

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

DÉVELOPPEMENT D'UN SYSTÈME D'IMAGERIE PHOTOACOUSTIQUE POUR  
APPLICATION À L'ATHÉROSCLÉROSE

CARL MATTEAU-PELLETIER  
INSTITUT DE GÉNIE BIOMÉDICAL  
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

THÈSE PRÉSENTÉE EN VUE DE L'OBTENTION  
DU DIPLÔME DE PHILOSOPHIÆ DOCTOR  
(GÉNIE BIOMÉDICAL)  
JUILLET 2013

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Cette thèse intitulée :

DÉVELOPPEMENT D'UN SYSTÈME D'IMAGERIE PHOTOACOUSTIQUE POUR  
APPLICATION À L'ATHÉROSCLÉROSE

présentée par : MATTEAU-PELLETIER Carl  
en vue de l'obtention du diplôme de : Philosophiæ Doctor  
a été dûment acceptée par le jury constitué de :

M. SAVARD Pierre, Ph.D., président  
M. LESAGE Frédéric, Ph.D., membre et directeur de recherche  
M. LINA Jean-Marc, Ph.D., membre et codirecteur de recherche  
M. VINET Alain, Ph.D., membre  
M. BEAULIEU Luc, Ph.D., membre

*À mes parents, Hélène et Gilles*

*Et à Françoise Vézina Pelletier*

## REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche le professeur Frédéric Lesage pour m'avoir donné l'opportunité d'effectuer mes travaux aux cycles supérieurs sous sa supervision à l'École Polytechnique de Montréal. Ses conseils avisés ainsi que sa patience furent très appréciés. Je veux également remercier mon codirecteur le professeur Jean-Marc Lina pour les encouragements, l'humour ainsi que les discussions enrichissantes partagées depuis le début de ma maîtrise.

J'aimerais remercier les collaborateurs du Centre de Recherche de l'Institut de Cardiologie de Montréal, en particulier Éric Rhéaume et Mélanie Mecteau. Merci à Léonie Rouleau pour tout le travail effectué dans la synthèse de la sonde. Merci également à Vanessa Durocher-Granger, Natacha Duquette et Juliette Trapeaux pour leur patience et leur aide lors des expériences. Pour leur support technique, je voudrais donner mes remerciements à Steve Dubé, Gaétan Décarie, Jacques Girardin et Claude Turcotte de l'École Polytechnique. Je tiens également à remercier Philippe Pouliot, le professeur Michel Bertrand ainsi que le Dr Gregory A. Lodygensky.

J'aimerais remercier toute l'équipe du laboratoire, avec qui j'ai eu le plaisir de partager l'exaltation de la recherche et ses vicissitudes. Merci à Michèle Desjardins, Samuel Bélanger, Maxime Abran, Mahnoush Amiri, Edgar Guevara-Codina, Li Baoqiang, Romain Berti, Abas Sabouni, Zhang Cong, Peng Ke, Joël Lefebvre, Émilie Beaulieu-Ouellet ainsi que tous ceux et celles qui ont terminé entretemps, Nicolas Ouakli, Karim Zerouali, Simon Dubeau, Simon Archambault, Clément Bonnery, Alexis Machado, Mathieu Dehaes, Louis Gagnon, Edward Baraghis, Nicolas Brieu, Sarah Chapuisat, Jean Provost et Mathieu Coursolles.

Un remerciement spécial adressé à Guillaume et Simon S. pour leurs encouragements.

Enfin, pour leur support indéfectible, je ne saurais trop exprimer ma gratitude envers Gilles, Lise, Aline et Jean, ainsi qu'Hélène, Marco, Laurence et Hughes.

## RÉSUMÉ

La tomographie photoacoustique est une nouvelle modalité d'imagerie préclinique non invasive combinant l'imagerie optique et les ultrasons. Dans le présente forme, elle permet de mesurer la distribution initiale de pression acoustique générée par l'absorption photonique dans les tissus biologiques, et reflète ainsi les propriétés optiques du spécimen examiné. Cette technique s'appuie notamment sur la diffusion optique dans les tissus pour approfondir le champ d'imagerie par rapport aux techniques d'imagerie optique fonctionnant dans les régimes balistique ou quasi-balistique. Par exemple, elle pourrait notamment permettre l'imagerie des structures profondes chez des modèles murins, qui sont fréquemment utilisés en recherche translationnelle. En outre, les principaux absorbants dans les tissus tels que l'oxyhémoglobine, la désoxyhémoglobine et les lipides, ainsi que les agents de contraste exogènes ont un profil d'absorption distinct qui pourrait être mis à profit par les techniques de différenciation multispectrales.

L'objectif global de ce projet est d'appliquer la tomographie photoacoustique pour l'imagerie du système vasculaire chez la souris, et plus spécifiquement l'imagerie moléculaire de la plaque d'athérosclérose. L'imagerie moléculaire vise la détection non invasive de sondes ciblées, dans le but d'apporter une information complémentaire aux données anatomiques. Présentement, plusieurs modalités d'imagerie moléculaire peuvent être appliquées à la détection de la plaque d'athérome. Cependant, aucune ne parvient à s'imposer sur tous les critères décisionnels tels que la sensibilité, la résolution spatiale ou temporelle, le niveau d'exposition à des rayonnements ionisants, la profondeur de pénétration ou le coût. L'imagerie photoacoustique est une modalité hybride entre les techniques optiques et l'imagerie ultrasonore, qui profite donc de la sensibilité de l'optique avec la résolution spatiale ultrasonore.

L'arche aortique a été choisie comme région d'intérêt ciblée pour ce projet. En effet, il s'agit du lieu de formation précoce de la plaque chez des modèles de souris athérosclérotiques ; elle fournit également des repères anatomiques uniques permettant un repositionnement précis pour des études répétées d'imagerie. À ce jour, très peu d'études ont été consacrées au système cardiovasculaire en photoacoustique. Les résultats de cette thèse constituent donc une contribution originale au domaine. Étant donné que le sang est à l'origine d'un fort contraste photoacoustique endogène, l'observation de ce contraste purement vasculaire est une condition favorable à la faisabilité de l'imagerie moléculaire dans cette région. Aussi, la majeure partie de ce travail est orientée vers l'obtention de ce contraste sanguin *in vivo* chez la souris.

La première contribution de cette thèse est liée la réalisation de simulations du problème direct en photoacoustique. Cet objectif visait à estimer l'ordre de grandeur de la pénétration lumineuse possible dans les tissus diffusants ou vasculaires, ainsi que l'influence de divers facteurs expérimentaux. Le signal de pression simulé a d'abord été caractérisé en faisant varier des paramètres telles la taille de la source, son uniformité, son intensité ainsi que l'atténuation ultrasonore dans les tissus. Un modèle de filtrage a également été appliqué sur les signaux de manière à reproduire la bande passante limitée des transducteurs ultrasonores. Des simulations Monte-Carlo ont été réalisées afin d'estimer l'étendue de la région illuminée pour différentes valeurs du coefficient d'absorption optique. Un fantôme numérique reproduisant un vaisseau sanguin a entre autres été utilisé pour évaluer l'influence de la dépendance spectrale du milieu sur l'absorption en profondeur.

La seconde contribution consiste en la fabrication d'un appareil d'imagerie photoacoustique en vue d'une application à l'imagerie de l'arche aortique chez la souris. Le dispositif comprenait également un système d'échographie en mode B statique afin de permettre la validation anatomique du contraste photoacoustique. Les composantes électroniques du circuit d'acquisition ont été placées sur une carte de circuit imprimé dessinée sur mesure. La machine à états d'acquisition a été programmée sur un réseau logique programmable et un lien de communication USB a été créé pour le transfert des données. Un programme de contrôle et de reconstruction des images a été écrit afin de permettre une visualisation rapide du contraste. Le dispositif a été caractérisé et validé sur des fantômes d'imagerie.

Un montage expérimental pour l'imagerie du petit animal a été réalisé en utilisant le système d'imagerie développé, ainsi qu'un système d'imagerie photoacoustique commercial. Des acquisitions ont été effectuées *in vivo* sur des souris. Le contraste échographique a permis l'identification formelle de l'aorte ascendante et de l'arche aortique, soit les vaisseaux ciblés par ce projet. L'injection d'une sonde moléculaire à base de nanocoquilles d'or visant VCAM-1 a permis d'observer une augmentation de contraste photoacoustique dans la région aortique. Un contraste photoacoustique vasculaire a également été obtenu avec une coupe d'échocardiographie standardisée. Les résultats obtenus *in vivo* suggèrent que l'imagerie photoacoustique pourrait potentiellement permettre l'imagerie de vaisseaux macroscopiques chez la souris pour des applications moléculaires.

## ABSTRACT

Photoacoustic tomography has emerged as a new preclinical imaging modality combining optical and ultrasound techniques. In the present implementation, photoacoustic imaging is used to recover the initial distribution of pressure generated by optical absorption in biological tissues. Further computation could allow the recovery of optical properties such as the optical absorption map. This technique relies on optical diffusion in turbid media in order to get a deeper field-of-view compared to optical modalities in the ballistic or nearly ballistic regimes. For instance, it could allow imaging of deep structures or organs in murin models, which are commonly found in translational research. Moreover, the main endogenous absorbing components of tissues such as oxy- or deoxyhemoglobin, lipids, or exogenous contrast agents have a specific absorption profile that could feed multispectral unmixing techniques.

The main goal of this projet is to apply photoacoustic tomography for vascular imaging in mice. More specifically, the technique is to be applied toward molecular imaging of atherosclerotic plaque. Molecular imaging is directed to noninvasive detection of targeted probes, in order to supplement anatomical data with complementary molecular information. Currently, several imaging modalities can be used to detect the atheroma. However, for each application a compromise must be made given that no technique is able to impose itself with respect to all decision criterias such as sensitivity, spatial or temporal resolution, level of exposure to ionizing radiation, depth of penetration or cost. Photoacoustic imaging is an hybrid modality evolving between optical techniques and conventionnal ultrasound imaging, and therefore benefits from the high sensitivity of optics as well as ultrasound spatial resolution.

For this project, the aortic arch has been defined as the targeted region of interest. Indeed, this area is prone to early plaque formation in atherosclerotic mice models and provides unique landmarks for repositioning in repeated studies. To date, very few studies have investigated the cardiovascular system in photoacoustics. Hence, the results of this thesis are an original contribution to the field. Photoacoustic measurements are very sensitive to whole blood, and therefore the detection of vascular contrast represents a window of opportunity for molecular imaging. The main accomplishments of this work have been done toward the detection of vascular contrast *in vivo* in mice.

In the first part of the thesis, we simulated the direct problem in photoacoustics. The purpose of this methodological objective was to estimate the order of magnitude of the depth of penetration of light in turbid or vascular tissues. The simulated pressure signal was first investigated by varying multiple parameters such as the source dimensions, homogeneity and

intensity in addition to the ultrasound attenuation of the simulated propagating medium. The filtering effect due to the transducers limited bandwidth was also modeled and applied to simulated signals. Monte Carlo simulations were also performed in order to estimate the possible depth of imaging for different values of the optical absorption coefficient. A numerical phantom comprising an artery was used to estimate the effect of spectral dependence of the diffusive medium on the far-reaching absorption.

A photoacoustic imaging apparatus was then designed and developed for imaging the aortic arch in mice. The apparatus comprised an ultrasound static B-mode echocardiographic system to allow anatomical validation of photoacoustic contrast. The electronic components of the acquisition circuit were assembled on a custom printed circuit board. The control state machine was programmed on an FPGA, while the data transfer channel was provided by a USB link. A nearly real-time reconstruction software was designed and implemented for the purpose of fast repositioning. The apparatus was characterized and validated by using imaging phantoms.

An experimental setup for small animal imaging was designed and built. Acquisitions were done *in vivo* using the custom photoacoustic imaging apparatus as well as a commercial photoacoustic system. The echocardiogram allowed formal identification of the ascending aorta and aortic arch. The injection of a molecular probe based on gold nanoshells targeting VCAM-1 was followed by an increase in photoacoustic signal in the aortic region. A vascular contrast was also obtained using a standardized echocardiographic view. These results suggest that photoacoustic imaging could potentially be used for molecular imaging of macroscopic vessels in atherosclerotic murin models.

## TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE . . . . .	iii
REMERCIEMENTS . . . . .	iv
RÉSUMÉ . . . . .	v
ABSTRACT . . . . .	vii
TABLE DES MATIÈRES . . . . .	ix
LISTE DES TABLEAUX . . . . .	xii
LISTE DES FIGURES . . . . .	xiii
LISTE DES ANNEXES . . . . .	xvi
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS . . . . .	xvii
LISTE DES SYMBOLES . . . . .	xx
CHAPITRE 1 INTRODUCTION . . . . .	1
1.1 Orientation générale de la thèse . . . . .	1
1.2 Objectifs de recherche . . . . .	3
1.3 Plan de la thèse . . . . .	4
CHAPITRE 2 ATHÉROSCLÉROSE . . . . .	5
2.1 Introduction . . . . .	5
2.2 Pathophysiologie . . . . .	5
2.2.1 Métabolisme et transport du cholestérol . . . . .	6
2.2.2 Inflammation . . . . .	7
2.2.3 Rupture des plaques vulnérables . . . . .	10
2.3 Modèles murins . . . . .	10
2.4 Imagerie moléculaire . . . . .	12
2.4.1 Sondes moléculaires . . . . .	13
2.4.2 Modalités d'imagerie chez l'animal . . . . .	14
2.5 Conclusion . . . . .	19

CHAPITRE 3	PRINCIPES DE L'IMAGERIE PHOTOACOUSTIQUE . . . . .	20
3.1	Introduction . . . . .	20
3.2	Biophotonique . . . . .	20
3.2.1	Mécanismes d'interaction lumière-tissus . . . . .	20
3.2.2	Propriétés optiques des tissus biologiques . . . . .	22
3.2.3	Modèle direct . . . . .	24
3.3	Ultrasons . . . . .	29
3.4	Photoacoustique . . . . .	32
3.4.1	Génération par expansion thermique . . . . .	33
3.4.2	Solution du problème direct . . . . .	37
3.4.3	Solution du problème inverse . . . . .	39
3.4.4	Conclusion . . . . .	42
CHAPITRE 4	SIMULATION DU PROBLÈME DIRECT . . . . .	43
4.1	Simulation Monte-Carlo . . . . .	43
4.2	Propagation acoustique . . . . .	48
4.2.1	Limitation de la bande passante . . . . .	52
4.2.2	Vitesse du son . . . . .	54
4.3	Conclusion . . . . .	54
CHAPITRE 5	CONCEPTION ET DÉVELOPPEMENT DE L'INSTRUMENTATION	58
5.1	Revue de littérature . . . . .	58
5.1.1	Détection ultrasonore . . . . .	59
5.1.2	Illumination . . . . .	61
5.2	Système d'acquisition développé . . . . .	62
5.2.1	Description générale du montage . . . . .	62
5.2.2	Optique . . . . .	63
5.2.3	Acoustique . . . . .	64
5.2.4	Mécanique . . . . .	65
5.2.5	Carte électronique d'acquisition . . . . .	66
5.2.6	FPGA . . . . .	69
5.2.7	Logiciel d'acquisition . . . . .	70
5.3	Reconstruction d'images . . . . .	74
5.4	Conclusion . . . . .	76
CHAPITRE 6	VALIDATION DU SYSTÈME . . . . .	77
6.1	Caractérisation des performances . . . . .	77

6.1.1	Contraste . . . . .	78
6.1.2	Résolution spatiale . . . . .	87
6.1.3	Stabilité et dérive . . . . .	88
6.1.4	Sensibilité . . . . .	89
6.1.5	Artéfact d'imagerie . . . . .	91
6.2	Discussion . . . . .	91
6.3	Conclusion . . . . .	93
CHAPITRE 7 EXPÉRIENCES <i>IN VIVO</i> . . . . .		97
7.1	Sondes moléculaires photoacoustiques . . . . .	97
7.1.1	Revue de littérature . . . . .	97
7.1.2	Sonde utilisée . . . . .	99
7.2	Échocardiographie de la souris . . . . .	100
7.3	Acquisitions avec transducteur monoélément . . . . .	104
7.3.1	Méthodologie . . . . .	104
7.3.2	Résultats . . . . .	104
7.4	Acquisitions avec système commercial . . . . .	108
7.4.1	Méthodologie et résultats . . . . .	109
7.5	Conclusion . . . . .	112
CHAPITRE 8 DISCUSSION GÉNÉRALE . . . . .		117
8.1	Synthèse des travaux et limitations spécifiques . . . . .	117
8.2	Limitations de la solution proposée . . . . .	122
8.3	Perspectives . . . . .	122
8.3.1	Détection ultrasonore . . . . .	123
8.3.2	Acquisitions <i>in vivo</i> . . . . .	124
8.3.3	Imagerie photoacoustique quantitative . . . . .	124
CONCLUSION . . . . .		126
BIBLIOGRAPHIE . . . . .		127
ANNEXES . . . . .		147

**LISTE DES TABLEAUX**

Tableau 2.1	Survol des modalités d'imagerie moléculaire pour utilisation chez le petit animal. . . . .	15
Tableau 4.1	Paramètres spectraux de simulation des tissus . . . . .	47
Tableau 4.2	Coefficients optiques des tissus . . . . .	47
Tableau 6.1	Résolution spatiale du système selon le transducteur utilisé. . . . .	87
Tableau 7.1	Sommaire des coupes d'échocardiographie transthoracique pour une vue de l'aorte ascendante/arche aortique chez la souris. . . . .	101

