les lysosomes (Casey, Grinstein, et Orłowski 2010). Afin d'adapter la modulation de la fluorescence (allumée/éteinte) au suivi de l'internalisation dans les cellules, l'équipe de O'Shea a proposé d'introduire un groupement nitro électroattracteur en position ortho du phénol. La base conjuguée du phénol est alors stabilisée par effets inductif et mésomère attracteurs provoquant ainsi la diminution du pK_A pour atteindre la valeur de 4. L'équipe d'O'Shea a alors démontré une augmentation de la fluorescence d'un facteur 21 entre le pH du milieu extracellulaire et le pH des lysosomes. L'Aza-Bodipy sous forme phénol possède un maximum d'absorption à 685 nm ($CHCl_3$), un coefficient d'absorption molaire de $97\ 000\ L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ ($CHCl_3$), un maximum d'émission à 707 nm ($CHCl_3$) et un rendement quantique de fluorescence de 0,18 ($CHCl_3$).

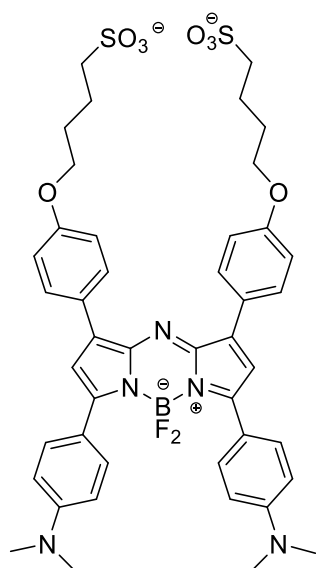


Figure 4.2 : Structure de l'Aza-Bodipy possédant deux groupements électro-donneurs de type p-diméthylamino en position 3 et 5 développé par l'équipe de professeur O'Shea (Daly et al. 2017).

Par ailleurs, les Aza-Bodipy sont généralement émissifs dans la région comprise entre 675 nm et 730 nm (Wu et al. 2016; Ge et O'Shea 2016; Pliquett et al. 2019). Dans l'objectif d'employer l'Aza-Bodipy pour faire de l'imagerie *in vivo*, la fenêtre d'émission autour de 780-820 nm est préférable. Cette fenêtre permet de sonder plus en profondeur les tissus et correspond aux domaines d'excitations utilisés sur les appareils d'imagerie clinique (calibrés pour l'ICG) (Rurack et Spieles 2011). À cette fin, l'équipe du professeur O'Shea a proposé d'introduire des groupements électro-donneurs de type N,N-diméthylaniline aux positions 3 et 5 de l'Aza-Bodipy (Daly et al. 2017, 2) (figure 4.2). L'Aza-Bodipy obtenu possède une absorption à 786 nm (DMSO), une émission à 826 nm (DMSO) et un rendement quantique de fluorescence de 0,03 (tampon pH = 7 en présence de 1% de Kolliphor EL (Kolliphor EL cf 1.4.2.2 les micelles)). Le pK_A des fonctions diméthylaniline est estimé proche de 1,3 ce qui est très éloigné des valeurs de pH des milieux biologiques. *In vivo*, le Bodipy ne sera donc pas protoné, ce qui permet d'éviter le décalage de son maximum d'émission et d'absorption en dehors de la fenêtre du proche infrarouge.

Dans notre cas, pour pouvoir être sensible aux variations de pH l'Aza-Bodipy doit être greffé en surface des NP afin que les fonctions basiques soient facilement accessibles aux protons en solution. Le greffage de manière covalente en surface de nanoparticules de type polylactide-b-polyéthylène glycol a été décrit par l'équipe de Couvreur en 2014 (Mackiewicz et al. 2014). Un copolymère dibloc de PLA-PEG-N₃ a été obtenu par polymérisation par ouverture de cycle du PEG-N₃ sur un DL-lactide. La formulation en nanoparticule de ce polymère permet d'obtenir des fonctions azotures

en surface des NP. Le greffage covalent d'un fluorophore en surface des NP est alors possible par réaction de chimie click, cycloaddition 1,3-dipolaire, entre la fonction azoture et une fonction alcyne présente sur le fluorophore. La réaction de chimie click et le greffage du fluorophore peuvent se faire soit avant la formulation en nanoparticule, directement sur le polymère, soit après formulation, directement sur les nanoparticules. Les deux stratégies de synthèses sont notamment évoquées par Klymchenko et son équipe dans leur article de 2021 (Melnychuk et al. 2021).

Dans ce chapitre 4, nous souhaitons donc combiner les trois innovations présentées dans les articles précédemment cités :

- 1) Un Aza-Bodipy possédant en **positions 3 et 5 des fonctions diméthylaniline** (figure 4.3 en vert). L'objectif est de décaler l'absorption et l'émission dans des gammes où l'on pourra spectralement différencier le Bodipy **[3]** et l'Aza-Bodipy. Pour l'AZA Bodipy, les maxima d'absorption et d'émission sont attendus vers respectivement 786 nm et 826 nm. Pour le Bodipy **[3]** le maximum d'absorption est situé vers 757 nm et l'émission vers 820 nm.
- 2) Un Aza-Bodipy possédant **une fonction phénol en position 7** (figure 4.3 en rouge) et en position ortho du phénol un groupement électroattracteur nitro. Le pK_A attendu pour le couple phénol/phénolate sera proche de 4 et conviendra donc pour une fluorescence modulable entre le milieu extracellulaire et les lysosomes. La modulation de la fluorescence des Aza-Bodipy avec le pH pourra également conduire à une modulation du signal photoacoustique (introduction paragraphe 1.3.3). Une imagerie multi-ondes photoacoustique et fluorescence des Aza-Bodipy sera alors envisageable.
- 3) La troisième innovation consiste à insérer **une fonction alcyne** (figure 4.3 en bleu) sur l'Aza-Bodipy. Cette fonction sera attachée par O-alkylation de la fonction phénol en position 1 de l'Aza-Bodipy, sur un halogénure propargylique. La présence de PEG-azoture en surface de NP pourra alors permettre de greffer de manière covalente l'Aza-Bodipy en surface des NP par une réaction de chimie click : cycloaddition 1,3-dipolaire catalysée par le cuivre.

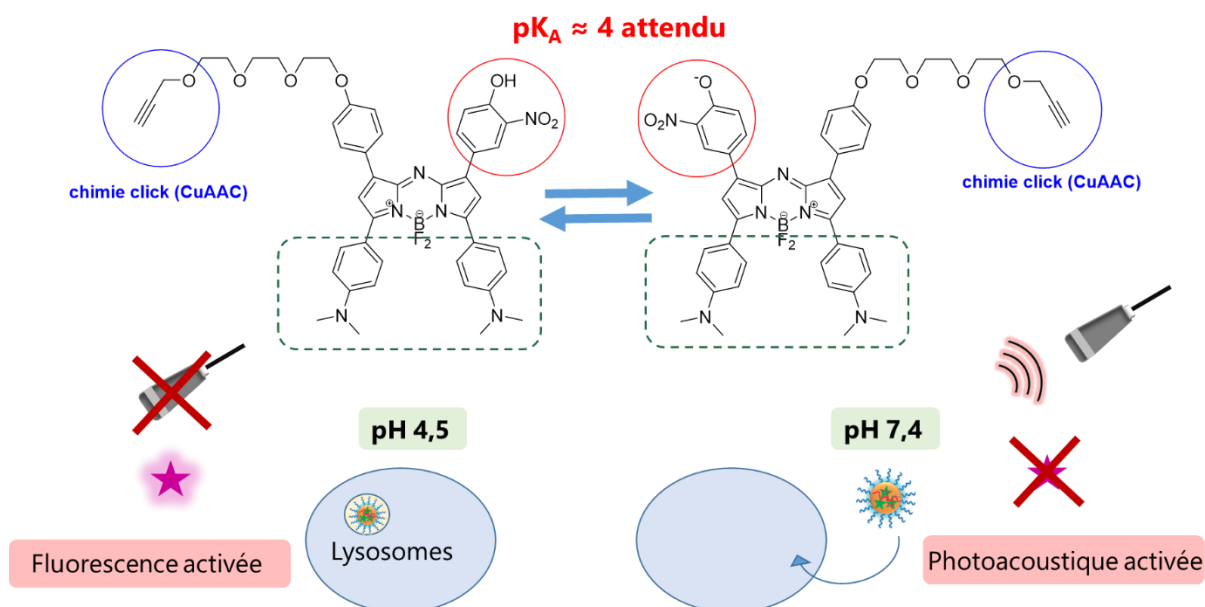


Figure 4.3 : Représentation schématique de la stratégie adoptée pour obtenir des NP sensibles au pH. En vert l'ajout des fonctions diméthylaniline. En rouge la fonction phénol sensible au pH. En bleu l'ajout d'un alcyne attaché au phénol en position 1 de l'Aza-Bodipy. CuAAC : « Copper Azide-Alkyne Huisgen Cycloaddition » en anglais, cycloaddition de Huisgen Azoture-alcyne catalysée par le cuivre.

4.3 SENSIBILITE AU PH DES NP DE PLA-BODIPY

L'objectif de cette partie est de vérifier que les NP de Bodipy **[3]** dans les chapitres 2 et 3 ne sont pas sensibles au pH dans les domaines d'acidité étudiés pour l'Aza-Bodipy. Nous souhaitons conserver ainsi : les très bonnes propriétés spectrales du Bodipy **[3]** pour la photoacoustique et éviter tout recouvrement spectral avec le signal de l'Aza-Bodipy. Dans un premier temps, nous étudierons les changements spectraux du Bodipy **[3]** en milieu acide (4.3.1.1), et nous déterminerons les valeurs des pK_A du Bodipy **[3]** (4.3.1.2). Dans un second temps, la stabilité des NP de PLA-Bodipy **[3]** dans les milieux acides sera étudiée, et nous déterminerons les pK_A des NP de Bodipy **[3]** (4.3.2). Enfin, grâce à un dosage par étalonnage, et une mesure du signal de fluorescence en milieu très acide (pH = 0,07), nous estimerons la quantité de Bodipy **[3]** en surface des NP (4.3.3).

4.3.1 Sensibilité au pH du Bodipy

4.3.1.1 Expériences préliminaires

Des expériences préliminaires dans du dichlorométhane (DCM) ont été réalisées afin d'avoir un premier aperçu de l'effet d'un milieu acide sur les propriétés spectrales du Bodipy **[3]**. Des solutions à $1,3 \times 10^{-6}$ mol.L⁻¹ de Bodipy **[3]** ont été introduites dans

des cuvettes en quartz (figure 4.4). Dans l'une, nous avons ajouté 100 μL supplémentaires d'acide TriFluoroAcétique (TFA) (cuvette de droite figure 4.4). En milieu acide, on observe un changement de couleur de la solution passant du violet à verdâtre. Le Bodipy **[3]** semble posséder des propriétés spectrales qui varient avec le pH.



Figure 4.4 : Photographie de cuvettes en quartz contenant le Bodipy **[3]** dans du DCM à $C = 1,3 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$. (Gauche) pas d'ajout d'acide. (Droite) Ajout de 100 μL d'acide trifluoroacétique.

Nous avons ensuite observé les spectres d'absorption (figure 4.5) de trois solutions de Bodipy dans du DCM ($1,3 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$) dans différentes conditions acides. Une solution sans ajout d'acide (en noir), une solution avec un ajout de 100 μL d'acide acétique à 99% (en vert), une solution avec ajout de 100 μL de TFA (en jaune). Puis, cette dernière solution sera observée à nouveau trente minutes plus tard (rouge). Les propriétés spectrales sont résumées tableau 4.1. Après l'ajout de 100 μL d'acide acétique, on observe un léger décalage hypsochrome de la bande. Le maximum de la bande passe de 751 nm à 743 nm. On peut également remarquer une forte augmentation de l'absorbance au niveau de l'épaule à 670 nm. Pour la solution contenant 100 μL de TFA (jaune), on observe un fort décalage hypsochrome du maximum d'absorption pour atteindre 658 nm. La bande principale est alors plus étroite passant de 1760 cm^{-1} (97 nm) dans du DCM seul à 1000 cm^{-1} (43 nm) avec ajout de TFA. L'affinement de la bande avec la protonation des fonction diméthylaniline est reporté dans la littérature pour des di-styryl Bodipy (Alexandra Sutter, Elhabiri, et Ulrich 2018; Galangau et al. 2010). Toujours sur le même spectre (en jaune), une deuxième bande est également notable aux alentours de 555 nm dont l'absorbance est plus faible. Enfin, après trente minutes de repos, le spectre d'absorption de la même solution contenant le TFA est à nouveau tracé (en rouge). On observe la disparition complète de la bande d'absorption à 658 nm au profit de la bande à 555 nm. Pour les spectres d'absorption contenant du TFA (courbes jaune et rouge) une petite bande d'absorption est également décelable dans le proche IR, vers 850 nm.

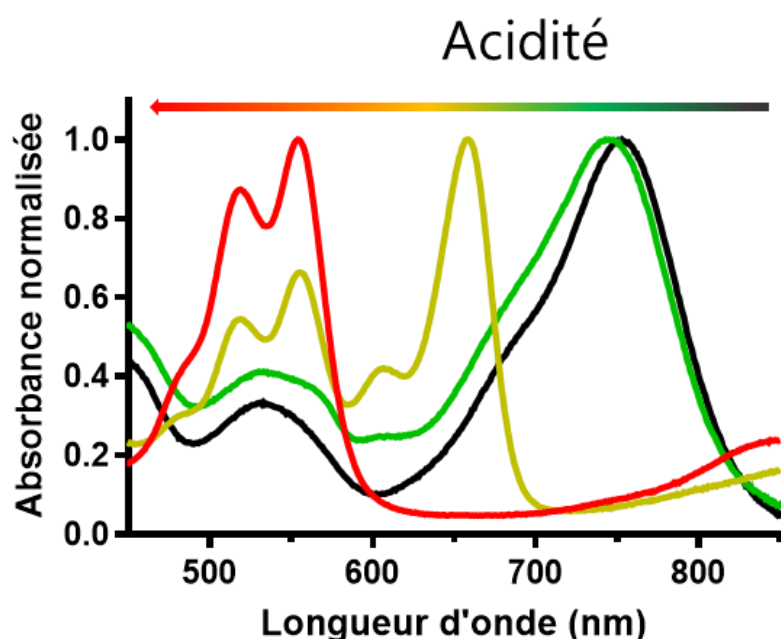


Figure 4.5 : Spectres d'absorption normalisés du Bodipy **[3]** dans du DCM, $C = 1,3 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$, avec ou sans ajout de $100 \mu\text{L}$ d'acide organique. (Noir) pas d'acide. (Vert) ajout d'acide acétique à 99%. (Jaune) ajout d'acide trifluoroacétique. (Rouge) même solution que pour le spectre jaune trente minutes plus tard.

$\lambda_{\text{abs,max}}$ (nm)	LMH (cm^{-1})	LMH (nm)	Espèce
751	$1760 \pm 15 \text{ cm}^{-1}$	97 ± 1	A
658	$1000 \pm 15 \text{ cm}^{-1}$	43 ± 1	AH^+
555	$2750 \pm 15 \text{ cm}^{-1}$	78 ± 1	AH_2^{2+}

Tableau 4.1 : Caractéristiques spectrales des bandes d'absorption du Bodipy **[3]** observées dans différentes conditions acides. LHM : Largeur à mi-hauteur de la bande.

Trois bandes d'absorption sont alors notables pour le Bodipy **[3]** (tableau 4.1) : une première bande large à 751 nm, la seule présente en l'absence d'acide, une deuxième bande étroite vers 658 nm majoritaire en milieu acide, une troisième bande plus large vers 555 nm qui devient majoritaire en milieu acide aux temps plus longs. Pour cette troisième bande, on suppose qu'il faut plus de temps aux réactions acido-basiques pour atteindre l'équilibre. Ces trois bandes peuvent correspondre à trois espèces acido-basiques différentes du Bodipy que l'on dénommera par la suite : A, AH^+ et AH_2^{2+} . Il semble que les espèces les plus acides soient celles possédant les spectres les plus décalés vers le bleu. Les caractéristiques spectrales de ces bandes d'absorption sont résumées dans le tableau 4.1. Dans la littérature, trois bandes d'absorption pour un Bodipy possédant deux fonctions N,N-diméthylaniline ont également été mises en évidence, les espèces les plus acides étant celles associées aux bandes les plus décalées vers le bleu (Alexandra Sutter, Elhabiri, et Ulrich 2018; Deniz et al. 2008).

La faible bande vers 850 nm peut correspondre à du Bodipy résiduel sous forme basique. Si en milieu non-acide cette bande d'absorption semble se situer vers 751 nm, il semble qu'avec ajout de TFA elle soit décalée vers le rouge (vers 850 nm). L'ajout de 100 μL de TFA peut modifier les propriétés du solvant (polarité et proticité), le décalage de la bande peut alors venir du caractère solvatochrome du Bodipy **[3]** (mis en évidence au chapitre 3). Une autre explication serait que cette bande d'absorption vers 850 nm corresponde à des agrégats des espèces acides du Bodipy, qui sont probablement moins solubles dans les solvants organiques, à cause de la présence de charge positive (AH^+ et AH_2^{2+}). Comme nous l'avons vu dans l'introduction, la formation d'agrégats J peut décaler le spectre d'absorption vers le rouge (théorie de l'exciton, introduction 1.4.2.2).

Les spectres d'émission des trois solutions précédentes ont ensuite été étudiés (figure 4.6 : gauche avec normalisation, droite sans normalisation). Dans du DCM seul, on retrouve le spectre d'émission du Bodipy **[3]** (noir) (comme aux chapitres 2 et 3) : un maximum d'émission vers 818 nm et une largeur à mi-hauteur de 923 cm^{-1} (61 nm). L'ajout de 100 μL d'acide acétique (courbe verte) ne change pas la position de la bande d'émission, mais un signal de fluorescence plus important est détecté entre 700 et 750 nm.

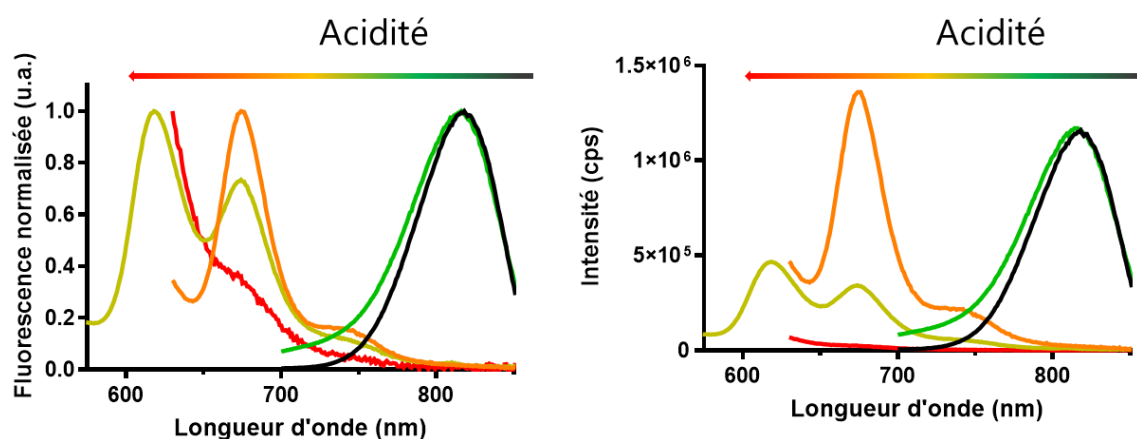


Figure 4.6 : (Gauche) spectres d'émission normalisés du Bodipy **[3]** dans du DCM, $C = 1,3 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$, avec ou sans ajout de 100 μL d'acide organique. (Noir) pas d'acide, excitation à 540 nm, largeur fente 9,5 nm. (Vert) ajout d'acide acétique à 99% excitation à 540 nm, largeur fente 9,5 nm. (Jaune) ajout d'acide trifluoroacétique excitation à 540 nm, largeur fente 6 nm. (Orange) ajout d'acide trifluoroacétique, excitation à 610 nm, largeur fente 3,5 nm. (Rouge) même spectre et même solution que pour le spectre orange observation trente minutes plus tard. (Droite) Les mêmes spectres d'émission sans normalisation.

Pour la solution avec ajout de 100 μL de TFA et observation immédiate, deux spectres d'émission ont été tracés : 1) un spectre avec une excitation à 610 nm (courbe

orange) et 2) un spectre avec excitation à 540 nm (courbe jaune). Sur la courbe orange, on observe la disparition de la bande d'émission à 818 nm au profit d'une nouvelle bande à 674 nm, plus étroite, de largeur à mi-hauteur 811 cm^{-1} (38 nm). Cependant, la totalité du spectre d'émission n'est pas visible et le deuxième spectre d'émission permet d'avoir accès à une plus grande gamme spectrale (courbe jaune). Sur la courbe jaune, on observe toujours la présence de la bande à 674 nm, mais une nouvelle bande d'émission est également visible à 618 nm, plus large, de largeur à mi-hauteur 1231 cm^{-1} (48 nm). Dans la solution contenant 100 μL de TFA et observation immédiate, deux bandes d'émission sont donc détectables à 674 nm et à 618 nm. Trois bandes d'émission sont donc notables pour le Bodipy **[3]**, avec un maximum à 818 nm, 674 nm et 618 nm (tableau 4.2). Comme pour l'absorption, on suppose que ces trois bandes peuvent correspondre à trois espèces acido-basiques différentes du Bodipy **[3]** : A, AH^+ et AH_2^{2+} . Il semble, comme pour l'absorption, que les espèces les plus acides soient associées aux spectres les plus décalés vers le bleu. Dans la littérature, les spectres d'émission les plus décalés vers le bleu sont également associés aux espèces les plus acides du Bodipy avec deux fonctions N,N-diméthylaniline (Alexandra Sutter, Elhabiri, et Ulrich 2018; Deniz et al. 2008).

La bande d'émission à 674 nm possède un signal de fluorescence plus faible lorsqu'on excite à 540 nm ($3,4 \times 10^5$ cps, jaune) plutôt qu'à 610 nm ($1,4 \times 10^6$ cps, orange) (figure 4.6 droite). On suppose que cette bande (674 nm) correspond à une seule et même espèce (AH^+) et que la concentration de cette espèce n'a pas évolué entre les deux spectres d'émission. De plus la largeur de fente du spectrofluorimètre est plus faible pour la courbe orange (3,5 nm) que pour la courbe jaune (9,5 nm), pourtant le signal de fluorescence à 674 nm est plus important pour la courbe orange. On peut donc supposer qu'à 610 nm (courbe orange) on excite plus l'espèce AH^+ qu'à 540 nm. C'est donc que l'espèce AH^+ absorbe plus à 610 nm qu'à 540 nm. A 610 nm, on excite dans la bande d'absorption dont le maximum est à 658 nm (associé à AH^+ , tableau 4.1 et figure 4.5). On peut donc en déduire que la bande d'absorption à 658 nm et la bande d'émission à 674 nm correspondent bien à la même espèce : AH^+ .

Finalement, le spectre d'émission de la solution contenant 100 μL de TFA est observé après trente minutes de repos (courbe en rouge). Ce spectre est à comparer avec la courbe orange : même longueur d'onde d'excitation (610 nm), même largeur de fente (3,5 nm), observation 30 minutes plus tard. On observe entre la courbe orange et la courbe rouge une diminution de la bande à 674 nm au profit de la bande à 618 nm. De plus, le signal de fluorescence chute drastiquement entre la courbe orange et la courbe rouge (figure 4.6 droite) attestant que la nouvelle espèce formée absorbe beaucoup moins à 610 nm ou est beaucoup moins fluorescente. Un temps plus long semble favorable pour former l'espèce AH_2^{2+} et le signal de fluorescence chute drastiquement car l'espèce AH_2^{2+} est très peu excitée à 610 nm (figure 4.5, tableau 4.1).

$\lambda_{em,max}$ (nm)	LMH (cm^{-1})	LMH (nm)	Espèce
818	$923 \pm 15 \text{ cm}^{-1}$	61 ± 1	A
674	$811 \pm 15 \text{ cm}^{-1}$	38 ± 1	AH ⁺
618	$1231 \pm 15 \text{ cm}^{-1}$	48 ± 1	AH ₂ ²⁺

Tableau 4.2 : Caractéristiques spectrales des bandes d'émission du Bodipy **[3]** dans du DCM observées dans différentes conditions acides. LHM : Largeur à mi-hauteur de la bande.

L'observation de la structure du Bodipy **[3]** (figure 4.7) nous renseigne sur les fonctions susceptibles d'être protonées. L'étude des spectres d'absorption et d'émission laisse entrevoir la présence de deux formes acides du Bodipy, que l'on a appelées AH⁺ et AH₂²⁺. De plus, la protonation semble provoquer un décalage hypsochrome des spectres d'absorption et d'émission. Ce décalage vers le bleu avec l'acidité peut être provoqué par une conjugaison moins grande ou bien une moins grande planéité ou un transfert de charge moins important pour les formes acides du Bodipy **[3]** (Valeur et Berberan-Santos 2013; Delaire et al. 2017). Sur le Bodipy **[3]**, deux fonctions N,N-diméthylaniline sont susceptibles d'être protonées en milieu acide (figure 4.7). Deux espèces acides peuvent alors être obtenues : l'espèce mono-protonée AH⁺ et l'espèce di-protonée AH₂²⁺. La protonation de chaque diméthylaniline du Bodipy provoque une diminution du transfert de charge intramoléculaire et du caractère D- π -A du Bodipy (cf introduction 1.3.2.2). L'écart en énergie entre les orbitales HO-BV est alors plus grand et les maxima d'absorption et d'émission sont décalés vers le bleu. Les bandes les plus décalées vers le bleu correspondent donc au diacide AH₂²⁺ et les bandes les plus décalées vers le rouge sont associées à la base A (tableau 4.1 et 4.2).

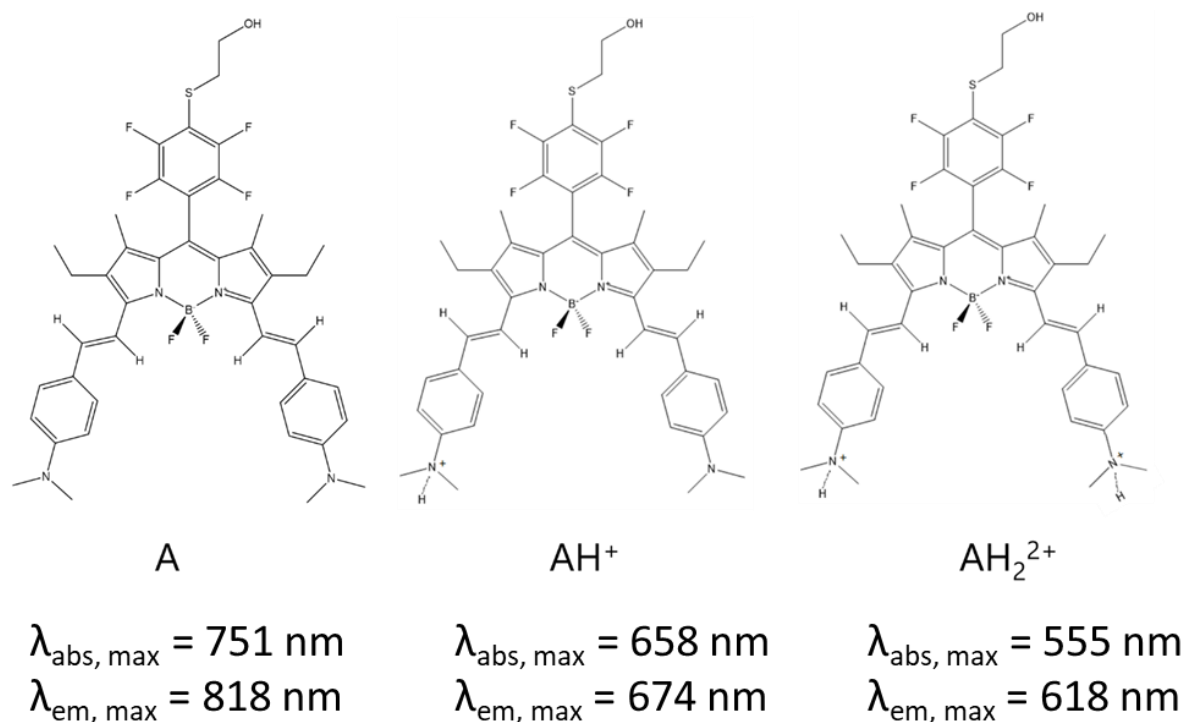


Figure 4.7 : structures des espèces acido-basiques du Bodipy **[3]** et position des bandes d'absorption et d'émission dans du DCM.

Les résultats obtenus sont proches de ceux mis en évidence sur un Bodipy de structure similaire par Galangau et son équipe en 2010 (Galangau et al. 2010) (figure 4.8). Cependant seule la forme mono-protonée du bi-styryl Bodipy a été mise en évidence : $\lambda_{\text{abs, max}} = 658 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{em, max}} = 671 \text{ nm}$. L'équipe de Galangau a déterminé un rendement quantique de fluorescence de 0,34 pour la forme mono-protonée AH⁺ et un rendement quantique de fluorescence trop faible pour être déterminé pour la forme A. La fluorescence semble donc améliorée après protonation d'au moins une fonction N,N-diméthylaniline. Ce phénomène peut être relié à la diminution de la force du transfert de charge avec la protonation. Les transferts de charge intramoléculaires étant néfastes pour la fluorescence (Valeur et Berberan-Santos 2013; Delaire et al. 2017) (paragraphe 1.3.4.3 dans l'introduction). La forme AH₂²⁺ du Bodipy **[3]** serait alors susceptible d'être la plus fluorescente des trois espèces acido-basiques. L'équipe de Sutter a également mis en évidence la présence de trois formes acido-basiques d'un bi-styryl Bodipy possédant deux fonctions N,N-diméthylaniline. Ils ont démontré que le décalage vers le bleu des spectres d'absorption et d'émission du Bodipy avec la protonation des fonctions N,N-diméthylaniline et une fluorescence plus grande pour les formes les plus protonées (Alexandra Sutter, Elhabiri, et Ulrich 2018; Deniz et al. 2008; Galangau et al. 2010).

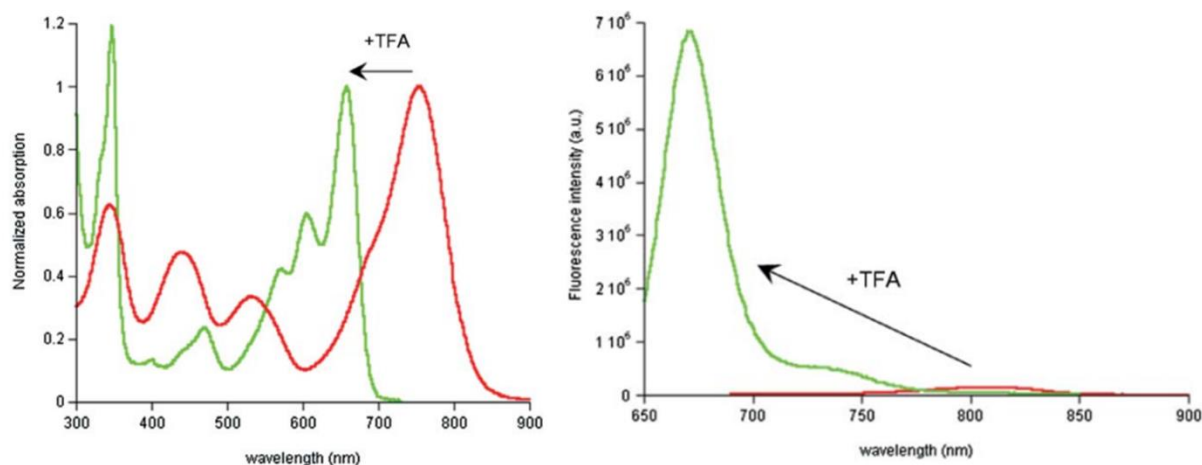


Figure 4.8 : (Gauche) spectres d'absorption du bi-styryl Bodipy de l'équipe de Galangau avec ajout de 2 équivalents de TFA dans du DCM (vert) et sans ajout (rouge). (Droite) spectres d'émission du bi-styryl Bodipy avec ajout de 2 équivalents de TFA (vert) et sans ajout (rouge), excitation at 650 nm. Graphiques tirés de (Galangau et al. 2010)

Conclusion

Ces expériences mériteraient d'être perfectionnées en conservant les mêmes gammes spectrales, mêmes longueurs d'onde d'excitation, et même largeur de fentes pour tous les spectres d'émission. La lecture et l'analyse des courbes serait alors plus aisée. Les conditions optimales seraient : une excitation à 540 nm, largeur de fente 3 ou 4 nm et une émission observée de 570 à 850 nm pour toutes les solutions. L'étude des spectres d'excitation (émission à 818 nm, 674 nm et 618 nm) permettrait d'associer à chaque espèce les bandes d'émission et d'absorption qui lui sont associées. Pour chacune des 3 espèces, un calcul de rendement quantique de fluorescence serait également envisageable. Une excitation sélective de chaque espèce est possible grâce aux maxima d'absorption suffisamment disjoints : excitation à 700 nm pour A, à 610 nm pour AH^+ et 555 nm pour AH_2^{2+} . Par manque de temps nous n'avons pas pu mener cette étude et nous nous sommes concentrés sur l'étude des NP.