## LISTE DES FIGURES

Figure 2.1	Progression d'une lésion athéroscléreuse représentée sous forme simplifiée.	8
Figure 3.1	Coefficients d'absorption linéique des principaux chromophores endogènes dans la fenêtre proche infrarouge. . . . .	23
Figure 3.2	Flux énergétique passant à travers un élément de surface $dA$ sous-tendu par un angle solide $d\Omega$ . . . . .	25
Figure 3.3	Dispersion photonique dans un élément différentiel de volume. . . . .	27
Figure 3.4	Pression acoustique théorique générée par une source photoacoustique sphérique homogène. . . . .	39
Figure 3.5	Formes d'onde photoacoustiques pour des impulsions lumineuses courtes.	40
Figure 3.6	Géométrie du problème inverse. . . . .	41
Figure 4.1	Simulation Monte-Carlo pour un volume homogène. . . . .	45
Figure 4.2	Fantôme numérique avec segment vasculaire pour simulation Monte-Carlo. . . . .	46
Figure 4.3	Simulation Monte-Carlo pour un fantôme numérique avec compartiment vasculaire. . . . .	48
Figure 4.4	Simulation Monte-Carlo pour un volume inhomogène avec une source d'illumination multiple. . . . .	49
Figure 4.5	Simulation d'une source acoustique sphérique. . . . .	50
Figure 4.6	Profils de pression pour une source acoustique sphérique de $8\Delta x$ de rayon. . . . .	50
Figure 4.7	Profils de pression pour une source acoustique sphérique de $4\Delta x$ de rayon. . . . .	51
Figure 4.8	Profils de pression pour une source acoustique sphérique de $12\Delta x$ de rayon. . . . .	51
Figure 4.9	Profils de pression pour une source acoustique sphérique de $8\Delta x$ de rayon et une atténuation acoustique $\alpha = 0,75 \text{ dB}/(\text{cm} \cdot \text{MHz}^{1,5})$ . . . . .	52
Figure 4.10	Profils de pression pour une source acoustique sphérique de $8\Delta x$ de rayon et une atténuation acoustique $\alpha = 2 \text{ dB}/(\text{cm} \cdot \text{MHz}^{1,5})$ . . . . .	53
Figure 4.11	Effets de la réponse impulsionnelle du transducteur sur les profils de pression. . . . .	55
Figure 4.12	Profils de pression pour une source sphérique avec un gradient de pression.	56
Figure 4.13	Profils de pression pour une source sphérique avec une coquille. . . . .	56
Figure 4.14	Profils de pression après filtrage passe-bande. . . . .	57

Figure 5.1	Reconstruction de l'image par concaténation des mesures des champs acoustiques. . . . .	60
Figure 5.2	Schéma du flux d'information du système PAT. . . . .	62
Figure 5.3	Schéma du système d'acquisition photoacoustique . . . . .	63
Figure 5.4	Schéma d'illumination du système PAT. . . . .	65
Figure 5.5	Profil de déplacement du transducteur dans une tranche. . . . .	66
Figure 5.6	Schéma-bloc du module d'acquisition . . . . .	68
Figure 5.7	Cartes de circuit imprimé du module d'acquisition. . . . .	69
Figure 5.8	Schéma-bloc du microprogramme d'acquisition du FPGA. . . . .	72
Figure 5.9	Capture d'écran du logiciel d'acquisition. . . . .	73
Figure 5.10	Schéma des principales fonctions du logiciel d'acquisition. . . . .	73
Figure 5.11	Étapes de traitement des signaux RF pour la formation d'une image en mode B. . . . .	75
Figure 5.12	Capture d'écran du logiciel de reconstruction. . . . .	75
Figure 6.1	Fantômes d'imagerie utilisés pour la validation du système. . . . .	78
Figure 6.2	Alignement des images photoacoustiques et ultrasonores. . . . .	79
Figure 6.3	Tranche PAUS d'un fantôme pour deux angles d'illumination. . . . .	80
Figure 6.4	Tranche latérale d'un tube droit. . . . .	80
Figure 6.5	Influence de la profondeur des fantômes sur le contraste PAUS. . . . .	82
Figure 6.6	Rapport signal à bruit (RSB) et rapport contraste à bruit (RCB) en fonction de la profondeur du fantôme. . . . .	83
Figure 6.7	Influence de la profondeur des fantômes sur le contraste PAUS avec une fenêtre de visualisation réduite. . . . .	83
Figure 6.8	Influence de la taille des tubes sur le contraste PAUS. . . . .	85
Figure 6.9	Tranche PAUS d'un cheveu. . . . .	86
Figure 6.10	Volume PA segmenté d'un noeud absorbant. . . . .	86
Figure 6.11	Tranche PAUS d'un fil de carbone de $10 \mu m$ de diamètre utilisé pour estimer la résolution spatiale du système. . . . .	87
Figure 6.12	Réponse impulsionnelle spatiale du système. . . . .	88
Figure 6.13	Évaluation de la dérive au démarrage du système. . . . .	89
Figure 6.14	Intensité maximale du signal PA en fonction de la concentration de nanoparticules d'or. . . . .	90
Figure 6.15	Intensité du signal PA en fonction de la concentration de nanoparticules d'or pour $OD < 1$ . . . . .	91
Figure 6.16	Intensité du signal PA en fonction de la concentration de nanoparticules d'or pour $OD < 1$ . . . . .	92

Figure 6.17	Tranches PAUS de tubes avec différentes concentrations de nanoparticules d'or. . . . .	93
Figure 6.18	Intensité maximale du signal PA en fonction de la fraction volumique en nanoparticules d'or d'un mélange AuNS/sang. . . . .	94
Figure 6.19	Signal photoacoustique RF mesuré au centre d'un cheveu lors d'une acquisition en coupe transversale. . . . .	95
Figure 6.20	Comparaison des signaux PA RF simulés et expérimentaux. . . . .	96
Figure 7.1	Validation <i>in vitro</i> de la sonde dans un milieu sanguin. . . . .	100
Figure 7.2	Images en résonance magnétique d'une souris adulte C57BL/6 <i>post mortem</i> . . . . .	102
Figure 7.3	Coeur et ses principaux embranchements. . . . .	102
Figure 7.4	Coupes échographiques pour une vue de l'aorte ascendante. . . . .	103
Figure 7.5	Plans et axes de référence pour l'échocardiographie. . . . .	103
Figure 7.6	Validation <i>in vivo</i> du contraste échographique. . . . .	105
Figure 7.7	Image PA à 710 nm dans la région de l'arche aortique (AAr), en coupe parasternale court-axe. . . . .	106
Figure 7.8	Échographie de la région aortique. . . . .	107
Figure 7.9	Images PA à 680 nm de la région aortique dans l'axe parasternal long. . . . .	107
Figure 7.10	Transducteur matriciel du système Vevo. . . . .	108
Figure 7.11	Contraste PA d'un fantôme avec le système Vevo. . . . .	111
Figure 7.12	Échographie de la région aortique avec le système Vevo. . . . .	112
Figure 7.13	Contraste PA endogène de l'arche aortique à 734 nm. . . . .	113
Figure 7.14	Détail d'une image PA de l'arche aortique. . . . .	114
Figure 7.15	Artéfact de dédoublement lors d'une expérience <i>in vivo</i> . . . . .	114
Figure 7.16	Moyenne des signaux PA dans la région aortique avec injection de AuNS. . . . .	115
Figure 7.17	Signaux PA sélectionnés dans la région aortique avec injection de AuNS. . . . .	116

**LISTE DES ANNEXES**

Annexe A	CONTRIBUTIONS SCIENTIFIQUES . . . . .	147
Annexe B	FANTÔMES D'IMAGERIE PHOTOACOUSTIQUE . . . . .	149

## LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

2D	Bidimensionnel
3D	Tridimensionnel
$\alpha_v\beta_3$	Intégrine alpha V et intégrine bêta 3
$\mu C$	Microcontrôleur
AAo	Aorte ascendante
AAr	Arche aortique
ANSI	<i>American National Standards Institute</i>
Apo	Apolipoprotéine
AuNP	Nanoparticule d'or
AuNS	Nanocoquille d'or
BHQ3	<i>Black Hole Quencher 3</i>
CAN	Convertisseur analogique à numérique
CCR2	<i>C-C Chemokine Receptor type 2</i>
CD36	<i>Cluster of Differentiation 36</i>
CETP	Protéine de transfert des esters de cholestérol
CLIO	<i>CrossLinked superparamagnetic Iron Oxide</i>
CNA	Convertisseur numérique à analogique
CT	Tomodensitométrie
Cy	Cyanine
dB	Décibel
DEL	Diode électroluminescente
ECG	Électrocardiographie
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
FDG	Fluorodésoxyglucose
FDM	Méthode des différences finies
FEM	Méthode des éléments finis
FIFO	<i>First In First Out</i>
FMT	Tomographie moléculaire par fluorescence
FP	Fabry-Perot
FPGA	<i>Field Programmable Gate Array</i>
FWHM	<i>Full Width at Half Maximum</i>
Gd-DOTA	<i>Gadolinium-DOTA</i>

Gd-DTPA	<i>Gadolinium-Diethylene Triamine Pentaacetic Acid</i>
HDL	Lipoprotéine de haute densité
HMG-CoA	Hydroxyméthylglutaryl-coenzyme A
IA	Artère brachiocéphalique
I <sup>2</sup> C	<i>Inter-Integrated Circuit</i>
ICAM1	<i>Intercellular Cellular Adhesion Molecule-1</i>
ICG	<i>Indocyanine green</i>
IL-1 $\beta$	Interleukine-1-bêta
IRM	Imagerie par résonance magnétique
IVUS	Ultrasonographie intravasculaire
JTAG	<i>Joint Test Action Group</i>
LA	Oreillette gauche
LCCA	Artère carotide commune gauche
LDL	Lipoprotéine de basse densité
LDLR	Récepteur de lipoprotéine de basse densité
LNA	<i>Low Noise Amplifier</i>
LSC	Artère subclavière gauche
LSF	<i>Line Spread Function</i>
LSVC	Veine cave supérieure gauche
MCP-1	<i>Monocyte Chemotactic Protein-1</i>
M-CSF	<i>Macrophage-Colony Stimulating Factor</i>
MCV	Maladie cardiovasculaire
MCX	<i>Monte-Carlo eXtreme</i>
MMP	Métalloprotéinase matricielle
MSOT	Tomographie optoacoustique
NIRS	Spectroscopie proche infrarouge
NP	Nanoparticule
OCT	Tomographie par cohérence optique
OD	Densité optique
OPO	Oscillateur paramétrique optique
oxLDL	LDL modifié
PA	Photoacoustique
PAA	Polyacrylamide
PAT	Tomographie photoacoustique
PAUS	Photoacoustique et échographique
PDGF	Facteur de croissance dérivé des plaquettes

PEG	Polyéthylène glycol
PSF	<i>Point Spread Function</i>
PTF	<i>Point Target Focus</i>
PTFE	Polytétrafluoroéthylène
PVA	Alcool polyvinylique
RAM	<i>Random Access Memory</i>
RCB	Rapport contraste à bruit
RF	Radiofréquence
RGD	Arginine (R), glycine (G), aspartate (D)
RL	<i>Right parasternal Longitudinal</i>
ROI	Région d'intérêt
ROM	<i>Read-Only Memory</i>
RPA	Artère pulmonaire droite
RSB	Rapport signal à bruit
RSVC	Veine cave supérieure droite
RTE	Équation du transport radiatif
RTV	<i>Room Temperature Vulcanizing</i>
SAFT	<i>Synthetic Aperture Focusing Technique</i>
SMC	Cellule musculaire lisse
SPECT	Tomographie d'émission monophotonique
SPR	Résonance plasmonique de surface
SR-A	<i>Scavenger Receptor-A</i>
St	Sternum
TAT	Tomographie thermoacoustique
TEP	Tomographie par émission de positons
Th	Thymus
TNF- $\alpha$	Facteur de nécrose tumorale alpha
Tr	Trachée
US	Ultrasonographie
USB	<i>Universal Serial Bus</i>
USPIO	<i>Ultrasmall SuperParamagnetic Iron Oxide</i>
VCAM-1	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule-1</i>
VHDL	<i>Very high-speed integrated circuit Hardware Description Language</i>
VLA-4	<i>Very Late Antigen-4</i>
VLDL	Lipoprotéine de très basse densité
XML	<i>Extensible Markup Language</i>

## LISTE DES SYMBOLES

$\alpha$	coefficient d'atténuation acoustique
$\alpha_P$	coefficient d'augmentation de pression isochore
$\alpha_{th}$	diffusivité thermique
<b><math>B</math></b>	champ magnétique
$\beta$	coefficient d'expansion thermique isobare
$c$	vitesse de la lumière dans un milieu
$c_L$	vitesse longitudinale du son
$C_m$	concentration
$C_P$	capacité thermique massique isobare
$C_V$	capacité thermique massique isochore
$d$	distance de la source
$d_f$	longueur de la zone focale
$D$	coefficient de diffusion
$\delta$	distance de pénétration
$\delta$	distribution de Dirac
$\delta_{ax}$	résolution axiale
$\delta_{lat}$	résolution latérale
$\Delta f$	bande passante du transducteur
$e$	bruit
<b><math>E</math></b>	champ électrique
$\epsilon$	coefficient d'extinction
$\eta$	rendement de conversion énergétique
$f$	fréquence temporelle
$f_0$	fréquence centrale du transducteur
$F$	fluence
$\phi$	colatitude
$\phi$	potentiel de vitesse
$\Phi$	intensité lumineuse
$\varphi$	radiance
$\varphi_\nu$	radiance spectrale
$g$	facteur d'anisotropie
$G$	fonction de Green
$\gamma$	coefficient de Laplace

$\Gamma$	paramètre de Grüneisen
$h$	réponse impulsionnelle du transducteur
$h_t$	fonction temporelle de l'échauffement
$h_r$	fonction spatiale de l'échauffement
$H$	énergie déposée
$\mathbf{k}$	vecteur d'onde acoustique
$k_L$	nombre d'onde
$K$	module d'élasticité isostatique
$K_T$	compressibilité isotherme
$\kappa$	conductivité thermique
$i$	intensité
$l$	largeur du faisceau ultrasonore
$\lambda$	longueur d'onde optique
$\lambda_L$	longueur d'onde acoustique
$\mu$	perméabilité
$\mu_a$	coefficient d'absorption
$\mu_s$	coefficient de dispersion
$\mu'_s$	coefficient de dispersion réduit
$\mu_t$	coefficient de transport
$\mu'_t$	coefficient de transport réduit
$\mu_{eff}$	coefficient d'atténuation effectif
$\hat{\mu}_{tube}$	moyenne de l'objet d'intérêt
$\hat{\mu}_{fond}$	moyenne du fond de l'image
$n$	indice de réfraction
$\mathbf{n}$	vecteur normal unitaire sortant
$\nu$	fréquence optique
$\omega$	fréquence angulaire
$p$	pression
$P$	puissance
$q$	source optique
$Q$	facteur de qualité
$r$	coordonnée radiale
$\mathbf{r}$	vecteur position
$R$	distribution spatiale des réflecteurs/diffuseurs
$R_{US}$	coefficient de réflexion
$\rho$	masse volumique

$s$	entropie
$s$	image
$\mathbf{s}$	vecteur direction
$S$	source de photons
$sO_2$	taux de saturation en oxygène
$\hat{\sigma}_{bruit}$	écart type du bruit
$\hat{\sigma}_{fond}$	écart type du fond de l'image
$T$	température
$T_{US}$	coefficient de transmission
$\tau$	constante de temps de l'échauffement
$\tau_p$	durée de propagation acoustique
$\tau_{th}$	durée de relaxation thermique
$\theta$	longitude
$\Theta$	fonction de phase normalisée
$u$	signal RF de pression
$\mathbf{u}$	déplacement
$\mathbf{U}$	fonction de Heaviside
$\mathbf{v}$	vélocité
$W$	travail
$z_0$	distance focale
$Z$	impédance acoustique

## CHAPITRE 1

### INTRODUCTION

#### 1.1 Orientation générale de la thèse

L'étude de l'interaction entre la lumière et les tissus biologiques couvre un champ relativement large qui regroupe, entre autres, la thérapie photodynamique, le détatouage au laser, l'oxymétrie, et l'imagerie optique. L'intérêt pour l'optique biomédicale repose sur la recherche de procédés rapides, performants et à faibles coûts. Les dernières décennies ont vu une progression immense dans les techniques optiques aux échelles micro, méso et macroscopique<sup>1</sup>. Les microscopies confocale et multiphotonique ont étendu le potentiel de mesure des fonctionnalités cellulaires, de même que la tomographie par cohérence optique pour les échelles tissulaires. Ces progrès ont été rendus possibles par des percées technologiques telles que les lasers, et de nombreuses modalités bénéficieront encore énormément de l'amélioration de leurs composantes. Les modalités microscopiques ont un champ de vision comparable à celui d'une biopsie excisionnelle conventionnelle, et nécessitent, pour des mesures *in vivo*, l'utilisation de fenêtres optiques, d'implants ou d'autres approches similaires. Ce travail focalisera plutôt sur les modalités *in vivo* non invasives à l'échelle macroscopique et utilisant une sonde moléculaire, qui sont regroupées sous le vocable d'*imagerie moléculaire*.

Les applications de l'imagerie moléculaire sont extrêmement nombreuses et comprennent notamment les maladies cardiovasculaires (CV), plus grande cause de mortalité dans les pays industrialisés, et son pendant l'athérosclérose, qui domine l'étiologie de ces maladies. Pourtant, elles ne sont pas l'apanage des sociétés modernes et le plus ancien cas connu d'athérosclérose a été diagnostiqué sur une momie égyptienne, par tomodensitométrie (CT) (Allam *et al.*, 2011). Néanmoins, il est certainement désirable d'obtenir un diagnostic plus précoce. L'athérosclérose étant une maladie des artères, la capacité d'identifier les plaques vulnérables avant la sténose luminale et la rupture est la pierre angulaire de la détection précoce. De nombreux individus développent des maladies CV en l'absence de profils de lipoprotéines anormaux. Le domaine général de l'imagerie des maladies CV athérosclérotiques comprend les changements primaires survenant dans la paroi artérielle et la plaque, et les variations secondaires, liées à la structure et à la fonction cardiaque. En moyenne, la plaque vulnérable est non calcifiée, non sténosée et de composition hétérogène, ce qui complique considérablement sa visualisa-

---

1. Les échelles micro, méso et macroscopique sont associées aux organismes vivants dont la taille est respectivement inférieure à 1 mm, de 1 mm à 1 cm, et supérieure à 1 cm.

tion non invasive (Falk *et al.*, 1995). Le rétrécissement des artères a traditionnellement été détecté avec des techniques telles que l’angiographie, l’échographie, la tomographie par émission de positons (TEP) et l’imagerie par résonance magnétique (IRM) (Fayad et Fuster, 2001). Toutefois, le syndrome coronarien aigu résulte majoritairement d’une rupture de plaque aux sites caractérisés seulement par un faible rétrécissement luminal (Myerburg *et al.*, 1997). Plusieurs techniques de cathétérisme ont été envisagées pour évaluer des caractéristiques morphologiques des plaques (p. ex. épaisseur de la chape fibreuse, contenu en lipides, étendue de la calcification) ou des propriétés mécaniques (p. ex. élasticité), notamment l’angioscopie, la tomographie par cohérence optique (OCT), la thermographie, la spectroscopie proche infrarouge (NIRS), l’imagerie par résonance magnétique intravasculaire et les ultrasons intravasculaires (IVUS) (Fayad et Fuster, 2001). À cause de la proximité entre les capteurs et la paroi artérielle, ces techniques sont en mesure d’apporter une grande résolution spatiale. La faible épaisseur de la paroi artérielle saine présente toutefois un défi considérable pour l’imagerie, ainsi que le mouvement continu des structures et la dispersion des substrats pathologiques. Également, le cathétérisme demeure une procédure complexe associée à des complications potentielles. Actuellement, la composition des plaques d’athérosclérose ne peut pas être déterminée avec précision *in vivo*, bien que cette information puisse refléter l’état d’avancement de la maladie et le niveau de risque individuel. Les technologies d’imagerie moléculaire sont précisément destinées à apporter ce type d’information moléculaire. Bien que de nombreuses technologies soient destinées à une application sur l’humain, les modèles animaux demeurent une source d’information essentielle dans l’étude de nombreuses pathologies, d’où la nécessité de concevoir des technologies qui y sont adaptées.

La tomographie photoacoustique (PAT)<sup>2</sup> est une modalité d’imagerie médicale non invasive au confluent des technologies optiques et ultrasonores qui s’inscrit tout à fait au sein des techniques moléculaires. Son principe de fonctionnement est simple : des impulsions brèves de lumière sont injectées dans les tissus et sont diffusées par ceux-ci jusqu’à l’absorption des photons ou leur sortie. L’absorption provoque alors une expansion thermoélastique qui génère une onde de pression ultrasonore se propageant jusqu’en surface. En mesurant ces signaux de pression, il est possible d’établir la distribution spatiale des émetteurs photoacoustiques dans les tissus. L’effet photoacoustique peut être observé avec toute radiation qui augmente rapidement (nano à microseconde) la température de l’échantillon, comme les micro-ondes<sup>3</sup> ou la lumière proche infrarouge. Le contraste obtenu est dû aux absorbants optiques endogènes comme l’oxyhémoglobine, la désoxyhémoglobine ou les lipides ainsi qu’aux agents exogènes comme les sondes ciblées destinées à l’imagerie moléculaire. La diffusion ultrasonore étant

---

2. Aussi appelée tomographie optoacoustique (MSOT).

3. On parle alors de tomographie thermoacoustique (TAT).

relativement faible dans les tissus, la résolution spatiale est similaire à celle de l'imagerie ultrasonore, soit environ 5-300  $\mu\text{m}$  selon la profondeur et la bande spectrale ultrasonore utilisée. L'imagerie photoacoustique bénéficie donc de la forte sensibilité des techniques optiques combinée à la résolution de l'imagerie ultrasonore ; c'est là son principal avantage. La profondeur de tissu pouvant générer un fort contraste a été rapportée comme étant de l'ordre du cm (Xu et Wang, 2006), ce qui permettrait l'étude tomographique de nombreux tissus et organes chez des modèles murins, par exemple.

À l'heure actuelle, l'imagerie photoacoustique demeure une technologie en constant développement, autant au niveau des techniques d'instrumentation que de reconstruction d'image. Néanmoins, de nombreuses applications ont été rapportées chez le petit animal en imagerie fonctionnelle et moléculaire (Xu et Wang, 2006; Yao et Jiang, 2011). L'imagerie moléculaire de l'athérosclérose apparaît alors comme une cible d'intérêt pouvant bénéficier du potentiel de l'imagerie photoacoustique (PA) en terme de résolution spatiale et temporelle, ainsi que de profondeur de champ.

Les travaux précédents réalisés dans ce champ d'étude sont rapportés à la section 2.4.2, tandis que le choix du modèle animal est justifié à la section 2.3. Les revues de littérature ont été regroupées par thème au fil des chapitres de la thèse, dont le plan est présenté à la section 1.3. Ces revues nous ont permis de définir les objectifs suivants orientant les travaux.

## 1.2 Objectifs de recherche

Le but principal de cette thèse est d'évaluer le potentiel de la PAT appliquée à la détection de la plaque d'athérosclérose chez la souris. En particulier, le projet vise à mesurer un contraste PA sanguin endogène au site de la plaque avec localisation anatomique (US) ainsi que l'activité PA temporelle au site de la plaque suite à l'injection d'une sonde moléculaire. Afin de réaliser cet objectif global, des objectifs spécifiques ont été établis.

**Objectif 1. Effectuer des simulations du problème direct en photoacoustique.** Étant donné la double nature - optique et acoustique - de l'effet photoacoustique, les simulations des deux types devront être effectuées afin d'expliquer les mesures sachant les propriétés du milieu. Même si le cadre théorique de l'imagerie PA est bien établi, la réalisation de cet objectif nous donnera d'abord des éléments de réponse au niveau de la faisabilité de l'imagerie PA pour une cible aussi profonde que l'aorte, même à l'échelle des modèles murins. Aussi, ces simulations nous permettront de prédire l'allure des signaux observables et ainsi de faciliter et d'accélérer les processus de développement et de validation de l'appareil.

**Objectif 2. Développer un appareil d'imagerie photoacoustique.** Il s'agit de concevoir et fabriquer un système d'imagerie PA destiné à l'imagerie de la région

aortique chez la souris. Le système devra également être en mesure de produire des images échographiques pouvant directement être mises en correspondance avec les images PA. En effet, le repérage anatomique, reposant sur l'emplacement et la géométrie des organes, est essentiel pour valider la spatialisation des sondes. Les ultrasons étant le mode de réception de l'imagerie PA, l'ajout d'un mode par écho d'impulsion constitue un passage naturel lors du développement d'un système. Le système devra produire un contraste PA en quasi temps réel pour corriger le positionnement de l'animal par rapport au système. Le système développé devra être testé, caractérisé et validé sur des fantômes de tissus.

**Objectif 3. Réaliser des expériences *in vivo* en imagerie photoacoustique.**

Des acquisitions *in vivo* devront être réalisées chez la souris, avec et sans injection d'une sonde moléculaire PA. Les régions d'intérêt des images PA seront validées à l'aide du contraste échographique. Étant donné que le sang est appelé à générer un fort contraste endogène, la visualisation de ce contraste pourrait nous renseigner sur la faisabilité de l'imagerie moléculaire. Ce dernier objectif permettra d'établir les possibilités et limitations actuelles de la PA pour l'imagerie vasculaire des modèles murins et de proposer des améliorations futures.

### 1.3 Plan de la thèse

Cette thèse se divise en sept chapitres. Outre la présente introduction, le deuxième chapitre constitue un tour d'horizon de la pathophysiologie de l'athérosclérose et des techniques d'imagerie moléculaire. Les caractéristiques des différentes technologies d'imagerie moléculaire du petit animal seront présentées sommairement, ainsi que les modèles de souris athérosclérotiques. L'imagerie PA ainsi située, le cadre théorique présentera une revue du modèle de propagation photonique dans les tissus biologiques, ainsi que du modèle acoustique suffisant à expliquer les mesures PA et par écho d'impulsion. L'effet photoacoustique sera revu en détails, notamment afin de souligner les propriétés à l'origine du signal. Le chapitre 4 présentera les résultats des simulations optique et acoustique du problème direct. Les aspects touchant à l'instrumentation développée seront présentés au cinquième chapitre. Une revue de littérature décrivant les principaux systèmes utilisés pour l'imagerie PA à l'échelle macroscopique précèdera la description du système fabriqué dans le cadre de ce projet. Suivra, au chapitre 6, les résultats de la caractérisation du système et de sa validation sur des fantômes d'imagerie. L'avant-dernier chapitre sera consacré aux résultats obtenus *in vivo*. Le chapitre 8 est une discussion générale destinée à synthétiser les travaux réalisés et leurs limitations, mais également à explorer les perspectives en découlant.

## CHAPITRE 2

### ATHÉROSCLÉROSE

#### 2.1 Introduction

Les maladies cardiovasculaires (MCV) sont une des premières causes de mortalité et de morbidité dans le monde, pour un total estimé en 2008 à 17,3 millions de décès par an, soit environ 30 % des décès survenus selon l'Organisation mondiale de la Santé (OMS, 2011). L'athérosclérose et ses complications sont à l'origine de la vaste majorité des cas de MCV. Une large proportion des patients affectés par un événement aigu tel que la mort subite, l'infarctus aigu du myocarde ou l'accident vasculaire cérébral n'ont pas de symptômes préalables et de nouvelles stratégies doivent être adoptées en plus des méthodes traditionnelles pour éradiquer l'épidémie de MCV athérosclérotiques. La détection et le traitement précoce de l'athérosclérose asymptomatique à haut risque reste une solution en tête de liste (Schaar *et al.*, 2004). Bien que la rupture de plaque soit le type le plus commun de complication, comptant pour environ 75 % des infarctus du myocarde (Finn *et al.*, 2010), les plaques fautives sont à divers degrés d'avancement (Naghavi *et al.*, 2003). Une méthode de détection robuste devrait donc être applicable à tous les stades physiologiques concernés.

#### 2.2 Pathophysiologie

L'athérosclérose est une inflammation chronique causée principalement par des prédispositions génétiques et des comportements liés à la santé. Elle résulte de l'interaction entre les lipoprotéines modifiées, les leucocytes, les plaquettes et les composantes cellulaires normales de la paroi artérielle. La lésion athéroscléreuse<sup>1</sup> consiste en l'épaississement local de la couche la plus intérieure de l'artère, l'intima. Du point de vue histologique, elle est constituée de cellules, d'éléments du tissu conjonctif, de lipides et de débris. La compréhension de la pathogénèse a évolué considérablement au cours des dernières décennies (Steinberg, 2004) et repose sur la combinaison de recherches chez des modèles animaux, des cultures cellulaires, des lésions humaines, des investigations cliniques et des études épidémiologiques. Nous nous limiterons ici à un bref survol des voies métaboliques du cholestérol et des événements inflammatoires au site de lésion. Il est important de noter que les aspects mécaniques jouent également un rôle prépondérant car l'augmentation des phénomènes menant à l'athérosclé-

---

1. Également appelée athérome ou plaque athéromateuse.

rose est attribuable au moins en partie aux forces mécaniques dues à la haute pression pulsée sur la paroi endothéliale.

### 2.2.1 Métabolisme et transport du cholestérol

#### Cholestérol

Toutes les cellules des mammifères requièrent du cholestérol pour leurs membranes plasmiques. Celui-ci peut être synthétisé par le corps à partir de substances plus simples, ou alors récupéré des sources alimentaires. Le cas échéant, le corps compense pour l'apport en cholestérol exogène par la réduction de la production interne. Le cholestérol sert principalement à établir la perméabilité et la fluidité des membranes plasmiques, et ce, en s'intercalant entre les molécules de phospholipides. À l'intérieur des cellules, le cholestérol est un précurseur de plusieurs voies métaboliques tels les acides biliaires, les hormones stéroïdes et la vitamine D. Il est également impliqué dans le transport intracellulaire, la conduction nerveuse et la signalisation cellulaire.

La synthèse du cholestérol commence avec une molécule d'acétyl-CoA et une molécule d'acétoacétyl-CoA. Celles-ci sont hydratées pour former l'hydroxyméthylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA). Cette dernière est ensuite réduite en mévalonate par l'enzyme HMG-CoA réductase. Cette étape est le goulot d'étranglement de la synthèse et le site d'action des médicaments de la famille des statines (inhibiteurs compétitifs de HMG-CoA réductase). Des réactions successives comprenant cinq produits intermédiaires sont ensuite nécessaires pour arriver à une molécule de cholestérol (Stryer *et al.*, 2000).

#### Lipoprotéines

Les lipoprotéines du sang sont une famille de complexes globulaires, ayant chacune un noyau de lipides neutres entouré d'une monocouche de phospholipides et de protéines. Celles-ci, appelées *apolipoprotéines* (notamment ApoA, ApoB, ApoC et ApoE), servent à identifier les conteneurs et leurs cargaisons distinctes, soit les différentes formes de lipides autrement insolubles. Les chylomicrons sont les lipoprotéines les plus larges et sont synthétisées par les intestins pour le transport des triglycérides et du cholestérol diététique jusqu'aux tissus musculaires et adipeux. La lipase brise alors les chylomicrons et les acides gras entrent dans les tissus. Les restants des chylomicrons sont ensuite absorbés par le foie. Les lipoprotéines de très basse densité (VLDL), contenant l'ApoB-100 et l'ApoE, sont synthétisés par le foie et servent à transporter les triglycérides et du cholestérol non requis par le foie aux tissus périphériques. Une portion des VLDL est ensuite maturée en lipoprotéine de basse densité (LDL) par l'enlèvement des noyaux de triglycérides et la dissociation des apolipoprotéines

autres que ApoB. La majorité du cholestérol endogène est transporté par les LDL. Celles-ci sont captées par les récepteurs LDLR pour internalisation par endocytose (Goldstein et Brown, 1977). La concentration en LDL est associée exponentiellement au risque de survenue d'un événement cardiovasculaire aigu. À l'instar du LDL, le contenu lipidique des lipoprotéines de haute densité (HDL) est formé essentiellement de cholestérol. Cependant, leur apolipoprotéine principale est l'ApoA. Les concentrations plasmatiques de HDL sont inversement associées à l'athérosclérose, ce qui en fait une cible thérapeutique potentielle. Toutefois, l'*hypothèse HDL* demeure une question de recherche étant donné que la plupart des études la soutenant ont été obtenues avec des variations marquées des autres lipides (Vergeer *et al.*, 2010). Le métabolisme du HDL est complexe et est influencé par de nombreux facteurs, mais leur mécanisme protecteur le plus reconnu est la promotion du flux de cholestérol depuis les macrophages et son transport jusqu'au foie pour excrétion subséquence, appelé *transport inverse du cholestérol*. Les esters de cholestérol du HDL peuvent être échangés avec des LDL ou des VLDL contre des triglycérides via l'action de la protéine de transfert des esters de cholestérol (CETP). Le cholestérol retourné au foie pourra, entre autres, être excrété directement dans les voies digestives via la bile ou être transformé en sels biliaires.

### 2.2.2 Inflammation

La paroi artérielle normale est constituée de trois couches. La couche la plus intérieure, l'*intima*, comprend une monocouche de cellules endothéliales posées sur une membrane basale, et contient typiquement une accumulation de matrice extracellulaire et de cellules musculaires lisses dispersées. La monocouche endothéliale résiste à la coagulation et à l'interaction avec les leucocytes du flux sanguin. L'endothélium normal produit des substances vasodilatatrices telles que l'oxide nitrique et les stimulateurs de fibrinolyse comme l'activateur tissulaire plasminogène, qui réduit les risques de thrombose. Une épaisse lame élastique interne sépare l'intima de la couche *média*. Cette couche intermédiaire est principalement constituée de cellules musculaires lisses investies par une matrice extracellulaire riche en élastine et en collagène. Une lame élastique externe vient démarquer la média de la couche la plus externe de l'artère, l'*adventice*. Celle-ci contient les *vasa vasorum*, des mastocytes dispersées ainsi que des terminaisons nerveuses du système autonome.