Cependant, nous avons mis en évidence une sensibilité aux conditions acides du Bodipy **[3]** dans le DCM. Les propriétés spectrales du Bodipy sont modifiées en milieu acide avec un décalage vers le bleu en absorption et en émission et une fluorescence plus grande. Dès lors, le Bodipy n'absorbe plus dans la région du proche infra-rouge et l'augmentation de son signal de fluorescence est susceptible de diminuer son efficacité photoacoustique. Dans le cadre de NP doublement marquées par un Bodipy et un Aza-Bodipy, il est alors important de vérifier que les propriétés du Bodipy ne seront pas modifiées dans les domaines pH étudiés pour les Aza-Bodipy : $4 < \text{pH} < 7$. Il est alors nécessaire d'estimer les valeurs des pK_A du Bodipy **[3]** pour s'assurer de la

stabilité de sa forme basique A aux pH étudiés. L'objectif est donc de vérifier que la forme A du Bodipy est très majoritaire ($4 \gg pK_{A2}$) pour $4 < \text{pH} < 7$.

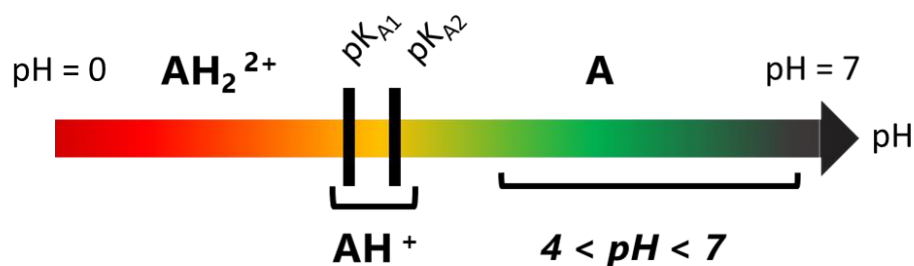


Figure 4.9 : Diagramme de prédominance des espèces acido-basiques du Bodipy [3].

4.3.1.2 Estimation des pK_A du Bodipy [3]

Le Bodipy [3] étant sensible au pH, nous souhaitons déterminer les pK_A associés afin de déterminer les domaines de pH dans lequel la forme basique A du Bodipy, actif en photoacoustique, est majoritaire.

En chimie organique, l'équilibre acido-basique entre une amine et un ammonium $R_1R_2R_3N / R_1R_2R_3NH^+$ est caractérisé par son pK_A : $pK_A = 10-11$ à 25°C (Rabasso 2020). Cependant, dans le cas d'une amine conjuguée à un système π , la présence d'une des nombreuses formes mésomères va permettre de délocaliser le doublet non-liant de l'azote et donc de stabiliser la base associée. La base est alors moins réactive et son pK_A diminue (Clayden, Greeves, et Warren 2012). Ainsi dans le cas d'une fonction N,N-diméthylaminostyryl, comme celles du Bodipy [3], on peut s'attendre à des pK_A beaucoup plus faibles. Dans la littérature, la N,N-diméthylaniline possède un pK_A de 5,07 à 25°C dans l'eau (Haynes 2016). Pour des Bodipy possédant un seul groupement N,N-diméthylaminostyryl le pK_A est estimé à 2,3 dans l'acétonitrile, démontrant une stabilité accrue de la base comparée à la N,N-diméthylaniline, grâce aux formes mésomères plus nombreuses (Baruah et al. 2006). Sur des Bodipy solubles dans l'eau possédant deux fonctions N,N-diméthylaminostyryl (figure 4.10), les pK_A ont été estimés à 3,12 et 2,7 dans l'eau à 25°C (Alexandra Sutter, Elhabiri, et Ulrich 2018).

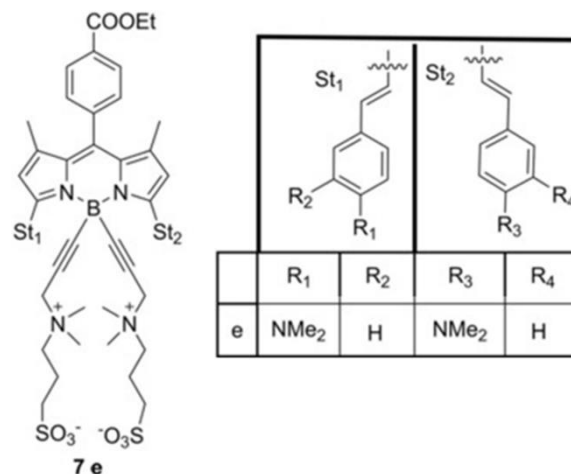
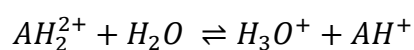


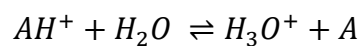
Figure 4.10 : Structure du Bodipy 7e possédant deux fonctions N,N-diméthylamino-styryl. Image tirée de (Alexandra Sutter, Elhabiri, et Ulrich 2018).

Pour le Bodipy **[3]** les deux équilibres acido-basiques suivants sont étudiés :



De constante d'équilibre* :

$$K_1 = \frac{[H_3O^+]_{\acute{e}q} [AH^+]_{\acute{e}q}}{[AH_2^{2+}]_{\acute{e}q}}$$



De constante d'équilibre :

$$K_2 = \frac{[H_3O^+]_{\acute{e}q} [A]_{\acute{e}q}}{[AH^+]_{\acute{e}q}}$$

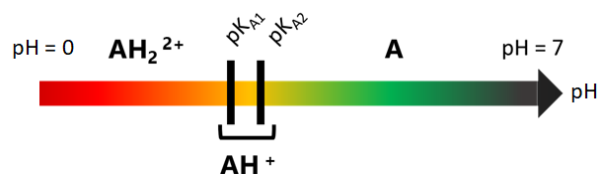


Figure 4.11 : Diagramme de prédominance du Bodipy **[3]**.

*Activité et constantes d'équilibres

La constante d'équilibre est définie à partir des activités, a_i , des solutés. En solution diluée, l'activité des solutés est définie par la relation suivante :

$$a_i = \frac{c_i}{c^\circ}$$

Avec c_i la concentration en soluté (mol.L^{-1}) et $c^\circ = 1 \text{ mol.L}^{-1}$.

$$K_1 = \frac{a(\text{H}_3\text{O}^+)_{\text{éq}} a(\text{AH}^+)_{\text{éq}}}{a(\text{AH}_2^{2+})_{\text{éq}}} = \frac{[\text{H}_3\text{O}^+]_{\text{éq}} [\text{AH}^+]_{\text{éq}}}{[\text{AH}_2^{2+}]_{\text{éq}} C^\circ}$$

Dans les constantes d'équilibres, on omet souvent les grandeurs c° .

Pour étudier le pK_A du Bodipy **[3]**, ce dernier est dissout dans un mélange 95/5 (volumique) tampon de McIlvaine (McIlvaine 1921) (tampon citrate, phosphate) / DMSO avec un pH variant de 0,08 à 7,9 et une concentration de $1,69 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$. Aux $\text{pH} > 2,0$ le Bodipy **[3]** précipite (plus de détail en annexe 1). Dans le cadre de cette étude, nous allons donc nous restreindre aux solutions sans précipité à des pH inférieurs ou égaux à 2,0. La photographie des solutions obtenues est visible figure 4.12. Sur l'image, un changement de couleur des solutions est visible avec un passage du violet au vert. À l'œil, la zone de virage semble se situer aux alentours de $\text{pH} = 1,0$. À ces pH, une forme acide, d'une couleur violette, et sa base conjuguée, d'une teinte verte, doivent être proches en concentrations. D'après la formule de Henderson-Hasselbalch : $\text{pH} = \text{p}K_A + \log\left(\frac{[\text{Base}]}{[\text{Acide}]}\right)$ (Po et Senozan 2001), pour des concentrations proches d'acide et de base conjuguée, le pH de la solution égal au pK_A du couple. Un des pK_A ou bien les deux pK_A du Bodipy **[3]** sont donc susceptibles d'être proche(s) de 1.

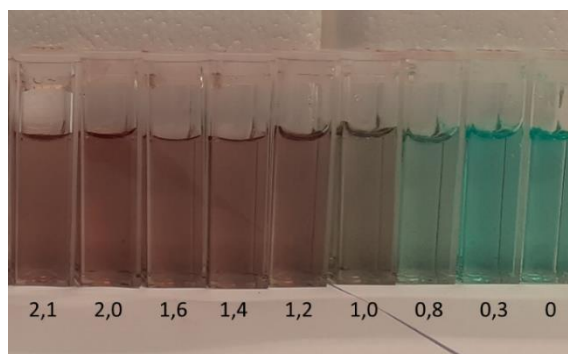


Figure 4.12 : Photographie des solutions de Bodipy **[3]** à $C = 1,69 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ dans un mélange 5%/95% volumique de DMSO/tampon aqueux de type McIlvaine. Solutions dont les pH sont compris entre $0 < \text{pH} < 2,1$. Les valeurs de pH associé aux cuvettes sont indiquées en noir.

Absorption

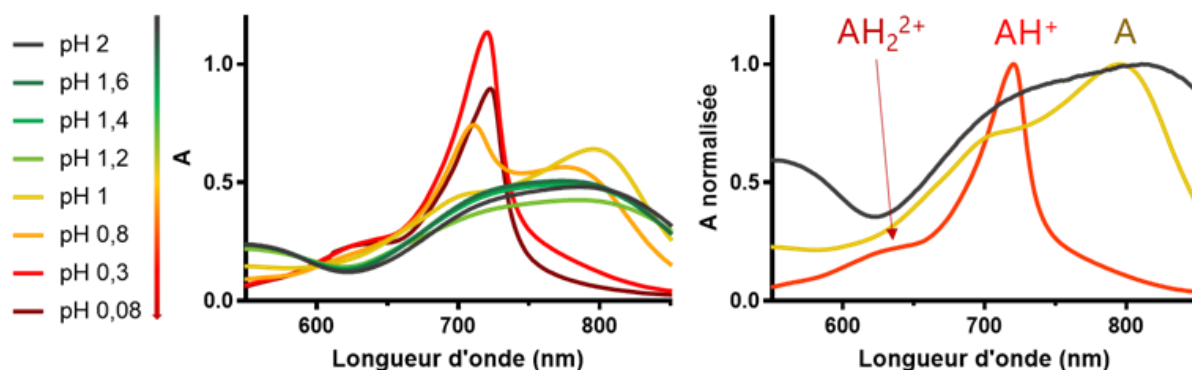


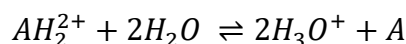
Figure 4.13 : (Gauche) Spectres d'absorption des solutions de Bodipy **[3]** dans un mélange 5%/95% volumique de DMSO/tampon aqueux de type McIlvaine. $C = 1,69 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$. (Droite) Spectres d'absorption normalisés des solutions de pH = 2,6 (noir) ; pH = 1 (jaune) et pH = 0,3 (rouge).

Les spectres d'absorption des solutions de Bodipy **[3]** sont obtenus figure 4.13. On observe la présence d'un point isobestique à 600 nm. Un point isobestique correspond à « une longueur d'onde pour laquelle l'absorbance totale de l'échantillon ne varie pas au cours d'une réaction chimique ou d'un changement physique de l'échantillon ». La présence d'un point isobestique atteste que la stœchiométrie de la réaction (ou des réactions) ne change au cours de l'étude (Nic 2006). Pour les spectres obtenus, deux bandes d'absorption sont remarquables : une bande avec un maximum vers 795 nm et une autre bande vers 721 nm. Ces deux bandes rappellent les bandes à 751 nm et 658 nm, obtenues dans du DCM, et que l'on avait attribuées respectivement à A et AH^+ (tableau 4.1). Comme pour les spectres obtenus dans le DCM, la position de la bande associée à l'espèce AH^+ est située au niveau de l'épaule vibronique de la bande associée à A (figure 4.5 et figure 4.13). La bande d'absorption associée à l'espèce AH_2^{2+} est difficilement décelable. Elle doit être décalée vers le bleu par rapport aux deux autres bandes et son signal doit être maximal aux pH les plus faibles (pH = 0,08). Vers 630 nm, on observe la présence d'un léger épaulement pour les solutions aux pH les plus bas. Cet épaulement est maximal pour un pH de 0,08. On suppose donc que cette bande d'absorption est associée à l'espèce AH_2^{2+} . Les attributions des bandes d'absorption sont délicates, probablement à cause de la présence de nano-agrégats de Bodipy, une étude plus détaillée est présentée en annexe 2. Les attributions des bandes sont résumées figure 4.13 droite.

La présence de deux équilibres acido-basiques, de constantes d'équilibre potentiellement très proches : $\Delta\text{pK}_A < 4$, rend difficile l'étude des deux acidités successives du Bodipy **[3]** ((PIARD et al. 2019; A Sutter, Elhabiri, et Ulrich 2018). De plus,

le fort recouvrement spectral entre les espèces A, AH⁺ et AH₂²⁺ en absorption (figure 4.13 droite) et le potentiel très faible domaine de pH où l'espèce AH⁺ est prédominante (figure 4.11) rendent difficile l'étude de AH⁺. Nous allons donc supposer que les deux acidités seront dosées simultanément et nous essayerons de négliger le plus possible le signal de l'espèce AH⁺ aux pH étudiés.

On étudie donc l'équilibre suivant :



De constante d'équilibre :

$$K = K_{A1}K_{A2}$$

$$pK = pK_{A1} + pK_{A2}$$

Les diagrammes de distribution des espèces suivent les équations ci-dessous (dont le détail est précisé en annexe 3).

$$\%A = \frac{1}{1 + 10^{2(\frac{pK}{2} - pH)}} \times 100 = \frac{A(\lambda) - A_{AH_2^{2+}}(\lambda)}{A_A(\lambda) - A_{AH_2^{2+}}(\lambda)} \times 100$$

$$\%AH_2^{2+} = \frac{1}{1 + 10^{2(pH - \frac{pK}{2})}} \times 100 = \frac{A(\lambda) - A_A(\lambda)}{A_{AH_2^{2+}}(\lambda) - A_A(\lambda)} \times 100$$

Avec A(λ) l'absorbance à la longueur d'onde étudiée, A_A(λ) l'absorbance du Bodipy sous forme basique seule, A_{AH₂²⁺}(λ) l'absorbance du Bodipy sous forme diacide seule.

La longueur d'onde de travail est sélectionnée de manière à ce qu'une des deux espèces, AH₂²⁺ ou A, absorbe majoritairement et que l'absorbance de l'espèce AH⁺ soit négligeable. Nous travaillons donc à 623 nm où l'absorbance de AH₂²⁺ est grande et celle de A est très faible. Les diagrammes de distribution des espèces AH₂²⁺ et A sont obtenus figure 4.14. Les courbes obtenues sont alors modélisées par une fonction sigmoïde (en trait continu sur la figure). Les modélisations mathématiques obtenues sont de bonne qualité : R² = 0,997 et nous renseignent sur le nombre de protons ayant effectivement réagi : n=2,0. Nous avons donc bien dosé simultanément les deux acidités du Bodipy. La modélisation nous renseigne également sur la valeur de pK, somme des deux pK_A du Bodipy **[3]**, pK =1,9. Il n'est cependant pas possible de déterminer individuellement la valeur de chaque pK_A.

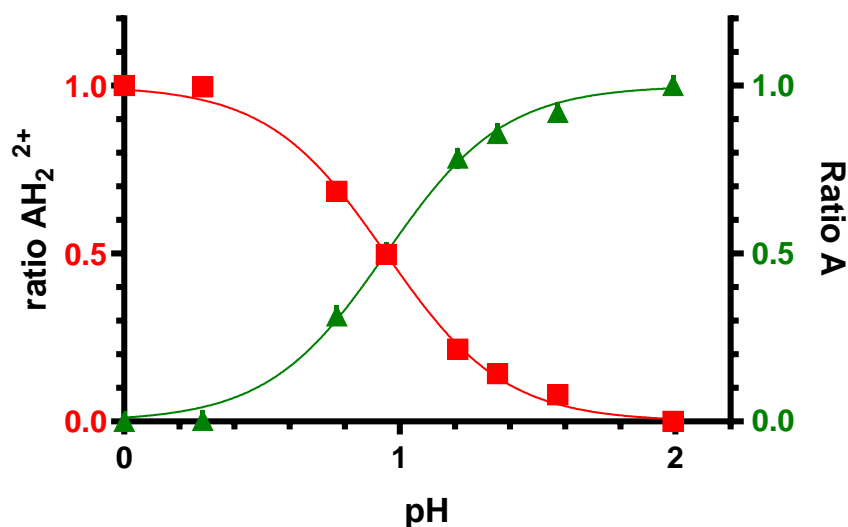


Figure 4.14 : Ratio des composés AH₂²⁺ (rouge) et A (vert) du Bodipy **[3]** déterminés grâce au signal d'absorption à 623 nm. Les modélisations mathématiques des courbes sont tracées en trait continu. Modèle mathématique de type sigmoïde $\%AH_2^{2+} = \frac{1}{1+10^{n(pH-\frac{pK}{n})}}$ ($R^2 = 0,997$, $n = 2,0$; $pK = 1,9$) et $\%A = \frac{1}{1+10^{n(-pH+\frac{pK}{n})}}$ ($R^2 = 0,997$, $n = 2,0$; $pK = 1,9$).

Emission

Les spectres d'émission du Bodipy **[3]** ont ensuite été étudiés dans différents tampons pH (Figure 4.15) contenant 0,3% volumique de DMSO à une concentration $C = 9,94 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$. Dans ces conditions, pour lesquels la concentration est plus faible que pour l'étude de l'absorption, aucune précipitation n'a été observée dans les solutions étudiées. Pour l'étude des spectres d'émission, on se limitera à des pH < 4. Sur les spectres d'émission de fluorescence, on observe la présence d'une bande d'émission intense à 614 nm. L'émission de cette bande est maximale dans les solutions les plus acides (en rouge) et sa position est proche de celle observée à 618 nm dans le DCM (tableau 4.2).

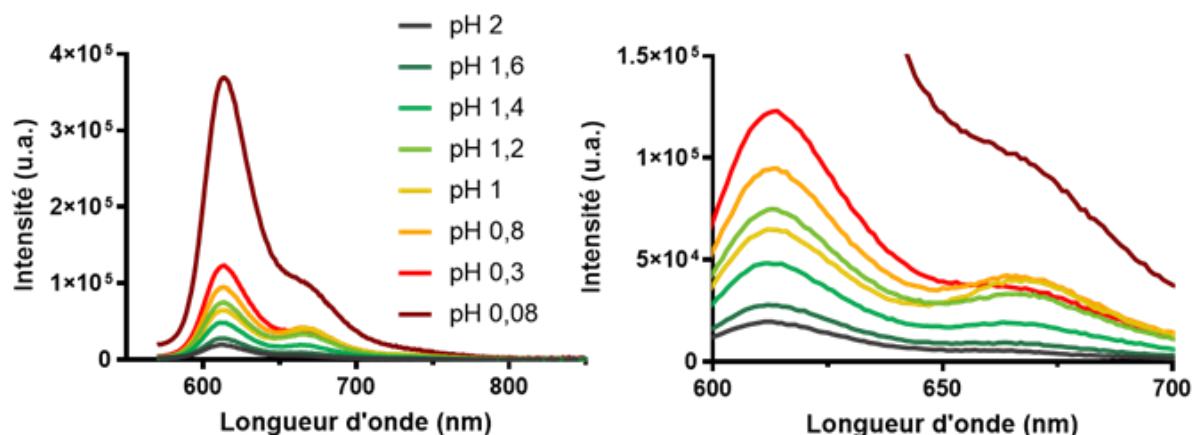


Figure 4.15 : (Gauche) Spectres d'émission des solutions de Bodipy **[3]** dans un mélange 0,3%/99,7% volumique de DMSO/tampon aqueux de type McIlvaine. $C = 9,94 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$. Pour toutes les solutions l'absorbance maximale est inférieure à 0,1. Excitation 540 nm, largeur de fente 4,9 nm. (Droite) Mêmes spectres d'émission, zoom entre 660 et 700 nm.

Nous en déduisons que cette bande est associée au Bodipy sous sa forme diacide AH_2^{2+} . Cette bande d'émission semble posséder un épaulement vibrationnel vers 667 nm. L'observation de l'émission entre 650 et 700 nm (figure 4.15 droite) nous laisse également apercevoir l'apparition d'une petite bande d'émission vers 665 nm, dont l'émission semble maximale pour les solutions à $\text{pH} = 0,8$ et $\text{pH} = 1,0$ (courbes jaune et orange). La position de cette bande d'émission correspond à celle observée dans les solutions de DCM pour l'espèce AH^+ à 674 nm (tableau 4.2). La difficulté de détecter l'espèce AH^+ est d'autant plus grande que la position de son maximum d'émission se situe dans l'épaulement de la bande d'émission associée à AH_2^{2+} . Les caractéristiques spectrales des bandes d'émission sont indiquées dans le tableau 4.3. Aucune bande d'émission caractéristique de l'espèce zwitterionique A n'a cependant été détectée. La fluorescence de A étant potentiellement beaucoup plus faible que celle de AH_2^{2+} et AH^+ (Nano et al. 2014; Alexandra Sutter, Elhabiri, et Ulrich 2018; Baruah et al. 2006), et l'utilisation de largeurs de fente assez faibles pour les monochromateurs du spectrofluorimètre, rendent difficile la détection de la bande d'émission de fluorescence associée à A. Plus de détail sur l'attribution des bandes d'émission est donné en annexe 2.

$\lambda_{em,max}$ (nm)	LMH (cm^{-1})	LMH (nm)	espèce
-	-		A
665	-		AH ⁺
614	$1000 \pm 15 cm^{-1}$	38 ± 1	AH ₂ ²⁺

Tableau 4.3 : Propriétés spectrales des bandes d'émission du Bodipy **[3]** dans le tampon 0,3%/99,7% volumique de DMSO/tampon aqueux de type McIlvaine. C = $9,94 \times 10^{-7} mol.L^{-1}$. LHM : Largeur à mi-hauteur de la bande.

Pour les spectres d'émission du Bodipy **[3]**, nous n'avons pas trouvé de longueurs d'onde de travail permettant de s'affranchir du signal de fluorescence de AH⁺. Les diagrammes de distribution des espèces AH₂²⁺ et A que nous avons obtenus n'ont pas pu être modélisés correctement par les équations d'équilibres acido-basiques d'une seule ou des deux acidités.

Excitation

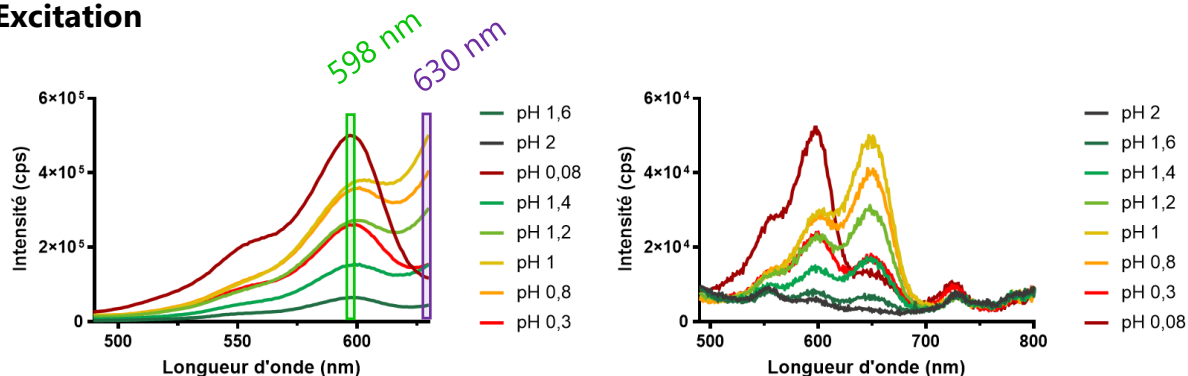


Figure 4.16 : Spectres d'excitation des solutions de Bodipy **[3]** dans un mélange 0,3%/99,7% volumique de DMSO/tampon aqueux de type McIlvaine. C = $9,94 \times 10^{-7} mol.L^{-1}$. (Gauche) Emission 668 nm, largeur de fente 6,5 nm. (Droite) Emission 830 nm, largeur de fente 15 nm. Pour toutes les solutions l'absorbance maximale est inférieure à 0,1. Les bandes colorées indiquent les longueurs d'onde à laquelle va être observé le signal de fluorescence en fonction du pH (figure 4.19) : à 630 nm (bande violette) et à 598 nm (bande verte).

Les spectres d'excitation des solutions de Bodipy **[3]** dans les tampons ont été étudiés pour deux longueurs d'ondes d'émission : à 668 nm (figure 4.16 gauche) et à 830 nm (figure 4.16 droite). Sur les spectres d'excitation, on observe la présence de deux bandes à 597 nm et à 647 nm. Ces bandes sont en bon accord avec les maxima d'absorption obtenus pour les solutions de Bodipy **[3]** dans le DCM : une bande à 555 nm et une autre vers 658 nm. Les spectres d'excitation nous permettent alors de beaucoup mieux estimer la position des bandes que sur les spectres d'absorption (tableau 4.7 annexe 1).

$\lambda_{ex,max}$ (nm)	LMH (cm^{-1})	LMH (nm)	espèce
725	-		A
647	$1335 \pm 50 cm^{-1}$	55 ± 3	AH^+
597	$1315 \pm 15 cm^{-1}$	46 ± 1	AH_2^{2+}

Tableau 4.4 : Propriétés spectrales des bandes d'excitation du Bodipy **[3]** dans le tampon 0,3%/99,7% volumique de DMSO/tampon aqueux de type McIlvaine. $C = 9,94 \times 10^{-7} mol.L^{-1}$. LHM : Largeur à mi-hauteur de la bande.

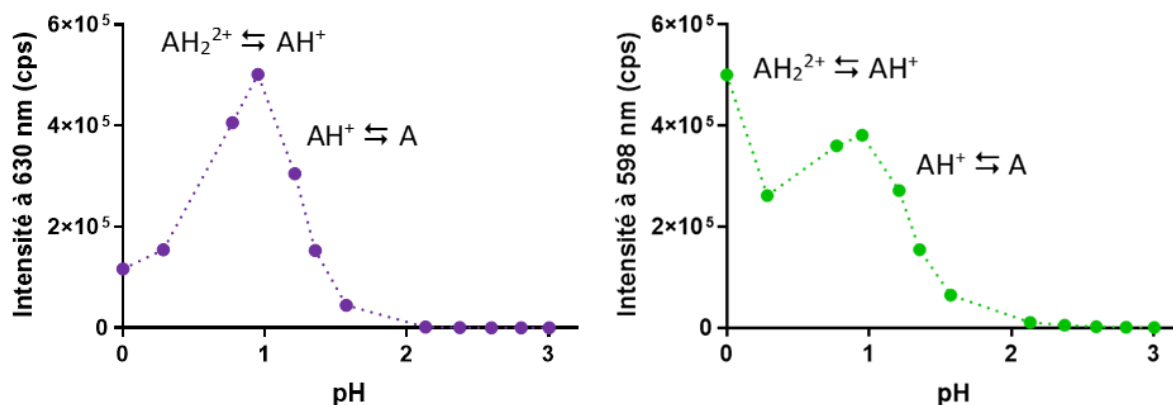


Figure 4.17 : (Gauche) Evolution du signal de fluorescence à 630 nm des spectres d'excitation (émission 668 nm, largeur de fente 6,5 nm). (Droite) Evolution du signal de fluorescence à 598 nm des spectres d'excitation (émission 668 nm, largeur de fente 6,5 nm).

Comme pour les spectres d'émission, nous n'avons pas trouvé de longueur d'onde qui permette de doser simultanément les deux acidités et de négliger la présence de l'espèce AH^+ . Cependant, l'observation de l'évolution des signaux de fluorescence en fonction du pH peut nous fournir des indications sur les équilibres. Dans le but d'observer spécifiquement l'évolution de la concentration de AH^+ , nous étudions le signal de fluorescence à 630 nm du spectre d'excitation (émission à 668 nm) (figure 4.17 gauche). Le signal à 630 nm est proche du maximum d'absorption de l'espèce AH^+ ($\lambda_{max,abs} = 658 nm$, tableau 4.1). C'est à cette longueur d'onde que le signal de AH_2^{2+} est également le plus faible. Le signal de fluorescence, est maximal pour une solution de $pH = 1,0$ (courbe jaune, figure 4.16). Entre le $pH = 3$ et $2,1$, le signal de fluorescence est très faible. L'espèce AH^+ n'est pas présente. Puis, entre $pH = 2,0$ et $pH = 1,0$, le signal de fluorescence augmente, le Bodipy **[3]** sous forme basique A est transformé en AH^+ . Aux pH inférieurs à $1,0$, le signal de fluorescence à 630 nm diminue, l'espèce AH^+ est transformée en AH_2^{2+} , qui absorbe beaucoup moins à la longueur d'onde étudiée (630 nm). Comme observé avec les spectres d'émission (figure 4.15 et annexe 4), l'espèce AH^+ est prédominante aux pH proches de $1,0$. Nous en déduisons

que le pK_{A1} est inférieur à 1 et que le pK_{A2} est supérieur à 1 (figure 4.18). Des résultats similaires ont été obtenus en observant le signal d'émission à 697 nm annexe 4.

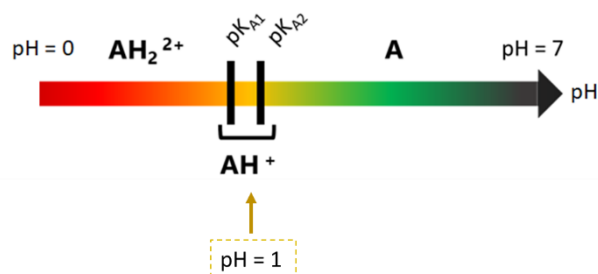


Figure 4.18 : Diagramme de prédominance du Bodipy [3].

Nous étudions également le signal de fluorescence à 598 nm (spectres d'excitation, émission à 630 nm) en fonction du pH (Figure 4.17 droite). À 598 nm, le signal détecté peut provenir à la fois de l'espèce AH^+ et de AH_2^{2+} . Comme observé précédemment, le signal de fluorescence est maximal à pH = 1,0, puis il diminue entre pH = 1,0 et pH = 0,3. Cette diminution du signal est associée à la disparition de l'espèce AH^+ au profit de AH_2^{2+} . Cependant, contrairement aux précédentes courbes, le signal de fluorescence augmente à nouveau entre pH = 0,3 et pH = 0,08 attestant de la transformation d'une importante quantité de AH^+ en AH_2^{2+} . À nouveau, on peut remarquer que l'espèce AH^+ prédomine aux pH proches de 1,0. Cela confirme les résultats obtenus avec les spectres d'émission : $pK_{A1} < 1,0$ et $pK_{A2} > 1,0$. Le changement d'évolution de la courbe aux alentours de pH = 0,3 est une bonne indication pour situer le changement d'espèce prédominante, entre AH_2^{2+} et AH^+ , aux alentours de cette valeur de pH. On estime donc que le pK_{A1} est proche de $0,3 \pm 0,3$. Comme la somme des deux pK_A vaut 1,9, on en déduit que pK_{A2} a une valeur proche de $1,6 \pm 0,3$.

La première estimation des pK_A du Bodipy [3] nous permet d'en déduire qu'au domaine de pH que l'on souhaite étudier avec l'Aza-Bodipy : $4 < pH < 7$, le Bodipy [3] sera seulement présent sous forme basique A car $pH \gg pK_{A2}$. Cependant, les équilibres acido-basiques du Bodipy [3] sont-ils les mêmes dans les suspensions de NP ?

4.3.2 Sensibilité au pH des NP de Bodipy [3]

Dans cette partie nous étudierons dans un premier temps la stabilité des suspensions de NP dans des tampons acides, puis dans un second temps les pK_A des NP seront estimés.

4.3.2.1 Stabilité des NP dans un tampon pH acide

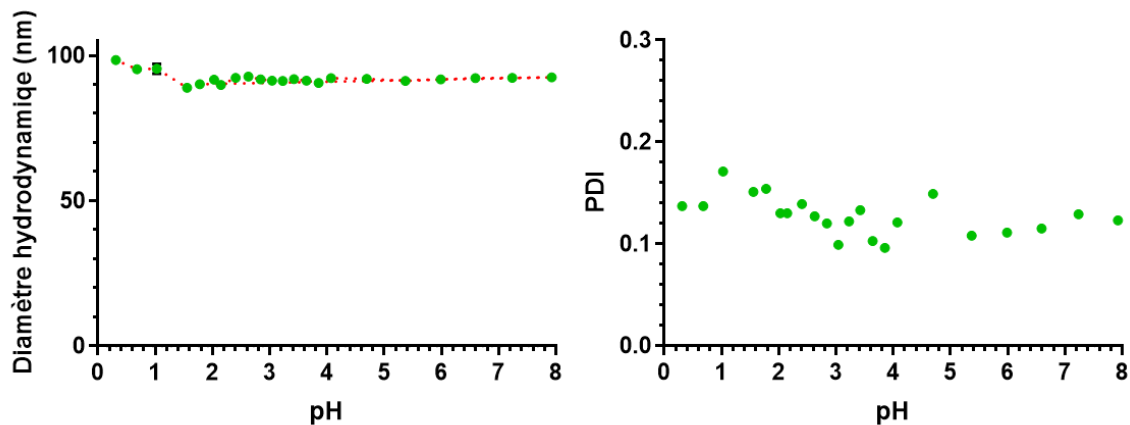


Figure 4.19 : (Gauche) Diamètre hydrodynamique des **NP-25%** de Bodipy en fonction du pH. (Droite) PDI (PolyDispersity Index en anglais, indice de polydispersité) des NP **NP-25%** de Bodipy en fonction du pH.

Les NP de Bodipy sont synthétisées comme nous l'avons vu dans le chapitre 2, par formulation d'un mélange de polymère de PLA-Bodipy et d'un polymère de PLA-PEG₅₀₀₀. Des **NP-25%** de Bodipy sont étudiées, ce qui signifie qu'elles contiennent 25% massique de PLA-Bodipy et 75% de PLA-PEG. La stabilité des suspensions de NP est alors évaluée en fonction du pH de la solution (figure 4.19). Les suspensions de NP sont diluées 10 fois dans une solution tampon et l'on mesure leur taille et leur indice de polydispersité en fonction du pH, 2-3h après ajout du tampon. La taille des NP **NP-25%** varie très peu avec le pH de la solution. Elles possèdent un diamètre de 92 ± 2 nm aux pH les plus basiques et une taille de 96 ± 2 nm aux pH les plus acides. L'écart relatif entre les tailles des NP en solution acide et basique est de 5-6%, ce qui est négligeable. On n'observe donc pas de changement de la taille des NP deux à trois heures après suspension dans des solutions tampons de pH < 8,0. On regarde également l'évolution des indices de polydispersité (PDI) des NP en fonction du pH (figure 4.19 droite). Aucune modification significative du PDI avec le pH n'est visible. Les PDI des NP sont tous compris entre 0,17 et 0,10. Les suspensions de NP sont monodisperses quel que soit le pH. Nous n'observons donc pas d'influence du pH ni sur la taille ni sur la dispersité des NP sur des échelles de temps de deux à trois heures. Les photographies des suspensions des **NP-25%** dans les différentes solutions tampons sont visibles figure 4.20. Aucune détérioration du polymère n'est visible à l'œil nu dans les suspensions.

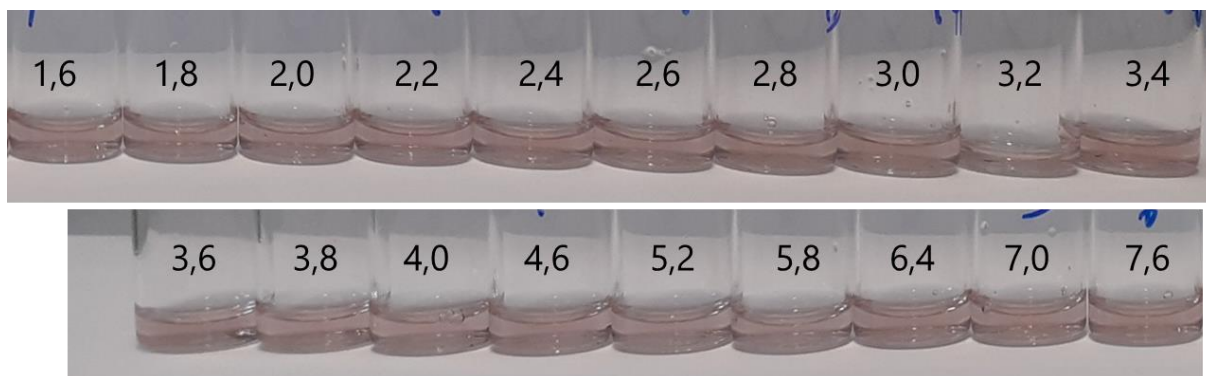


Figure 4.20 : Photographie des suspensions des **NP-25%** de Bodipy dans différentes solutions tampons (2-3 heures après suspension dans la solution tampon). Les valeurs de pH sont indiquées en noir sur chaque solution.

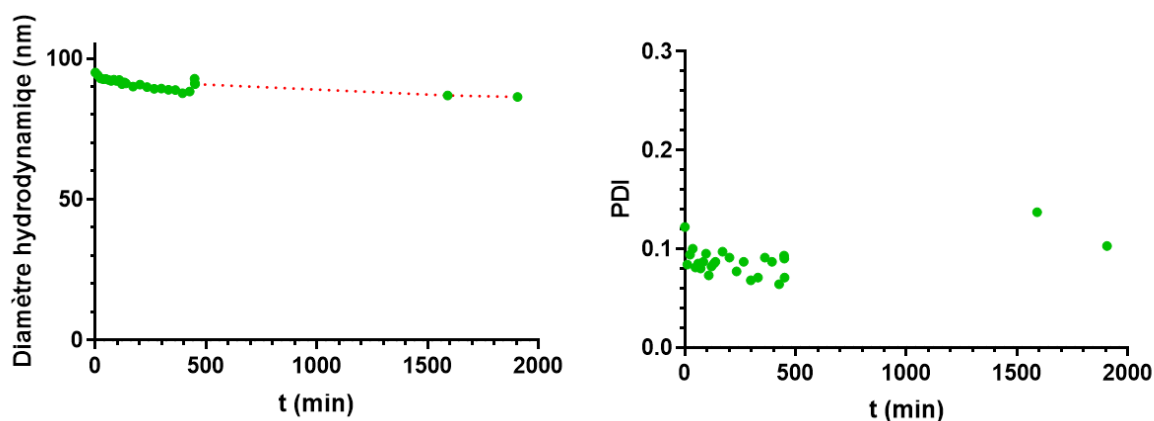


Figure 4.21 : (Gauche) Diamètre hydrodynamique des **NP-25%** de Bodipy en fonction du temps dans une solution tampon pH = 0,08. (Droite) PDI (PolyDispersity Index en anglais, indice de polydispersité) des **NP-25%** de Bodipy en fonction du temps dans une solution tampon pH = 0,08.

Nous avons étudié ensuite la stabilité des NP dans une solution tampon très acide (pH = 0,08) en fonction du temps. Les **NP-25%** sont diluées dix fois dans la solution tampon et on étudie la taille et le PDI en fonction du temps (figure 4.21). La taille des NP diminue très légèrement avec le temps, en passant d'un diamètre de 95 nm à t = 0 min, à un diamètre de 86 nm après environ 31 heures (1906 min). Cette diminution de la taille au cours du temps correspond à un écart relatif de 9,5%. On peut donc considérer que cette variation est significative. Le PDI des NP suspendues dans un tampon très acide ne semble pas changer avec le temps (figure 4.21 droite). Les NP restent très mono-disperses tout le long de l'étude. De même, le diagramme de distribution de la taille des NP (figure 4.22) indique bien la présence d'une seule taille de NP centrée autour de 100 nm pour tous les temps étudiés. La solution tampon

acide semble donc provoquer une faible réduction de la taille des NP, mais pas leur destruction. Les NP sont stables pendant au moins 31 heures dans une solution tampon acide. Dans la littérature, des films d'acide polylactique-co-glycolique-PEG (PLGA-PEG) ont démontré une résistance accrue à l'hydrolyse dans du tampon phosphate à 37°C grâce à l'augmentation de l'hydrophobicité et de la température de transition vitreuse des copolymères. Dans les films les plus hydrophobes la diffusion de l'eau est plus lente et la dégradation du polymère est alors moins rapide. Les copolymères possédant le plus grand rapport molaire d'unité lactique par rapport aux unités glycoliques sont alors les plus stables vis-à-vis de l'hydrolyse (Vey et al. 2011; Casalini et al. 2019). La stabilité des NP de PLA-Bodipy peut donc s'expliquer par une diffusion lente de l'eau dans la matrice hydrophobe du PLA. La légère diminution de la taille des NP dans un tampon acide peut quant à elle s'expliquer par l'hydrolyse des PEG en surface des NP. En effet, Vey et son équipe ont démontré que l'hydrolyse du PEG est 1,3 fois plus rapide que celle du PLGA (Vey et al. 2011).

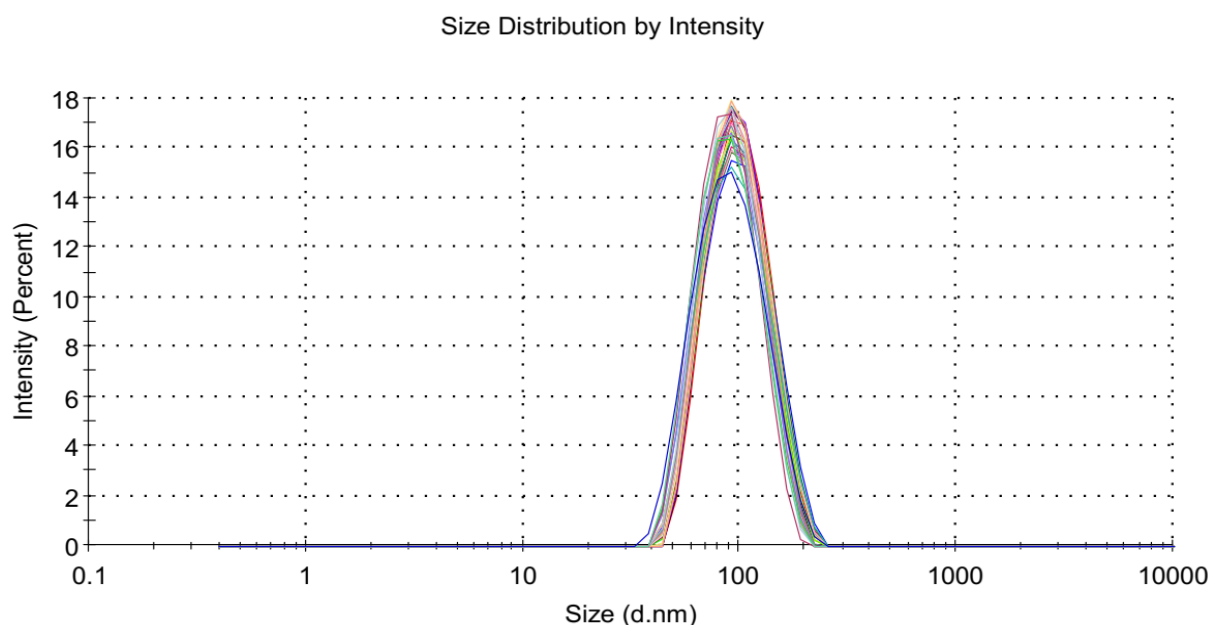


Figure 4.22 : Diagramme de distribution de la taille des NP pour la suspension de **NP-25%** de Bodipy pour tous les temps (de 0 min à 1906 min)

Trois suspensions de NP de Bodipy : **NP-50%** ; **NP-25%** et **NP-5%** ont été diluées dans un tampon très acide (pH = 0,08) et un tampon neutre (pH = 7,3). Les photographies des suspensions sont visibles figure 4.23. On observe un très léger changement de couleur lors du passage d'un tampon neutre à acide. La couleur passe du violet clair au violet plus foncé. Ce changement de couleur n'est pas aussi marqué que celui observé sur le Bodipy **[3]** dissout dans des mélanges tampon/DMSO (figure 4.12). De plus, on n'observe pas non plus d'apparition de couleur verdâtre ou vert clair comme pour les expériences avec le Bodipy **[3]** en solution.

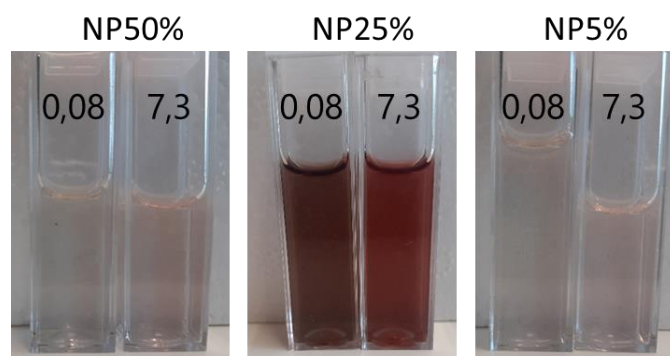


Figure 4.23 : Photographie des suspensions des **NP** : **NP-5%**, **NP-25%**, **NP-50%** de Bodipy dans différents tampons pH. Les valeurs de pH sont indiquées en noir sur chaque solution. Les suspensions de **NP-50%** ont été diluées 252 fois, les **NP-25%** ne sont pas diluées, les **NP-5%** sont diluées d'un facteur 12.

4.3.2.2 Détermination des pK_A des NP de Bodipy [3]

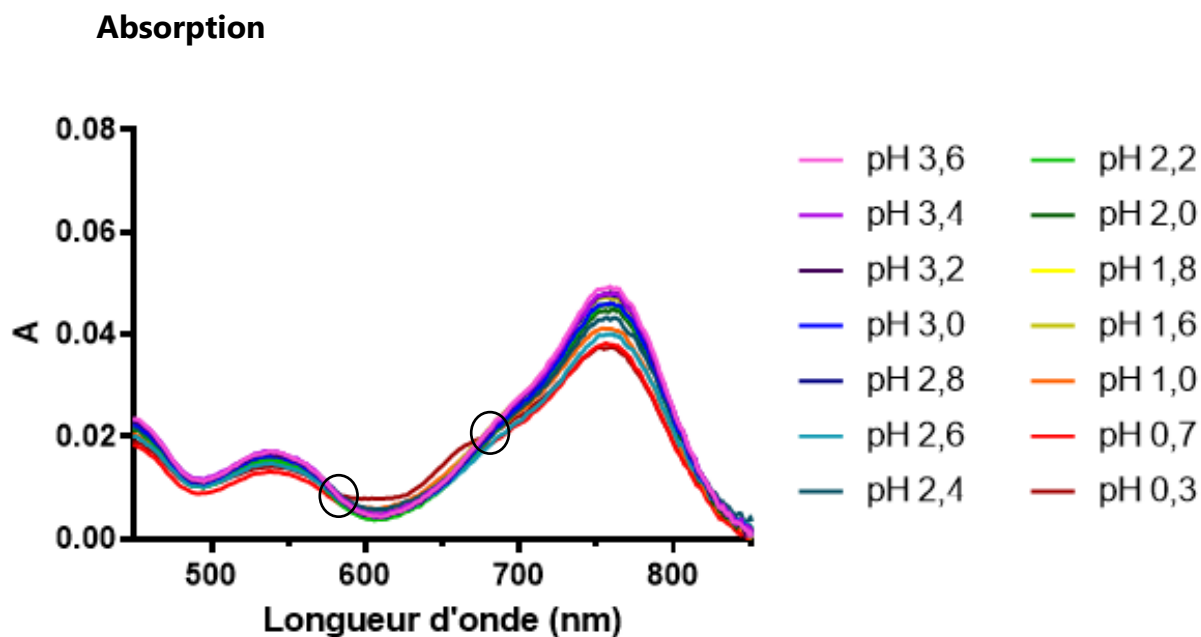


Figure 4.24 : Spectres d'absorption des **NP-25%** de Bodipy dans différentes solutions tampons $0,3 < \text{pH} < 3,6$. $C = 1,0 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ en PLA-Bodipy [3]. Les points isobestiques sont entourés en noir.

Les spectres d'absorption des **NP-25%** dans les différentes solutions tampons ont été étudiés figure 4.24. On observe la présence de deux points isobestiques : à 682 nm et à 580 nm. Comme observé dans les précédents chapitres (chapitres 2 et 3) de cette thèse, on observe pour les NP de Bodipy, la présence d'une bande principale vers 757 nm. La position de cette bande ne change pas avec la diminution du pH des solutions. Aucune nouvelle bande n'est décelable pour tous les pH étudiés. Toutefois,

on peut remarquer une augmentation de l'absorbance à 661 nm et une diminution de l'absorbance à 750 nm avec la diminution du pH.

Comme pour les expériences avec le Bodipy **[3]** en solution, nous étudions le dosage simultané de 2 protons des **NP-25%** en observant le signal d'absorbance à 610 nm. Le diagramme de distribution ainsi que la modélisation mathématique associée sont indiqués figure 4.25. La qualité des modélisations est acceptable : $R^2 = 0,973$. Cependant, la modélisation mathématique nous indique que l'équilibre observé est associé au dosage d'une seule acidité : $n = 1,2$. D'après la modélisation, la valeur du pK_A associé à cet équilibre est de 1,1. Le pK_A étant plus grand que 1,0, on suppose qu'il s'agit de l'équilibre entre AH^+ et A (pK_{A2}). On a donc une estimation de $pK_{A2} \approx 1,1 \pm 0,3$ pour les NP de Bodipy **NP-25%** à 20°C. On peut également en déduire que le signal d'absorption aux alentours de 610 nm doit être associé à la formation de l'espèce AH^+ .

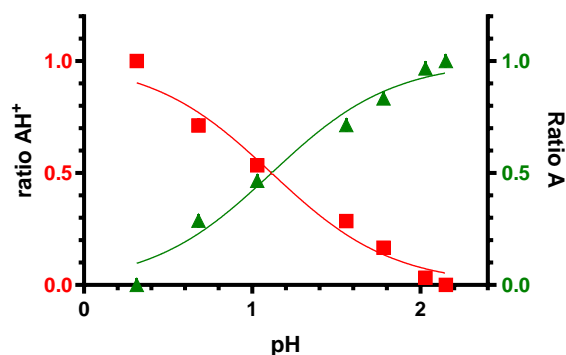


Figure 4.25 : Diagramme de distribution des espèces AH^+ (rouge) et A (vert) des **NP-25%** de Bodipy **[3]** déterminé grâce au signal d'absorption à 610 nm. Les modélisations mathématiques des courbes sont tracées en trait continu. Modèle mathématique de type sigmoïde $\%AH^+ = \frac{1}{1+10^{n(pH-\frac{pK}{n})}}$ ($R^2 = 0,973$, $n = 1,2$; $pK = 1,1$) et $\%A = \frac{1}{1+10^{n(-pH+\frac{pK}{n})}}$ ($R^2 = 0,973$, $n = 1,2$; $pK = 1,1$).

Emission

Les spectres d'émission des **NP-25%** sont ensuite étudiés (figure 4.26). Deux spectres sont obtenus : un premier, figure 4.26 gauche (excitation à 670 nm) et un deuxième, figure 4.26 droite (excitation à 540 nm). Pour chaque graphique, un point iso-émissif est visible à 775 nm (4.27 gauche) et à 749 nm (4.27 droite). On observe les mêmes positions de bandes que pour les expériences avec le Bodipy **[3]** dissous dans les solutions tampons (tableau 4.2). Une première bande avec un maximum à 615 nm, associée à AH_2^{2+} , et une deuxième bande à 665 nm, associée à AH^+ . Cependant, contrairement aux expériences avec le Bodipy **[3]** en solution, on observe une bande d'émission intense à 820 nm. C'est la bande d'émission caractéristique des NP

suspendues dans l'eau, que nous avons déjà observée dans les chapitres 2 et 3 de cette thèse. L'intensité de la bande à 820 nm diminue avec le pH, témoignant de la transformation de l'espèce A du Bodipy en ses formes acides AH^+ et AH_2^{2+} . De même, l'augmentation des intensités des bandes à 615 nm et 665 nm atteste de la formation des espèces acides du Bodipy. La bande d'émission à 820 nm est la plus intense malgré le fait que le Bodipy sous sa forme basique possède le rendement quantique de fluorescence le plus faible (Galangau et al. 2010; Nano et al. 2014; Alexandra Sutter, Elhabiri, et Ulrich 2018).

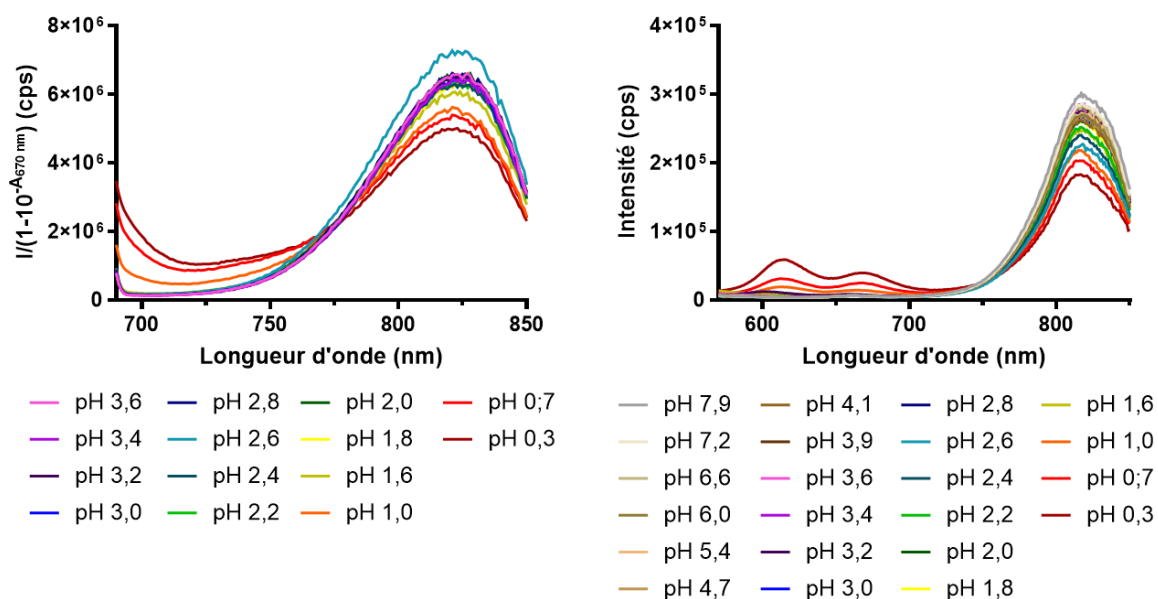


Figure 4.26 : (Gauche) spectres d'émission des NP de Bodipy **NP-25%** dans des solutions tampons et dilution d'un facteur 83. Excitation à 670 nm, largeur de fentes 12 nm. Le signal de fluorescence est corrigé de l'absorption à 670nm. (Droite) spectres d'émission des NP de Bodipy **NP-25%** dans des solutions tampons et dilution d'un facteur 83. Excitation à 540 nm, largeur de fentes 12 nm.

Les diagrammes de distribution des espèces acido-basiques sont étudiés à 690 nm (figure 4.27 gauche) et à 615 m (figure 4.27 droite). Les modélisations mathématiques obtenues pour les deux diagrammes indiquent le dosage simultané des deux acidités : $n = 2,5$ et $n = 1,9$, pour respectivement 690 nm et 615 nm. La modélisation de la courbe à 690 nm est très bonne : $R^2 = 0,991$ et permet d'en déduire une valeur pour la somme des deux pK_A : $pK = 1,8$. D'après les résultats obtenus en absorption, on peut en déduire les deux valeurs des pK_A des NP **NP-25%** : $pK_{A1} = 0,7 \pm 0,3$ et $pK_{A2} = 1,1 \pm 0,3$.

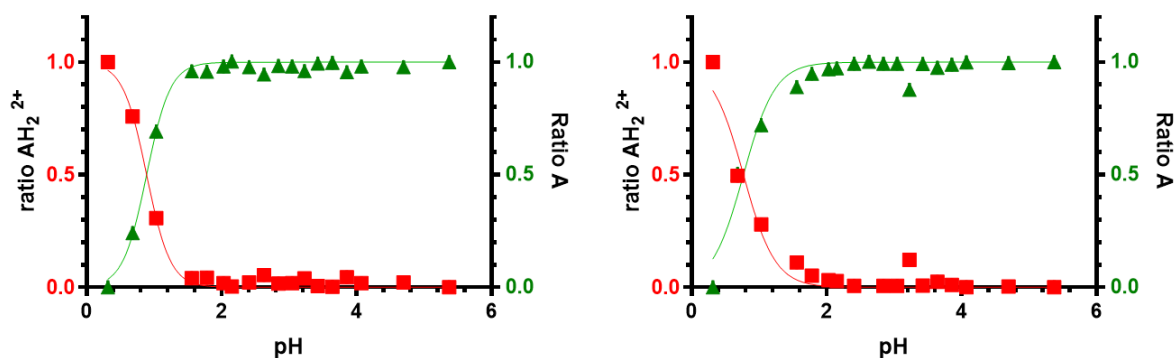


Figure 4.27 : (Gauche) Diagramme de distribution des espèces AH_2^{2+} (rouge) et A (vert) des **NP-25%** de Bodipy **[3]** déterminé grâce au signal d'émission à 690 nm (spectre d'émission, excitation à 670 nm, 12 nm de largeur de fente). Les modélisations mathématiques des courbes sont tracées en trait continu. Modèle mathématique de type sigmoïde $\%AH_2^{2+} = \frac{1}{1+10^{n(pH-\frac{pK}{n})}}$ ($R^2 = 0,991$, $n = 2,5$; $pK = 1,8$) et $\%A = \frac{1}{1+10^{n(-pH+\frac{pK}{n})}}$ ($R^2 = 0,991$, $n = 2,5$; $pK = 1,8$). (Droite) Diagramme de distribution des espèces AH_2^{2+} (rouge) et A (vert) des **NP-25%** de Bodipy **[3]** déterminé grâce au signal d'émission à 615 nm (spectre d'émission excitation à 540nm, 12 nm de largeur de fente). Les modélisations mathématiques des courbes sont tracées en trait continu. Modèle mathématique de type sigmoïde $\%AH_2^{2+} = \frac{1}{1+10^{n(pH-\frac{pK}{n})}}$ ($R^2 = 0,954$, $n = 1,9$; $pK = 1,5$) et $\%A = \frac{1}{1+10^{n(-pH+\frac{pK}{n})}}$ ($R^2 = 0,954$, $n = 1,9$; $pK = 1,5$).

Conclusion

Dans cette partie, nous avons étudié l'influence du pH sur des NP de Bodipy. Les NP de Bodipy **NP-25%** sont stables pendant au moins 31 heures dans un tampon pH très acide (pH = 0,08). Elles sont également stables pendant au moins 2-3 heures pour des solutions de pH < 8,0. Dans un milieu très acide, pH < 2,0, on observe l'apparition d'un signal de fluorescence des NP vers 615 nm et 665 nm. Cette fluorescence augmente avec la diminution du pH au détriment de la bande principale d'émission à 820 nm. Cependant, la perte de fluorescence reste faible et les spectres d'absorption des NP sont également peu modifiés. Nous avons pu estimer les valeurs des pK_A des deux acidités des NP de Bodipy **NP-25%** : $pK_{A1} = 0,7$ et $pK_{A2} = 1,1$. Les constantes d'acidité obtenues pour les NP de Bodipy **NP-25%** ne sont pas très différentes de celles obtenues pour le Bodipy **[3]** en solution ($pK_{A1} = 0,3$; $pK_{A2} = 1,6$). Les valeurs légèrement différentes des constantes d'équilibre peuvent s'expliquer par l'influence du solvant sur les équilibres acido-basiques. Dans le cas du Bodipy **[3]** solvaté, le solvant est constitué d'un mélange tampon/DMSO. Dans les suspensions, la présence des NP peut modifier les paramètres du solvant : comme la constante diélectrique, la force ionique, la mobilité des ions, et la viscosité.

La présence d'un important signal de fluorescence à 820 nm associé à la forme basique A du Bodipy est notable même aux pH les plus acides pour lesquels le $\text{pH} < \text{pK}_{A2}$ (figure 4.26). Cette bande de fluorescence à 820 nm n'était pas détectable pour les expériences avec le Bodipy **[3]** dissous dans des solutions tampons acides (figure 4.15). Dans les suspensions de NP, cette bande de fluorescence à 820 nm reste la plus intense quel que soit le pH (Figure 4.26). De plus, pour détecter la fluorescence des NP, des largeurs de fentes beaucoup plus grandes pour les monochromateurs (12 nm, excitation 540 nm) ont été nécessaires comparées aux expériences du Bodipy **[3]** solvaté (4,9 nm, excitation 540 nm) malgré des valeurs d'absorbance similaires ($A < 0,1$ pour la fluorescence). Enfin, le changement de couleur est très peu marqué dans les suspensions de NP et ne correspond pas au net changement de couleur du violet au vert observé avec le Bodipy **[3]**.

Dès lors, il semble que dans les suspensions de NP, une quantité importante de Bodipy est présente sous sa forme basique A, malgré les faibles valeurs de pH ($\text{pH} < \text{pK}_{A2}$) pour lesquels les formes AH_2^{2+} et AH^+ sont censé être prédominantes. De plus, les valeurs de constantes d'équilibre déterminées ne permettent pas d'expliquer la présence de d'une quantité importante de A aux pH les plus acides. On suppose alors, que dans les NP, grande partie du Bodipy **[3]** n'a pas été protonée. La structure très hydrophobe du Bodipy **[3]** rend susceptible son agrégation au sein de la matrice polymère polylactide des NP (Casalini et al. 2019). Seuls les Bodipy en surface des NP sont accessibles pour réagir avec les protons. La matrice polylactide étant dense, apolaire et vitreuse, l'eau et les protons diffusent très lentement à l'intérieur (Vey et al. 2011; Tanase et Spiridon 2014; Luo, Wang, et Wang 2012, 2; Casalini et al. 2019). Ainsi, à court terme (quelques heures) seuls les Bodipy **[3]** en surface des NP sont susceptibles d'être protonés.