### Strie lipidique

Les sites de prédilection pour la formation des lésions sont associés à un écoulement sanguin turbulent et une haute tension pariétale, par exemple aux bifurcations du tronc vasculaire. Le LDL s'infiltré alors dans la paroi artérielle et est retenu dans l'intima au moins

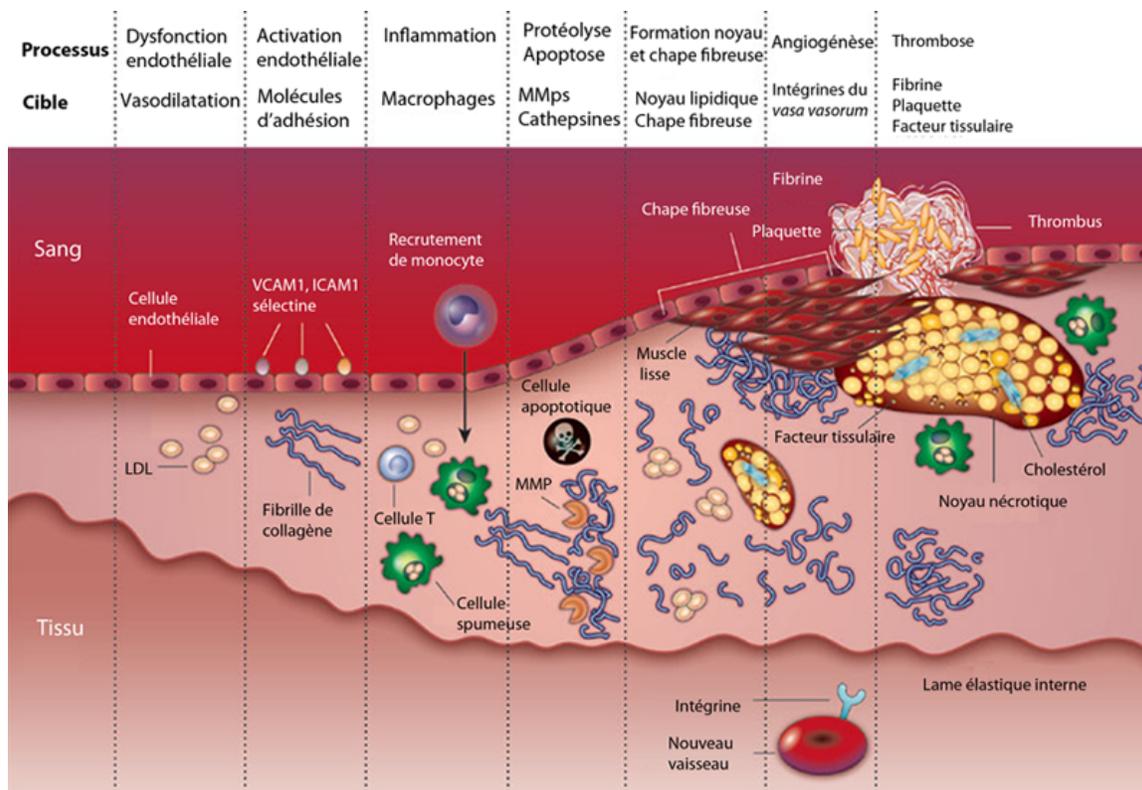


Figure 2.1 Progression d'une lésion athéroscléreuse représentée sous forme simplifiée. Le développement part d'un vaisseau sanguin normal (extrémité gauche) à un vaisseau avec plaque et thrombus surimposé (extrémité droite). Les cibles potentielles pour l'imagerie moléculaire sont indiquées à chaque stade. Figure adaptée de Wu *et al.* (2007) et Sanz et Fayad (2008).

partiellement par la liaison entre l'ApoB-100 et les protéoglycanes de la matrice extracellulaire (Skalen *et al.*, 2002; Tabas *et al.*, 2007). Le LDL, qui n'est plus protégé de l'oxydation comme dans le plasma, est alors altéré par des mécanismes enzymatiques et non enzymatiques. Le LDL ainsi modifié (oxLDL) est immunogénique et serait un élément déclencheur de la cascade de réponses immunitaires innées et acquises impliquées dans l'inflammation (Glass et Witztum, 2001; Leitinger, 2003; Hansson et Hermansson, 2011). Selon une hypothèse, les plaquettes seraient les premières arrivées sur les lieux du crime (Massberg *et al.*, 2002). Certaines de leurs glycoprotéines se lieraient alors à des récepteurs des cellules endothéliales, ce qui contribuerait à leur activation. Les cellules endothéliales activées vont exprimer une variété de molécules d'adhésion des leucocytes, dont VCAM-1, qui se lie à son ligand complémentaire sur le leucocyte, l'intégrine VLA-4 (Ley et Reutershan, 2006). Une fois attaché à l'endothélium, la migration chimiotactique des leucocytes dans l'espace subendothélial est provoquée par la sécrétion de chimiokines telles que MCP-1 (récepteur CCR2) (Gerszten *et al.*, 2000); il s'ensuit alors une phase de roulement du leucocyte sur la paroi vasculaire, puis la diapédèse. Les phagocytes mononucléaires tels que les monocytes/macrophages sont les plus abondants dans les lésions athéroscléreuses, mais les lymphocytes T, les cellules B, les mastocytes, les cellules dendritiques et des neutrophiles s'y accumulent également (Rotzius *et al.*, 2010; Weber et Noels, 2011). Une fois présents dans l'intima, les monocytes peuvent se différencier en macrophages sous l'impulsion d'un facteur de croissance comme M-CSF. Ils expriment alors à leur tour des récepteurs éboueurs (p. ex. SR-A et CD-36) qui leur permettent d'internaliser des lipoprotéines modifiées. Les cellules résultantes, appelées *cellules spumeuses* en raison de l'apparence sous microscope des vésicules lipidiques dans le cytoplasme, auraient une panoplie de fonctions, dont la sécrétion de cytokines interleukines-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) et TNF- $\alpha$ , qui amplifient la réponse inflammatoire. Les macrophages ont deux mécanismes potentiels principaux pour disposer du cholestérol en excès : une modification enzymatique vers des formes plus solubles ou le reflux via le transport membranaire ; l'accepteur serait alors HDL. L'accumulation des cellules spumeuses dans la paroi forme la strie lipidique, un stade réversible mais menant au développement de la lésion athéromateuse. La plupart des enfants âgés de plus de 10 ans ont des stries lipidiques (Kumar *et al.*, 2007).

### **Lésions avancées**

Les cellules de l'athérome prolifèrent, sous la gouverne de régulateurs comme le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF). En particulier, dans l'intima, les cellules musculaires lisses (SMC) subissent une modulation phénotypique et produisent de la matrice extracellulaire comprenant du collagène interstitiel, de l'élastine et des protéoglycanes et forment une chape fibreuse qui couvre la plaque. Les SMC et les cellules spumeuses peuvent

mourir par apoptose (Geng et Libby, 2002); les lipides relâchés sous forme de cholestérol cristallisé et les débris cellulaires s'accumulent alors dans l'espace extracellulaire pour former le *noyau nécrotique*; l'élimination des cellules mortes (efférocytose) est alors déficiente. Les phagocytes activés produisent des métalloprotéinases matricielles (MMP) qui peuvent dégrader la matrice extracellulaire qui donne sa rigidité à la chape fibreuse. Les macrophages sécrètent aussi le facteur tissulaire, qui peut interagir avec les plaquettes pour former les thrombi. Les plaques avancées favorisent également le développement des microvaisseaux du vasa vasorum qui s'étendent profondément depuis l'adventice vers l'intima. L'angiogénèse de ce réseau pourrait supporter la croissance de la plaque en apportant l'oxygène les nutriments qui ne peuvent rejoindre les couches artérielles profondes par simple diffusion (Moreno *et al.*, 2006).

### 2.2.3 Rupture des plaques vulnérables

Plusieurs scénarios permettent d'expliquer la formation des thrombi qui interrompent le flux sanguin localement ou dans les segments artériels en aval. Le scénario de la rupture de la chape fibreuse mince est le scénario le plus évoqué (Finn *et al.*, 2010). Si les mécanismes fibrinolytiques réussissent à dominer la coagulation, un thrombus mural plutôt qu'occlusif se formera. Le scénario de l'érosion superficielle, responsable de 30 à 35 % de l'étiologie de la mort subite coronarienne (Finn *et al.*, 2010), consiste en la desquamation de cellules endothéliales de la monocouche qui couvre l'intima et l'exposition subséquente du collagène subendothélial et du facteur von Willebrand qui promeut l'adhésion des plaquettes et leur activation. Des thrombi attribuables aux nodules calcifiés ont aussi été observés. La complexité des causes des événements CV aigus ont conduit à la définition du paradigme du *patient vulnérable*, où le niveau de risque serait non seulement fonction de l'état d'avancement des plaques, mais également de la coagulabilité sanguine et de la susceptibilité du myocarde à développer des arythmies fatales (Naghavi *et al.*, 2003).

## 2.3 Modèles murins

L'athérome peut être produit au moins partiellement chez presque tous les modèles animaux avec une diète qui élève le taux de cholestérol sanguin (Roberts *et al.*, 1965). Une lésion inflammatoire peut aussi être produite par un trauma direct à la paroi, soit par une élévation de la pression artérielle ou par la dénudation de l'endothélium par des moyens chimiques ou physiques. Les souris sauvages sont généralement très résistantes au développement de l'athérosclérose, bien que la susceptibilité à celle-ci varie considérablement selon la lignée (Dansky *et al.*, 1999). Les régimes très athérogènes comme la diète Paigen (15,5 %

gras, 1,25 % cholestérol et 0,5 % de cholate de sodium), également hépatotoxique, causent des lésions athéroscléreuses chez les lignées susceptibles comme C57BL/6 (Paigen *et al.*, 1985). Toutefois, ces lésions progressent rarement au-delà de la strie lipidique.

Le développement d'animaux modifiés génétiquement, en particulier les souris hypercholestérolémiques, a permis un flux d'information bidirectionnel entre humain et animal qui a été crucial pour la compréhension de la pathophysiologie et pour la validation de moyens thérapeutiques. Actuellement, la souris est établie comme le modèle le plus utilisé pour la recherche sur les lésions athéromateuses complexes (Meir et Leitersdorf, 2004; Maeda *et al.*, 2007), particulièrement depuis le séquençage de son génome. Toutefois, d'autres modèles animaux sont nécessaires pour étudier la pathologie, notamment pour des motifs mentionnés ci-dessous. Les modèles standard sont la souris déficiente en apolipoprotéine E (ApoE<sup>-/-</sup>), la souris déficiente en récepteur du LDL (Ldlr<sup>-/-</sup>), ou surexprimant une variante dysfonctionnelle de l'apolipoprotéine E (ApoE\*3-Leiden). La plupart des modèles sont conçus à partir de la lignée C57BL/6.

Le premier modèle de souris athérosclérotique, la souris ApoE<sup>-/-</sup>, a été produit en 1992 par le groupe de Maeda (Piedrahita *et al.*, 1992; Zhang *et al.*, 1992) et indépendamment par Plump *et al.* (1992). L'ApoE joue un rôle central dans le métabolisme des lipoprotéines et est requis pour la clairance plasmatique des chylomicrons restants et de VLDL par le foie (Mahley, 1988). Le déficit en ApoE dans les souris mutantes élève le taux de cholestérol total au-dessus de 500 mg/dL, et ce, même sur régime *chow* (4,5 % gras, 0,02 % cholestérol). La diète dite *Western* (21 % gras, 0,15 % cholestérol) quadruple ce niveau (Piedrahita *et al.*, 1992; Plump *et al.*, 1992). La souris ApoE<sup>-/-</sup> peut être considérée comme un modèle d'athérosclérose similaire à l'humain (Nakashima *et al.*, 1994; Osada *et al.*, 2000) et a des lésions sévères qui peuvent être trouvées dans l'arche aortique<sup>2</sup> et aux embranchements des artères brachiocéphalique, subclavière et de la carotide commune à 4-6 mois d'âge (Reddick *et al.*, 1994). Les souris déficientes en LDLR (Ldlr<sup>-/-</sup>) (Ishibashi *et al.*, 1993) accumulent elles aussi un excès de LDL plasmatique mais montrent des lésions moins développées que ApoE<sup>-/-</sup>, en particulier si elles sont nourries avec une alimentation *chow*. Les caractéristiques des lésions sont les mêmes que pour ApoE<sup>-/-</sup>, mais leur formation est plus facile à contrôler par des changements diététiques. Les taux de cholestérol sanguin sont également plus bas et donc un peu plus près des niveaux humains. Il existe une grande variété de modèles murins d'athérosclérose (Maeda *et al.*, 2007). La prédominance des études utilisant les deux types mentionnés ci-haut reflète la facilité d'utiliser des souris avec un seul gène défectueux, et le fait qu'ils ont été les premiers à être développés (Maeda *et al.*, 2007). Le croisement de ces modèles avec des souris qui surexpriment ou sous-expriment d'autres gènes d'intérêt a permis d'identifier

---

2. Plus souvent appelée la *croisse aortique*.

de nombreuses protéines qui accélèrent ou ralentissent le développement des lésions. Bien que l'athérosclérose humaine ressemble à celle de la souris, la formation des lésions chez les modèles présentés se fait à un rythme accéléré. Les niveaux dantesques de cholestérol atteints amènent un questionnement sur la validité des transferts de certains résultats obtenus chez la souris vers l'humain. En particulier, des divergences ont été observées pour au moins deux processus principaux impliqués dans l'athérogénèse : le métabolisme des lipoprotéines et les voies inflammatoires (Zadelaar *et al.*, 2007). Aussi, beaucoup d'incohérences ont été observées entre différentes études chez la souris, ce qui pourrait s'expliquer par l'utilisation de souches différentes et un manque de standardisation dans la mesure de la taille des lésions (Zadelaar *et al.*, 2007). Une faiblesse évidente est l'absence de modèle murin de plaque vulnérable. En effet, les souris génétiquement modifiées sont fréquemment utilisées pour étudier les mécanismes d'initiation et de progression mais développent rarement des ruptures spontanées de plaque avec thrombose ; d'autres modèles sont alors nécessaires.

## 2.4 Imagerie moléculaire

L'imagerie moléculaire désigne l'utilisation des techniques d'imagerie non invasives pour l'étude des événements moléculaires et cellulaires chez des organismes *in vivo*. La plupart des connaissances actuelles en athérosclérose ont été inférées d'observations histopathologiques de modèles animaux ou de tissus humain étudiés à différents stades de la maladie ou après des interventions thérapeutiques. Les microscopes photonique et électronique ont été les principaux outils d'observation, apportant une résolution subcellulaire fine mais avec un champ de vision réduit. En général, il est beaucoup plus difficile d'étudier longitudinalement les mêmes voies moléculaires chez les organismes intacts où la plupart des cellules sont situées dans les tissus profonds (Weissleder *et al.*, 2010). Le bénéfice est toutefois proportionnel au fardeau : la possibilité d'observer des interactions complexes dans leur environnement natif où toutes les boucles de rétroaction sont intactes. Entre autres, les barrières de transport pourront être préservées chez l'organisme intact ainsi que les interactions avec le système immunitaire ou des organes ou tissus distants. Un second avantage principal est la possibilité d'imager chaque sujet à de multiples occasions ce qui permet des études de développement, de progression pathologique ou d'effets thérapeutiques. Puisque chaque animal peut servir comme son propre contrôle, ce type d'étude peut compenser la variabilité biologique et interindividuelle pour obtenir des résultats statistiquement significatifs avec moins d'animaux. Bien que certaines techniques d'imagerie moléculaire soient destinées à des applications cliniques éventuelles, d'autres sont envisagées pour une utilisation avec des modèles animaux afin de répondre à des questions biologiques fondamentales, ou encore à valider des médicaments.

### 2.4.1 Sondes moléculaires

Si cela était possible en toutes circonstances, un contraste endogène serait idéal pour quantifier la cible d'intérêt. Par contre, les techniques actuelles d'imagerie ne permettent pas toujours de distinguer les processus cellulaires, et des agents de contraste ciblés, appelés *sondes moléculaires*, sont alors nécessaires. Le choix de la cible guide toute la chaîne de recherche. Les protéines constituent d'excellentes cibles d'imagerie car elles sont très présentes ( $10^2$  à  $10^6$  copies par cellule) et parce qu'elles résultent de l'expression génétique et pas seulement de la présence de gènes (Weissleder *et al.*, 2010). L'abondance et la spécificité de la cible pour la pathologie à l'étude est critique pour le succès de l'imagerie moléculaire. Les molécules d'adhésion cellulaire sont des cibles intéressantes pour l'étude de l'athérosclérose à cause de leur participation dans les stades précoces de la pathologie. Les macrophages, les intégrines et les récepteurs moléculaires sont également privilégiés. La présence d'enzymes spécifiques, comme les métalloprotéinases, oriente généralement la conception des sondes activables. Le ligand de la sonde est souvent constitué d'un peptide ou d'un anticorps (Lee *et al.*, 2010). Tous les aspects de l'athérosclérose depuis l'initiation jusqu'à la complication thrombotique sont des cibles potentielles pour l'imagerie moléculaire, dans les limites du modèle animal (Jaffer et Weissleder, 2004). La plupart des sondes sont constituées de trois sections : une composante chimique ayant une grande affinité pour la cible, une composante «antenne» à l'origine du signal détecté et un coupleur, facultatif selon le cas (Mulder *et al.*, 2008). Également, une fonctionnalisation appropriée est nécessaire pour réduire la toxicité et les liaisons non spécifiques. En effet, il est critique qu'une sonde ne perturbe pas significativement le milieu dans lequel elle est injectée et qu'elle ne cause aucune toxicité aigüe ou chronique pour le sujet. Pour produire des images avec un haut contraste, la sonde doit posséder une pharmacocinétique<sup>3</sup> favorable, une haute efficacité de liaison et une grande spécificité. Elle doit également être synthétisable de manière économiquement viable.