Si seuls les Bodipy présents en surface des NP peuvent être protonés, le signal de fluorescence en milieu acide peut donc nous renseigner sur la quantité de Bodipy **[3]** surface des NP. Nous allons donc essayer de doser le Bodipy en surface des NP.

4.3.3 Dosage du Bodipy **[3]** en surface des NP

Nous avons étudié le signal de fluorescence de trois lots de NP : **NP-5%**, **NP-25%** et **NP-50%** dans un tampon acide $\text{pH} = 0,07$ et dans un tampon $\text{pH} = 7$. Les spectres sont indiqués figure 4.28. Les NP ont toutes été diluées de manière à ajuster l'absorbance aux alentours de 0,1 au maximum de la bande. Pour chaque lot de NP, lorsque l'on suspend les NP dans un tampon acide, on observe une diminution de la fluorescence à 820 nm et une augmentation du signal de fluorescence à 615 nm et 665 nm. Des Bodipy sous forme basique A sont donc protonés pour former des Bodipy AH^+ et AH_2^{2+} . Le quotient du signal de fluorescence en milieu acide sur celui en milieu neutre nous donne les spectres figure 4.28 (d). Sur cette figure, on observe la présence

de deux bandes à 670 nm et 617 nm, correspondant respectivement aux espèces Bodipy AH⁺ et AH₂²⁺. Le quotient de fluorescence acide/base au maximum de la bande (670 nm) diminue avec le pourcentage de PLA-Bodipy dans les NP. Pour les **NP-5%**, le rapport entre les deux spectres est de 5,7 au maximum. Pour les **NP-25%**, ce rapport est de 4,6 et pour les **NP-50%** le rapport est de 2,2. La perte du signal de fluorescence à 820 nm provient de la transformation de A accessible en surface des NP en AH⁺ et AH₂²⁺. Il semble alors que plus le taux de chargement des NP est important moins il y ait de Bodipy basique (A) accessible en surface des NP comparé à la quantité totale de Bodipy dans les suspensions.

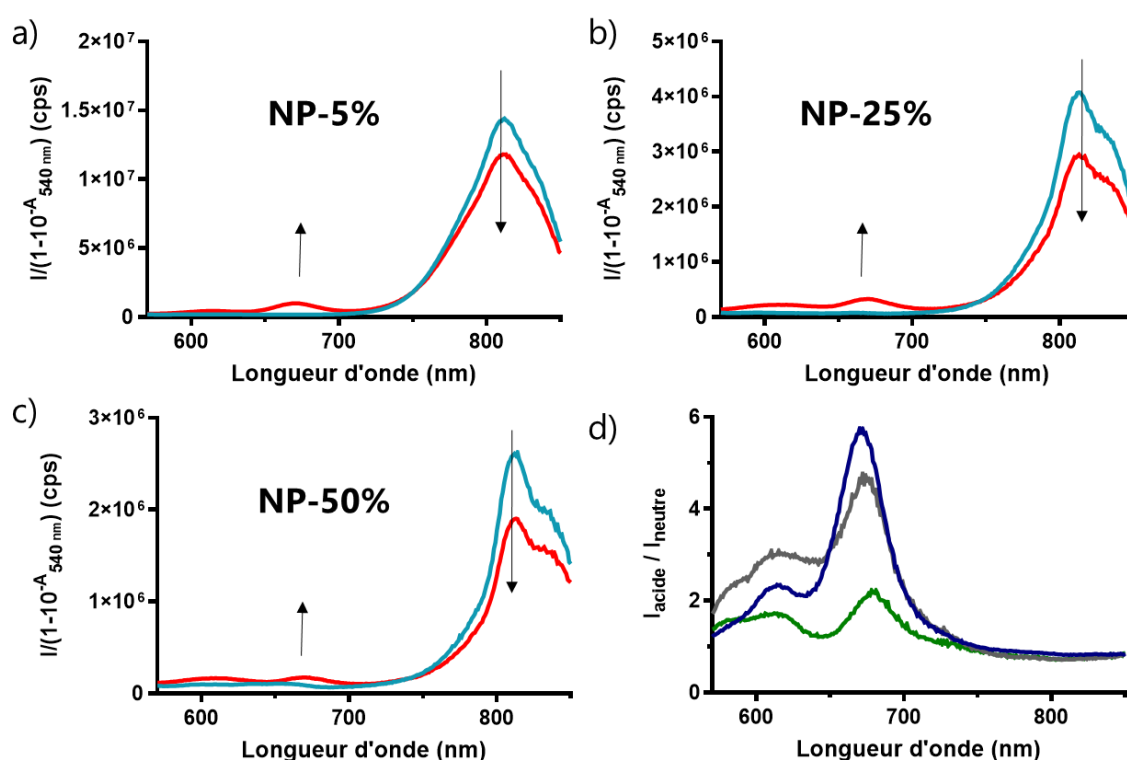


Figure 4.28 : Spectres d'émission des NP de Bodipy, excitation 540 nm, largeur de fente 9,5 nm. Courbe rouge NP suspendues dans un tampon acide pH = 0,07. Courbe bleu NP suspendues dans tampon pH = 7. Le signal de fluorescence est corrigé de l'absorption à 670nm. Le nom associé à chaque synthèse de NP est indiqué en gras sur chaque graphique : (a) **NP-5%** ; (b) **NP-25%** ; (c) **NP-50%**. (d) Quotient de l'intensité de fluorescence en milieu acide par celle en milieu neutre pour chaque synthèse de NP (bleu, **NP-5%**) ; (gris, **NP-25%**) ; (vert, **NP-50%**).

Afin de vérifier ces hypothèses, nous désirons doser le Bodipy en surface des NP. Pour cela, nous avons réalisé une droite d'étalonnage de la fluorescence du Bodipy en milieu acide à pH = 0,07. Les solutions étalons sont construites par dilutions successives dans des solutions tampons acides à partir d'une solution mère de Bodipy **[3]** dans du DMSO ($C_0 = 1,3 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$). Les solutions étalons étudiées possèdent

alors des concentrations comprises entre $3,2 \times 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1} < C < 1,3 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$ et des pourcentages volumiques de DMSO compris entre $0,3 \% < \%V < 1\%$. Les spectres d'émission des solutions étalons et des NP en milieu acide sont superposés figure 4.29 et sont obtenus dans les mêmes conditions. Afin de doser l'ensemble des Bodipy protonés sous forme AH^+ et AH_2^{2+} ($C_{t,\text{acide}}$), le signal de fluorescence est intégré entre 570 et 720 nm. La fluorescence intégrée est alors tracée en fonction de la concentration des solutions étalons pour donner la droite d'étalonnage figure 4.29 droite. La courbe est modélisée par une fonction affine, dont le coefficient de corrélation (0,9963), atteste de la bonne qualité de la modélisation. L'ordonnée à l'origine obtenue n'est pas nulle : $-1,31 \times 10^6 \text{ cps.nm}$, mais cette valeur est proche en ordre de grandeur du signal de fluorescence mesuré sur un échantillon ne contenant que du tampon acide $9,3 \times 10^5 \pm 2 \times 10^5 \text{ cps.nm}$.

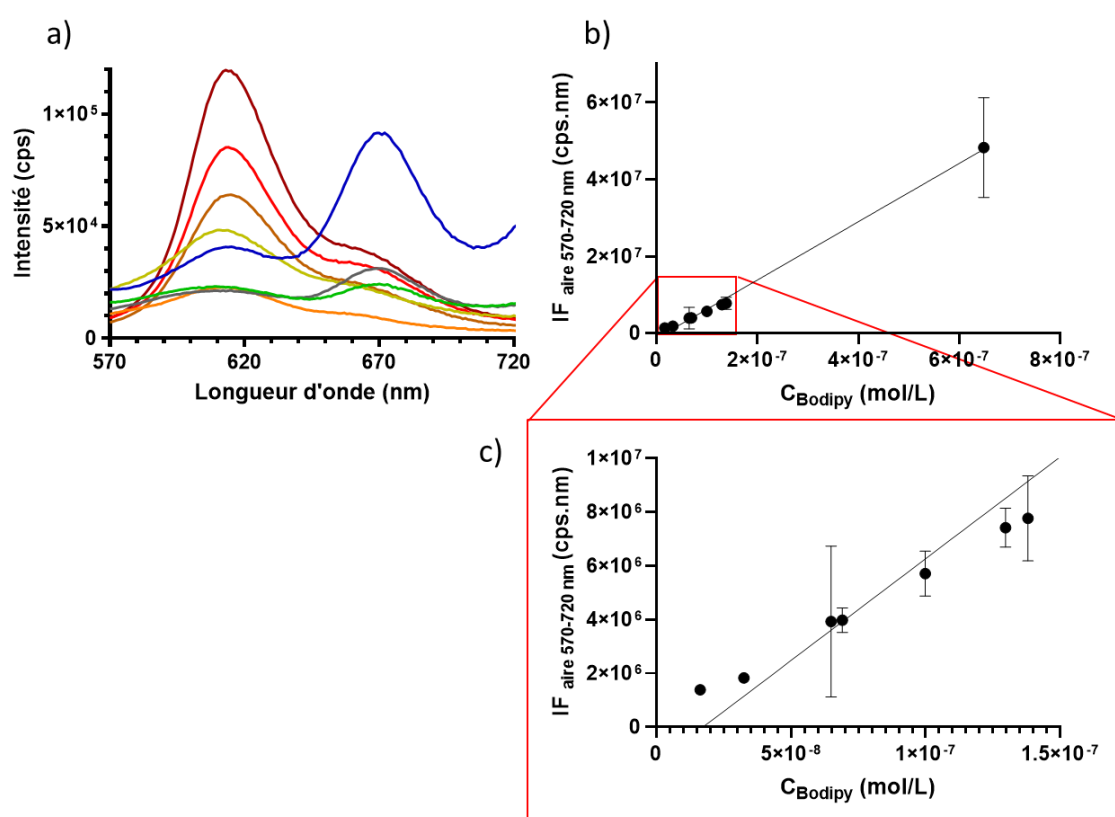


Figure 4.29 : (a) Spectres d'émission des solutions étalons de Bodipy [3] dans un tampon pH = 0,07, (Rouge foncé, $C = 1,3 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$) ; (Rouge clair, $C = 1,0 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$) ; (marron foncé, $C = 6,9 \times 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$) ; (jaune, $C = 6,5 \times 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$) ; (Orange, $C = 3,2 \times 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$). Les spectres d'émission des NP de Bodipy sont indiqués en bleu pour **NP-50%**, gris pour **NP-25%** et vert pour **NP-50%** (dilution des suspensions de NP pour avoir $A_{\text{max}} \approx 0,1$). Excitation 540 nm, largeur de fente 9,5 nm. (b) Droite d'étalonnage du signal de fluorescence intégré entre 570 nm et 720 nm des solutions étalons de Bodipy [3] dans des tampons. Modélisation mathématique $y = 7,57 \times 10^{13} C_{\text{Bodipy}} - 1,31 \times 10^6$ ($R^2 = 0,9963$). (c) zoom du graphique (b) pour $0 \text{ mol.L}^{-1} < C_{\text{Bodipy}} < 1,5 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$ et $0 < I_F < 1 \times 10^7 \text{ mol.L}^{-1}$.

On utilise alors la droite d'étalonnage pour remonter à la concentration totale en espèces acide du Bodipy AH_2^{2+} et AH^+ $C_{t,acide}$ dans les suspensions de NP. Les résultats du dosage sont indiqués tableau 4.5 et les concentrations $C_{t,acide}$ obtenues pour chaque NP sont comparées à la concentration totale en Bodipy dans chaque suspension $C_{t,Bodipy}$. Le quotient de la quantité de Bodipy sous forme acide par la quantité totale de Bodipy dans la suspension nous renseigne sur le pourcentage de Bodipy pouvant être protoné en surface des NP. Pour **NP-5%** on obtient 9,2% des Bodipy qui sont accessibles en surface, et 3,6% et 3,1% pour respectivement **NP-25%** et **NP-50%**. Comme pour les spectres d'émission des NP (figure 4.28), plus le taux d'encapsulation est élevé plus le pourcentage de Bodipy en surface des NP diminue. Le Bodipy est une molécule hydrophobe, plus le taux d'encapsulation est grand, plus le Bodipy est susceptible de s'agréger par interaction hydrophobe au cœur de la NP.

NP	$C_{t,acid} \text{ (mol.L}^{-1}\text{)}$	$C_{t,Bodipy} \text{ (mol.L}^{-1}\text{)}$	%surface
NP-5%	$1,1 \times 10^{-7}$	$1,2 \times 10^{-6}$	9,2
NP-25%	$5,7 \times 10^{-8}$	$1,6 \times 10^{-6}$	3,6
NP-50%	$5,6 \times 10^{-8}$	$1,8 \times 10^{-6}$	3,1

Tableau 4.5 : Résultats du dosage par étalonnage du Bodipy sous forme acide dans les NP de Bodipy. Les calculs de concentration sont effectués sur les solutions de NP diluées pour la spectroscopie. **NP-5%** dilution par 13,33. **NP-25%** dilution par 41,41. **NP-50%** dilution par 76,96.

Contrôle de la validité des résultats

Afin de vérifier que les ordres de grandeurs obtenus de pourcentage de Bodipy, en surface des NP, ne soient pas aberrants, nous avons essayé d'estimer la taille de la coquille surfacique contenant le Bodipy. Nous supposons une répartition uniforme en volume du Bodipy dans les NP. Ainsi, pour 9,2% des Bodipy accessibles en surface des NP, on considère que la coquille surfacique occupe 9,2% du volume total de la NP. Les résultats sont indiqués dans le tableau 4.6. La taille estimée de la coquille surfacique contenant les Bodipy correspond à un rayon de 1,6 à 0,6 nm. Cette valeur ne paraît pas aberrante et correspond à l'ordre de grandeur de la taille d'une molécule de Bodipy (Duan et al. 2019).

NP	% Bodipy cœur	R _{coquille} (nm)	R _{NP} (nm)
NP-5%	90,8	1,6	47,5
NP-25%	96,4	0,6	46,8
NP-50%	96,9	0,7	57,8

Tableau 4.6 : Estimation de la taille du cœur et de la coquille des NP de PLA-Bodipy pour chaque synthèse. Le volume estimé du cœur des NP correspond au pourcentage de Bodipy dans le cœur appliqué au volume totale de la NP. La taille des coquilles en est déduite par soustraction. $V_{cœur} = V_t \times \%Bodipy_{cœur}$ et $R_{cœur} = \left(\frac{3V_{cœur}}{4\pi}\right)^{\frac{1}{3}}$.

Conclusion

A l'aide d'une droite d'étalonnage de la fluorescence du Bodipy [3] en milieu acide, nous avons pu déterminer la quantité de Bodipy sous forme acide ($C_{t,acide}$, AH_2^{2+} et AH^+) pour chaque synthèse de NP de Bodipy : **NP-5%**, **NP-25%** et **NP-50%**. Les résultats obtenus démontrent que seul un très faible pourcentage, < 10%, des Bodipy sont accessibles en surface des NP et participent donc aux équilibres acido-basiques. Dans les NP, la majorité du Bodipy est présente au cœur des NP et n'est donc pas accessible aux protons en solution. Le pourcentage surfacique de Bodipy dans les NP diminue avec le taux d'encapsulation. Pour les **NP-5%**, **NP-25%** et **NP50%** il est respectivement de 9,2%, 3,6% et 3,1%. Plus le taux d'encapsulation est grand, plus le Bodipy est susceptible d'être agrégé dans le cœur des NP par interaction hydrophobe. Finalement, la validité du dosage est contrôlée par une estimation de la taille de la coquille des NP contenant le Bodipy en surface. Une répartition homogène en volume du Bodipy permet d'estimer des taille coquille surfacique de 2 à 0,6 nm de rayon.

Nous avons donc démontré que les NP de Bodipy ne sont pas sensibles au pH dans les domaines que nous souhaitons étudier pour l'Aza-Bodipy : $4 < pH < 7$. Les NP sont stables dans un tampon pH très faible ($pH = 0,08$) pendant au moins 32 h. De plus l'eau et les protons diffusent très lentement dans la matrice PLA (Casalini et al. 2019), ainsi donc seul les Aza-Bodipy en surface devraient pouvoir être affectés par les variations de pH.

Nous allons donc maintenant nous intéresser à la synthèse des NP d'Aza-Bodipy sensibles au pH.

4.4 SYNTHÈSE DES AZA-BODIPY

La synthèse de l'Aza-Bodipy a été réalisée suivant les étapes indiquées figure 4.30 et exploite la stratégie de synthèse d'Aza-Bodipy symétriques historiquement développée par O'shea et son équipe en 2004 (Gorman et al. 2004). La première étape consiste en une protection de la fonction phénol du para-hydroxybenzaldéhyde sous forme d'acétal (Choi et al. 2001). Le phénol est mis à réagir avec le dihydropyrane en

milieu acide pour former un éther de tétrahydropyranyle avec 90% de rendement. L'éther formé est alors stable en milieu basique et va ainsi permettre d'améliorer le rendement des étapes ultérieures dont trois sur les quatre suivantes sont réalisées sous assistance basique. Les produits obtenus seront plus solubles que les phénols correspondants ce qui facilitera les étapes de purification par chromatographie sur gel de silice. L'aldéhyde est ensuite mis à réagir avec du 4-diméthylaminoacétophénone pour donner par aldolisation/crotonisation une chalcone avec un rendement de 91% (Daly et al. 2017). Une réaction de Michael est ensuite réalisée sur la chalcone pour permettre d'obtenir le composé nitré avec un rendement de 50%. La molécule de type aza-dipyrrine est ensuite obtenue avec 71% de rendement par réaction de condensation en présence d'un large excès d'acétate d'ammonium. Cette étape est suivie par une complexation au bore, en présence de la diisopropyléthylamine, pour permettre de rigidifier le squelette de la molécule et obtenir un Aza-Bodipy avec un rendement de 43% (Daly et al. 2017). On procède ensuite à la dé-protection des fonctions phénol par hydrolyse des acétals sous catalyse acide.

Pour permettre le greffage de l'Aza-Bodipy sur des nanoparticules par réaction de chimie click, nous désirons introduire une fonction azoture sur l'Aza-Bodipy. Ainsi, parallèlement à la synthèse de l'Aza-Bodipy, du bromure de propargyle a été mis à réagir avec du 2-[2-(2-Chloroéthoxy)éthoxy]éthanol en présence d'hydruure de sodium pour donner le chloroalcyne par réaction de Williamson (Piron et al. 2010). Une réaction d'échange d'halogène est ensuite réalisée pour obtenir le dérivé iodé avec 88% de rendement (Piron et al. 2010). La substitution d'un atome de chlore par un atome d'iode permet d'affaiblir la liaison carbone-halogène et va ainsi favoriser la réaction de substitution nucléophile sur l'alcyne grâce à l'introduction d'un meilleur groupe partant (Clayden, Greeves, et Warren 2012). Enfin, la O-alkylation sur l'alcyne est réalisée par réaction de Williamson en présence de la base fluorure de césium. Le temps de réaction est court (20 min) afin de favoriser la O-alkylation par une seule des deux fonctions phénol de l'Aza-Bodipy (Grossi et al. 2016). L'ion fluorure permet d'activer le phénol par création d'une liaison hydrogène entre l'ion fluorure et l'atome d'hydrogène du phénol (Clark 1980). L'Aza-Bodipy mono O-alkylé, obtenu avec un rendement de 46%, possède alors une fonction alcyne qui permettra de greffer l'Aza-Bodipy facilement à la surface des NP par réaction de chimie click avec un azoture.

Enfin, la dernière étape de la synthèse consiste à réaliser une nitration en position ortho du phénol. L'ajout d'un groupe attracteur en alpha du phénol permet de stabiliser la base conjuguée et donc d'abaisser le pK_A du couple phénol/phénolate de 9 à 4 (Grossi et al. 2016; Clayden, Greeves, et Warren 2012). La nitration est réalisée par substitution électrophile aromatique et le produit est obtenu avec 25% de rendement.

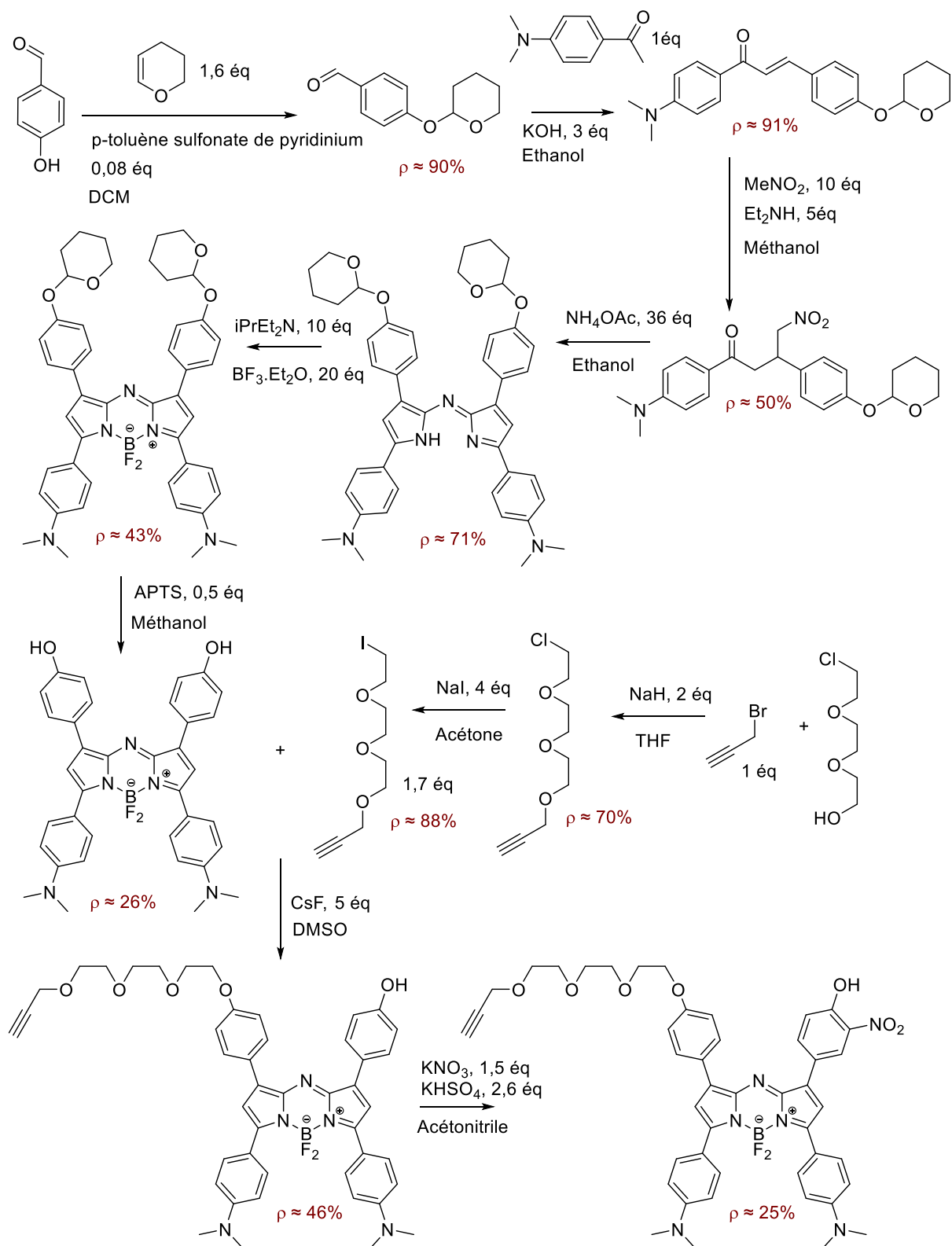


Figure 4.30 : Schéma de synthèse de l'Aza-Bodipy sensible au pH. ρ correspond au rendement de l'étape associée. APTS : acide paratoluènesulfonique. THF : tétrahydrofurane.

Le polymère polyéthylène glycol, possédant une fonction azoture et une fonction alcool en bout de chaîne : HO-PEG-N₃, est utilisé comme amorceur pour réagir avec un DL-lactide par polymérisation par ouverture de cycle catalysé par un complexe d'étain (figure 4.31). Le polymère polylactide-polyéthylène glycol azoture PLA-PEG-N₃, de masse molaire Mn = 9800 g.mol⁻¹, est alors obtenu avec un rendement de 25%.

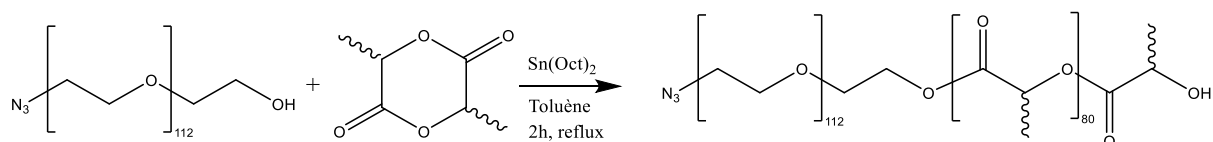


Figure 4.31 : Schéma de synthèse du polymère PLA-PEG-N₃.

4.5 CONCLUSION

Nous avons donc démontré que si le Bodipy **[3]** est sensible au pH, les valeurs de ses pK_A sont si faibles, que dans le domaine 4 < pH < 7, seul le Bodipy sous forme basique A, actif en photoacoustique, est présent. De plus, nous avons démontré la bonne stabilité des NP de polylactide dans des solutions tampons acides pendant au moins 32 heures. Nous avons également mis en évidence que la majorité du Bodipy (plus de 90% molaire) est présente au cœur des NP et ne peut donc pas intervenir dans les équilibres acido-basiques. Tous ces résultats tendent à montrer la conservation des propriétés spectrales des NP de Bodipy **[3]** dans les domaines de pH que nous allons étudier pour l'Aza-Bodipy : 4 < pH < 7. Cela est donc encourageant pour la photoacoustique. Un double marquage Aza-Bodipy en surface et Bodipy au cœur des NP de polylactide sera donc envisageable.

Nous avons ensuite réalisé la synthèse de l'Aza-Bodipy. Ce dernier possède deux fonctions *N,N*-diméthylaniline en positions 3 et 5 de l'indacène pour décaler les propriétés spectrales dans la région du proche infra-rouge (absorption vers 786 nm et émission vers 826 nm) et pour éviter tout recouvrement spectral avec le Bodipy **[3]**. La présence d'une fonction phénol en position 7 de l'indacène, avec un groupement nitro en position ortho, permettra d'obtenir un Aza-Bodipy sensible aux variations de pH dans le domaine 4 < pH < 7. Enfin, l'ajout d'une fonction alcyne sur le phénol en position 1, va permettre de greffer l'Aza-Bodipy en surface des NP par réaction de chimie click entre l'alcyne et une fonction azoture.

Par manque de temps, nous n'avons pas pu mener l'étude des propriétés spectrales de l'Aza-Bodipy synthétisé, ni son greffage en surface de NP de polylactide. Dans nos prochains travaux, nous devons donc greffer l'Aza-Bodipy en surface de NP de polylactide-b-polyéthylène glycol par cycloaddition (chimie click). Les propriétés photophysiques (fluorescence, temps de vie de fluorescence, absorption) et photoacoustiques de ces NP d'Aza-Bodipy seront étudiées dans deux solutions

tampons de pH $pH = 4$ et $pH = 7$. Enfin, le pK_A des NP d'Aza-Bodipy sera déterminé par des expériences de titration et un suivi spectrophotométrique (fluorescence et absorption).

4.6 PARTIE EXPERIMENTALE

4.6.1 Matériel

Les réactifs employés proviennent en général de la société Sigma-Aldrich ou de TCI. Le DL-lactide provient de Biovalley Polysciences Inc. (Etats-Unis). Le poly(éthylène glycol) et le poly(éthylèneglycol) azoture ont été commandés chez la société Iris Biotech GmbH (Allemagne) (OH-PEG-OCH₃, $M_n = 5000 \text{ g.mol}^{-1}$), (OH-PEG-N₃, $M_n = 5000 \text{ g.mol}^{-1}$). Les produits n'ont pas été purifiés avant utilisation. Les solvants utilisés pour les études spectroscopiques proviennent de la société Sigma-Aldrich et sont de qualité spectroscopique. De l'eau milliQ est utilisée (Merck-Millipore, France, 18.2 M Ω .cm à 20°C). Les solvants utilisés pour la synthèse de l'Aza-Bodipy ont été purifiés par le purificateur de solvant de MBraun (MBraun, SPS-800). Les intermédiaires de synthèses ont été purifiés, si nécessaire, par chromatographie flash (Reveleris® X2 flash chromatographie) sur colonne de silice (Carbo Elba, 60 Å, 70-200 μm). Les produits obtenus sont caractérisés par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) sur un appareil JEOL ECS 400 MHz. Pour la RMN du proton, le tétraméthylsilane est utilisé comme référence (0 ppm). Pour la RMN du carbone 13, le pic du solvant est utilisé comme référence (Pour CDCl₃ 77.16 ppm). Les déplacements chimiques sont par la suite indiqués en ppm et les abréviations suivantes sont employées pour désigner les multiplicités : s pour singulet, d pour doublet, t pour triplet et m pour multiplet.

Le diamètre hydrodynamique (diffusion dynamique de la lumière (DLS)), l'indice de polydispersité (PDI) et le potentiel zêta ont été mesurés à l'aide d'un Zetasizer Nano ZS avec un angle de rétrodiffusion de 173°, un laser de 632,8 nm et à une température de 25°C (Malvern, France). La moyenne sur trois mesures de taille est obtenue sur des solutions avec une dilution par 10 fois des suspensions de NP.

4.6.2 Etude du pH

4.6.2.1 Solutions tampons

Les solutions tampons ont été préparées selon la méthode présentée par McIlvaine (McIlvaine 1921). Ces solutions tampons consistent en un mélange d'une solution d'acide citrique (C₈H₈O₇) à 0,1 mol.L⁻¹ et d'une solution d'hydrogénophosphate de sodium (Na₂HPO₄) à 0,2 mol.L⁻¹. Le mélange de différents pourcentages volumiques de chaque solution permet d'obtenir des solutions tampons dont le pH varie entre 7,9 et 2,0. Afin d'atteindre des valeurs de pH plus faibles, quelques μL d'acide chlorhydrique fumant à 37% (entre 20 μL et 2 mL) ont été ajoutés

à la solution d'acide citrique à $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ pour obtenir des solutions dont les pH sont compris entre 1,6 et 0,08. Le pH des solutions obtenues a été contrôlé à l'aide d'une sonde pH-métrique (Mettler Toledo, Seven Multi™). Le pH-mètre a été étalonné par la méthode des segments à l'aide de trois solutions tampons pH = 10,01 ; pH = 7,01 et pH = 4,01. La mesure du pH est effectuée à $T = 24,7 \text{ °C}$ et l'incertitude sur le pH est estimé à $\pm 0,02 \text{ pH}$.

4.6.2.2 Bodipy [3]

Une solution mère de Bodipy [3] dans du DMSO a été obtenue par dissolution de 5,34 mg de Bodipy [3] dans 20 mL de DMSO ($C = 3,38 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$). Cette solution mère a été diluée vingt fois dans 3 mL de solution tampon aqueux de McIlvaine pour obtenir des solutions à 5% volumique de DMSO de concentration $C = 1,69 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ en Bodipy [3] avec des pH variant entre 7,0 et 0,08. Les spectres d'absorption ont été mesurés sur ces solutions à 5% volumique de DMSO. Pour l'étude de l'émission de fluorescence à différents pH, les solutions précédentes de Bodipy [3] ont été diluées dix-sept fois pour obtenir des solutions à 0,29% volumique de DMSO et de concentration $C = 9,94 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$.

4.6.2.3 NP de Bodipy [3] NP-25%

Pour les études des équilibres acido-basiques des suspensions de NP de Bodipy [3], nous avons utilisé des **NP-25%** synthétisées comme vu dans les chapitres 2 et 3. Afin d'éviter tout problème de précipitation, le cholate de sodium, tensio-actif utilisé pour la formulation en NP, a été retiré des suspensions de NP grâce à une ultracentrifugation (1h at 4°C 40 000 rotation per minute, Optima LE-80K Ultracentrifuge Beckman Coulter). Les nanoparticules sont ensuite re-suspendues dans exactement le même volume d'eau. La taille des nanoparticules est contrôlée avant et après dilution dans les solutions tampons. Pour les mesures de taille, les suspensions de NP ont été diluées dix fois dans un tampon de McIlvaine, la mesure de la taille est effectuée après agitation au vortex et repos 2-3h de la solution. La moyenne sur trois mesures de taille est obtenue. Pour les études spectroscopiques, les suspensions de NP sont diluées 10 fois puis 8,33 fois dans les tampons de McIlvaine, afin d'obtenir des absorbances $< 0,1$, nécessaires pour éviter les effets de filtre interne en émission.

4.6.2.4 Etude photophysique

Les mesures ont été effectuées dans des cuvettes 4 faces en PMMA de 10 mm de long. Les spectres d'absorption ont été enregistrés à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible Shimadzu UV-2600 et une sphère d'intégration recouverte de sulfate de baryum ISR-2600PLUS pour éliminer le signal de diffusion. Des mesures de transmission ont été effectuées, avec une acquisition directe du signal d'absorbance. Les spectres d'émission de fluorescence ont été enregistrés à l'aide d'un

spectrofluorimètre Fluoromax-4 (Jobin-Yvon ; Horiba). Les signaux d'intensité corrigés des fluctuations de la lampe et de la fonction de réponse de l'instrument (IRF) ont été enregistrés. Les solutions sont diluées pour éviter les effets de filtre interne : absorbance inférieure à 0,1 sur toute la gamme de longueurs d'onde.

Le pH des solutions a également été contrôlé directement dans les cuvettes en quartz contenant les solutions de Bodipy **[3]** et les suspensions de NP. Cette mesure a été effectuée à l'aide du pH-mètre portable Orion Star™ A121 et de la micro-électrode Orion™ 9863BN (Thermo Scientific) (étalonnage à 25°C avec trois solutions tampons pH = 10,01 ; pH = 7,01 et pH = 4,01). Aucune différence significative n'a été observée entre le pH des solutions tampons et le pH mesuré dans les cuvettes de spectroscopie.

4.6.2.5 Modélisation des diagrammes de distribution

Les modélisations mathématiques de type sigmoïde ont été réalisées sur le logiciel Origin (OriginLab), à l'aide de la fonction `slogistic1` et de l'algorithme de Levenberg-Marquardt.

4.6.2.6 Stabilité des NP

La stabilité des NP dans des solutions tampons a été évaluée par dilution dix fois dans le tampon des suspensions de NP. La mesure de taille a été observée après agitation vigoureuse au vortex puis repos des suspensions pendant 2 à 3 heures.

La stabilité des NP dans un tampon acide pH = 0,08 a également été étudiée. Les NP sont diluées dix fois dans ce tampon et on réalise une mesure de taille par DLS toutes les douze minutes.

4.6.2.7 Dosage cœur-surface des NP

Des NP **NP-5%**, **NP-25%** et **NP-50%** ont été synthétisées selon le protocole décrit dans les chapitres 2 et 3. Deux solutions tampons ont été utilisées pour cette étude : un tampon acide pH = 0,08 obtenu grâce à 2,5 mL d'acide chlorhydrique fumant 37% introduit dans 25 mL d'eau milliQ et un tampon neutre pH = 7,03 (solution tampon du pH-mètre Mettler Toledo. Pour chaque synthèse de NP, les suspensions ont été diluées dans le tampon acide et dans le tampon neutre. Les facteurs de dilutions ont été adaptés de manière à avoir des absorbances du même ordre de grandeur pour toutes les solutions $A \approx 0,1$. **NP-5%** dilution par 13,33. **NP-25%** dilution par 41,41. **NP-50%** dilution par 76,96. Les spectres d'absorption des NP ont été mesurés. Puis les spectres d'émission des NP ont été obtenus en excitant à deux longueurs d'onde différentes : 670 nm (fentes 9 nm) et 540 nm (fente 12 nm).

La concentration totale en Bodipy **[3]** présente dans chaque suspension de NP a été déterminée grâce à la mesure de l'absorbance à 757 nm pour les NP suspendues

dans le tampon pH = 7. L'utilisation de la droite d'étalonnage de la concentration de PLA-Bodipy en fonction de l'absorbance à 757 nm permet d'en déduire la concentration totale en PLA-Bodipy dans les NP.

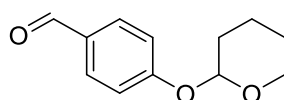
La concentration en Bodipy **[3]** en surface des NP a été déterminée grâce à une droite d'étalonnage du signal de fluorescence du Bodipy **[3]** en milieu acide. Pour cela, nous avons utilisé une solution mère de Bodipy **[3]** à $C = 1,3 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ dans 100% volumique de DMSO. La solution mère est diluée dans un tampon acide pH = 0,07. Les solutions étalons étudiées possèdent alors des concentrations comprises entre $3,2 \times 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1} < C < 1,3 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$ et des pourcentages volumiques de DMSO compris entre $0,3 \% < \%V < 1\%$. Les spectres d'émission des solutions étalons sont obtenus dans les mêmes conditions que les NP : 670 nm (fentes 9 nm) et 540 nm (fente 12 nm). La droite d'étalonnage est obtenue en traçant le signal de fluorescence intégré entre 570 nm et 720 nm en fonction de la concentration en Bodipy **[3]** dans les solutions étalons. Les concentrations en Bodipy **[3]** étant faibles, et le signal de fluorescence bruité, pour plus de précisions les mesures les signaux de fluorescence sont moyennés sur 4 à 6 mesures de spectres pour chaque concentration en Bodipy **[3]**.

Pour l'observation comparée des spectres d'émission entre solution acide et solution neutre, les signaux d'émissions ont été corrigés du signal d'absorption à la longueur d'onde d'excitation : $I_{corr} = \frac{I}{1-10^{-A}}$ avec A l'absorbance à la longueur d'onde d'excitation.

4.6.3 Synthèse de l'Aza-Bodipy

4.6.3.1 Synthèse moléculaire de l'Aza-Bodipy

4-((tétrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)benzaldéhyde (Choi et al. 2001)



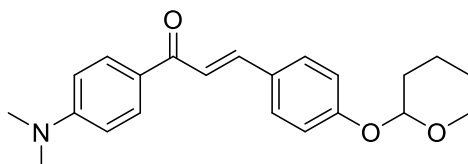
L'aldéhyde 4-hydroxybenzaldéhyde (10 g, 0,0819 mol) est mis en solution dans 130 mL de DCM avec le *p*-toluène sulfonate de pyridinium (1,646 g, 6,6 mmol). Le mélange est agité vivement à température ambiante. A côté est préparée une solution de 3,4-dihydro-2H-pyran (11,021 g, 0,1310 mol) dans 40 mL de DCM. Cette solution est ajoutée goutte à goutte dans le ballon, puis on agite le mélange pendant une heure et trente minutes à température ambiante. La phase organique est lavée avec une solution aqueuse saturée en chlorure de sodium (3x100 mL) puis séchée avec du sulfate de magnésium anhydre. On filtre et on évapore le solvant. Le produit 4-((tétrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)benzaldéhyde est obtenu avec un rendement de 90% (15,20 g, $M = 206,24 \text{ g.mol}^{-1}$) sans purification ultérieure.

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ 9.87 (s, 1H), 7.82 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.15 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 5.52 (s, 1H), 3.82 (m, 1H), 3.61 (m, 1H), 1.83-2.06 (m, 3H), 1.54-1.76 (m, 3H).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ 190.9, 162.2, 131.8, 130.4, 116.5, 96.1, 62.0, 30.0, 25.0, 18.5

RMN ¹³C DEPT135 (CDCl₃, 100 MHz): δ 190.9, 131.8, 116.5, 96.1, 62.0, 30.0, 25.0, 18.5.

(E)-1-(4-(diméthylamino)phényl)-3-(4-((tétrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)phényl)prop-2-en-1-one (Daly et al. 2017)



Le 4-((tétrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)benzaldéhyde (5 g, 30,6 mmol) et le 4-diméthylaminoacétophénone (6,32 g, 30,6 mmol) sont dissous dans 20 mL d'éthanol. La potasse est ajoutée et on laisse réagir sous agitation pendant une heure. Le précipité est récupéré par filtration, lavé et séché sous pression réduite. Le produit est obtenu avec un rendement de 91% (9,822 g, *M* = 351,45 g.mol⁻¹) sans purification ultérieure.

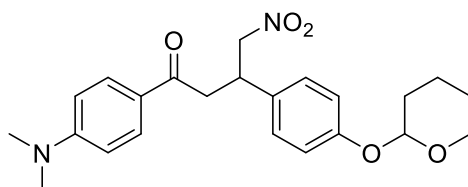
RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.99 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.75 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 7.57 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.48 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 7.07 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 6.67 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 5.46 (t, *J* = 3.2 Hz, 1H), 3.87 (m, 1H), 3.60 (m, 1H), 3.03 (s, 6H) 1.54-2.06 (m, 6H).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ 187.8, 158.6, 153.3, **142.3**, **130.7**, **129.8**, 128.9, 126.1, **120.1**, **116.6**, **110.8**, **96.1**, **62.1**, **40.0**, **30.2**, **25.1**, **18.7**.

RMN ¹³C DEPT135 (CDCl₃, 100 MHz): δ 142.4, 130.8, 129.8, 120.2, 116.7, 110.9, 96.2, 62.1, 40.2, 30.3, 25.2, 18.7.

HRMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ calculé pour C₂₂H₂₅NO₃, 351.1834; found 352.1913.

1-(4-(diméthylamino)phényl)-4-nitro-3-(4-((tétrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)phényl)butan-1-one (Daly et al. 2017)



On dissout la crotonone (9,322 g, 26,5 mmol), le nitrométhane (16,19 g, 0,265 mol) et la *N,N*-diéthylamine (9,7 g, 0,1326 mol) dans 60 mL de méthanol. Le mélange est porté à reflux pendant 10 heures, puis est ramené à température ambiante. Le solvant

est évaporé. Le produit brut est analysé par cChromatographie sur Couche Mince (CCM, éther de pétrole (EP)/Acétate d'éthyle (AE) 50/50 $R_f = 0,71$). Le produit brut est purifié par chromatographie flash sur silice (EP/AE 22% à 45%). Le produit pur est obtenu avec un rendement de 50% (5,471 g, $M = 412,49 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$).

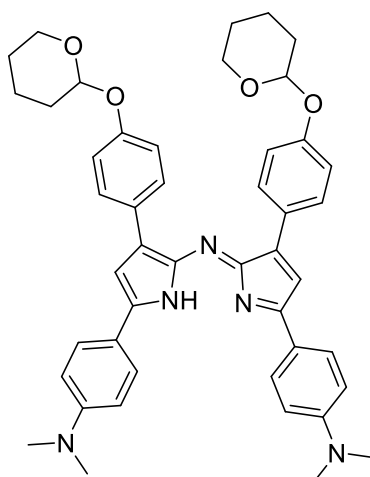
RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.89 (d, $J = 8.7 \text{ Hz}$, 2H), 7.25 (d, $J = 8.7 \text{ Hz}$, 2H), 7.06 (d, $J = 8.7 \text{ Hz}$, 2H), 6.68 (d, $J = 8.7 \text{ Hz}$, 2H), 5.43 (m, 1H), 4.88 (m, 1H), 4.67 (m, 1H), 4.21 (m, 1H), 3.94 (m, 1H), 3.64 (m, 1H), 3.33 (m, 2H), 3.10 (s, 6H) 1.60-2.10 (m, 6H).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz): δ 194.9, 156.5 (d), 153.7, 132.6, **130.4**, **128.5**, 124.4, **116.8 (d)**, **110.7**, **96.4 (d)**, **80.0**, **62.2**, **41.0**, **40.1**, **39.1**, **30.4**, **25.3**, **18.9**.

RMN ^{13}C DEPT135 (CDCl_3 , 100 MHz): δ 130.4, 128.5, 116.9, 116.8, 110.7, 96.4, 96.3, 80.0, 62.1, 41.0, 40.1, 39.1, 30.4, 25.3, 18.9.

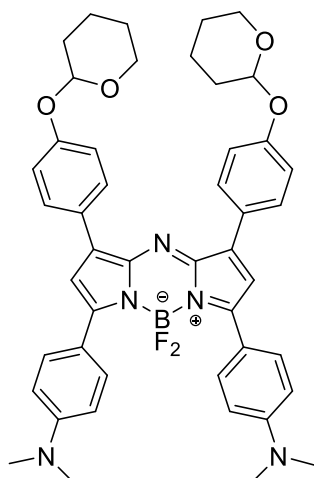
HRMS (ESI) m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculé pour $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_5$, 412.1998; trouvé 413.2076.

(Z)-4-(2-((5-(4-(diméthylamino)phényl)-3-(4-((tétrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)phényl)-1H-pyrrol-2-yl)imino)-3-(4-((tétrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)phényl)-2H-pyrrol-5-yl)-N,N-diméthylaniline (Daly et al. 2017)



Le composé nitré (5,418 g, 13,1 mmol) et l'acétate d'ammonium (50 g, 0,649 mol) sont mis en solution dans 100 mL d'éthanol. Le mélange est porté à reflux pendant 24 heures, puis ramené à température ambiante. Les trois-quarts du solvant sont évaporés, puis le brut réactionnel est mis à refroidir dans un bain de glace. Le précipité est filtré et lavé à l'eau froide puis séché sous pression réduite. Le produit est obtenu avec un rendement de 71% (6,863 g, $M = 735,93 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) et utilisé dans l'étape suivante sans purification supplémentaire.

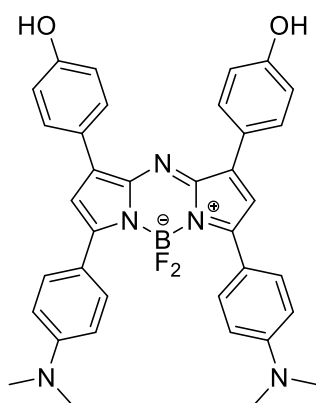
4,4'-(5,5-difluoro-1,9-bis(4-((tétrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)phényl)-5H-4l4,5l4-dipyrrolo[1,2-c:2',1'-f][1,3,5,2]triazaborinine-3,7-diyl)bis(N,N-diméthylaniline)
(Daly et al. 2017)



La molécule de type aza-dipyrine (4,850 g, 6,59 mmol) et la *N*-éthyl-*N,N*-diisopropylamine (8,517 g, 65,9 mmol) sont mises en solution dans du DCM et sous atmosphère d'Argon. Le mélange est agité pendant 15 minutes. On porte la solution à 0°C puis le l'éthérate de trifluorure de bore est ajouté au goutte à goutte. La solution est ramenée à température ambiante et l'agitation est poursuivie pendant une journée. Le mélange réactionnel est ensuite dilué dans du DCM (10 mL) puis lavé à l'eau. La phase organique est séchée et évaporée à sec. CCM EP/AE 50/50 $R_f = 0,86$. Le brut réactionnel est purifié sur une courte colonne de chromatographie (éluant : DCM/méthanol 4/1 v/v). Le produit Aza-Bodipy purifié est obtenu avec un rendement de 43% (2,234 g, $M = 783,73 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$).

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 8.03 (d, $J = 8.7 \text{ Hz}$, 4H), 7.87 (d, $J = 8.7 \text{ Hz}$, 4H), 7.40 (s, 2H), 7.09 (d, $J = 8.7 \text{ Hz}$, 4H), 6.93 (d, $J = 8.7 \text{ Hz}$, 4H), 5.57 (s, 2H), 3.81 (m, 2H), 3.61 (m, 2H), 3.07 (s, 12H), 1.75-1.95 (m, 6H), 1.52-1.69 (m, 6H)

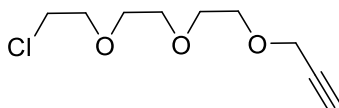
4,4'-(3,7-bis(4-(diméthylamino)phényl)-5,5-difluoro-5H-4l4,5l4-dipyrrolo[1,2-c:2',1'-f][1,3,5,2]triazaborinine-1,9-diyl)diphénol



L'Aza-Bodipy protégé (2,1 g, 2,68 mmol) est mis en solution dans 300 mL de méthanol avec l'acide *p*-toluènesulfonique (231 mg, 1,34 mmol). Le mélange est agité à température ambiante pendant 15 heures. Le solvant est ensuite évaporé puis le brut est repris dans du DCM. La phase organique est séchée et évaporée à sec. Le produit est purifié sur une courte colonne chromatographique (éluant EP/AE de 1% à 100%). Le produit pur est obtenu avec un rendement de 26% (430 mg, 615,49 g.mol⁻¹). La RMN est conforme à celle de la littérature (Daly et al. 2017).

RMN ¹H (DMSO-d₆, 400 MHz): δ 7.97 (d, J = 8.7 Hz, 4H), 7.87 (d, J = 8.7 Hz, 4H), 7.32 (s, 2H), 6.94 (d, J = 8.7 Hz, 4H), 6.84 (d, J = 8.7 Hz, 4H), 3.07 (s, 12H).

3-(2-(2-(2-chloroéthoxy)éthoxy)éthoxy)prop-1-yne (Tokunaga et al. 2020)

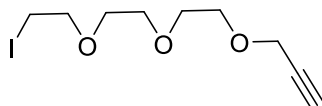


Une solution de 2-(2-(2-chloroéthoxy)éthoxy)éthan-1-ol (5 g, 29,7 mmol) est préparée dans 50 mL de tétrahydrofurane sec. La solution est portée à 0°C sous atmosphère d'argon. L'hydrure de sodium (0,97 g, 59,3 mmol) est ajouté lentement puis on laisse sous agitation pendant 30 minutes. Le bromure de propargyle est ajouté (2,970 g, 2,7 mL, 29,7 mmol) au goutte-à-goutte puis le mélange est laissé sous agitation pendant 2 heures à 0°C. Après retour à température ambiante, l'agitation est poursuivie pendant une nuit. Le mélange réactionnel est ensuite hydrolysé puis extrait au DCM (trois fois). La phase organique est séchée, filtrée puis évaporée à sec. On obtient une huile jaune. CCM EP/éther diéthylique 80/20, R_f = 0,44, révélation KMnO₄. Le produit est purifié par chromatographie flash. Le produit est obtenu avec 70 % de rendement (4,26 g, M = 206,67 g.mol⁻¹). La RMN du produit pur est identique à celle de la littérature (Tokunaga et al. 2020).

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ 4.21 (d, *J* = 2.3 Hz, 2H), 3.77 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.72–3.67 (m, 8H), 3.64 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 2.43 (t, *J* = 2.3 Hz, 1H).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ 79.8, 74.7, 71.5, 70.8, 70.7, 70.6, 69.2, 58.5, 42.9.

3-(2-(2-(2-iodoéthoxy)éthoxy)éthoxy)prop-1-yne (Tokunaga et al. 2020)

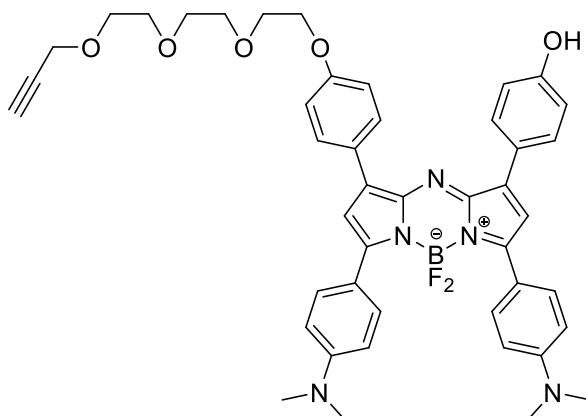


L'iodure de sodium a été mis à sécher à l'étuve la veille de la réaction. Le chloroalcyne (4,260 g, 20,6 mmol) et l'iodure de sodium (12,358 g, 82,5 mmol) sont mis en solution dans l'acétonitrile anhydre. Le mélange réactionnel est porté à reflux pendant 6 heures. Après retour à température ambiante, les sels sont filtrés et le solvant est évaporé. Le brut réactionnel est repris dans 100 mL de DCM puis lavé à l'eau deux fois. La phase organique est séchée et le solvant est évaporé. CCM EP/éther diéthylique 80/20 *R_f* = 0,46, révélation KMnO₄. Le produit est obtenu avec un rendement de 88% (5,393 g, *M* = 298,12 g.mol⁻¹). La RMN du produit pur est identique à celle de la littérature (Tokunaga et al. 2020).

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ 4.22 (d, *J* = 2.3 Hz, 2H), 3.76 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 3.66–3.72 (m, 8H), 3.27 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 2.44 (t, *J* = 2.3 Hz, 1H).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ 79.8, 74.7, 72.1, 70.6, 70.6, 70.3, 69.2, 58.6, 3.1.

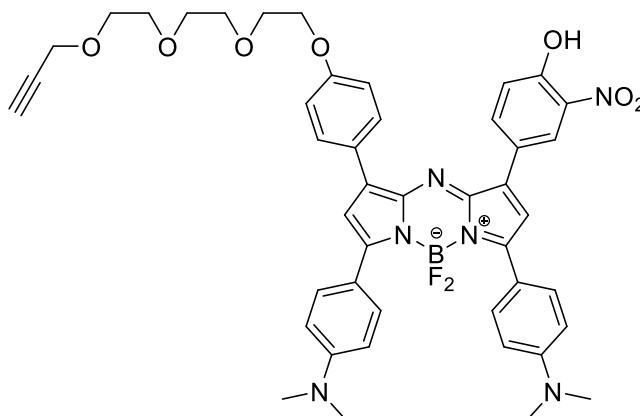
4-(3,7-bis(4-(diméthylamino)phényl)-5,5-difluoro-9-(4-(2-(2-(2-(prop-2-yn-1-yloxy)éthoxy)éthoxy)éthoxy)phényl)-5H-4H,5H-dipyrrolo[1,2-c:2',1'-f][1,3,5,2]triazaborinin-1-yl)phénol (Grossi et al. 2016)



L'Aza-Bodipy déprotégé (122mg, 0,198 mmol) et le fluorure de césium (200 mg, 0,99 mmol) sont dissous dans 5 mL de DMSO. Le mélange est agité à 30°C sous atmosphère de diazote pendant 10 min. L'iodoalcyne (223 mg, 0,34 mmol) est ensuite ajouté à la seringue et la solution est agitée à 30°C pendant 20 minutes. La solution est ensuite diluée dans 75 mL d'acétate d'éthyle et 75 mL de tampon phosphate salin (pH = 7). La phase organique est séparée et lavée trois fois à l'eau puis une fois avec une solution aqueuse saturée en chlorure de sodium (50 mL). La phase organique est séchée, filtrée et évaporée à sec. CCM 7/3 AE/EP $R_f = 0,76$ pour le produit mono-alkylé et $R_f = 0,88$ pour le produit di-alkylé. Le produit brut est purifié par chromatographie flash sur colonne de silice (éluant DCM/acétate d'éthyle 99/1 à 90/10 v/v). On obtient l'Aza-Bodipy mono O-alkylé avec un rendement de 48% (75 mg, $M = 785,71 \text{ g.mol}^{-1}$).

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δ 8.05 (m, 4H), 7.85 (m, 4H), 7.03 (d, $J=8.7 \text{ Hz}$, 2H), 6.97 (d, $J=7.8 \text{ Hz}$, 4H), 6.83 (d, $J=8.7 \text{ Hz}$, 2H), 4.23-4,21 (m, 4H), 3.77 (t, $J=4.9\text{Hz}$, 2H), 3.75-3.66 (m, 8H), 3.09 (s, 12H), 2.43 (t, $J=2.3 \text{ Hz}$, 1H)

4-(3,7-bis(4-(diméthylamino)phényl)-5,5-difluoro-9-(4-(2-(2-(2-(prop-2-yn-1-yloxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)phényl)-5H-4I4,5I4-dipyrrolo[1,2-c:2',1'-f][1,3,5,2]triazaborinin-1-yl)-2-nitrophenol (Grossi et al. 2016)



L'Aza-Bodipy mono O-alkylé (75 mg, 0,095 mmol) est mis en solution dans l'acétonitrile (5 mL) et chauffé à reflux pendant 5 minutes. On ajoute une solution (1 mL d'eau) contenant un mélange d'hydrogénosulfate de potassium KHSO_4 (32mg, 0,24 mmol) et de nitrate de potassium (14,5 mg, 0,14 mmol) dans le mélange réactionnel. On chauffe à reflux pendant 5 minutes puis on laisse revenir à température ambiante. On ajoute 150 mL d'acétate d'éthyle et 75 mL d'eau. La phase organique est séparée et lavée à l'eau et avec une solution aqueuse saturée en chlorure de sodium. La phase organique est ensuite séchée, filtrée et évaporée à sec. Le produit brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (EP/acétate d'éthyl de 0 à 100%). Le produit est obtenu avec un rendement de 25% (20 mg, $M = 830,70 \text{ g.mol}^{-1}$).

RMN ^1H (CD_3COCD_3 , 400 MHz): δ 8.10 (m, 3H), 7.86-8.00 (m, 4H), 7.25 (m, 2H), 7.03 (d, $J=8.7$ Hz, 2H), 6.91 (d, $J=7.8$ Hz, 4H), 6.82 (d, $J=8.7$ Hz, 2H), 4.22 (t, $J=4.8$ Hz, 2H), 4.17 (d, $J=2.8$ Hz, 2H), 3.86 (t, $J=4.9$ Hz, 2H), 3.57-3.70 (m, 8H), 3.09 (s, 12H), 2.92 (t, $J=2.3$ Hz, 1H)

4.6.3.2 Spectrométrie de masse

Les données de spectrométrie de masse à haute résolution (HRMS) ont été obtenues auprès du laboratoire de spectrométrie de masse de l'ICSN-CNRS à Gif-sur-Yvette (France).

4.6.4 Synthèse du PLA-PEG- N_3

Le polymère de polylactide-poly(éthylène glycol) azoture a été synthétisé par polymérisation par ouverture de cycle (ROP) sur un DL-lactide en utilisant le PEG comme amorceur (Houvenagel et al. 2017). Nous avons introduit le OH-PEG- N_3 (475 mg, 0,095 mmol, 5000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) dans un Schlenk ainsi que le DL-lactide racémique 945 mg, 6,6 mmol, 144 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$). Dans un autre Schlenk, deux gouttes 2-éthylhexanoate d'étain (II) ($\text{Sn}(\text{Oct})_2$) (0,070 g, $1,7 \times 10^{-4}$ mol, 405 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) et 3 mL de toluène anhydre ont été ajoutés. 2 mL de la solution $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ ($C = 23,3$ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) a ensuite été introduite dans le Schlenk contenant le PEG. Le Schlenk réactionnel a ensuite été chauffé dans un bain d'huile à 130°C pendant 2 heures sous argon. La réaction est arrêtée par un bain de glace et le toluène est évaporé pendant 30 min sur la rampe à vide. Le solide obtenu a été dissous dans le strict minimum de chloroforme puis on fait précipiter le soluté dans 80 mL d'éther diéthylique froid sous agitation vigoureuse. Le surnageant est éliminé par centrifugation (5000 rotations par minute, 4°C) et le solide dissous dans un minimum de tétrahydrofurane. Le soluté précipite dans 80 ml d'eau distillée sous agitation vigoureuse. Le surnageant est éliminé par centrifugation (5000 rotations par minute, 4°C), et le solide est lyophilisé (3 ou 4 jours) pour obtenir le polymère final PLA-PEG $_{5000}$ - N_3 (530 mg, 10 800 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$, 52%).

Les indices de polymérisation ont été déterminés par intégration du signal RMN. Pour le PLA-PEG $_{5000}$ - N_3 , l'intégration du signal à 3,64 ppm (proton de la chaîne principale CH_2 du PEG) a été comparée au signal à 5,15 ppm (CH de la partie lactyle). Le poids moléculaire du polymère a été déduit du degré de polymérisation (Liu et al. 2018).

PLA-PEG $_{5000}$ - N_3 : ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 5.16 (m, 1H, CH), 4.36 (q, 1H, CH), 3,64 (s, 2, 5,64H, CH_2CH_2), 1.56 (m, 2,8, CH_3).

La Chromatographie d'exclusion stérique a été réalisée avec deux colonnes de Polymer Laboratories (PL-gel MIXED-D 300 7,5 mm, diamètre des billes 5 m ; partie linéaire 200 à 4 000 000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$). Les analyses ont été effectuées à 34 °C dans du

chloroforme (qualité HPLC) à un débit de 1 mL.min⁻¹. Le toluène a été utilisé comme marqueur de débit. Les échantillons ont été filtrés avec un filtre PTFE de 0,2 µm avant l'analyse. Un détecteur d'indice de réfraction différentiel (Spectrasystem RI-150, Thermo Electron Corp.). La courbe d'étalonnage utilise des étalons de poly(méthacrylate de méthyle) (PMMA) (plage 625-625 500 g.mol⁻¹) de Polymer Laboratories. Le logiciel Analysis a permis de déterminer la masse moléculaire moyenne en nombre Mn, la masse moléculaire moyenne en poids Mw et la dispersité ($\bar{D} = Mw/Mn$).

4.7 ANNEXE

4.7.1 Annexe 1 : Précipitation du Bodipy **[3]** en milieu acide

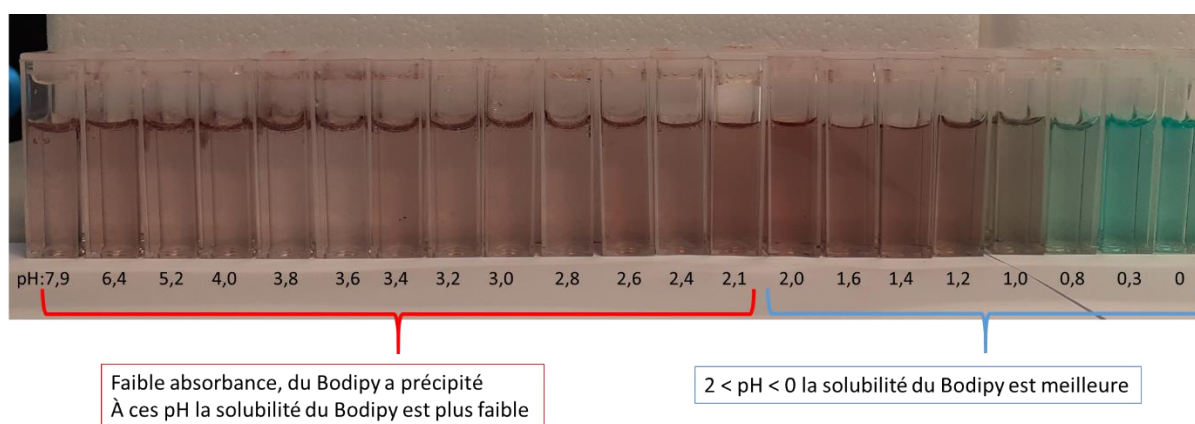


Figure 4.32 : Photographie des solutions de Bodipy **[3]** à $C = 1,69 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ dans un mélange 5%/95% volumique de DMSO/tampon aqueux de type McIlvaine. Solutions dont les pH sont compris entre $0 < \text{pH} < 7,9$.