La conception de sondes hybrides destinées à plusieurs modalités est possible et connaît même un intérêt grandissant (Sosnovik *et al.*, 2005; Mulder *et al.*, 2007). Les sondes qui altèrent leurs propriétés photophysiques après contact avec une cible sont dites *activables* ; elles sont conçues de manière à ne pas produire de signal avant l'interaction avec leur cible. La détection simultanée de plusieurs cibles moléculaires est appelée *multiplexage* ; le problème de la différentiation entre la sonde et le volume sanguin en est un cas particulier. À l'heure actuelle, un haut multiplexage (supérieur à 3-5 sondes) n'est pas possible (Gambhir, 2010). Si la contrainte de mesure simultanée des cibles d'intérêt est relaxée, alors des mesures sérielles pour déterminer les niveaux de cibles additionnelles peuvent être effectuées.

---

3. Les méthodes de pharmacocinétique cherchent à décrire l'évolution temporelle simultanée des concentrations de la substance exogène dans différentes parties du corps (organes, tissus ou cellules.).

Les facteurs influençant la biodistribution des sondes sont nombreux et comprennent la lipophilie, le flux sanguin, la perméabilité, le potentiel de saturation, les voies d'élimination (rénale ou hépatobiliaire) et le métabolisme (Weissleder *et al.*, 2010). Par exemple, les grandes nanoparticules sont enlevées du pool sanguin par le système réticuloendothélial beaucoup plus efficacement que les petites. Le temps de « demi-vie » d'une nanoparticule dans le sang varie entre quelques minutes et plusieurs douzaines d'heures, selon sa taille et le type de revêtement. La pharmacocinétique de la sonde dépend de ces facteurs et peut être modélisée pour extraire de l'information quantitative sur les concentrations à la cible (Huang *et al.*, 2010).

#### 2.4.2 Modalités d'imagerie chez l'animal

Du point de vue anatomique, les défis principaux pour l'imagerie de la plaque d'athérosclérose sont la petite taille de la cible, la grande profondeur dans le corps ainsi que les artéfacts de mouvements causés par la pulsation cardiaque. Les modalités présentées dans cette section ne représentent qu'une fraction des techniques d'imagerie disponibles, soit celles qui sont actuellement envisagées pour l'imagerie de la plaque.

Des systèmes dédiés pour l'imagerie des petits animaux sont disponibles pour toutes les modalités d'imagerie incluant l'imagerie ultrasonore, la tomographie monophotonique d'émission (SPECT), la tomographie par émission de positons (TEP), l'imagerie par résonance magnétique (IRM), la tomodensitométrie (CT) et la tomographie par fluorescence (FMT). Le tableau 2.1 résume les caractéristiques principales de ces systèmes. Les valeurs données sont à titre indicatif seulement et peuvent ne pas être appropriées pour toutes les conditions ou toutes les applications possibles. La résolution spatiale renvoie à la taille de la plus petite structure qui peut être détectée sans ambiguïté, souvent décrite en termes de la distance la plus proche entre deux points ou lignes sources qui peuvent être séparés sur une image. Le temps d'acquisition désigne le temps minimal nécessaire pour obtenir une image avec un contraste raisonnable.

#### TEP et SPECT

Les techniques d'imagerie nucléaire sont des technologies très sensibles et en mesure de détecter des concentrations de radiotraceurs de l'ordre du picomolaire. Une grande variété de sondes radioactives sont disponibles pour des applications cliniques ou précliniques. Par contre, les coûts élevés des appareils et des technologies liées (cyclotron pour TEP) freinent leur adoption. De plus, les résolutions spatiales atteignables sont significativement inférieures au CT ou à l'IRM. Pour des études longitudinales, les risques liés aux expositions répétées à des radiations ionisantes sont une considération importante. Funk *et al.* (2004) ont estimé

Tableau 2.1 Survol des modalités d'imagerie moléculaire pour utilisation chez le petit animal. Adapté de Massoud et Gambhir (2003), Rudin et Weissleder (2003) et Cherry et Fox (2007).

Technique	Contraste	Coût	Sensitivité (M)	Résolution spatiale	Temps d'acquisition
SPECT	Émetteurs de photons p. ex. $^{201}\text{Tl}$ , $^{99m}\text{Tc}$ , $^{111}\text{In}$ , $^{123}\text{I}$ , $^{125}\text{I}$ , $^{177}\text{Lu}$	\$\$\$	$10^{-10}$ - $10^{-11}$	0,2 - 4 mm	min - h
TEP	Émetteur de positons p. ex. $^{18}\text{F}$ , $^{15}\text{O}$ , $^{13}\text{N}$ , $^{11}\text{C}$ , $^{64}\text{Co}$	\$\$\$\$	$10^{-11}$ - $10^{-12}$	0,8 - 2,5 mm	min - h
IRM	Chélates paramagnétiques, particules magnétiques	\$\$\$\$	$10^{-3}$ - $10^{-9}$	25 - 100 $\mu\text{m}$	min - h
Ultrasons HF	Microbulles	\$ - \$\$	N/D	50 - 200 $\mu\text{m}$	temps réel
Photoacoustique	Nanoparticules	\$ - \$\$	$10^{-9}$	50 - 200 $\mu\text{m}$	sec
FMT	Fluorochromes p. ex. Cy5, Cy5.5, ICG	\$-\$\$	$10^{-9}$	2 - 3 mm	sec - min
CT	Iode, baryum, krypton, xénon	\$\$	$10^{-3}$	50-200 $\mu\text{m}$	min

que la dose de radiation sur le corps entier pour plusieurs études SPECT chez la souris était une fraction significative du paramètre LD50/30 (50 % de mortalité en 30 jours) et assez élevée pour augmenter l'expression génétique.

En SPECT, la performance d'un appareil dépend de sa configuration pour une tâche d'imagerie donnée; une collaboration étroite avec le fabricant est souvent nécessaire pour mener à bien des adaptations logicielles et matérielles. Cette modalité permet le multiplexage des sondes si elles ont des énergies photoniques différentes. Toutefois, la demi-vie du  $^{99m}\text{Tc}$ , de 6,02 h, est trop courte pour obtenir une accumulation suffisante de sondes ciblées à base de peptides traçables et d'anticorps monoclonaux. Typiquement, le traceur  $^{111}\text{In}$  (demi-vie de 2,8 jours) est utilisé pour ces applications, même si la chélation du  $^{111}\text{In}$  est plus difficile et moins stable *in vivo*. Par exemple, le SPECT/CT a été utilisé avec  $^{111}\text{In}$  pour l'imagerie des monocytes chez ApoE $^{-/-}$  (Kircher *et al.*, 2008). La longue demi-vie de  $^{125}\text{I}$  et le grand nombre de composés disponibles en font un agent de plus en plus envisagé chez la souris (Clinthorne et Meng, 2010).

En TEP, un seul instrument peut servir à beaucoup de traceurs chez la souris et le rat. Par contre, cette technique ne permet pas le multiplexage et la préparation des sondes y est plus complexe. L'imagerie TEP utilisant du fluorodésoxyglucose (FDG) lié au fluor 18 ( $^{18}\text{F}$ -FDG) est l'approche la plus utilisée pour l'imagerie de l'inflammation de la plaque; elle est hautement reproductible dans les études cliniques (Rudd *et al.*, 2007).

## IRM

L'imagerie par résonance magnétique a l'avantage de permettre une haute résolution spatiale ainsi qu'un excellent contraste endogène pour les tissus mous, et ce, sans exposition à des radiations ionisantes et sans injection d'un agent de contraste. La faiblesse principale de cette technique en imagerie moléculaire est sa faible sensibilité en comparaison avec l'imagerie nucléaire. Cependant, certaines nanoparticules telles que les oxydes de fer superparamagnétiques (USPIO) et les chélates de gadolinium (p. ex. Gd-DTPA ou Gd-DOTA) ont été utilisées avec de nombreux ligands pour obtenir, respectivement, une réduction du signal  $T_2/T_2^*$  et une hausse du signal  $T_1$  (Kooi *et al.*, 2008). Une autre approche fait appel à des nanoparticules de perfluorocarbone porteur de  $^{19}\text{F}$  pour une détection par une séquence spécifique à celui-ci (Neubauer *et al.*, 2008). Kelly *et al.* (2005) ont utilisé une sonde multimodale fluorescence/IRM à base d'oxyde de fer réticulé (CLIO) avec une séquence d'environ 6 peptides ciblant VCAM-1 chez ApoE $^{-/-}$  pour montrer la captation dans les lésions d'athérome, contrairement aux particules de contrôle sans peptide spécifique. Dans d'autres études, des nanoparticules magnétiques ont été adjointes à un fluorochrome proche infrarouge pour l'imagerie multimodale IRM/NIRF de la plaque (Jaffer *et al.*, 2006b; Nahrendorf *et al.*, 2006).

Des nanoparticules trimodales IRM/TEP/fluorescence ont également été créées (Nahrendorf *et al.*, 2008).

## CT

La tomодensitométrie offre un temps d'acquisition très court et un bon contraste en angiographie coronarienne. Toutefois, elle nécessite l'utilisation de radiations ionisantes et d'agents néphrotoxiques. En imagerie moléculaire, la tomодensitométrie est majoritairement utilisée pour la coregistration de la morphologie du squelette. Des composés à base d'iode peuvent également être injectés pour obtenir un contraste vasculaire. Plus récemment, des micelles remplies d'iode ont été utilisées avec un système CT pour l'imagerie ciblée des macrophages dans l'aorte du lapin (Hyafil *et al.*, 2007). L'imagerie CT multi-énergie pourrait permettre d'apporter un contraste spécifique aux sondes à base d'éléments ayant un numéro atomique élevé (Schlomka *et al.*, 2008; Cormode *et al.*, 2010).

## Échographie

On parle d'échographie, ou d'imagerie ultrasonore par écho d'impulsion, lorsque les ultrasons sont générés et détectés par le même dispositif, ce qui est généralement le cas. L'échographie est largement répandue, peu invasive et peu coûteuse en comparaison avec les systèmes mentionnés précédemment. La profondeur maximale atteignable par les systèmes de haute fréquence est suffisante pour l'imagerie des vaisseaux chez les modèles de petits animaux ; un transducteur à 20 MHz pourra pénétrer jusqu'à environ 3 cm, alors que la plupart des organes de la souris sont situés à une profondeur de 0,5-2 cm (Coatney, 2001). Toutefois, les structures observables sont limitées, à cause de la présence d'os et de poches de gaz. La méthode par échos conventionnelle (échographie) est la méthode d'évaluation privilégiée pour l'évaluation des paramètres cardiaques chez la souris. Pour la visualisation des structures, un transducteur à large bande opérant minimalement à 15 MHz avec un taux de répétition de 200-300 images par seconde est recommandé (Hoit et Walsh, 1997; Scherrer-Crosbie *et al.*, 1998; Fitzgerald *et al.*, 2003). Seule l'échographie possède une vitesse d'acquisition suffisante pour être considérée comme une technique en temps réel. Toutefois, la variabilité interopérateurs de l'examen échocardiographique demeure une problématique, spécialement pour des études longitudinales (Collins *et al.*, 2003).

L'imagerie ultrasonore moléculaire est basée sur l'utilisation de biocolloïdes formés d'une coquille organique (lipides, albumine dénaturée ou polymères) de moins de 5  $\mu\text{m}$  de diamètre emprisonnant un gaz (p. ex. octafluoropropane, décafluorobutane) (Ferrara *et al.*, 2007; Villanueva et Wagner, 2008; Kaufmann, 2009). Ces «microbulles», conçues pour se

lier à l'endothélium, ont une fréquence de résonance comprise dans la bande fréquentielle des transducteurs d'utilisation clinique. Une variante plus invasive de l'échographie conventionnelle, l'imagerie par ultrasons intravasculaires (IVUS), produit des images du lumen et de la paroi artérielle *in vivo* chez l'humain et les modèles animaux de taille moyenne à l'aide d'un cathéter et d'un transducteur rotatif à 30-40 MHz (MacNeill *et al.*, 2003). Le contraste intrinsèque permet alors la visualisation des couches artérielles saines et des couches anormales athéromateuses. La stratégie intravasculaire peut également être utilisée en conjonction avec une sonde ciblée (Hamilton *et al.*, 2004). Le développement de séquences d'impulsions ultrasonores spécifiques pourrait accroître la sensibilité et la spécificité des microbulles pour l'imagerie de l'inflammation en athérosclérose (Kaufmann *et al.*, 2007).

## Fluorescence

La tomographie optique de fluorescence (FMT) permet une détection rapide et sensible de sondes fluorescentes (Weissleder et Pittet, 2008). La pénétration limitée de la lumière dans les tissus limite son utilisation *in vivo*. Les avantages de l'optique comprennent une grande sensibilité, une facilité d'utilisation et un faible coût. Toutefois, la forte absorption et diffusion de la lumière dégrade la résolution et résulte en un profil de sensibilité inégal avec une forte préférence pour les cibles proches de la surface et les tissus avec un faible contenu sanguin. Aussi, l'hétérogénéité des tissus se reflète au niveau des propriétés optiques et leur segmentation est nécessaire pour modéliser adéquatement la propagation lumineuse. Les sondes d'origine synthétique comme les points quantiques<sup>4</sup> ont l'avantage de ne pas subir de blanchiment après une exposition prolongée et leur spectre d'émission peut être contrôlé précisément. Les fluorophores organiques, quant à eux, sont beaucoup moins brillants, moins stables, mais ils sont également jugés moins toxiques que leurs comparses synthétiques. L'imagerie optique permet le multiplexage de sondes et l'utilisation de sondes activables.

## Photoacoustique

La tomographie photoacoustique possède une sensibilité similaire à la tomographie optique et la résolution spatiale de l'imagerie ultrasonore. Le taux d'acquisition des images PA est limité par la fréquence de répétition du laser pulsé utilisé. Les systèmes d'imagerie PA récents utilisent généralement l'intervalle entre deux impulsions lumineuses pour produire un contraste ultrasonore conventionnel, et ainsi obtenir une coregistration anatomique du spécimen. Étant donné que cette modalité est le sujet de la présente thèse, les considérations pour l'imagerie et les applications chez l'animal sont détaillées dans les chapitres suivants, en

---

4. Les points quantiques sont des semi-conducteurs à l'échelle nanométrique dont les caractéristiques électroniques sont étroitement liées aux dimensions.

particulier aux sections 5.1 et 7.1.1. À notre connaissance, jusqu'à présent une seule étude d'imagerie PA a été réalisée au niveau de la région aortique chez la souris (Taruttis *et al.*, 2010), en vue transversale et sans validation échographique. Les résultats ont notamment montré une augmentation du signal dans les veines caves supérieures suite à l'injection d'un agent de contraste non spécifique, ainsi que la possibilité pour le signal photoacoustique de traverser la cage thoracique malgré son amplitude réduite par rapport au signal écho d'impulsion.

## 2.5 Conclusion

L'athérosclérose est une affection complexe qui implique un grand nombre de boucles de rétroaction. L'étude des mécanismes de progression et de rupture de la plaque bénéficierait de l'imagerie moléculaire de l'athérome chez des modèles murins. Bien que certains facteurs limitent la comparaison de données quantitatives entre les sujets, la spécificité apportée par l'imagerie moléculaire demeure l'une de ses grandes forces. La tomographie photoacoustique pourrait grandement améliorer la résolution et la sensibilité des mesures tout en demeurant non invasive. Les combinaisons modalité/cible/modèle pour l'étude de l'athérosclérose sont déjà très nombreuses ; des revues de littérature plus exhaustives peuvent être trouvées dans Jaffer *et al.* (2006a), Saraste *et al.* (2009), Shaw (2009) et Kusters *et al.* (2012).

## CHAPITRE 3

### PRINCIPES DE L'IMAGERIE PHOTOACOUSTIQUE

#### 3.1 Introduction

L'imagerie photoacoustique implique trois principaux phénomènes, lesquels peuvent être approximés par trois types de modèles distincts. Le premier décrit la propagation lumineuse dans le milieu cible, tandis qu'un second représente le réchauffement impulsif suivi d'une expansion thermoélastique. Enfin, un troisième modèle décrit la propagation de l'onde ultrasonore jusqu'à l'instrument de mesure et l'effet d'éventuels obstacles. L'objectif de ce chapitre est de présenter une revue du cadre théorique pour chacun de ces phénomènes, suivant ainsi le processus de formation d'image en imagerie photoacoustique. Nous pourrions alors lier les caractéristiques optiques et acoustiques d'un spécimen au signal mesuré. Une brève description des mécanismes d'interaction lumière-tissus impliqués dans l'imagerie PA sera présentée, suivie des principaux modèles de propagation photonique. La théorie de l'imagerie ultrasonore conventionnelle sera ensuite exposée. La dernière partie est consacrée à la génération des formes d'onde observées en imagerie PA.

#### 3.2 Biophotonique

Les tissus biologiques sont des matériaux optiquement inhomogènes. Les réfractions multiples subies par un rayon lumineux lors de sa grande traversée se traduiront par une « marche de l'ivrogne » à l'intérieur du spécimen, jusqu'à ce qu'il soit absorbé ou qu'il en ressorte. Le parcours effectué par le photon moyen pourra alors être estimé par la connaissance des propriétés optiques qui déterminent le processus d'interaction et les domaines de validité des approximations.