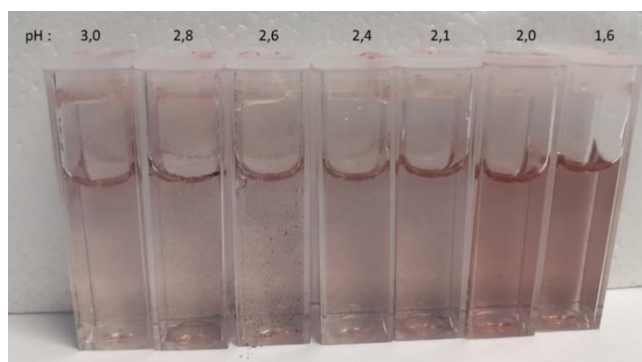


Figure 4.33 : Photographie des solutions de Bodipy **[3]** à $C = 1,69 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ dans un mélange 5%/95% volumique de DMSO/tampon aqueux de type McIlvaine. $1,6 < \text{pH} < 3$.

Sur l'image, on peut observer que le Bodipy précipite pour les solutions tampons comprises entre pH = 7,9 et pH = 2. Pour ces solutions, on peut déceler la présence de particules solides en solution qui flottent en surface. Pour les solutions à pH 2,0 et 1,6 (figure 4.33), les particules en suspension ne sont plus visibles et la couleur des solutions est beaucoup plus sombre. Pour ces pH, la solubilité du Bodipy semble avoir augmentée, il est plus soluble et il n'y a plus de précipitation : la solution absorbe donc plus.

L'augmentation de la solubilité du Bodipy **[3]** avec le pH peut provenir de la formation d'espèces ioniques du Bodipy : AH_2^{2+} et AH^+ , plus polaires et donc potentiellement plus solubles en milieu aqueux que le Bodipy sous forme zwitterionique A (figure 4.7).

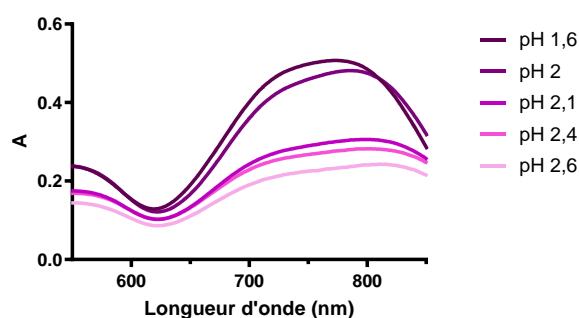


Figure 4.34 : Spectres d'absorption des solutions de Bodipy **[3]** dans un mélange 5%/95% volumique de DMSO/tampon aqueux de type McIlvaine. $C = 1,69 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$. $1,6 \leq \text{pH} \leq 2,6$.

L'observation des spectres d'absorption du Bodipy **[3]** à des pH supérieurs à 2,0 nous renseigne, comme vu sur les photographies (figures 4.32 et 4.33), sur la présence de précipitation. En effet, on observe une diminution importante de l'absorbance aux pH supérieurs à 2 (figure 4.34). Il faut donc bien se restreindre aux solutions avec $\text{pH} \leq 2$.

4.7.2 Annexe 2 : Attribution des bandes d'absorption et d'émission du Bodipy **[3]** dans le mélange tampon/DMSO

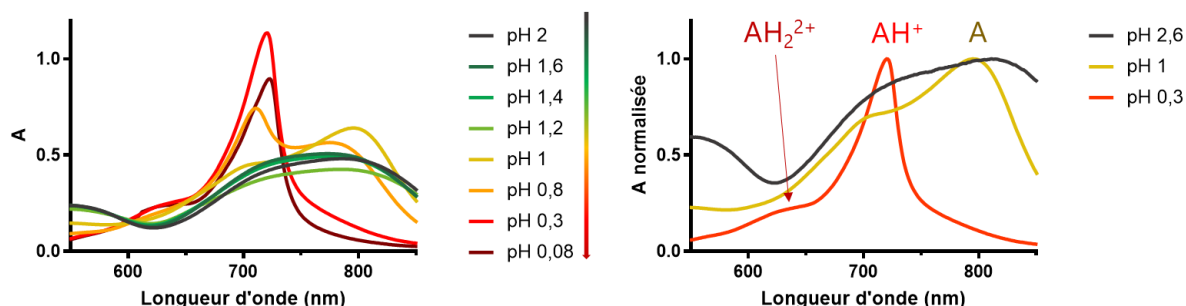


Figure 4.13 : (Gauche) Spectres d'absorption des solutions de Bodipy **[3]** dans un mélange 5%/95% volumique de DMSO/tampon aqueux de type McIlvaine. $C = 1,69 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$. (Droite) Spectres d'absorption normalisés des solutions de pH = 2,6 (noir) ; pH = 1 (jaune) et pH = 0,3 (rouge).

Pour les spectres obtenus, deux bandes d'absorption sont remarquables : une bande avec un maximum vers 795 nm et une autre bande vers 721 nm. Ces deux bandes rappellent les bandes à 751 nm et 658 nm, obtenues dans du DCM, que l'on avait attribuées respectivement à A et AH⁺ (tableau 4.1). Comme pour les spectres obtenus dans le DCM, la position de la bande associée à l'espèce AH⁺ est située au niveau de l'épaule vibronique de la bande associée à A (figure 4.5 et figure 4.13). Les bandes d'absorption sont décalées vers le rouge par rapport aux bandes obtenues dans du DCM. Cela peut s'expliquer par le solvatochromisme positif du Bodipy **[3]** (vu au chapitre 3). Dans un solvant plus polaire, comme le mélange tampon /DMSO, les spectres d'absorption sont décalés vers le rouge. Les caractéristiques de ces deux bandes sont indiquées dans le tableau 4.7. Comme pour les expériences dans le DCM, la bande correspondant à AH⁺ (721 nm) est plus étroite (890 cm^{-1}) que celle associée à A (721 nm, 3360 cm^{-1}). De plus, la bande à 721 nm possède une largeur spectrale, 890 cm^{-1} , proche de celle obtenue dans du DCM (1000 cm^{-1}). Ce n'est cependant pas le cas pour la bande d'absorption associée à A, qui est presque deux fois plus large que celle obtenue dans du DCM. L'espèce A étant potentiellement la moins soluble, des déformations spectrales par agrégation peuvent expliquer cette différence (théorie de l'exciton, (Kasha 1950; Vu et al. 2013)). De plus, aux pH étudiés, la coexistence de A et AH⁺ et le fort recouvrement spectral des deux bandes d'absorption, peuvent modifier la forme et la position des bandes associées à chaque espèce. Pour la bande associée à A, l'absorbance maximale est obtenue pour la solution à pH = 1. Pour la bande associée AH⁺, c'est la solution à pH = 0,3 qui absorbe le plus.

La bande d'absorption associée à l'espèce AH₂²⁺ est difficilement décelable. Elle doit être décalée vers le bleu par rapport aux deux autres bandes et son signal doit

être maximal aux pH les plus acides (pH =0,08). Vers 630 nm, on observe la présence d'un léger épaulement pour les solutions aux pH les plus acides. Cet épaulement est maximal pour un pH de 0,08. On suppose donc que cette bande d'absorption est associée à l'espèce AH_2^{2+} . Les attributions des bandes sont résumées figure 4.13 et tableau 4.7.

$\lambda_{abs,max}$ (nm)	LMH (cm^{-1})	LMH (nm)	Espèce
795	$3360 \pm 15 cm^{-1}$	174 ± 1	A
721	$890 \pm 15 cm^{-1}$	45 ± 1	AH^+
~ 630	-	-	AH_2^{2+}

Tableau 4.7 : Caractéristiques spectrales des bandes d'absorption du Bodipy **[3]** dans tampon pH/DMSO 5%/95% $C = 1,69 \times 10^{-5} mol.L^{-1}$. LHM : Largeur à mi-hauteur de la bande.

$\lambda_{em,max}$ (nm)	LMH (cm^{-1})	LMH (nm)	espèce
-	-	-	A
665	-	-	AH^+
614	$1000 \pm 15 cm^{-1}$	38 ± 1	AH_2^{2+}

Tableau 4.3 : Propriétés spectrales des bandes d'émission du Bodipy **[3]** dans le tampon 0,3%/99,7% volumique de DMSO/tampon aqueux de type McIlvaine. $C = 9,94 \times 10^{-7} mol.L^{-1}$. LHM : Largeur à mi-hauteur de la bande.

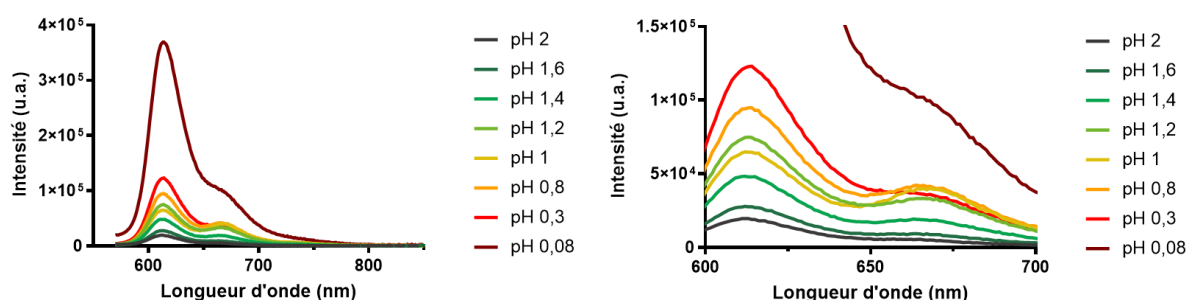


Figure 4.15 : (Gauche) Spectres d'émission des solutions de Bodipy **[3]** dans un mélange 0,3%/99,7% volumique de DMSO/tampon aqueux de type McIlvaine. $C = 9,94$

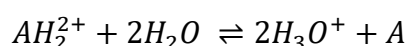
$\times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$. Pour toutes les solutions l'absorbance maximale est inférieure à 0,1. Excitation 540 nm, largeur de fente 4,9 nm. (Droite) Mêmes spectres d'émission, zoom entre 660 et 700 nm.

Si les positions des bandes d'émission sont en assez bon accord avec les spectres dans le DCM, ce n'est pas le cas pour les spectres d'absorption. De plus, les positions des maxima d'absorption associés à chaque espèce, sont plus hautes en longueur d'onde que les maxima d'émission (tableau 4.3 et 4.7). Pour AH^+ , on observe une absorption à 721nm et une émission à 665 nm. Pour AH_2^{2+} , on observe une absorption à 795nm et une émission à 614 nm. Ce phénomène est contraire à la loi de Stokes : la longueur d'onde d'émission est toujours plus grande que celle d'absorption (Valeur et Berberan-Santos 2013). Cependant, la très faible solubilité du Bodipy **[3]**, la forte concentration utilisée pour les expériences d'absorption ($C = 1,69 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) et le faible pourcentage volumique de DMSO (5%) sont favorables aux déformations spectrales par diffusion et à la formation de nano-agrégats de Bodipy **[3]**. C'est le phénomène que nous avons mis en évidence dans le chapitre 3 pour les expériences de reprecipitation du Bodipy **[3]** dans des mélanges eau/THF. La formation de nano-agrégats de type J est susceptible de décaler les spectres des espèces vers le rouge et peut expliquer que les spectres d'absorption soient décalés vers le rouge. La plus faible fluorescence de ces agrégats et la plus forte fluorescence des espèces protonées du Bodipy limitent leur influence sur les spectres d'émission.

4.7.3 Annexe 3 : Equations acide base et dosage

4.7.3.1 Dosage simultanée des deux acidités

On étudie donc l'équilibre suivant :



De constante d'équilibre :

$$K = K_{A1}K_{A2} = \frac{[H_3O^+]_{\text{éq}}^2 [A]_{\text{éq}}}{[AH_2^{2+}]_{\text{éq}}}$$

$$pK = pK_{A1} + pK_{A2}$$

$$\%AH_2^{2+} = \frac{[AH_2^{2+}]_{\text{éq}}}{[AH_2^{2+}]_{\text{éq}} + [A]_{\text{éq}} + [AH^+]_{\text{éq}}} \times 100$$

On suppose que l'espèce AH^+ est une espèce observable sur un domaine très restreint de pH et qu'aux pH étudiés sa concentration est négligeable devant celles de A et AH_2^{2+} . On en déduit :

$$AH_2^{2+} = \frac{1}{1 + \frac{[A]_{\acute{e}q}}{[AH_2^{2+}]_{\acute{e}q}}} \times 100 = \frac{1}{1 + \frac{K}{[H_3O^+]_{\acute{e}q}^2}} = \frac{1}{1 + 10^{-pK+2pH}}$$

On en déduit :

$$\%AH_2^{2+} = \frac{1}{1 + 10^{2(pH - \frac{pK}{2})}} \times 100$$

On obtient de la même manière :

$$\%A = \frac{1}{1 + 10^{2(\frac{pK}{2} - pH)}} \times 100$$

Par ailleurs en utilisant la loi de Beer-Lambert, l'absorbance de la solution à une longueur d'onde donnée est :

$$A(\lambda) = \varepsilon_A l [A]_{\acute{e}q} + \varepsilon_{AH_2^{2+}} l [AH_2^{2+}]_{\acute{e}q}$$

Si l'on travaille à un pH où seulement la base est présente l'absorbance s'exprime selon :

$$A_A(\lambda) = \varepsilon_A l C_t$$

Avec C_t la concentration totale en solution. De la même manière, s'il existe un pH tel que seule la forme diacide est présente

$$A_{AH_2^{2+}}(\lambda) = \varepsilon_{AH_2^{2+}} l C_t$$

Sachant que :

$$C_t = [A]_{\acute{e}q} + [AH_2^{2+}]_{\acute{e}q}$$

On en déduit que :

$$A(\lambda) = \varepsilon_A l [A]_{\acute{e}q} + \varepsilon_{AH_2^{2+}} l (C_t - [A]_{\acute{e}q}) = l [A]_{\acute{e}q} (\varepsilon_A - \varepsilon_{AH_2^{2+}}) + A_{AH_2^{2+}}(\lambda)$$

De la même manière on obtient :

$$A(\lambda) = \varepsilon_{AH_2^{2+}} l [AH_2^{2+}]_{\acute{e}q} + \varepsilon_A l (C_t - [AH_2^{2+}]_{\acute{e}q}) = l [AH_2^{2+}]_{\acute{e}q} (\varepsilon_{AH_2^{2+}} - \varepsilon_A) + A_A(\lambda)$$

On en déduit les deux relations suivantes :

$$[A]_{\acute{e}q} = \frac{A(\lambda) - A_{AH_2^{2+}}(\lambda)}{l(\varepsilon_A - \varepsilon_{AH_2^{2+}})}$$

$$[AH_2^{2+}]_{\acute{e}q} = \frac{A(\lambda) - A_A(\lambda)}{l(\varepsilon_{AH_2^{2+}} - \varepsilon_A)}$$

On peut alors avoir accès aux proportions avec :

$$\%AH_2^{2+} = \frac{100 \times [AH_2^{2+}]_{\acute{e}q}}{C_t} = \frac{100 \times (A(\lambda) - A_A(\lambda))}{C_t l(\varepsilon_{AH_2^{2+}} - \varepsilon_A)} = \frac{A(\lambda) - A_A(\lambda)}{A_{AH_2^{2+}}(\lambda) - A_A(\lambda)} \times 100$$

$$\%A = \frac{100 \times [A]_{\acute{e}q}}{C_t} = \frac{100 \times (A(\lambda) - A_{AH_2^{2+}}(\lambda))}{C_t l(\varepsilon_A - \varepsilon_{AH_2^{2+}})} = \frac{A(\lambda) - A_{AH_2^{2+}}(\lambda)}{A_A(\lambda) - A_{AH_2^{2+}}(\lambda)} \times 100$$

$$\%AH_2^{2+} = \frac{1}{1 + 10^{2(pH - \frac{pK}{2})}} \times 100 = \frac{A(\lambda) - A_A(\lambda)}{A_{AH_2^{2+}}(\lambda) - A_A(\lambda)} \times 100$$

$$\%A = \frac{1}{1 + 10^{2(\frac{pK}{2} - pH)}} \times 100 = \frac{A(\lambda) - A_{AH_2^{2+}}(\lambda)}{A_A(\lambda) - A_{AH_2^{2+}}(\lambda)} \times 100$$

La courbe de distribution des espèces peut alors être modélisée par deux fonctions sigmoïdes d'équation :

$$\%AH_2^{2+} = \frac{1}{1 + 10^{n(pH - \frac{pK}{n})}} \times 100$$

$$\%A = \frac{1}{1 + 10^{n(-pH + \frac{pK}{n})}}$$

La valeur de n renseigne sur le nombre effectif de protons qui ont réagi. Si on dose bien simultanément les deux acidités la valeur de n doit être proche de 2. La valeur de pK nous renseigne sur la somme des deux pK_A du Bodipy.

Pour plus de détail le lecteur peut se référer à la référence suivante : (PIARD et al. 2019).

4.7.4 Annexe 4 : suivi du signal de fluorescence du Bodipy [3] à 697 nm dissous dans les solutions tampons.

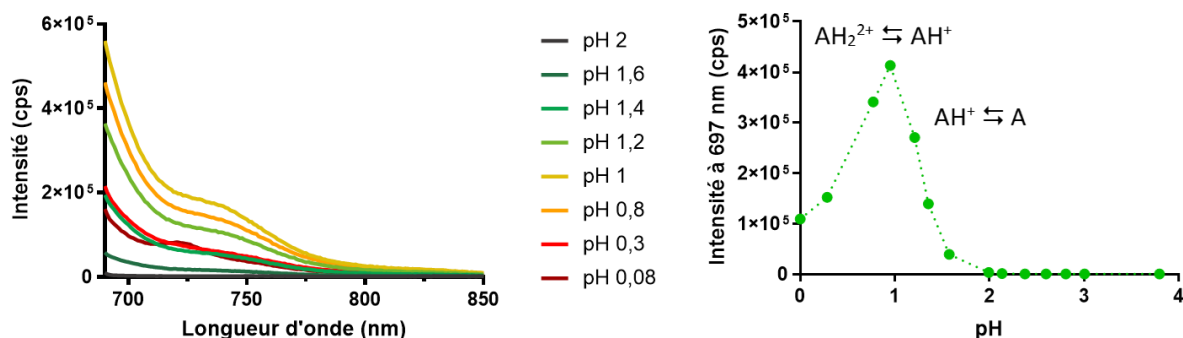


Figure 4.35 : (Gauche) Spectres d'émission des solutions de Bodipy [3] dans un mélange 0,3%/99,7% volumique de DMSO/tampon aqueux de type McIlvaine. $C = 9,94 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$. Pour toutes les solutions l'absorbance maximale est inférieure à 0,1. Excitation 670 nm, largeur de fente 12 nm. (Droite) Evolution du signal de fluorescence à 697 nm en fonction du pH (excitation 670 nm, largeur de fente 12 nm).

Dans l'objectif d'observer spécifiquement l'évolution de la concentration de AH^+ , nous avons tracé le spectre d'émission du Bodipy [3] en excitant à 670 nm (figure 4.35 gauche). Le signal de fluorescence est maximal à 690 nm et pour une solution de $\text{pH} = 1,0$ (courbe jaune). Cette longueur d'onde est proche du maximum d'émission de l'espèce AH^+ (tableau 4.3). On étudie l'évolution du signal de fluorescence à 697 nm, où l'émission de AH_2^{2+} peut être le plus minimisée, en fonction du pH (figure 4.35 droite). Entre le $\text{pH} = 3,7$ et $2,1$, le signal de fluorescence est très faible. L'espèce AH^+ n'est pas présente. Puis, entre $\text{pH} = 2,0$ et $\text{pH} = 1,0$, le signal de fluorescence augmente, le Bodipy [3] sous forme basique A est transformé en AH^+ . Aux pH inférieurs à 1,0, la fluorescence à 697 nm diminue, l'espèce AH^+ est transformée en AH_2^{2+} beaucoup moins fluorescente à la longueur d'onde étudiée (697 nm). Comme observé avec les précédents spectres d'émission (figure 4.35), l'espèce AH^+ est prédominante aux pH proches de 1,0. Nous en déduisons que le $\text{pK}_{\text{A}1}$ est inférieur à 1 et que le $\text{pK}_{\text{A}2}$ est supérieur à 1 (figure 4.18).

4.8 BIBLIOGRAPHIE

Baruah, Mukulesh, Wenwu Qin, Cristina Flors, Johan Hofkens, Renaud A. L. Vallée, David Beljonne, Mark Van der Auweraer, Wim M. De Borggraeve, et Noël Boens. 2006. « Solvent and pH Dependent Fluorescent Properties of a Dimethylaminostyryl Borondipyrromethene Dye in Solution ». *The Journal of Physical Chemistry A* 110 (18): 5998-6009. <https://doi.org/10.1021/jp054878u>.

- Casalini, Tommaso, Filippo Rossi, Andrea Castrovinci, et Giuseppe Perale. 2019. « A Perspective on Polylactic Acid-Based Polymers Use for Nanoparticles Synthesis and Applications ». *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 7. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fbioe.2019.00259>.
- Casey, Joseph R., Sergio Grinstein, et John Orlowski. 2010. « Sensors and Regulators of Intracellular PH ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11 (1): 50-61. <https://doi.org/10.1038/nrm2820>.
- Choi, Dong Hoon, Sang Joon Oh, Hyo Bok Cha, et Joon Youl Lee. 2001. « Photochemically Bifunctional Epoxy Compound Containing a Chalcone Moiety ». *European Polymer Journal* 37 (10): 1951-59. [https://doi.org/10.1016/S0014-3057\(01\)00102-1](https://doi.org/10.1016/S0014-3057(01)00102-1).
- Clark, James H. 1980. « Fluoride ion as a base in organic synthesis ». *Chemical Reviews* 80 (5): 429-52. <https://doi.org/10.1021/cr60327a004>.
- Clayden, Jonathan, Nick Greeves, et Stuart Warren. 2012. *Organic Chemistry*. OUP Oxford.
- Daly, Harrison C., Gonzalo Sampedro, Corentin Bon, Dan Wu, Ghazi Ismail, Ronan A. Cahill, et Donal F. O'Shea. 2017. « BF₂-Azadipyromethene NIR-Emissive Fluorophores with Research and Clinical Potential ». *European Journal of Medicinal Chemistry* 135 (juillet): 392-400. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.04.051>.
- Delaire, Jacques, Jonathan Piard, Rachel Méallet-Renault, et Gilles Clavier. 2017. *Photophysique et photochimie: Des fondements aux applications*. EDP Sciences.
- Deniz, Erhan, G. Ceyda Isbasar, O. Altan Bozdemir, Leyla T. Yildirim, Aleksander Siemiarczuk, et Engin U. Akkaya. 2008. « Bidirectional Switching of near IR Emitting Boradiazaindacene Fluorophores ». *Organic Letters* 10 (16): 3401-3. <https://doi.org/10.1021/ol801062h>.
- Duan, Chong, Yibin Zhou, Guo-Gang Shan, Yuncong Chen, Weijun Zhao, Dandan Yuan, Lintao Zeng, Xiaobo Huang, et Guangle Niu. 2019. « Bright Solid-State Red-Emissive BODIPYs: Facile Synthesis and Their High-Contrast Mechanochromic Properties ». *Journal of Materials Chemistry C* 7 (12): 3471-78. <https://doi.org/10.1039/C8TC06421K>.
- Galangau, Olivier, Cécile Dumas-Verdes, Rachel Méallet-Renault, et Gilles Clavier. 2010. « Rational Design of Visible and NIR Distyryl-BODIPY Dyes from a Novel Fluorinated Platform ». *Organic & Biomolecular Chemistry* 8 (20): 4546-53. <https://doi.org/10.1039/C004812G>.
- Ge, Yuan, et Donal F. O'Shea. 2016. « Azadipyromethenes: From Traditional Dye Chemistry to Leading Edge Applications ». *Chemical Society Reviews* 45 (14): 3846-64. <https://doi.org/10.1039/C6CS00200E>.
- Gorman, Aoife, John Killoran, Caroline O'Shea, Tony Kenna, William M. Gallagher, et Donal F. O'Shea. 2004. « In Vitro Demonstration of the Heavy-Atom Effect for

- Photodynamic Therapy ». *Journal of the American Chemical Society* 126 (34): 10619-31. <https://doi.org/10.1021/ja047649e>.
- Grossi, Marco, Marina Morgunova, Shane Cheung, Dimitri Scholz, Emer Conroy, Marta Terrile, Angela Panarella, Jeremy C. Simpson, William M. Gallagher, et Donal F. O'Shea. 2016. « Lysosome Triggered Near-Infrared Fluorescence Imaging of Cellular Trafficking Processes in Real Time ». *Nature Communications* 7 (1): 10855. <https://doi.org/10.1038/ncomms10855>.
- Haynes, William M. 2016. *CRC Handbook of Chemistry and Physics, 94th Edition*. CRC Press.
- Hillaireau, Hervé, et Patrick Couvreur. 2009. « Hillaireau, H and Couvreur, P. Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. *Cell Mol Life Sci* 66: 2873-2896 ». *Cellular and molecular life sciences: CMLS* 66 (juillet): 2873-96. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0053-z>.
- Houvenagel, Sophie, Guilherme Picheth, Camille Dejean, Annie Brûlet, Alexis Chennevière, Olivier Couture, Nicolas Huang, Laurence Moine, et Nicolas Tsapis. 2017. « End-Chain Fluorination of Polyesters Favors Perfluorooctyl Bromide Encapsulation into Echogenic PEGylated Nanocapsules ». *Polymer Chemistry* 8 (16): 2559-70. <https://doi.org/10.1039/C7PY00400A>.
- Kasha, Michael. 1950. « Characterization of Electronic Transitions in Complex Molecules ». *Discussions of the Faraday Society* 9 (0): 14-19. <https://doi.org/10.1039/DF9500900014>.
- Liu, Xue, Yanxiang Wang, Peng Yun, Xin Shen, Feng Su, Yangsheng Chen, Suming Li, et Danqing Song. 2018. « Self-Assembled Filomicelles Prepared from Polylactide-Poly(Ethylene Glycol) Diblock Copolymers for Sustained Delivery of Cycloprotoberberine Derivatives ». *Saudi Pharmaceutical Journal* 26 (3): 342-48. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2018.01.008>.
- Luo, Yan-Bing, Xiu-Li Wang, et Yu-Zhong Wang. 2012. « Effect of TiO₂ Nanoparticles on the Long-Term Hydrolytic Degradation Behavior of PLA ». *Polymer Degradation and Stability* 97 (5): 721-28. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2012.02.011>.
- Mackiewicz, Nicolas, Julien Nicolas, Nadège Handké, Magali Noiray, Julie Mougin, Cyril Daveu, Harivardhan Reddy Lakkireddy, Didier Bazile, et Patrick Couvreur. 2014. « Precise Engineering of Multifunctional PEGylated Polyester Nanoparticles for Cancer Cell Targeting and Imaging ». *Chemistry of Materials* 26 (5): 1834-47. <https://doi.org/10.1021/cm403822w>.
- Mcllvaine, T. C. 1921. « A BUFFER SOLUTION FOR COLORIMETRIC COMPARISON ». *Journal of Biological Chemistry* 49 (1): 183-86. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)86000-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)86000-8).
- Melnychuk, Nina, Pichandi Ashokkumar, Ilya Aparin, et Andrey Klymchenko. 2021. « Pre- And Postfunctionalization of Dye-Loaded Polymeric Nanoparticles for

- Preparation of FRET-Based Nanoprobes ». *ACS Applied Polymer Materials*, décembre. <https://doi.org/10.1021/acsapm.1c00819>.
- Nano, Adela, Pascal Retailleau, Jerry P. Hagon, Anthony Harriman, et Raymond Ziessel. 2014. « A Hybrid Bis(Amino-Styryl) Substituted Bodipy Dye and Its Conjugate Diacid: Synthesis, Structure, Spectroscopy and Quantum Chemical Calculations ». *Physical Chemistry Chemical Physics* 16 (21): 10187-98. <https://doi.org/10.1039/C3CP55021D>.
- Nic, Miloslav. 2006. *IUPAC Goldbook*. IUPAC.
- PIARD, Jonathan, Ran BI, Aurélien BRION, Rémi PERRIN, Lei SHI, et Clément DORÉ. 2019. « Utilisation d'un tampon universel pour l'étude d'indicateurs colorés acido-basiques (par spectrophotométrie UV-visible) ». *Bull. Un. Phys.* 113 (n° 1015): 661-92.
- Piron, Flavia, Cornelia Oprea, Crina Cismaș, Anamaria Terec, Jean Roncali, et Ion Grosu. 2010. « Synthesis of Podands with Cyanurate or Isocyanurate Cores and Terminal Triple Bonds ». *Synthesis* 2010 (10): 1639-44. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1218724>.
- Pliquett, Jacques, Adrien Dubois, Cindy Racœur, Nesrine Mabrouk, Souheila Amor, Robin Lescure, Ali Bettaïeb, et al. 2019. « A Promising Family of Fluorescent Water-Soluble aza-BODIPY Dyes for in Vivo Molecular Imaging ». *Bioconjugate Chemistry* 30 (4): 1061-66. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00795>.
- Po, Henry N., et N. M. Senozan. 2001. « The Henderson-Hasselbalch Equation: Its History and Limitations ». *Journal of Chemical Education* 78 (11): 1499. <https://doi.org/10.1021/ed078p1499>.
- Rabasso, Nicolas. 2020. *Chimie organique: Généralités, études des grandes fonctions et méthodes spectroscopiques*. De Boeck Supérieur.
- Rurack, Knut, et Monika Spieles. 2011. « Fluorescence Quantum Yields of a Series of Red and Near-Infrared Dyes Emitting at 600–1000 nm ». *Analytical Chemistry* 83 (4): 1232-42. <https://doi.org/10.1021/ac101329h>.
- Shi, Zhenxiong, Xu Han, Wenbo Hu, Hua Bai, Bo Peng, Lei Ji, Quli Fan, Lin Li, et Wei Huang. 2020. « Bioapplications of Small Molecule Aza-BODIPY: From Rational Structural Design to in Vivo Investigations ». *Chemical Society Reviews* 49 (21): 7533-67. <https://doi.org/10.1039/D0CS00234H>.
- Sutter, A, Mourad Elhabiri, et Gilles Ulrich. 2018. « Fluorescent pH-Responsive Probes Based on Water-Soluble Boron-Dipyrromethene (BODIPY) Derivatives, Featuring Long-Wavelength Emission ». *Chemistry - A European Journal* 24 (43): 11119-30. <https://doi.org/10.1002/chem.201801540>.
- Sutter, Alexandra, Mourad Elhabiri, et Gilles Ulrich. 2018. « Fluorescent PH-Responsive Probes Based on Water-Soluble Boron-Dipyrromethene (BODIPY) Derivatives, Featuring Long-Wavelength Emission ». *Chemistry – A European Journal* 24 (43): 11119-30. <https://doi.org/10.1002/chem.201801540>.

- Tanase, C., et Iuliana Spiridon. 2014. « PLA/chitosan/keratin composites for biomedical applications ». *Materials Science and Engineering: C* 40 (juillet): 242-47. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.03.054>.
- Tokunaga, Keisuke, Mami Sato, Keiko Kuwata, Chizuru Miura, Hirokazu Fuchida, Naoya Matsunaga, Satoru Koyanagi, Shigehiro Ohdo, Naoya Shindo, et Akio Ojida. 2020. « Bicyclobutane Carboxylic Amide as a Cysteine-Directed Strained Electrophile for Selective Targeting of Proteins ». *Journal of the American Chemical Society* 142 (43): 18522-31. <https://doi.org/10.1021/jacs.0c07490>.
- Valeur, Bernard, et Mário Nuno Berberan-Santos. 2013. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. John Wiley & Sons.
- Vey, E., C. Rodger, J. Booth, M. Claybourn, A. Miller, et A. Saiani. 2011. « Degradation kinetics of poly(lactic-co-glycolic) acid block copolymer cast films in phosphate buffer solution as revealed by infrared and Raman spectroscopies ». <https://doi.org/10.1016/J.POLYMDEGRADSTAB.2011.07.011>.
- Vu, Thanh Truc, Marina Dvorko, Elena Y. Schmidt, Jean-Frédéric Audibert, Pascal Retailleau, Boris A. Trofimov, Robert B. Pansu, Gilles Clavier, et Rachel Méallet-Renault. 2013. « Understanding the Spectroscopic Properties and Aggregation Process of a New Emitting Boron Dipyrromethene (BODIPY) ». *The Journal of Physical Chemistry C* 117 (10): 5373-85. <https://doi.org/10.1021/jp3097555>.
- Wu, Dan, Shane Cheung, Corry James O'Sullivan, Yinghua Gao, Zhi-long Chen, et Donal F. O'Shea. 2016. « Strained Alkyne Substituted near Infrared BF₂ Azadipyrromethene Fluorochrome ». *RSC Advances* 6 (90): 87373-79. <https://doi.org/10.1039/C6RA19843K>.

5 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

5	Conclusions et perspectives.....	273
	5.1 <u>Conclusions</u>	273
	5.2 <u>Perspectives</u>	277
	5.2.1 <u>Regarder la cartographie de l'accumulation des NP sur des modèles de tumeurs</u> 277	
	5.2.2 <u>Favoriser la séparation spectrale avec l'hémoglobine</u>	277
	5.2.3 <u>Compréhension photophysique des mécanismes de génération de l'onde acoustique</u>	280
	5.2.4 <u>Lien photoacoustique et extinction de fluorescence par agrégation : étude sur différents chromophores</u>	282
	5.2.5 <u>Contre-ions volumineux et mobilité des rotors moléculaires</u>	282
	5.3 <u>bibliographie</u>	285

5.1 CONCLUSIONS

Dans cette thèse, nous avons trois grands objectifs :

1. Observer le signal photoacoustique *in vivo* de NP biocompatibles, cliniquement transposables ;
2. Comprendre comment favoriser les voies de désexcitation non-radiatives pour augmenter l'efficacité photoacoustique ;
3. Synthétiser des NP sensibles au pH pour le suivi multi-ondes de leur internalisation dans des cellules.

Dans le chapitre 2 de cette thèse, nous avons tout d'abord synthétisé un nouveau Bodipy avec deux innovations. 1) Le Bodipy possède un transfert de charge intramoléculaire grâce à la présence de deux fonctions N,N-diméthylaminostyryle, qui permettent de diminuer le rendement quantique de fluorescence et donc d'augmenter le signal photoacoustique, ainsi que de décaler le maximum d'absorption dans la fenêtre biologique. 2) Le Bodipy possède une fonction alcool qui permet d'amorcer la polymérisation par ouverture de cycle sur un monomère DL-lactide. On obtient alors un poly lactide-Bodipy PLA-Bodipy. Le polymère PLA-Bodipy a ensuite été formulé en nanoparticules PEGylées avec différents taux d'encapsulation en PLA-Bodipy. La liaison covalente avec le polymère permet d'éviter la libération rapide du Bodipy et d'augmenter l'efficacité et les taux d'encapsulation. Nous obtenons des NP de 100 nm

de diamètre qui possèdent un fort coefficient d'absorption molaire situé entre celui des petites molécules organiques et celui des NP d'or. Les NP de PLA-Bodipy absorbent à 760 nm, dans la fenêtre du proche infra-rouge et possèdent une excellente photostabilité comparées aux NP de PLA marquées avec une cyanine. Nous avons également démontré l'innocuité des NP sur des macrophages en culture. Enfin, après injection intraveineuse dans des souris saines, nous avons réussi à détecter le signal photoacoustique des NP *in vivo* à l'aide de séparation spectrale et d'un système commercial d'imagerie photoacoustique.

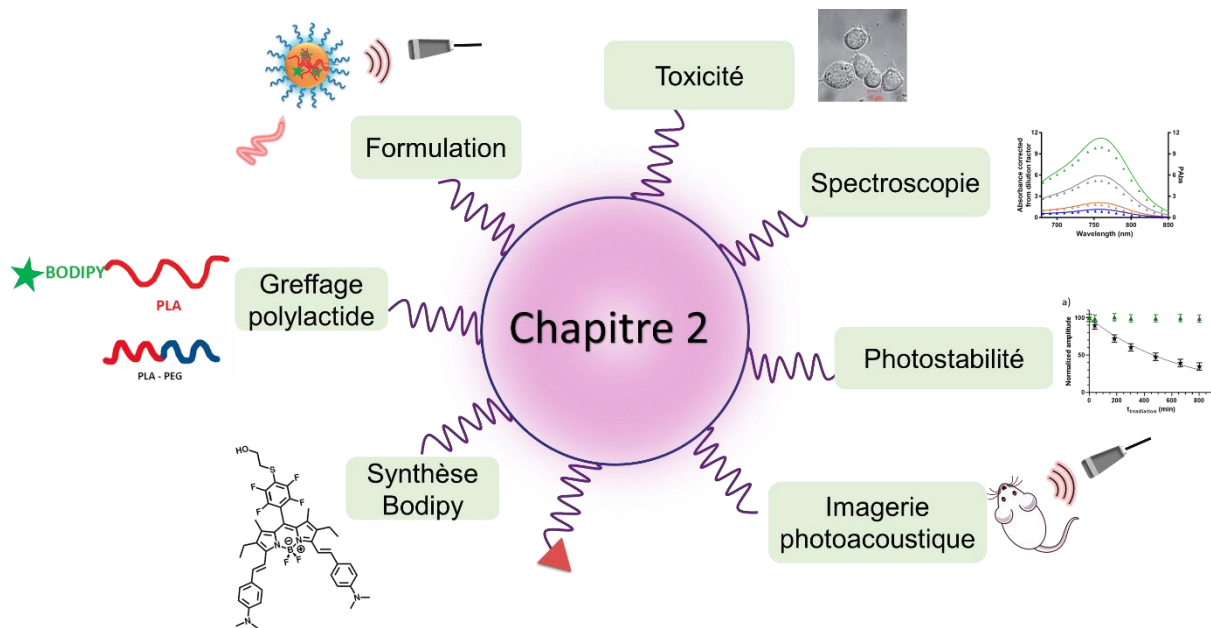


Figure 5.1 : Représentation schématique des objectifs du chapitre 2.

Dans le chapitre 3 de cette thèse, nous nous sommes intéressés à rationaliser le lien entre l'extinction de fluorescence par agrégation et l'efficacité photoacoustique. Pour cela, nous avons exploité un spectrophotomètre photoacoustique calibré et nous avons défini deux grandeurs : le rendement photoacoustique PAY et l'efficacité de génération photoacoustique PGE. Par analogie avec le rendement quantique de fluorescence, le rendement photoacoustique est défini comme le quotient du nombre total de photons contribuant au signal photoacoustique sur le nombre de photons absorbés. Le PGE, quant à lui, correspond au quotient de l'absorbance photoacoustique sur l'absorbance pour une seule longueur d'onde donnée. L'étude des NP avec différents taux de chargement en PLA-Bodipy nous a permis de mettre en évidence deux régimes d'émission photoacoustique : un régime monomère et un régime d'extinction causée par l'agrégation (noté ACQ). En dessous de 10% de PLA-Bodipy dans les NP, dans le régime monomère, l'émission de fluorescence du monomère est la voie de désexcitation majoritaire et limite l'efficacité de génération photoacoustique.

Dans le régime d'extinction causée par l'agrégation, au-dessus de 10% de PLA-Bodipy, les désexcitations par voies non-radiatives sont majoritaires et le rendement photoacoustique atteint une valeur asymptotique élevée de 93%. Nous avons proposé un modèle mathématique pour permettre de prédire le taux de chargement minimal pour être dans le régime d'extinction causée par l'agrégation sur les NP de PLA-Bodipy en exploitant seulement les spectres d'absorption et d'émission, le coefficient d'absorption molaire et la relation de Strickler-Berg. Enfin, nous avons démontré qu'à hautes fluences laser ($3,5 \text{ mJ.cm}^{-2}$), au maximum de la bande d'absorption, une perte du signal photoacoustique est remarquable par dépopulation de l'état fondamental. Cet effet non-linéaire peut être limité avec des nanoparticules dans le régime d'extinction causée par agrégation. L'utilisation de NP dans lesquelles les Bodipys sont agrégés permet donc de travailler à de fortes puissances laser sans perte de signal photoacoustique. Les NP possédant plus de 10% de PLA-Bodipy démontrent alors une efficacité de génération photoacoustique élevée et une faible perte de signal par des effets non-linéaires. Nous avons enfin développé une modélisation mathématique fine des spectres d'absorption et photoacoustiques afin de calculer une efficacité photoacoustique moyenne au maximum de la bande $\overline{PGE}_{\text{rouge}}$ et dans l'épaulemement vibrationnel $\overline{PGE}_{\text{bleu}}$. La modélisation nous permet alors de différencier spectralement l'efficacité photoacoustique dans la bande d'absorption et de s'affranchir des problèmes de décalage de bandes entre absorption et photoacoustique qui empêchent tout calcul du PGE (λ). Pour caractériser les bonnes performances des NP en imagerie photoacoustique nous avons défini la brillance photoacoustique B_{PA} , par analogie avec la brillance de fluorescence, comme le produit du rendement photoacoustique PAY par le coefficient d'extinction molaire des NP. Nous avons obtenu des NP très brillantes grâce au très bon rendement photoacoustique des NP agrégées ($\text{PAY} \approx 0,9$) et aux forts coefficients d'extinction molaires ($1,5 \times 10^7 - 2,4 \times 10^8 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$).

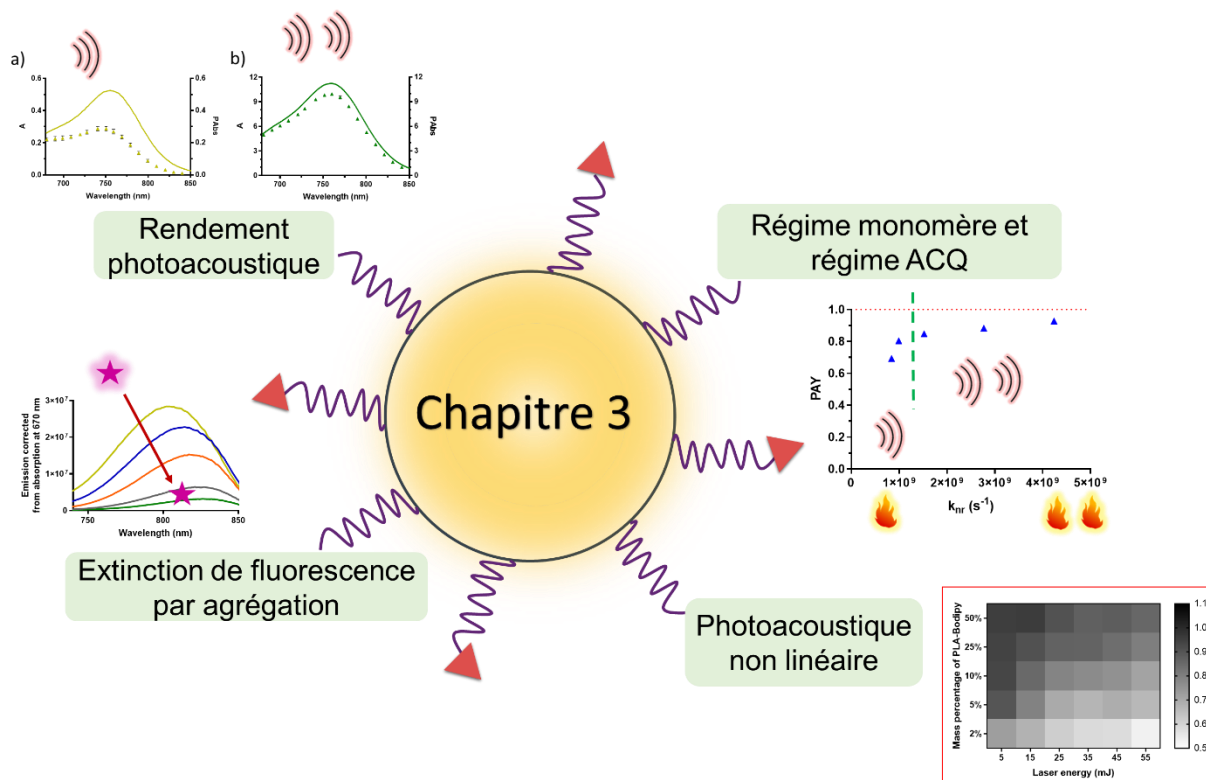


Figure 5.2 : Représentation schématique des objectifs du chapitre 3.

Dans le chapitre 4, notre objectif était de synthétiser des NP biocompatibles et biodégradables sensibles au pH. Pour ce faire, un Aza-Bodipy dont la fluorescence est modulable avec le pH sera greffé de manière covalente à la surface de NP de polylactide. Dans un premier temps, nous avons étudié la sensibilité au pH du Bodipy **[3]** et des NP de Bodipy **[3]**, afin de nous assurer de la stabilité de leurs excellentes propriétés photoacoustiques en milieu acide et d'éviter tout recouvrement spectral avec le signal de l'Aza-Bodipy. Nous avons estimé deux valeurs de pK_A pour le Bodipy **[3]** : $pK_{A1} = 0,3$; $pK_{A2} = 1,6$ et deux valeurs de pK_A pour les NP de Bodipy **[3]** : $pK_{A1} = 0,7$ et $pK_{A2} = 1,1$. Ces faibles valeurs de pK_A permettent de s'assurer la prédominance de la forme basique du Bodipy dans les domaines de pH que l'on souhaite étudier $4 < pH < 7$. De plus, nous avons également démontré qu'un très faible pourcentage du Bodipy **[3]** ($< 10\%$ molaire) est accessible par les protons en surface des NP. La majorité du Bodipy est présent dans le cœur hydrophobe des NP et ne participe donc pas aux équilibres acido-basiques. La stabilité des NP dans un tampon acide ($pH = 0,08$) pendant au moins 32h a été démontrée. Enfin, nous avons réalisé la synthèse de l'Aza-Bodipy avec l'association de trois innovations. 1) Des fonctions diméthylaniline en positions 3 et 5 du cœur indacène pour décaler l'absorption et l'émission dans des gammes de longueur d'onde où l'on pourra différencier spectralement l'Aza-Bodipy

du Bodipy [3]. 2) Une fonction phénol en position 7 et un groupement nitro en position ortho du phénol, pour obtenir un pK_A proche de 4, adapté pour une fluorescence modulable entre le milieu extracellulaire et les lysosomes. 3) Une fonction alcyne pour greffer de manière covalente l'Aza-Bodipy par réaction de chimie click sur la surface de NP possédant des PEG-azoture en surface. L'Aza-Bodipy a été synthétisé avec succès.

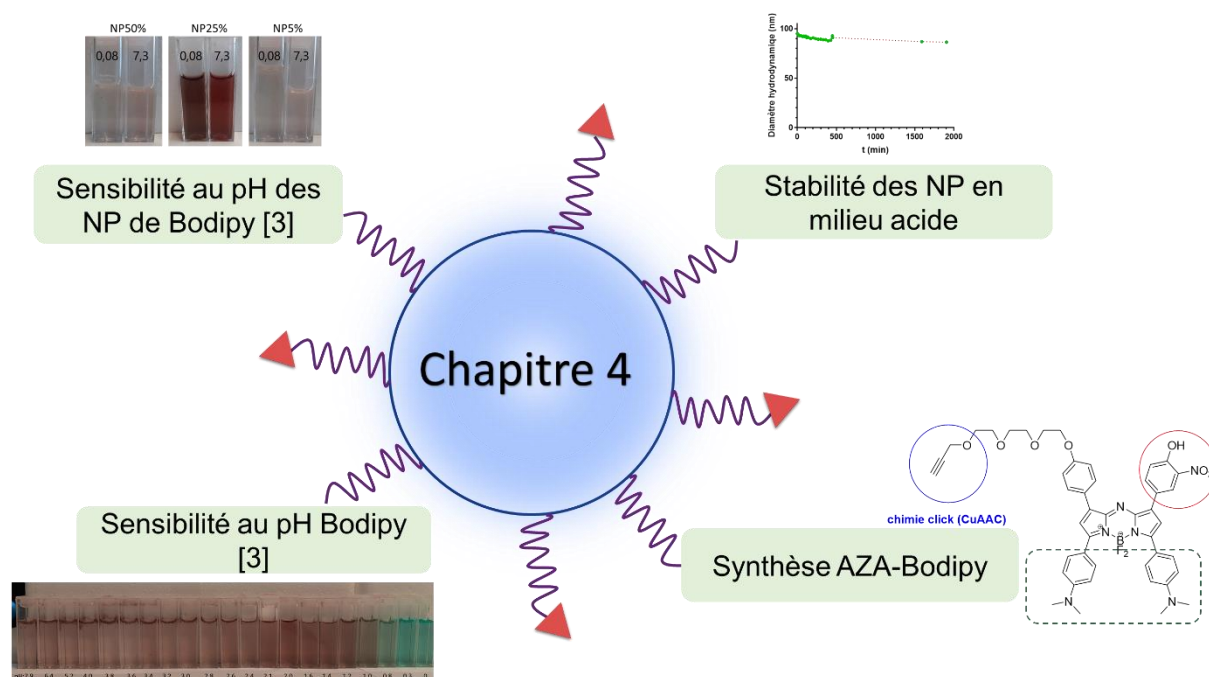


Figure 5.3 : Représentation schématique des objectifs du chapitre 4.

5.2 PERSPECTIVES

5.2.1 Regarder la cartographie de l'accumulation des NP sur des modèles de tumeurs

Dans le chapitre 2 nous avons démontré que le signal des NP de Bodipy pouvait être détecté *in vivo* sur des souris saines. Une perspective intéressante serait d'observer l'accumulation des NP sur des modèles de tumeurs *in vivo*. Nous pourrions alors regarder si les NP s'accumulent bien au site des tumeurs par effet EPR.

5.2.2 Favoriser la séparation spectrale avec l'hémoglobine

5.2.2.1 Bodipy julolidine

Dans le chapitre 2 de cette thèse, nous avons réussi à détecter le signal photoacoustique des NP de PLA-Bodipy [3] *in vivo* dans une souris saine. Cependant, sur les images obtenues, il est difficile de déceler le signal photoacoustique de l'hémoglobine de celui du Bodipy [3] (figure 5.4). Seule une séparation spectrale

permet de spécifiquement identifier le signal du Bodipy **[3]** de celui de l'hémoglobine. La qualité des images pourrait être améliorée grâce à une meilleure différenciation spectrale entre le signal de l'hémoglobine et celui du Bodipy **[3]**. En effet, comme visible sur la figure 5.4 (e) et (d), le maximum d'absorption du Bodipy **[3]** (en vert) à 750 nm se situe à l'endroit d'un maximum local de l'absorption de l'hémoglobine désoxygénée (en bleu figure 5.4 (d)). Une meilleure différenciation des maxima pourrait donc être obtenue en décalant de 30-50 nanomètres vers l'infra-rouge l'absorption des agents de contraste.

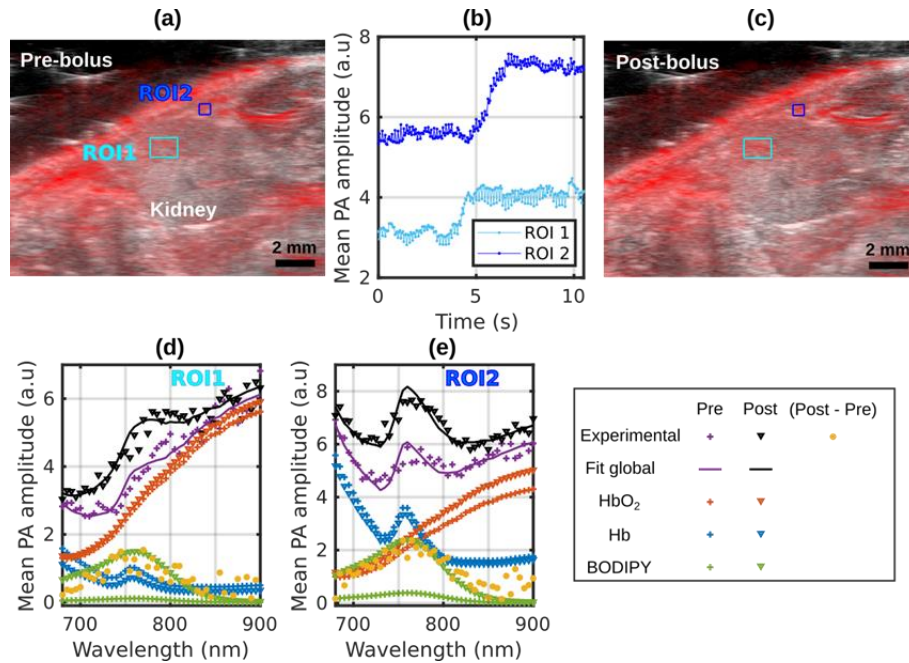


Figure 5.4 : Détection *in vivo* des NP marquées au Bodipy. Les NP ont été injectées par voie intraveineuse dans la veine de la queue et les images photoacoustiques ont été acquises dans la région du rein gauche, la souris étant en position couchée (à gauche). Un bolus de 200 μ L a été injecté. Les images PA acquises à 750 nm sont affichées avec une échelle rouge et une plage dynamique de -45 dB par rapport aux images échographiques en mode-B affichées avec une échelle de gris dans (a) et (c). Deux régions d'intérêt (ROI1 et ROI2) ont été identifiées. (a) Image avant l'injection, le signal PA est lié à un chromophore endogène : l'hémoglobine. (b) Amplitude moyenne de l'image PA dans chaque ROI en fonction du temps pendant l'injection du bolus. (c) Image après l'injection du bolus. Acquisitions multispectrales avant et autour de 5 min après l'injection. L'amplitude moyenne dans une ROI en fonction de la longueur d'onde est affichée pour respectivement la ROI1 (d) et la ROI2 (e). Les résultats du processus de séparation spectrale sont présentés par la contribution individuelle de chaque chromophore. Image tirée du chapitre 2.

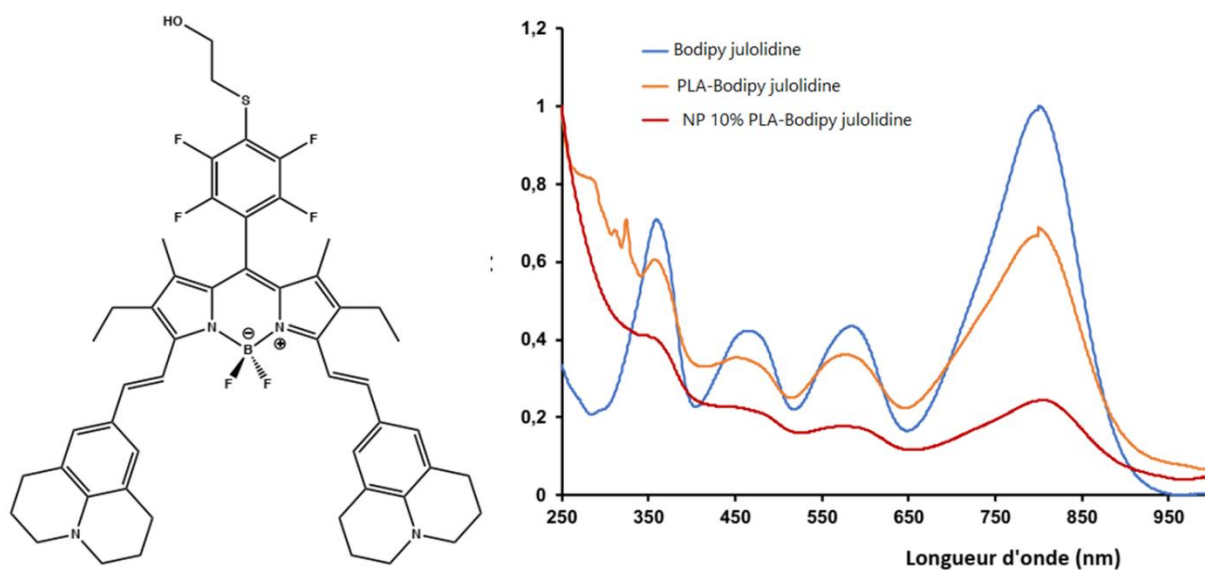


Figure 5.5 : (Gauche) Structure du Bodipy substitué avec le groupement julolidine. (Droite) Spectre d'absorption du Bodipy julolidine (bleu), du PLA-Bodipy julolidine (orange) et des NP 10% de PLA-Bodipy julolidine (rouge). Image tirée du rapport de stage de master 1 de Justine Coïs.

L'idéal serait donc d'obtenir un agent de contraste avec un maximum d'absorption aux alentours de 800 nm. Avant le début de cette thèse, un travail préliminaire avait été effectué par Justine Coïs, en stage de M1, sur un Bodipy possédant un groupement julolidine à la place de la N,N-diméthylaniline du Bodipy **[3]** (figure 5.5). La cyclisation de l'amine permet d'augmenter la force du groupement donneur d'électrons et donc de décaler d'autant plus vers le rouge le maximum d'absorption. Lors de son stage, Justine Coïs avait alors réussi à synthétiser le Bodipy julolidine, le greffer sur un polylactide et le formuler en NP à 10% de PLA-Bodipy julolidine. Sur la figure 5.5, on peut remarquer que le Bodipy obtenu possède un maximum d'absorption vers 805 nm. Aucune étude du signal photoacoustique des NP de PLA-Bodipy julolidine n'a cependant été effectuée durant le stage de Justine.

Ainsi, une première perspective prometteuse serait de reprendre et de continuer la synthèse de NP de PLA-Bodipy julolidine et d'observer leur signal photoacoustique sur le spectrophotomètre photoacoustique calibré de Jérôme Gâteau au Laboratoire d'Imagerie Biomédicale (LIB, UMR 7371). Puis, dans un deuxième temps, d'essayer d'observer le signal photoacoustique de ces NP *in vivo* sur des souris saines et de voir si la séparation spectrale est plus aisée et si le contraste des images est meilleur. De plus, la très grande force du transfert de charge intramoléculaire est très prometteuse pour un signal de fluorescence faible et donc un signal photoacoustique fort. Il serait alors également possible d'exploiter les méthodes que nous avons développées dans le chapitre 3 pour regarder si l'extinction de fluorescence par agrégation permettrait également d'augmenter l'efficacité de génération photoacoustique des NP de PLA-

Bodipy julolidine. Comme dans le chapitre 3, nous pourrions estimer le taux de chargement minimal pour rendre prédominantes les désexcitations par voies non-radiatives. Enfin les performances photoacoustiques (efficacité de génération photoacoustique (PGE), rendement photoacoustique (PAY) et coefficient d'extinction molaire) pourraient être déterminées et comparées aux valeurs des NP de PLA-Bodipy [3].

5.2.2.2 Agrégats J de Bodipy [3]

Toujours dans l'objectif de décaler le maximum d'absorption des agents de contrastes aux alentours de 800 nm, une autre perspective serait de favoriser encore plus la formation d'agrégats J de Bodipy [3] au sein des NP. Comme nous l'avons vu dans l'introduction, la formation d'agrégats J provoque un décalage vers le rouge du maximum d'absorption (1.4.2.2). C'est par exemple la stratégie employée par Cayla A. Wood et son équipe en encapsulant de très grandes quantités d'ICG dans des liposomes ($1,5 \times 10^6$ molécules d'ICG par liposome) (Wood et al. 2021) (introduction 1.4.2.2). Dans le chapitre 2, nous avons démontré que les NP **NP-50%** de PLA-Bodipy possédaient environ 3100 PLA-Bodipy par NP. Une perspective prometteuse serait alors de tester des NP de PLA-Bodipy avec des taux de chargement au-dessus de 50%. Nous pourrions essayer 75% et 90% de PLA-Bodipy par exemple. La stabilité de ces NP très chargées devra être évaluée et les spectres d'absorption, d'émission et photoacoustiques seront étudiés. Si, comme pour l'équipe de Wood, la forte agrégation provoque l'apparition d'une nouvelle bande d'absorption décalée vers le rouge, nous pourrions également observer le signal photoacoustique *in vivo* de ces NP sur des souris saines et voir si la séparation spectrale et les images photoacoustiques sont de bonne qualité. Les performances photoacoustiques seraient également évaluées : PGE, PAY et coefficient d'extinction molaire, et comparées aux valeurs des NP de PLA-Bodipy [3].

Enfin, dans le but d'augmenter encore plus les taux de chargement en PLA-Bodipy et favoriser l'agrégation, une solution serait de diminuer la masse molaire du PLA accrochée au Bodipy. On augmenterait alors la proportion massique de Bodipy dans le polymère PLA-Bodipy et on pourrait donc accroître plus facilement le taux de chargement en Bodipy dans les NP.

5.2.3 Compréhension photophysique des mécanismes de génération de l'onde acoustique

Comme nous l'avons vu au chapitre 3, l'extinction de fluorescence causée par l'agrégation favorise les désexcitations par voies non-radiatives et augmente donc l'efficacité de génération de l'onde acoustique. Cependant, la dynamique de relaxation

depuis les états excités est encore peu comprise. Une compréhension fine des phénomènes de désexcitation depuis les états excités pour des NP très agrégées permettrait de mieux rationaliser la génération du signal photoacoustique. Pour cela, une première possibilité serait d'effectuer des expériences d'absorption transitoire femto-seconde sur les NP de PLA-Bodipy. Une première expérience serait de regarder la dynamique de relaxation par absorption transitoire femto-seconde sur le Bodipy **[3]** dans du DCM. Puis, on étudierait ensuite l'absorption transitoire femto-seconde des NP de PLA-Bodipy avec différents taux d'encapsulation : **5%**, **10%** et **50%** par exemple. Pour ces expériences, nous pourrions nous inspirer des travaux réalisés par Hu et son équipe sur des NP lipidiques de DSPE-PEG et de leurs expériences d'absorption transitoires femto-seconde (W. Hu et al. 2019). Pour effectuer ce travail, une collaboration est envisageable avec le Laboratoire de Spectrochimie Infrarouge et Raman (LASIR) à l'Université de Lille (Michel Sliwa, spécialisé en absorption transitoire femto- seconde).

Toujours dans l'objectif de comprendre la relation entre les désexcitations par voies non-radiatives et l'efficacité de génération photoacoustique, une perspective très prometteuse serait d'étudier simultanément, sur un même appareil, le signal photoacoustique résolu en temps et le signal d'absorption dans les états excités à l'aide d'une expérience pompe-sonde femto-seconde. Sur cet appareil, le signal photoacoustique et le signal d'absorption transitoire pourraient être mesurés conjointement. Dans la littérature, des expériences pompe-sonde femto-secondes pour la photoacoustiques sont développées (Märk et al. 2015; S. Hu 2016; Märk et al. 2017) mais très peu s'intéressent à étudier la dynamique de relaxation depuis les états excités. Dans sa revue de 2016, Song Hu relève toutefois que la variation du délai entre la pompe et la sonde pourrait permettre d'obtenir des informations sur la dynamique de relaxation depuis les états excités.

Enfin, des calculs de chimie théorique pourraient être effectués pour mieux comprendre la formation des agrégats au sein des NP et leurs propriétés photophysiques. Comme nous l'avons évoqué au chapitre 3, l'agrégation du Bodipy **[3]** peut être modélisée par deux modèles d'agrégats : les agrégats H et les agrégats J (théorie de l'exciton, voir introduction et chapitre 3). Des calculs de chimie théorique sur des dimères J et des dimères H permettraient de mieux comprendre le rôle des agrégats dans la dynamique de relaxation et l'extinction de fluorescence. On pourrait ainsi étudier la répartition de la densité électronique dans l'espace sur les orbitales HO et BV des dimères J et H. Il serait alors possible de mettre en évidence les éventuels transferts de charge intramoléculaire ou intermoléculaire des dimères. Des études d'optimisation de géométrie sur des dimères de Bodipy **[3]** pourraient permettre d'estimer les distances et les angles dièdres entre les agrégats. Ces valeurs pourraient être comparées aux distances des rayons de Förster pour connaître l'efficacité des transferts d'énergie par FRET. Pour ces études, nous pourrions nous appuyer sur l'article

de l'équipe de Wenbo Hu en 2019 qui a utilisé pour ses calculs la théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT), la fonctionnelle hybride B3LYP et la base 6-31G(d,p) sur des dimères H et J de Bodipy à transfert de charge (W. Hu et al. 2019).