##### 3.2.1 Mécanismes d'interaction lumière-tissus

À l'échelle moléculaire, les mécanismes d'interaction entre la lumière et les tissus biologiques sont nombreux, qu'il s'agisse d'effets photochimiques, photothermiques ou par photoablation. Pour une expérience donnée, le phénomène dominant dépendra de la puissance, de la durée et de la longueur d'onde d'illumination ainsi que du type de molécules contenues dans les tissus (Niemz, 2007). L'exposition lumineuse utilisée en imagerie optique biomé-

dicale est d'une intensité relativement faible<sup>1</sup> et non ionisante, ce qui limite notre revue à quelques processus photophysiques : la diffusion, la diffusion Raman, l'absorption ainsi que deux processus de relaxation, soit la fluorescence et l'effet photothermique.

## Diffusion

L'indice de réfraction  $n$  est une propriété fondamentale de la propagation de la lumière dans la matière. Il est défini, pour un milieu homogène, comme le rapport entre la vitesse de la lumière dans le vide à la vitesse de la lumière dans ce milieu. Les cellules qui composent les tissus biologiques sont constituées d'une grande variété d'organites et de molécules aux indices de réfraction distincts qui dépendent de la longueur d'onde. La déviation d'un photon en fonction de sa longueur d'onde est appelée *dispersion*, alors que l'effet global de redirection des rayons lumineux est appelé *diffusion*. Les photons sont dispersés plus fortement par les structures dont la taille est comparable à la longueur d'onde et avec un indice de réfraction différent du milieu environnant. La diffusion Mie modélise l'effet de dispersion dans le cas où les structures dispersantes sont sphériques (Kerker, 1969). La diffusion Rayleigh, qui est un cas limite de la précédente, modélise le cas où les structures sont beaucoup plus petites que la longueur d'onde. La distribution des tailles de particules d'un milieu biologique n'étant pas uniforme, la meilleure modélisation requière une combinaison de Mie et Rayleigh (Niemz, 2007). La lumière incidente sur certaines surfaces est quelquefois diffusée avec une longueur d'onde différente de celle de la lumière incidente. Cette *diffusion Raman* est une collision inélastique qui est le fruit d'une transition de la molécule diffusante à un état virtuel, puis le retour à un état vibrationnel différent, et donc l'émission d'un photon d'énergie différente (Wang et Wu, 2007). Le rendement de cette diffusion est faible, typiquement de 1 sur  $10^5$  photons, mais les signaux Raman sont très riches spectralement et la plupart des molécules biologiques ont une empreinte Raman spécifique (Romer *et al.*, 2000).

## Absorption

L'excitation, par un photon, d'une molécule ou d'un atome dans un état énergétique supérieur est appelée *absorption*. Si les niveaux d'énergie permettent une transition, toute l'énergie du photon incident sera alors transférée à un électron de valence. Dans les tissus biologiques, les absorbants principaux sont l'oxyhémoglobine, la désoxyhémoglobine, la mélanine, l'eau et les lipides (Cope, 1991). Ces chromophores ont un spectre d'absorption caractéristique qui aide à les discriminer et à quantifier leurs concentrations *in vivo*. La profondeur de pénétration de la lumière dans les tissus biologiques, limitée par l'absorption, dépend fortement de la

---

1. La norme ANSI Z136.1 limite l'exposition à  $200 \text{ mW/cm}^2$  alors que l'intensité moyenne à la surface de la Terre due au soleil est de  $140 \text{ mW/cm}^2$ .

longueur d'onde. La fenêtre spectrale la plus favorable, appelée fenêtre thérapeutique, se situe dans la région proche-infrarouge (600-1000 nm), tel que montré à la figure 3.1. En dehors de cette région, l'absorption forte de l'hémoglobine et de l'eau, pour les longueurs d'onde inférieures et supérieures, respectivement, restreint l'examen optique à une interrogation peu profonde.

### Relaxation radiative et non radiative

À la suite d'une absorption photonique, l'électron excité peut transiter à son état de base par le processus radiatif de *fluorescence*, qui est d'un intérêt particulier en imagerie. La relaxation s'accompagne alors de l'émission d'un photon de plus basse énergie, la différence énergétique étant attribuable à l'énergie injectée dans les modes vibrationnels et rotationnels (Wang et Wu, 2007). Une molécule fluorescente est caractérisée par son spectre d'émission, son rendement quantique<sup>2</sup> et la durée de vie de l'état excité. Le contraste intrinsèque (autofluorescence) des tissus biologiques peut être utilisé, ainsi que la fluorescence de composés injectables ayant un haut rendement quantique et un comportement spectral favorable. Enfin, un électron excité peut également perdre son énergie avec la seule redistribution intramoléculaire dans les modes vibratoires et rotationnels, puis par collision avec d'autres molécules pour un transfert d'énergie translationnelle. On parle alors de relaxation *photothermique* ; cet effet se traduit par un échauffement local du milieu (Moros, 2012).

### 3.2.2 Propriétés optiques des tissus biologiques

Les effets décrits précédemment peuvent être quantifiés pour chaque tissu biologique. Le coefficient d'absorption  $\mu_a(\mathbf{r}, \lambda)$  est défini comme la probabilité d'absorption d'un photon dans un milieu par unité de distance parcourue. Sa réciproque est appelée le *parcours libre moyen*. Dans la fenêtre proche infrarouge, la valeur de  $\mu_a$  se situe à 0,1-1  $\text{cm}^{-1}$  pour la plupart des tissus (Wang et Wu, 2007). Le coefficient d'extinction  $\epsilon_m(\lambda)$  du chromophore  $m$  représente son absorption à une concentration normalisée. La figure 3.1 présente les coefficients d'absorption linéique des principaux chromophores endogènes dans la fenêtre proche infrarouge. Dans le cas le plus simple, le coefficient d'absorption d'un mélange de  $M$  chromophores est donné par l'application linéaire

$$\mu_a(\mathbf{r}, \lambda) = \sum_{m=1}^M \epsilon_m(\lambda) C_m(\mathbf{r}) \quad (3.1)$$

où  $C_m(\mathbf{r})$  est la concentration du chromophore  $m$ .

---

2. Défini comme le taux de photons émis par photon absorbé.

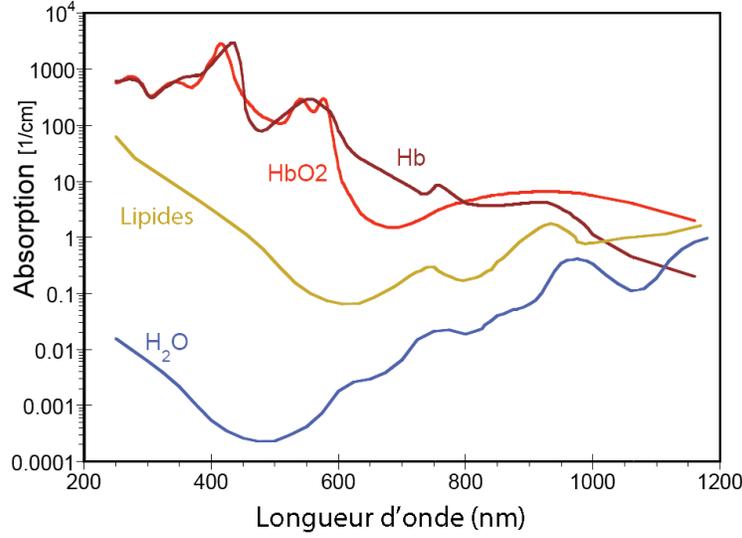


Figure 3.1 Coefficients d'absorption linéique des principaux chromophores endogènes dans la fenêtre proche infrarouge. Adapté de Weissleder (2001).

Le coefficient de dispersion  $\mu_s(\mathbf{r}, \lambda)$  est défini comme la probabilité de dispersion d'un photon dans un milieu par unité de distance parcourue. Sa réciproque est appelée le *parcours de dispersion moyen*. Aussi, le coefficient de transport est défini comme la probabilité par unité de distance parcourue qu'un photon soit absorbé ou dispersé :

$$\mu_t \stackrel{\text{déf}}{=} \mu_a + \mu_s. \quad (3.2)$$

Un événement de dispersion entraîne une déflexion d'un photon par un angle  $\theta$  par rapport à sa trajectoire initiale. La fonction de phase normalisée  $\Theta(\hat{\mathbf{s}}', \hat{\mathbf{s}}) = \Theta(\theta)$  où  $\theta \stackrel{\text{déf}}{=} \hat{\mathbf{s}}' \cdot \hat{\mathbf{s}}$  représente la probabilité de dispersion d'un photon dans la direction  $\hat{\mathbf{s}}$  à partir de la direction  $\hat{\mathbf{s}}'$ . L'approximation de la fonction de phase par la fonction de Henyey-Greenstein a montré une bonne concordance avec les observations expérimentales (Niemz, 2007) :

$$\Theta(\theta) = \frac{1 - g^2}{(1 + g^2 - 2g \cos(\theta))^{3/2}}, \quad (3.3)$$

où  $g$  est l'anisotropie. Cette dernière est définie comme l'espérance du cosinus de l'angle :  $g \stackrel{\text{déf}}{=} \langle \cos(\theta) \rangle$ . Si  $g = 0$ , alors la diffusion est isotropique, alors que si  $g = 1$ , la diffusion se fait entièrement vers l'avant. Pour la plupart des tissus biologiques,  $g$  prend une valeur entre 0,7 et 0,99 (Cheong *et al.*, 1990).

À cause de l'inhomogénéité des tissus, l'indice de réfraction est le mieux représenté par une valeur effective généralement considérée comme intermédiaire entre celle de l'eau et celle

des lipides ( $n \approx 1,4$ ) (Ding *et al.*, 2006). L'indice de réfraction de la peau peut aussi être utilisé pour estimer les pertes par réflexion spéculaire en surface. Toutefois, il faut considérer que la plupart des tissus biologiques ont une surface rugueuse, ce qui affecte la distribution lumineuse à l'intérieur des tissus en raison des pertes surfaciques dues à une réflexion accrue aux plus grands angles d'incidence (Splinter et Hooper, 2007). À cause de l'inhomogénéité des tissus, l'indice de réfraction est le mieux représenté par une valeur effective généralement considérée comme intermédiaire entre celle de l'eau et celle des lipides ( $n \approx 1,4$ ) (Ding *et al.*, 2006). L'indice de réfraction de la peau peut aussi être utilisé pour estimer les pertes par réflexion spéculaire en surface. Toutefois, il faut considérer que la plupart des tissus biologiques ont une surface rugueuse, ce qui affecte la distribution lumineuse à l'intérieur des tissus en raison des pertes surfaciques dues à une réflexion accrue aux plus grands angles d'incidence (Splinter et Hooper, 2007).

Enfin, il faut souligner que la mesure des propriétés optiques des tissus est difficile, particulièrement *in vivo*. La présence ou l'absence de sang dans un tissu est le premier facteur de discrimination entre les observations *in vivo*, *in vitro* ou *ex vivo*. Bien que certaines valeurs soient disponibles dans la littérature, il subsiste une grande variabilité due à la préparation expérimentale et à la méthode de mesure, particulièrement à cause du degré d'exsanguination et de dégénérescence des tissus prélevés. La variabilité intersujet et la température ont également une influence sur les caractéristiques mesurées (Tsai *et al.*, 2001).

### 3.2.3 Modèle direct

Les événements d'absorption ou de dispersion surviennent au fur et à mesure que les photons se propagent dans les tissus. Si on utilise une illumination laser, la cohérence de la lumière incidente sera dégradée par les événements de dispersion, jusqu'à être complètement perdue. Les régimes de propagation lumineuse sont généralement divisés en trois : la lumière non dispersée, le régime quasi-ballistique où l'information sur la cohérence peut être utilisée, et le régime de diffusion.

### Définitions

La *radiance* (ou *rayonnement lumineux*)  $\varphi(\mathbf{r}, \mathbf{s}, t)$  peut être définie comme la moyenne temporelle de la longueur du vecteur de Poynting

$$\varphi(\mathbf{r}, \hat{\mathbf{s}}, t) \stackrel{\text{déf}}{=} \left\langle \frac{\mathbf{E} \times \mathbf{B}}{\mu} \right\rangle \quad (3.4)$$

où  $\mathbf{E}$  est le champ électrique,  $\mathbf{B}$  est le champ magnétique,  $\mu$  est la perméabilité du milieu,  $\mathbf{r} = (x, y, z)$  est la position,  $\hat{\mathbf{s}} = (\theta, \phi)$  est la direction du flux et  $t$  est le temps. La radianse cor-

respond au flux d'énergie d'un élément de surface par unité d'aire de la projection orthogonale de cet élément sur le plan perpendiculaire à la direction du flux (voir figure 3.2). Son unité est  $\text{W}/(\text{cm}^2\text{sr})$ . La radiance doit être interprétée comme un flux quasi-monochromatique obtenue par l'intégration de la *radiance spectrale*  $\varphi_\nu$  sur une bande fréquentielle étroite  $[\nu, \nu + \Delta\nu]$  :

$$\varphi(\mathbf{r}, \hat{\mathbf{s}}, t) = \varphi_\nu(\mathbf{r}, \hat{\mathbf{s}}, t)\Delta\nu. \quad (3.5)$$

L'*intensité lumineuse*<sup>3</sup>  $\Phi(\mathbf{r}, t)$  est définie comme étant le flux d'énergie par unité d'aire par

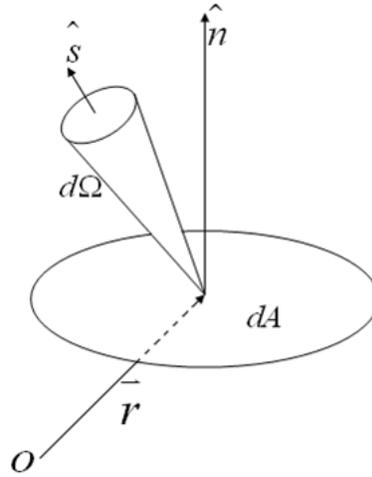


Figure 3.2 Flux énergétique passant à travers un élément de surface  $dA$  sous-tendu par un angle solide  $d\Omega$ .

unité de temps sans égard à la direction du flux (unité  $\text{W}/\text{m}^2$ ); elle est exprimée comme la radiance intégrée sur tout l'angle solide  $4\pi$  :

$$\Phi(\mathbf{r}, t) \stackrel{\text{déf}}{=} \int_{4\pi} \varphi(\mathbf{r}, \hat{\mathbf{s}}, t) d\Omega. \quad (3.6)$$

Enfin, la fluence  $F(\mathbf{r})$  est définie comme l'intensité lumineuse intégrée dans le temps :

$$F(\mathbf{r}) \stackrel{\text{déf}}{=} \int_{-\infty}^{+\infty} \Phi(\mathbf{r}, t) dt. \quad (3.7)$$

Son unité est  $\text{J}/\text{m}^2$ .

---

3. Aussi appelée *taux de fluence* ou *densité photonique*.

## Équation du transport radiatif

L'équation du transport radiatif (RTE)<sup>4</sup> est une équation intégral-différentielle qui décrit le déplacement du flux d'énergie dans le temps (Glasstone, 1952; Davison, 1957; Case et Zweifel, 1967). La radiance est la variable dépendante de la RTE. Les fondations de la théorie du transport reposent sur l'hypothèse de particules migrantes qui n'interagissent pas entre elles. On peut dériver heuristiquement la RTE du principe de conservation de l'énergie où on néglige les effets des interférences (cohérence et polarisation) ainsi que les effets non linéaires (p. ex. excitation multiphotonique). Dans le domaine temporel, l'équation du transport radiatif est donnée par

$$\left( \frac{1}{c} \frac{\partial}{\partial t} + \hat{\mathbf{s}} \cdot \nabla + \mu_t(\mathbf{r}) \right) \varphi(\mathbf{r}, \hat{\mathbf{s}}, t) = \mu_s(\mathbf{r}) \int_{S^{n-1}} \Theta(\hat{\mathbf{s}}' \cdot \hat{\mathbf{s}}) \varphi(\mathbf{r}, \hat{\mathbf{s}}', t) d\hat{\mathbf{s}}' + q(\mathbf{r}, \hat{\mathbf{s}}, t) \quad (3.8)$$

où  $q(\mathbf{r}, \hat{\mathbf{s}}, t)$  est la distribution spatiale et angulaire de la source lumineuse, et  $c$  est la vitesse de la lumière dans le milieu. Les propriétés optiques (incluant  $\mu_t$ ,  $\mu_s$  et les quantités reliées) sont considérées invariantes dans le temps mais pas dans l'espace. La RTE stipule qu'un faisceau lumineux perd de l'énergie à travers la divergence et l'extinction (incluant l'absorption et la diffusion sortant du faisceau) et prend de l'énergie des sources lumineuses et de la diffusion vers le faisceau (voir figure 3.3). Les solutions analytiques de la RTE sont difficiles à trouver pour une majorité de conditions frontières notamment parce qu'elle comprend 6 variables indépendantes ( $x, y, z, \theta, \phi, t$ ) et par la complexité du terme de collision (Rouse et Simons, 1978), soit le premier terme du membre de droite de l'équation 3.8. Il existe des solutions pour des géométries planes (Chandrasekhar, 1960), sphériques (Aronson, 1984) et d'autres cas spéciaux (Alexandrov *et al.*, 1993).

Puisqu'en photoacoustique la propagation acoustique s'effectue sur une échelle temporelle beaucoup plus longue que le dépôt d'énergie (voir section 3.4.1), seule la RTE indépendante du temps est nécessaire (Cox *et al.*, 2012) :

$$(\hat{\mathbf{s}} \cdot \nabla + \mu_t(\mathbf{r})) \varphi(\mathbf{r}, \hat{\mathbf{s}}) = \mu_s(\mathbf{r}) \int_{S^{n-1}} \Theta(\hat{\mathbf{s}}' \cdot \hat{\mathbf{s}}) \varphi(\mathbf{r}, \hat{\mathbf{s}}') d\hat{\mathbf{s}}' + q(\mathbf{r}, \hat{\mathbf{s}}). \quad (3.9)$$

où  $\varphi(\mathbf{r}, \hat{\mathbf{s}}')$  est maintenant utilisé pour représenter la radiance intégrée dans le temps.

## Équation de diffusion

Dans le régime où la diffusion prévaut, la propagation lumineuse peut être modélisée correctement par une approximation de la RTE, l'équation de diffusion, donnée par (Patterson

---

4. Appelée *équation de Boltzmann* dans le contexte de la théorie cinétique des gaz.

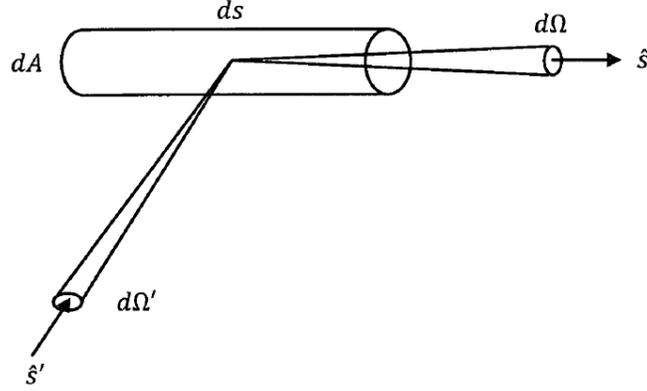


Figure 3.3 Dispersion photonique dans un élément différentiel de volume.

*et al.*, 1989)

$$\left( \frac{1}{c} \frac{\partial}{\partial t} + \mu_a(\mathbf{r}) - \nabla \cdot (D(\mathbf{r}) \nabla) \right) \Phi(\mathbf{r}, t) = S(\mathbf{r}, t) \quad (3.10)$$

où  $S(\mathbf{r}, t)$  est la source lumineuse et  $D(\mathbf{r})$  est le *coefficient de diffusion* donné par

$$D(\mathbf{r}) \stackrel{\text{déf}}{=} \frac{1}{3(\mu_a(\mathbf{r}) + \mu'_s(\mathbf{r}))}, \quad (3.11)$$

où  $\mu'_s$  est le coefficient de dispersion réduit défini par

$$\mu'_s \stackrel{\text{déf}}{=} \mu_s(1 - g). \quad (3.12)$$

De façon similaire, le coefficient de transport réduit est défini par

$$\mu'_t \stackrel{\text{déf}}{=} \mu_a + \mu'_s. \quad (3.13)$$

La variable  $\Phi(\mathbf{r}, t)$  agit maintenant comme variable dépendante. Cette équation est obtenue de la RTE en négligeant les termes d'ordre supérieur dans le développement en harmoniques sphériques de la radiance (Arridge, 1999). Cette dernière devient alors presque isotropique, ce qui réduit à quatre le nombre de degrés de liberté. La seconde approximation faite pour justifier ce nouveau modèle est que la variation relative de l'intensité lumineuse est bien inférieure à l'unité à l'intérieur d'un parcours libre moyen. Ces deux conditions peuvent être réunies en une seule qui stipule que  $\mu'_s \gg \mu_a$ , ce qui implique qu'en moyenne, un photon est dispersé plusieurs fois avant d'être absorbé (Furutsu et Yamada, 1994). Jacques et Pogue (2008) suggèrent que  $\mu'_s/\mu_a > 20$  est une bonne limite pour utiliser l'approximation de diffusion. Aussi, si des sources collimées sont utilisées, le point d'observation doit être

suffisamment loin de celles-ci car la description de la radiance près de la surface peut y être erronée. Cette dernière condition peut être relaxée si les sources sont isotropiques ou si l’approximation de delta-Eddington pour la fonction de phase normalisée est utilisée (Joseph *et al.*, 1976; Cong *et al.*, 2007). Cette approche permet de tenir compte de l’anisotropie en approximant la fonction de phase comme la somme d’une fonction delta et d’une fonction lisse.

L’équation de diffusion peut être résolue analytiquement pour des géométries spécifiques. Bien que moins précise que la RTE ou la simulation Monte-Carlo, l’approximation de diffusion demeure le modèle le plus utilisé en tomographie optique. L’équation est alors généralement résolue numériquement avec la méthode des éléments finis (FEM) ou des différences finies (FDM), ce qui permet l’application à des géométries complexes. Si le coefficient d’absorption est nul, l’équation se réduit à l’équation de diffusion de la chaleur.

Dans le régime diffusif pour un milieu infini et homogène ( $\mu_a(\mathbf{r}) = \mu_a^0$ ,  $D(\mathbf{r}) = D_0$ ) et une source constante dans le temps, la fluence peut être modélisée grossièrement par (Cox *et al.*, 2012)

$$F(d) = \frac{F_0}{4\pi D_0} e^{-\mu_{eff}d} \quad (3.14)$$

où  $d$  est la distance de la source,  $F_0$  est la fluence initiale et  $\mu_{eff} = \sqrt{3\mu_a\mu'_t}$  est le coefficient d’atténuation effectif pour la lumière diffuse, soit le facteur dominant pour déterminer l’atténuation lumineuse lorsque  $d \gg 1/\mu'_s$ . Aussi, la distance de pénétration  $\delta$  de la lumière dans un tissu est définie comme la distance suivant laquelle le taux de fluence atteint  $e^{-1}$  fois sa valeur initiale. On a alors  $\delta = 1/\mu_{eff}$ .

## Simulation Monte-Carlo

La méthode Monte-Carlo consiste à simuler la marche aléatoire d’un grand nombre de photons subissant tous les types d’événements modélisés par la RTE (Wang *et al.*, 1995; Banerjee et Sharma, 2010). Il s’agit donc de réaliser une expérience pseudo-aléatoire pour chaque photon où les propriétés optiques des tissus sont utilisées pour modéliser l’occurrence des événements de dispersion et d’absorption ainsi que les angles de dispersion et la longueur des pas. La fluence est ensuite calculée sur toute la population photonique pour déterminer la propagation lumineuse moyenne. La simulation Monte-Carlo est considérée comme la méthode donnant la meilleure estimation de la distribution lumineuse dans les tissus, pourvu que le temps de simulation soit suffisant. Toutefois, elle nécessite l’allocation de ressources de calcul considérables, particulièrement si le nombre de photons simulés est très grand. L’utili-

sation de processeurs graphiques pour paralléliser les opérations permet de diminuer le temps de calcul par un facteur de l'ordre de  $10^2$  (Fang et Boas, 2009).

### 3.3 Ultrasons

#### Introduction

Les ondes ultrasonores (US) sont des ondes de pression similaires aux ondes acoustiques mais définies pour les bandes fréquentielles au-delà de la fenêtre audible. Les particules du milieu traversé par une onde effectuent alors un mouvement d'aller-retour autour de leur position d'origine, caractérisé par un déplacement  $\mathbf{u} = \mathbf{u}(\mathbf{r}, t)$  et à une vitesse  $\mathbf{v} = \mathbf{v}(\mathbf{r}, t)$ , pour induire une perturbation de la pression locale  $p = p(\mathbf{r}, t)$ . Les tissus biologiques contenant énormément d'eau, on fait l'hypothèse que les ondes US se propagent seulement longitudinalement. En réalité, les tissus sont des solides élastiques qui peuvent également subir des contraintes de cisaillement, mais dans une moindre mesure (Sarvazyan *et al.*, 1998). On considère un milieu homogène et isotropique où la masse volumique et la pression à l'équilibre sont  $\rho_0$  et  $p_0$ , respectivement. La vitesse d'une particule est reliée au déplacement par

$$\mathbf{v} \stackrel{\text{déf}}{=} \partial \mathbf{u} / \partial t. \quad (3.15)$$

Puisque l'onde longitudinale est irrotationnelle, on peut, pour simplifier la modélisation, introduire le potentiel de vitesse ( $\phi$ ) défini tel que

$$\mathbf{v} = \nabla \phi. \quad (3.16)$$

Pour un fluide non visqueux, la pression est donnée par

$$p = -\rho_0 \frac{\partial \phi}{\partial t}. \quad (3.17)$$

Le déplacement de l'onde est alors représenté par l'équation d'onde tridimensionnelle

$$\left[ \nabla^2 - \frac{1}{c_L^2} \frac{\partial^2}{\partial t^2} \right] \phi = 0 \quad (3.18)$$

où  $\nabla^2$  est le Laplacien en coordonnées cartésiennes et  $c_L$  est la vitesse longitudinale du son dans le milieu. Cette vitesse est déterminée par (Cobbold, 2007)

$$c_L = \sqrt{\frac{K}{\rho_0}} \quad (3.19)$$

où  $K$  est le module d'élasticité isostatique. Bien que la vitesse du son varie beaucoup en fonction de la température, sa variation en fonction de la fréquence demeure faible entre 1 et 15 MHz (Szabo, 2004). En effet, la vitesse du son dans les tissus mous est d'environ  $c_L \approx 1,5 \text{ mm}/\mu\text{s}$ , avec une variabilité d'environ 5% (Duck, 1990).

La longueur d'onde  $\lambda_L$  est définie comme la distance entre deux points de phase constante dans l'espace à un instant donné. La fréquence ultrasonore  $f$  est reliée à cette quantité par  $f\lambda_L = c_L$ . L'onde est aussi caractérisée par le nombre d'onde  $k_L = \omega/c_L$  avec la fréquence angulaire  $\omega = 2\pi f$ . Une solution spécifique importante à l'équation d'onde est le phaseur

$$\phi(\mathbf{r}, t) = \phi_0(e^{i(\omega t - \mathbf{k} \cdot \mathbf{r})} + e^{i(\omega t + \mathbf{k} \cdot \mathbf{r})}) \quad (3.20)$$

où le vecteur d'onde  $\mathbf{k}$  regroupe les composantes de la direction de propagation ( $k_1, k_2, k_3$ ) selon les axes  $x, y$  et  $z$ .  $\mathbf{r}$  est la position et  $\phi_0$  est l'amplitude. En pratique, on mesurera, par exemple, la pression de l'onde se dirigeant dans la direction positive :

$$p(\mathbf{r}, t) = p_0 \text{Re} \{ e^{i(\omega t - \mathbf{k} \cdot \mathbf{r})} \} = p_0 \cos(\omega t - \mathbf{k} \cdot \mathbf{r}). \quad (3.21)$$

Pour une onde harmonique de fréquence angulaire  $\omega$ , l'impédance acoustique<sup>5</sup> du milieu est définie par

$$Z(\mathbf{r}, \omega) \stackrel{\text{déf}}{=} \frac{p(\mathbf{r}, \omega)}{v(\mathbf{r}, \omega)} \quad (3.22)$$

où  $p(\mathbf{r}, \omega)$  est le phaseur de pression et  $v(\mathbf{r}, \omega)$  est le phaseur de vitesse d'une particule. L'impédance acoustique est un paramètre très important en imagerie ultrasonore parce qu'elle détermine l'amplitude des échos réfléchés ou dispersés par les tissus. L'unité de  $Z$  est le Rayleigh (Rayl), où  $1 \text{ Rayl} = 1 \text{ Pa} \cdot \text{s}/\text{m}$ . Les valeurs typiques sont de l'ordre de  $10^6 \text{ Rayl}$ . Pour une onde plane dans un milieu non visqueux, on aura une expression de la forme

$$Z = Z_0 = \rho_0 c_L. \quad (3.23)$$

Enfin, l'intensité d'une onde ultrasonore est l'énergie moyenne transportée par unité d'aire perpendiculaire à la direction de propagation. La puissance  $P$  peut être reliée au travail  $W$  par

$$dP \stackrel{\text{déf}}{=} \frac{dW}{dt} = \frac{d\mathbf{F} \cdot d\mathbf{u}}{dt} = v(t)dF. \quad (3.24)$$

L'intensité instantanée  $i(t)$  est définie comme la puissance instantanée par unité d'aire :

$$i(t) \stackrel{\text{déf}}{=} dP/dA = v(t)dF/dA = p(t)v(t). \quad (3.25)$$

---

5. Aussi appelée *impédance caractéristique*.

Dans le cas d'une onde sinusoïdale, l'intensité moyenne peut être trouvée en intégrant sur un cycle :

$$I = p_P v_P \frac{1}{T} \int_0^T \sin^2(\omega t) dt = \frac{1}{2} p_P v_P = \frac{1}{2} \rho_0 c_L v_P^2 \quad (3.26)$$

où  $p_P$  et  $v_P$  sont l'amplitude de la pression et de la vitesse du milieu, respectivement.

### Réflexion et réfraction

Lorsqu'une onde ultrasonore plane rencontre l'interface entre deux milieux d'impédances acoustiques différentes  $Z_1$  (milieu de l'onde incidente) et  $Z_2$ , elle sera réfléchiée et réfractée, à l'instar des rayons lumineux à une interface optique soumise à la loi de Snell-Descartes. Les coefficients de réflexion et de transmission,  $R_{US}$  et  $T_{US}$ , peuvent s'exprimer comme

$$R_{US} \stackrel{\text{déf}}{=} \frac{p_r}{p_i} = \frac{Z_2 \cos \theta_i - Z_1 \cos \theta_t}{Z_2 \cos \theta_i + Z_1 \cos \theta_t}, \quad (3.27)$$

$$T_{US} \stackrel{\text{déf}}{=} \frac{p_t}{p_i} = \frac{2Z_2 \cos \theta_t}{Z_2 \cos \theta_i + Z_1 \cos \theta_t}, \quad (3.28)$$

où  $\theta_i$  et  $\theta_t$  sont respectivement les angles d'incidence et de transmission définis par rapport à la normale à l'interface, et  $p_r$ ,  $p_i$  et  $p_t$  sont les pressions de réflexion, d'incidence et de transmission (Cobbold, 2007). Ce modèle explique la formation de l'image des systèmes d'imagerie échographiques, qui sont basés sur les réflexions d'ondes dues aux inhomogénéités présentes dans le milieu de propagation. Il explique également l'extrême nécessité d'utiliser un milieu de couplage adéquat entre le transducteur et le spécimen d'imagerie pour éviter les réflexions aux interfaces et les pertes subséquentes de contraste. Aussi, si la normale d'une interface présente un grand angle par rapport à la direction de l'onde incidente, comme c'est le cas des surfaces courbes, la méthode à écho d'impulsion peut s'avérer inadéquate pour décrire la courbure.

### Atténuation, absorption et diffusion

Une onde ultrasonore qui se propage dans un milieu hétérogène voit son intensité atténuée en fonction de la distance. En effet, la pression d'une onde plane unidimensionnelle parallèle à l'axe des  $x$ , par exemple, décroît exponentiellement en fonction de la distance :

$$p(x) = p(0)e^{-\alpha x} \quad (3.29)$$

où  $p(0)$  est la pression à l'origine et  $\alpha$  est le coefficient d'atténuation acoustique (Cobbold, 2007). L'atténuation peut être négligée sans complication pour les basses fréquences ou de

courtes distances, mais devient problématique lorsque la fréquence augmente. En effet, pour la plupart des tissus mous, une bonne approximation est donnée par

$$\alpha(f) = \alpha_0 |f|^y \quad (3.30)$$

où  $y$  se situe entre 1 et 2 (Duck, 1990), tandis que l'absorption classique peut seulement expliquer une dépendance quadratique ( $y = 2$ ) à la fréquence. Une atténuation  $\alpha = 0,6 \text{ dB}/(\text{cm} \cdot \text{MHz})$  est souvent utilisée comme valeur représentative (Wells, 1999). L'absorption est le mécanisme dominant à l'origine de l'atténuation et se traduit par une conversion de l'énergie de l'onde en chaleur. Deux mécanismes principaux sont envisagés pour l'expliquer : la viscosité du milieu, et un phénomène de relaxation lié au temps de retour des particules à leur position d'équilibre (Shung, 2006). Les pertes d'intensité sont aussi attribuables à la diffusion due aux inhomogénéités dont les dimensions sont inférieures ou comparables à la longueur d'onde. Les échos diffusés apparaissent dans les images ultrasonores sous une forme granulaire (*speckle*) caractéristique de chaque type de tissu, ce qui aide à les différencier.

### Formation d'image

Si l'on néglige l'atténuation et la diffraction, l'écho reçu par le transducteur peut donc être approximé par (Macovski, 1983)

$$p(t) = A \left\{ p_{ax}(t) l(\mathbf{r}) *** R \left( x, y, \frac{c_L t}{2} \right) \right\} \quad (3.31)$$

où  $A$  est une constante d'amplitude,  $p_{ax}(t)$  est l'impulsion se dirigeant dans la direction axiale,  $l(\mathbf{r})$  est la largeur du faisceau dans les axes transverse et élevationnel et  $R(\mathbf{r})$  est la distribution tridimensionnelle des réflecteurs ou diffuseurs. Le produit de convolution 3D est représenté par le symbole  $***$ .