5.2.4 Lien photoacoustique et extinction de fluorescence par agrégation : étude sur différents chromophores

Une perspective intéressante serait de tester le modèle mathématique (régression linéaire de k_{nr}) développé au chapitre 3 sur différents types de chromophores plus ou moins fluorescents et possédant ou non un transfert de charge intramoléculaire. Une première possibilité serait d'étudier une Rhodamine, une cyanine, une fluorescéine et le bleu de méthylène. Les chromophores seraient greffés comme précédemment sur un polylactide et formulés en NP. Différents taux de chargement pour chaque NP de chromophore seraient étudiés. Les constantes de vie non-radiatives pourraient alors être estimées pour chaque synthèse de NP à l'aide de la relation de Strickler-Berg et du temps de vie de fluorescence moyen (chapitre 3). L'évolution de la constante de vie non-radiative k_{nr} serait étudiée en fonction du pourcentage de PLA-Chromophore. Nous pourrions alors voir si la constante de vitesse non-radiative augmente de façon linéaire avec le taux de chargement pour tout type de chromophore ou si cette relation n'est valable que pour les Bodipy à transfert de charge. Dans le cas d'une relation linéaire, nous pourrions alors estimer le taux de chargement minimal pour favoriser les voies de désexcitations non-radiatives. Enfin, nous pourrions observer le signal photoacoustique de ces NP de chromophores sur le spectrophotomètre photoacoustique calibré et vérifier si les résultats obtenus par la modélisation de k_{nr} prédisent bien l'évolution de l'efficacité photoacoustique avec le taux de chargement. Pour chaque NP de chromophore les performances photoacoustiques seraient également évaluées : PGE, PAY et coefficient d'extinction molaire, et comparées aux valeurs des NP de PLA-Bodipy [3]. Grâce au spectrophotomètre photoacoustique calibré et à la détermination des paramètres photoacoustiques, nous pourrions alors développer une bibliothèque de chromophores pour la photoacoustique et une caractérisation fine de leurs performances photoacoustiques.

5.2.5 Contre-ions volumineux et mobilité des rotors moléculaires

Comme nous l'avons évoqué dans l'introduction au paragraphe 1.3.4.5, l'utilisation de contre-ions volumineux au cœur des nanoparticules peut permettre de libérer des espaces entre les chromophores à l'état agrégé. Les contre-ions servent alors d'espaceurs entre les chromophores, empêchant les liaisons π - π intermoléculaires néfastes pour la fluorescence (Reisch et al. 2014; Andreiuk et al. 2019). Cette stratégie a été développée par Klymchenko et son équipe pour obtenir des clignotements de la fluorescence des NP et des transferts d'énergie d'excitation

sur de très grands nombres de fluorochromes. Cette stratégie pourrait être adaptée aux NP de polymères pour la photoacoustique.

Pour la photoacoustique l'utilisation de rotors moléculaires permet de favoriser les désexcitations par voies non-radiatives et donc d'avoir de bonnes efficacités photoacoustiques et de faibles signaux de fluorescence (Cai et al. 2017; Zhao et al. 2019). Cependant, à l'état agrégé, dans les NP, le rapprochement des chromophores fait perdre la mobilité moléculaire et donc diminue l'efficacité photoacoustique. Pour remédier à cela, de nombreux articles utilisent des espaceurs : de longues chaînes alkyles, qui vont libérer des espaces entre les molécules pour permettre aux rotors de conserver de la mobilité (Liu et al. 2019; Qi et al. 2021; Diez-Cabanes, Monari, et Pastore 2021; Gao et al. 2021). Ces longs espaceurs volumineux complexifient les synthèses des chromophores organiques et rajoutent des étapes coûteuses en rendement, en solvant et en temps. L'utilisation de contre-ions volumineux au sein de la NP permettrait de jouer le rôle d'espaceurs entre les chromophores sans rajouter de complexité aux synthèses organiques. De plus, l'équipe de Klymchenko a également démontré que dans des matrices hydrophobes, comme le PLGA, des transferts d'énergie d'excitation sur de très grands nombres de fluorochromes pouvaient avoir lieu et conduisaient à l'extinction de fluorescence et au clignotement des NP. L'extinction de la fluorescence et les transferts d'énergie seraient également prometteurs pour avoir de bonnes efficacités photoacoustiques.

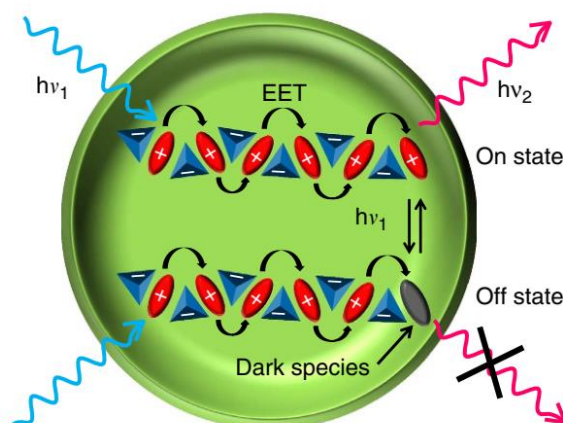


Figure 5.6 : Représentation schématique du mécanisme de clignotement et de transfert d'énergie d'excitation sur de nombreux chromophores. En bleu les contre-ions volumineux. En rouge le chromophore anionique. En gris des pièges énergétiques. Image tirée de (Reisch et al. 2014).

Actuellement, aucune trace de l'utilisation de contre-ions pour la photoacoustique des nanoparticules n'a été trouvée dans la littérature. Nous pourrions envisager cette stratégie sur le Bodipy **[3]**. Des rotors moléculaires de type

triphénylamine pourraient être ajoutés sur le Bodipy **[3]** à la place des fonctions N,N-diméthylaniline. Une fonction ammonium serait également rajoutée sur le Bodipy pour obtenir un chromophore cationique avec un contre ion anionique, de type halogénure par exemple. L'ajout d'un contre-ion volumineux est ensuite réalisable par échange d'ion en solution puis purification par chromatographie (Reisch et al. 2014; 2017). La formulation en NP du Bodipy en présence des contre-ions volumineux serait alors réalisée. La comparaison des performances photoacoustiques des NP avec et sans contre-ions volumineux seraient évaluées sur le spectrophotomètre photoacoustique calibré.

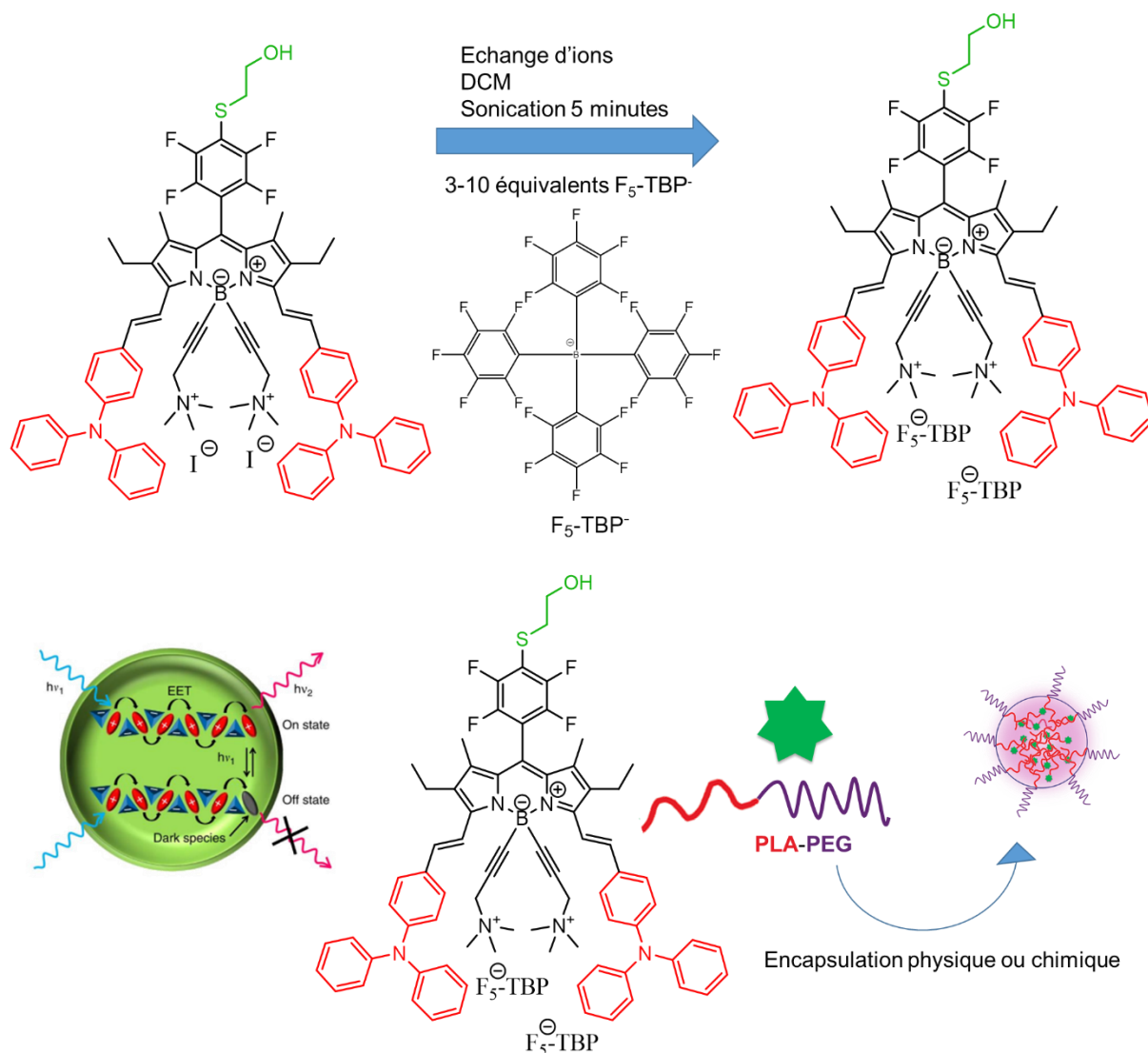


Figure 5.7 : Représentation schématique de la stratégie pour obtenir des NP de Bodipy cationiques avec contre ion volumineux.

La synthèse du Bodipy cationique possédant les rotors moléculaires de type triphénylamine (introduction 1.3.4.4) peut être réalisée selon la même stratégie que

pour le Bodipy [3] (figure 5.8). Lors de la réaction de type condensation de Knoevenagel, le 4-(N,N-diméthylamino)benzaldéhyde est remplacé par le réactif commercialement disponible 4-(diphénylamino)benzaldéhyde (CAS 4181-05-9) pour obtenir une fonction triphénylamine. Un Bodipy cationique peut ensuite être synthétisé en s'inspirant de la stratégie de l'équipe de Christine Goze sur les Aza-Bodipy (Florès et al. 2020).

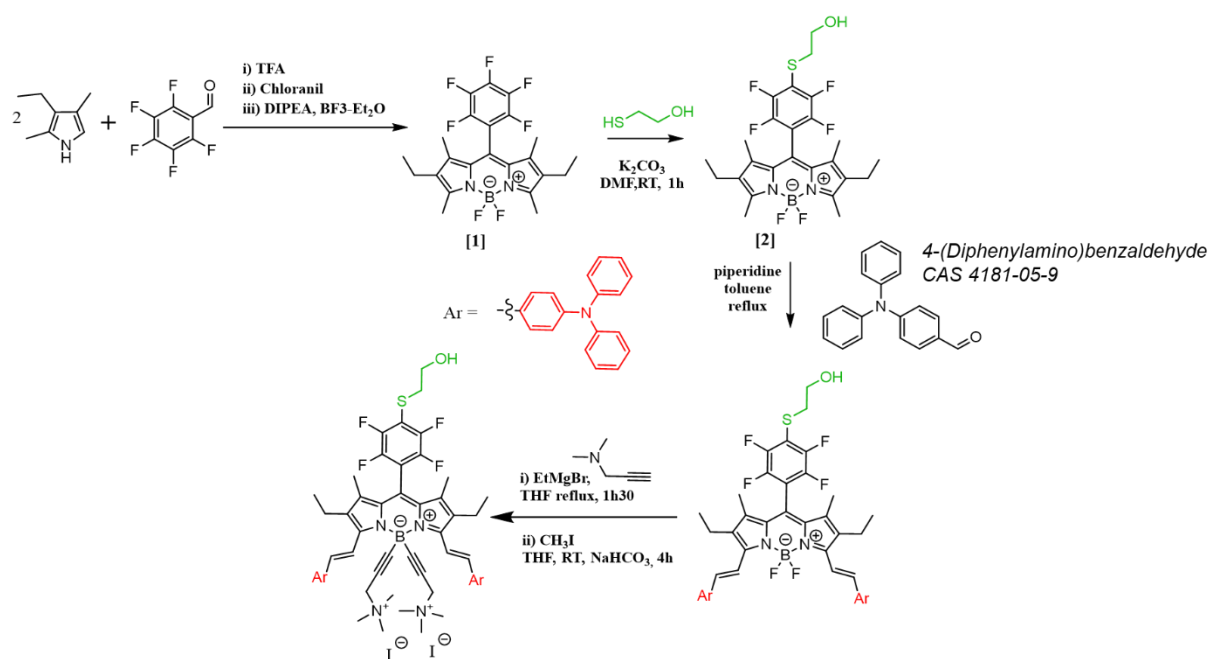


Figure 5.8 : Schéma de la synthèse envisagée pour obtenir le Bodipy cationique avec des rotors moléculaires de type triphénylamine.

5.3 BIBLIOGRAPHIE

- Andreiuk, Bohdan, Andreas Reisch, Eduard Bernhardt, et Andrey Klymchenko. 2019. « Fighting Aggregation-Caused Quenching and Leakage of Dyes in Fluorescent Polymer Nanoparticles: Universal Role of Counterion ». *Chemistry - An Asian Journal* 14 (janvier). <https://doi.org/10.1002/asia.201801592>.
- Cai, Xiaolei, Jie Liu, Weng Heng Liew, Yukun Duan, Junlong Geng, Nitish Thakor, Kui Yao, Lun-De Liao, et Bin Liu. 2017. « Organic Molecules with Propeller Structures for Efficient Photoacoustic Imaging and Photothermal Ablation of Cancer Cells ». *Materials Chemistry Frontiers* 1 (8): 1556-62. <https://doi.org/10.1039/C7QM00056A>.
- Diez-Cabanes, Valentin, Antonio Monari, et Mariachiara Pastore. 2021. « Competition between the Photothermal Effect and Emission in Potential Phototherapy Agents ». *The Journal of Physical Chemistry B* 125 (31): 8733-41. <https://doi.org/10.1021/acs.jpccb.1c03977>.

- Florès, Océane, Jacques Pliquett, Laura Abad Galan, Robin Lescure, Franck Denat, Olivier Maury, Agnès Pallier, et al. 2020. « Aza-BODIPY Platform: Toward an Efficient Water-Soluble Bimodal Imaging Probe for MRI and Near-Infrared Fluorescence ». *Inorganic Chemistry* 59 (2): 1306-14. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.9b03017>.
- Gao, Heqi, Xingchen Duan, Di Jiao, Yi Zeng, Xiaoyan Zheng, Jingtian Zhang, Hanlin Ou, Ji Qi, et Dan Ding. 2021. « Boosting Photoacoustic Effect via Intramolecular Motions Amplifying Thermal-to-Acoustic Conversion Efficiency for Adaptive Image-Guided Cancer Surgery ». *Angewandte Chemie International Edition* 60 (38): 21047-55. <https://doi.org/10.1002/anie.202109048>.
- Hu, Song. 2016. « Emerging Concepts in Functional and Molecular Photoacoustic Imaging ». *Current Opinion in Chemical Biology, Chemical genetics and epigenetics* * Molecular imaging, 33 (août): 25-31. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.04.003>.
- Hu, Wenbo, Xiaofei Miao, Haojie Tao, Alexander Baev, Can Ren, Quli Fan, Tingchao He, Wei Huang, et Paras N. Prasad. 2019. « Manipulating Nonradiative Decay Channel by Intermolecular Charge Transfer for Exceptionally Improved Photothermal Conversion ». *ACS Nano* 13 (10): 12006-14. <https://doi.org/10.1021/acsnano.9b06208>.
- Liu, Shunjie, Xin Zhou, Haoke Zhang, Hanlin Ou, Wu Jacky, Yang Liu, Linqi Shi, Dan Ding, et Ben Tang. 2019. « Molecular Motion in Aggregates: Manipulating TICT for Boosting Photothermal Theranostics ». *Journal of the American Chemical Society* 141 (mars). <https://doi.org/10.1021/jacs.8b13889>.
- Märk, ulia, Franz-Josef Schmitt, Christoph Theiss, Hakan Dortay, Thomas Friedrich, et Jan Laufer. 2015. « Photoacoustic Imaging of Fluorophores Using Pump-Probe Excitation ». *Biomedical Optics Express* 6 (7): 2522-35. <https://doi.org/10.1364/BOE.6.002522>.
- Märk, Julia, Asja Wagener, Edward Zhang, et Jan Laufer. 2017. « Photoacoustic Pump-Probe Tomography of Fluorophores in Vivo Using Interleaved Image Acquisition for Motion Suppression ». *Scientific Reports* 7 (1): 40496. <https://doi.org/10.1038/srep40496>.
- Qi, Ji, Leyan Feng, Xiaoyan Zhang, Haoke Zhang, Liwen Huang, Yutong Zhou, Zheng Zhao, et al. 2021. « Facilitation of Molecular Motion to Develop Turn-on Photoacoustic Bioprobe for Detecting Nitric Oxide in Encephalitis ». *Nature Communications* 12 (1): 960. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21208-1>.
- Reisch, Andreas, Pascal Didier, Ludovic Richert, Sule Oncul, Youri Arntz, Yves Mély, et Andrey S. Klymchenko. 2014. « Collective Fluorescence Switching of Counterion-Assembled Dyes in Polymer Nanoparticles ». *Nature Communications* 5 (1): 1-9. <https://doi.org/10.1038/ncomms5089>.
- Reisch, Andreas, Kateryna Trofymchuk, Anne Runser, Guillaume Fleith, Michel Rawiso, et Andrey S. Klymchenko. 2017. « Tailoring Fluorescence Brightness and Switching of Nanoparticles through Dye Organization in the Polymer Matrix ».

ACS Applied Materials & Interfaces 9 (49): 43030-42.
<https://doi.org/10.1021/acsami.7b12292>.

Wood, Cayla A., Sangheon Han, Chang Soo Kim, Yunfei Wen, Diego R. T. Sampaio, Justin T. Harris, Kimberly A. Homan, et al. 2021. « Clinically Translatable Quantitative Molecular Photoacoustic Imaging with Liposome-Encapsulated ICG J-Aggregates ». *Nature Communications* 12 (1): 5410.
<https://doi.org/10.1038/s41467-021-25452-3>.

Zhao, Zheng, Chao Chen, Wenting Wu, Fenfen Wang, Lili Du, Xiaoyan Zhang, Yu Xiong, et al. 2019. « Highly Efficient Photothermal Nanoagent Achieved by Harvesting Energy via Excited-State Intramolecular Motion within Nanoparticles ». *Nature Communications* 10 (1): 768. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08722-z>.

6 PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

6.1 "CINNAPHT" DYES: A NEW CINNOLINE/NAPHTHALIMIDE FUSED HYBRID FLUOROPHORE. SYNTHESIS, PHOTO-PHYSICAL STUDY AND USE FOR BIO-IMAGING

RSC Advances, 2021,11, 30088-30092. <https://doi.org/10.1039/D1RA05110E>

Minh-Duc Hoang,^{a‡} Jean-Baptiste Bodin,^{b‡} Farah Savina,^b Vincent Steinmetz,^a Jérôme Bignon,^a Philippe Durand,^a Gilles Clavier,^c Rachel Méallet Renault^b and Arnaud Chevalier^{*a}

a Université Paris-Saclay, CNRS, Institut de Chimie des Substances Naturelles, UPR 2301, 91198, Gif-sur-Yvette, France.

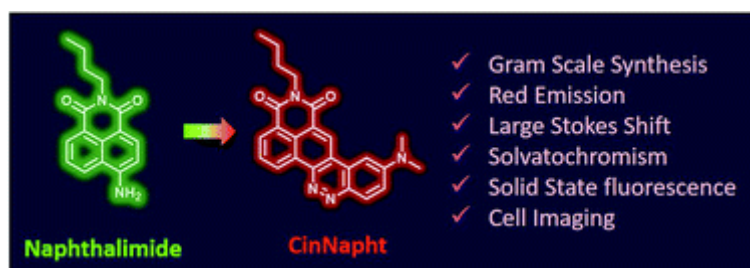
b Université Paris-Saclay, CNRS, Institut des Sciences Moléculaires d'Orsay, Orsay, 91405, France.

c Université Paris-Saclay, ENS Paris-Saclay, CNRS, PPSM, 91190, Gif-sur-Yvette, France.

‡ These authors contributed equally to this work

Abstract

"Six membered diaza ring of Cinnoline have been fused on Naphthalimide dye to give donor-acceptor system called CinNapht. These red shifted fluorophore that can be synthesised in gram scale exhibit as large Stoke Shift and quantum yield up to 0.33. It is also characterized by strong solvatochromic effect for green to red emission as well and can be used for bio-imaging."



6.2 BIOCOMPATIBLE AND PHOTOSTABLE PHOTOACOUSTIC CONTRAST AGENTS AS NANOPARTICLES BASED ON BODIPY-SCAFFOLD AND POLYLACTIDE POLYMERS: SYNTHESIS, FORMULATION AND IN VIVO EVALUATION

Submitted, ACS Applied Materials & Interfaces, major revision

Jean-Baptiste Bodin^{1,2}, Jérôme Gateau³, Justine Cois⁴, Théotim Lucas³, Flora Lefebvre², Laurence Moine², Magali Noiray², Catherine Cailleau², Stéphanie Denis², Gilles Clavier⁴, Nicolas Tsapis^{2*}, Rachel Méallet-Renault^{1*}

1 Université Paris-Saclay, CNRS, Institut des Sciences Moléculaires d'Orsay, 91405, Orsay, France.

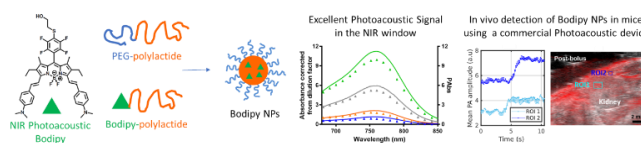
2 Université Paris-Saclay, CNRS, Institut Galien Paris-Saclay, 92296, Châtenay-Malabry, France

3 Sorbonne Université, CNRS, INSERM, Laboratoire d'Imagerie Biomédicale, LIB, F-75006, Paris, France

4 Université Paris-Saclay, ENS Paris-Saclay, CNRS, PPSM, 91190, Gif-sur-Yvette, France

Abstract

We have designed a new Bodipy scaffold for efficient in vivo photoacoustic (PA) imaging of nanoparticles commonly used as drug nanovectors. The new dye has an optimized absorption band in the near-infrared window in biological tissue and a low fluorescence quantum yield that leads to a good photoacoustic generation efficiency. After Bodipy-initiated ring opening polymerization of lactide, the polylactide-Bodipy was formulated into PEGylated nanoparticles (NPs) by mixing with PLA-PEG at different concentrations. Formulated NPs around 100 nm exhibit excellent PA properties: absorption band at 760 nm and molar absorption coefficient in between molecular PA absorbers and gold NPs. Highly improved photostability -compared to cyanine-labelled PLA NPs as well as innocuity in cultured macrophages were demonstrated. After intravenous injection in healthy animals, NPs were easily detected using a commercial PA imaging system and spectral unmixing, opening the way to their use as theranostic agents.



6.3 HOW AGGREGATION CAUSED QUENCHING AND EXCITATION ENERGY TRANSFER ALLOW TO FINELY TUNE PHOTOACOUSTIC EFFICIENCY ?

To be submitted

Jean-Baptiste Bodin^{1,2}, Clément Linger^{2,3}, Jérôme Gateau³, Théo Beguin¹, Théotim Lucas³, Laurence Moine², Ha Thi Minh Huong¹, Anam Fatima¹, Gilles Clavier⁴, Nicolas Tsapis^{2*}, Rachel Méallet-Renault^{1*}

¹ Université Paris-Saclay, CNRS, Institut des Sciences Moléculaires d'Orsay, 91405, Orsay, France.

² Université Paris-Saclay, CNRS, Institut Galien Paris-Saclay, 92296, Châtenay-Malabry, France.

³ Sorbonne Université, CNRS, INSERM, Laboratoire d'Imagerie Biomédicale, LIB, F-75006, Paris, France

⁴ Université Paris-Saclay, ENS Paris-Saclay, CNRS, PPSM, 91190, Gif-sur-Yvette, France.

Abstract

In this article we finely characterized the relation between fluorescence quenching by Aggregation Caused Quenching (ACQ) and the photoacoustic efficiency in polylactide-Bodipy nanoparticles. For this purpose, we exploited a calibrated photoacoustic spectrophotometer and a robust synthetic pathway to create polymer NP with different Bodipy loading amount (from 5% to 50% in weight of PLA-Bodipy). We exploited the Photoacoustic Yield PAY, which represents energy conversion between the absorbed light to the acoustic signal. The presence of two regime for photoacoustic emission was demonstrated: a monomer regime and an Aggregation Caused Quenching Regime. In the monomer regime, below 10% in weight of PLA-Bodipy, the fluorescence emission from the Bodipy monomer limits the photoacoustic yield. Above 10% of PLA-Bodipy, in the ACQ regime, non-radiative deactivations from the aggregates, are predominant and the photoacoustic yield reaches a high value of 93%. We obtained ultrabright NPs ($22 \times 10^7 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) thanks to great PAY of the aggregated NPs (PAY = 0.93 for **NP-50%**) and high NP molar extinction coefficients ($2.4 \times 10^8 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ for **NP-50%**). Finally, we highlighted that high laser fluences ($1\text{-}3.5 \text{ mJ.cm}^{-2}$), at the band maximum excitation, can significantly reduce the photoacoustic signal by ground state depopulation (-20% for **NP-2%**). This non-linear effect can be highly reduced with nanoparticles in the ACQ regime. The > 10% PLA-Bodipy NPs exhibits great photoacoustic brightness and very poor signal loss by nonlinear effects. We developed a fine mathematical fit of the absorption and photoacoustic excitation spectra to spectrally differentiate the photoacoustic efficiency at the band maximum \overline{PGE}_{red} and in the vibrational shoulder \overline{PGE}_{blue} .

7 CONGRÈS

7.1 COMMUNICATIONS ORALES

- EUGLOH Annual Student Research Conference, Global Health Challenges: Diseases of Modern Life, September 28th – 30th 2020. Online Conference. "Biocompatible photoacoustic nanoparticulate contrast agents based on BODIPY-scaffold and polylactide polymers". Jean-Baptiste Bodin^{1,3}, Justine Cois², Flora Lefebvre³, Magali Noiray³, Gilles Clavier², Jérôme Gateau⁴, Nicolas Tsapis³, Rachel Méallet Renault¹. **Second Oral best presentation.**
- "PhotOnline" webconference, SCF, SP2P. October 15th, 2020. "Biocompatible photoacoustic nanoparticulate contrast agents based on BODIPY-scaffold and polylactide polymers". Best Oral Presentation. 2ème Journée Scientifique IRMIT, 7 Décembre 2020. Online Conference. "Biocompatible photoacoustic nanoparticulate contrast agents based on BODIPY-scaffold and polylactide polymers". Jean-Baptiste Bodin^{a,c}, Justine Cois^b, Flora Lefebvre^c, Magali Noiray^c, Gilles Clavier^b, Jérôme Gateau^d, Nicolas Tsapis^c, Rachel Méallet-Renault^a. **Prix du jury de la meilleure flash communication.**
- La journée de l'école doctorale de l'ED 2MIB, 14 Juin 2021. Conférence en ligne. "Biocompatible photoacoustic nanoparticulate contrast agents based on BODIPY-scaffold and polylactide polymers". Jean-Baptiste Bodin^{a,c}, Justine Cois^b, Flora Lefebvre^c, Magali Noiray^c, Gilles Clavier^b, Jérôme Gateau^d, Nicolas Tsapis^c, Rachel Méallet-Renault^a
- Webinaire Jeune chercheur de la SCF RJ'21, 24 Juin 2021. "Biocompatible photoacoustic nanoparticulate contrast agents based on BODIPY-scaffold and polylactide polymers". Jean-Baptiste BODIN (1,3), Justine COÏS (2), Flora LEFEBVRE (3), Magali NOIRAY (3), Gilles CLAVIER (2), Jérôme GATEAU (4), Nicolas TSAPIS (3) Rachel MEALLET-RENAULT (1).
- Demi-journée de la Fédération de Chimie-Physique de Paris-Saclay (CPPS, FR3510 CNRS), 24 Juin 2021. Visioconférence. "Biocompatible photoacoustic nanoparticulate contrast agents based on BODIPY-scaffold and polylactide polymers". **Jean-Baptiste. Bodin**^{1,3}, **Justine Cois**², **Flora Lefebvre**³, **Magali Noiray**³, **Gilles Clavier**², **Jérôme Gateau**⁴, **Nicolas Tsapis**³, **Rachel Méallet-Renault**¹

- C'nano 2020 Toulouse : The Nanoscience Meeting, 23 au 25 novembre 2021. Présentiel. "Biocompatible photoacoustic nanoparticulate contrast agents based on BODIPYscaffold and polylactide polymers". Jean-Baptiste Bodin^{1,3}, Justine Cois², Flora Lefebvre³, Magali Noiray³, Gilles Clavier², Jérôme Gateau⁴, Nicolas Tsapis³, Rachel Méallet-Renault¹
- Deuxième journée scientifique IRMIT (Institut de Recherche sur le Médicament et l'Innovation Thérapeutique), 7 décembre 2020, visioconférence, Biocompatible photoacoustic nanoparticulate contrast agents based on BODIPYscaffold and polylactide polymers". Jean-Baptiste Bodin^{1,3}, Justine Cois², Flora Lefebvre³, Magali Noiray³, Gilles Clavier², Jérôme Gateau⁴, Nicolas Tsapis³, Rachel Méallet-Renault^{a1} **Prix du Jury de la meilleur flash communication.**

7.2 POSTERS

- International Conference on Photochemistry 19-23 Juillet 2021. "Biocompatible photoacoustic nanoparticulate contrast agents based on BODIPY-scaffold and polylactide polymers". Jean-Baptiste Bodin^{1,3}, Justine Cois², Flora Lefebvre³, Magali Noiray³, Gilles Clavier², Jérôme Gateau⁴, Nicolas Tsapis³, Rachel Méallet-Renault^{a1}
- 17th European Molecular Imaging Meeting EMIM 2022 à Thessalonique en Grèce, 15 au 18 mars 2022, présentiel. « Biocompatible and photostable photoacoustic contrast agents based on Bodipy-scaffold and polylactide polymers: synthesis, formulation, photoacoustic characterization and in vivo evaluation". Jean-Baptiste Bodin^{1,2}, Jérôme Gateau³, Justine Cois⁴, Théotim Lucas³, Flora Lefebvre², Laurence Moine², Magali Noiray², Catherine Cailleau², Stéphanie Denis², Gilles Clavier⁴, Nicolas Tsapis², Rachel Méallet-Renault¹. **Poster Award in Optoacoustic, US and Multimodal Probe**