Si la distribution des diffuseurs est dense, les interactions diffuseur-diffuseur doivent aussi être considérées dans le modèle de formation d'image (Cobbold, 2007). Le coefficient de rétro-diffusion acoustique peut être utilisé pour quantifier le niveau de diffusion ; il est défini comme la puissance rétrodiffusée par unité de volume par stéradian par unité d'intensité incidente (unité  $\text{cm}^{-1}\text{sr}^{-1}$ ).

### 3.4 Photoacoustique

L'effet photoacoustique (PA) a d'abord été décrit par Bell (1880). Lors d'une expérience sur la transmission de signaux sonores sans câble, il soumit des matériaux à une source de

lumière solaire modulée par un disque troué, produisant ainsi des sons audibles. La découverte créa l'enthousiasme mais tomba dans l'oubli jusqu'à ce que M.L. Viengerov la revisite en 1938 (Rosencwaig, 1980). Le regain d'intérêt actuel semble avoir été provoqué par les travaux de Kreuzer et Patel (1971) sur la détection d'ultra-traces de gaz par l'effet PA induit par laser. Rosencwaig et Gersho (1976) ont posé les bases théoriques de l'effet photoacoustique dans les solides. De nombreux autres modèles ont été développés pour expliquer l'effet PA dans la matière gazeuse et non gazeuse (Patel et Tam, 1981; Sigrist, 1986; Tam, 1986; Gusev et Karabutov, 1991).

### 3.4.1 Génération par expansion thermique

Les ondes photoacoustiques sont généralement provoquées par des effets photothermiques, notamment l'électrostriction, l'expansion thermique, l'ablation, la formation de plasma ou la cavitation. L'effet photoacoustique par expansion thermique<sup>6</sup> est un mécanisme intéressant pour l'imagerie médicale car il est non destructif et non invasif. Il peut être observé lorsque l'absorption lumineuse génère une hausse locale de température ; la loi de Boyle-Gay-Lussac prédit alors une augmentation nette du volume local. Dans certaines conditions, cette hausse de température produit une onde de pression dans le milieu. La génération PA peut être classifiée en deux modes d'excitation : le mode de modulation continue, où le faisceau d'excitation a un facteur de marche d'environ 50%, et le mode pulsé, où le faisceau possède un facteur de marche très faible mais une forte pointe de puissance. Dans le mode pulsé, l'excitation est typiquement très courte et la distance de propagation acoustique est généralement beaucoup plus faible que la taille de l'échantillon. La forme d'onde PA est donc indépendante des réflexions aux frontières et l'échantillon est souvent considéré d'étendue infinie, contrairement au type continu où les interférences entre les modes d'excitation de la source et les modes vibrationnels de l'échantillon doivent être pris en compte. Conséquemment, dans le domaine de l'imagerie seuls les appareils de type pulsé sont habituellement utilisés.

Les équations linéarisées de la dynamique des fluides pour la conservation de la masse, du moment et de l'énergie sont, respectivement,

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} = -\rho_0 \nabla \cdot \mathbf{v}, \quad (3.32)$$

$$\rho_0 \frac{\partial \mathbf{v}}{\partial t} = -\nabla p, \quad (3.33)$$

$$\rho_0 T_0 \frac{\partial s}{\partial t} = \nabla \cdot (\kappa \nabla T) + H \quad (3.34)$$

---

6. Aussi appelé *effet thermoélastique*.

où  $s$  est l'entropie associée à la fluctuation de masse due à l'onde acoustique,  $T$  est la température,  $\kappa$  est la conductivité thermique,  $H$  est l'énergie déposée par le faisceau optique incident par unité de volume et de temps et l'indice 0 indique une quantité de l'équilibre initial (Morse et Ingard, 1968). Les pressions générées en imagerie photoacoustique sont très faibles (de l'ordre du kPa), c'est pourquoi les effets non linéaires (p. ex. génération d'harmoniques) peuvent être négligés. La convection par le flux sanguin ou la perfusion sont également négligées, et la vitesse initiale est considérée nulle. L'apport d'énergie thermique résulte en une hausse locale de température typiquement inférieure à 0,1 K, qui en général s'accompagne de variations dans la masse volumique  $\rho$  et la pression  $p$ , et qui satisfont la relation thermodynamique

$$\rho = \rho_0 K_T p - \rho_0 \beta T, \quad (3.35)$$

où  $K_T$  est la compressibilité isotherme (unité Pa<sup>-1</sup>) et  $\beta$  est le coefficient d'expansion thermique isobare (unité K<sup>-1</sup>),  $\beta \stackrel{\text{déf}}{=} (1/V)(\partial V/\partial T)_p$ . Les équations 3.32 et 3.33 peuvent être combinées en éliminant la vitesse de la particule  $\mathbf{v}$ . La divergence appliquée à l'équation 3.33 nous mène à

$$\nabla \cdot (\nabla p / \rho_0) = -\nabla \cdot \frac{\partial \mathbf{v}}{\partial t} \quad (3.36)$$

tandis que la dérivée de l'équation 3.32 nous donne

$$\frac{\partial^2 \rho}{\partial t^2} = -\rho_0 \nabla \cdot \frac{\partial \mathbf{v}}{\partial t} \quad (3.37)$$

$$= \rho_0 \nabla \cdot (\nabla p / \rho_0) \quad (3.38)$$

et on peut écrire

$$\frac{\partial^2}{\partial t^2} (K_T p - \beta T) = \nabla \cdot (\nabla p / \rho_0) \quad (3.39)$$

Pour un processus adiabatique réversible, nous pouvons écrire (Zemansky, 1996, p. 265)

$$\rho_0 T_0 s = \rho_0 C_P T - T_0 \beta p, \quad (3.40)$$

où  $C_P$  est la capacité thermique massique isobare, ce qui nous permet de réécrire l'équation 3.34 comme

$$\frac{\partial}{\partial t} (\rho_0 C_P T - T_0 \beta p) = \nabla \cdot (\kappa \nabla T) + H. \quad (3.41)$$

La paire d'équations 3.39 et 3.41 décrivant les perturbations dans la température et la pression doivent être résolues simultanément. L'équation 3.41 peut être vue comme l'équation de diffusion de la chaleur avec l'ajout d'un terme avec une dépendance à la pression pour tenir compte du réchauffement adiabatique où il y a une compression. L'équation 3.39 est une équation pour la pression acoustique avec une vitesse du son isotherme et un terme de source

qui dépend du taux de variation de la température. L'équation 3.41 peut être écrite en fonction du coefficient de Laplace  $\gamma = C_P/C_V$ , où  $C_V$  est la capacité thermique à volume constant, et du coefficient d'augmentation de pression isochore  $\alpha_P = (\partial P/\partial T)_V$  (Morse et Ingard, 1968) :

$$\frac{\partial}{\partial t} \left( T - \frac{\gamma - 1}{\gamma \alpha_P} p \right) = \frac{\kappa \nabla^2 T}{\rho_0 C_P} + \frac{H}{\rho_0 C_P}. \quad (3.42)$$

Lorsque  $\gamma \approx 1$ , ce qui est une bonne approximation pour plusieurs fluides communs ( $\gamma = 1,0152$  pour l'eau à 30 °C), le terme correspondant peut être négligé. Aussi, dans certaines conditions on peut négliger le terme de conductivité thermique en posant  $\kappa \approx 0$ . Soit  $\tau_p = d/c_L$  la durée caractéristique de propagation acoustique, et  $\tau_{th} = d^2/4\alpha_{th}$  le temps de relaxation thermique<sup>7</sup>, où  $d$  est la longueur caractéristique de la zone échauffée<sup>8</sup> et  $\alpha_{th}$  est la diffusivité thermique du matériau. L'hypothèse du *confinement thermique* est satisfaite lorsque  $\tau_p \ll \tau_{th}$ , c'est-à-dire lorsque la diffusion thermique prend beaucoup plus de temps que la propagation acoustique. On obtient alors l'équation d'onde photoacoustique pour un milieu hétérogène :

$$\frac{1}{c_L^2} \frac{\partial^2 p}{\partial t^2} - \rho_0 \nabla \cdot \left( \frac{1}{\rho_0} \nabla \right) p = \frac{\beta}{C_P} \frac{\partial H}{\partial t}, \quad (3.43)$$

qui se réduit à l'équation photoacoustique usuelle lorsque la masse volumique  $\rho_0(\mathbf{r})$  et la vitesse du son  $c_L$  sont constantes dans l'espace :

$$\left( \frac{\partial^2}{\partial t^2} - c_L^2 \nabla^2 \right) p = \Gamma \frac{\partial H}{\partial t} \quad (3.44)$$

où  $\Gamma = c_L^2 \beta / C_P = \beta / (\kappa \rho C_V)$  est un coefficient sans dimension appelé *paramètre de Grüneisen*, qui représente la fraction d'énergie thermique qui est convertie en pression. Lorsque la source est stationnaire, elle est séparable en composantes spatiales et temporelles,

$$H(\mathbf{r}, t) = h_r(\mathbf{r}) h_t(t) \quad (3.45)$$

où  $\int h_t(t) dt = 1$  par commodité. Si la fonction d'échauffement est temporellement gaussienne, par exemple, on aura

$$h_t(t) = e^{-(t/\tau)^2} / (\tau \sqrt{\pi}) \quad (3.46)$$

où  $\tau$  est la constante de temps qui caractérise la durée de l'échauffement. Lorsque celle-ci est beaucoup plus courte que le temps de voyage acoustique typique,  $\tau \ll \tau_p$ , alors la partie temporelle de la source peut être approximée comme une impulsion de Dirac,  $h_t(t) \rightarrow \delta(t)$

7. Pour la plupart des tissus mous,  $\alpha_{th} \approx 10^3 \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  Duck (1990). Avec  $d \approx 1 \text{ mm}$ , on a  $\tau_{th} \approx 10 \text{ } \mu\text{s}$ .

8. Soit la taille de la cible absorbante ou la constante de décroissance de la fonction d'illumination, s'il y a lieu.

quand  $T \rightarrow 0$ . Cette condition, appelée *confinement de contrainte*, est équivalente à supposer que toute l'énergie thermique est déposée avant le changement de masse volumique. Mettre  $\rho = 0$  dans la relation  $\rho = \rho_0 K_T p - \rho_0 \beta T$  donne la distribution initiale de pression

$$p_0(\mathbf{r}) = p|_{t=0}(\mathbf{r}) = (\beta/K_T)T = \Gamma(\mathbf{r})h_r(\mathbf{r}). \quad (3.47)$$

C'est cette pression que les systèmes de tomographie photoacoustique essaient de retrouver. La résolution de l'équation 3.44 avec le terme de source  $\Gamma h_r \partial \delta / \partial t$  équivaut à résoudre l'équation homogène

$$\left( \frac{\partial^2}{\partial t^2} - c_L^2 \nabla^2 \right) p = 0, \quad (3.48)$$

avec les conditions initiales

$$p|_{t=0} = \Gamma(\mathbf{r})h_r(\mathbf{r}) \quad \text{et} \quad \partial p / \partial t|_{t=0} = 0. \quad (3.49)$$

Cette dernière condition signifie que le système est à l'équilibre au début d'une impulsion lumineuse. Donc, les caractéristiques temporelles et spatiales peuvent être déduites de la distribution d'énergie déposée sans l'évaluation d'intégrales ou de résoudre l'équation différentielle. En général, le dépôt spatial d'énergie est déterminé par l'absorption et la fluence :

$$h_r(\mathbf{r}) = \eta(\mathbf{r})\mu_a(\mathbf{r})F(\mathbf{r}) \quad (3.50)$$

où  $\eta(\mathbf{r})$  est le rendement de conversion de l'énergie optique absorbée en chaleur. On a alors

$$p_0(\mathbf{r}) = \Gamma(\mathbf{r})\eta(\mathbf{r})\mu_a(\mathbf{r})F(\mathbf{r}). \quad (3.51)$$

Dans l'hypothèse d'un milieu inhomogène au niveau de  $\rho_0$ , l'équation doit être résolue telle quelle avec ou sans l'hypothèse d'une illumination courte et résulte en des formes d'onde complexes pour des géométries simples et symétriques (Diebold *et al.*, 1991). Pour les tissus mous, le facteur de conversion et le paramètre de Grüneisen sont souvent approximés par  $\eta \approx 1$  et  $\Gamma \approx 0,2$  (Yao et Wang, 2013), et ils sont souvent considérés invariants dans l'espace. Dans le cas des nanotiges d'or et d'argent, plus de 99,9 % de l'énergie absorbée est transformée rapidement en chaleur (Link et El-Sayed, 2000). Si des tissus caractérisés par  $\mu_a = 0,1 \text{ cm}^{-1}$  sont excités par une source homogène de fluence  $F = 20 \text{ mJ/cm}^2$ , qui correspond à la norme d'exposition à une lumière laser pour les applications photoacoustiques, alors  $h_r = 2 \text{ mJ/cm}^3 = 2 \text{ kPa}$ . De plus, nous aurons  $T = h_r / (\rho C_V) = 0,5 \text{ mK}$  et  $p_0 = \Gamma h_r = 400 \text{ Pa}$ . Les pressions générées par l'effet photoacoustique sont donc très faibles en comparaison avec celles produites par des transducteurs ultrasonores en mode écho

d'impulsion.

Notons que la capacité thermique massique et la vitesse du son de l'eau augmentent toutes deux avec la température (Duck, 1990), alors que l'effet inverse se produit pour les corps gras (Bamber et Hill, 1979). Dans les deux cas, le coefficient de Grüneisen, et donc le signal photoacoustique dépend directement de la température (Sigrist, 1986). Numériquement, une hausse de température de 10°C dans un milieu homogène ayant les mêmes propriétés que l'eau peut causer une augmentation de 51 % du signal PA (Shah *et al.*, 2008). Les mesures photoacoustiques sont donc très sensibles à la température du spécimen.

### 3.4.2 Solution du problème direct

L'équation photoacoustique (3.44) peut être résolue par l'approche par la fonction de Green. La fonction de Green est définie implicitement comme la réponse à une source impulsionnelle au niveau spatial et temporel :

$$\left(\nabla^2 - \frac{1}{v_s^2} \frac{\partial^2}{\partial t^2}\right) G(\mathbf{r}, t; \mathbf{r}', t') = -\delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}')\delta(t - t') \quad (3.52)$$

où  $\mathbf{r}'$  et  $t'$  désignent la localisation et le temps de survenue de la source. Dans l'espace infini, et plus loin encore, la fonction de Green correspondant à l'opérateur différentiel de l'équation d'onde 3.52 est donnée par

$$G(\mathbf{r}, t; \mathbf{r}', t') = \frac{\delta(t - t' - |\mathbf{r} - \mathbf{r}'|/c_L)}{4\pi|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|} \quad (3.53)$$

qui représente une onde sphérique impulsionnelle divergente partant de  $\mathbf{r}'$ . En intégrant la source contre le noyau d'intégration nouvellement défini, on obtient

$$p(\mathbf{r}, t) = \frac{\beta}{C_P} \int_{-\infty}^{\infty} \int_V G(\mathbf{r}, t; \mathbf{r}', t') \frac{\partial H(\mathbf{r}', t')}{\partial t'} d\mathbf{r}' dt' \quad (3.54)$$

qui représente la solution générale de l'équation photoacoustique pour une source arbitraire. En considérant que  $h_t(t) = \delta(t)$ , on a

$$p(\mathbf{r}, t) = \frac{\beta}{C_P} \int_{-\infty}^{\infty} \int_V G(\mathbf{r}, t; \mathbf{r}', t') h_r(\mathbf{r}') \delta'(t') d\mathbf{r}' dt' \quad (3.55)$$

où  $\delta'$  représente la dérivée de la fonction de Dirac. En utilisant la propriété de cette dernière  $\int \delta'(t - t_0) f(t) dt = -f'(t_0)$ , et que  $\partial G / \partial t' = -\partial G / \partial t$ , l'équation 3.55 devient

$$p(\mathbf{r}, t) = \frac{\beta}{C_P} \int_V h_r(\mathbf{r}') \frac{\partial G}{\partial t}(\mathbf{r}, t; \mathbf{r}') d\mathbf{r}' \quad (3.56)$$

qui peut s'écrire en fonction de la distribution initiale de pression par

$$p(\mathbf{r}, t) = \frac{1}{c_L^2} \int_V p_0(\mathbf{r}') \frac{\partial G}{\partial t}(\mathbf{r}, t; \mathbf{r}') d\mathbf{r}'. \quad (3.57)$$

La solution de Poisson à l'équation d'onde (Landau et Lifshitz, 1987) peut être dérivée des deux équations précédentes pour calculer une solution par l'intégration sur des surfaces sphériques  $S$  de rayon  $|\mathbf{r} - \mathbf{r}'| = c_L t$ ,

$$p(\mathbf{r}, t) = \frac{1}{4\pi c_L} \frac{\partial}{\partial t} \int_S \frac{p_0(\mathbf{r}')}{|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|} dS. \quad (3.58)$$

Dans le cas où les hypothèses de confinement ne seraient pas satisfaites, la fonction d'échauffement doit être écrite comme une convolution du profil temporel de l'illumination et de la décroissance exponentielle de la relaxation thermique. Le signal généré par une source sphérique a une importance particulière en imagerie car une source étendue peut être subdivisée en petits volumes de sources qui contribuent tous au signal au point d'observation par la superposition des signaux individuels. Les calculs numériques basés sur les ondes photoacoustiques cylindriques sont difficiles d'application puisque la géométrie et les dimensions des sources peuvent être variées. On considère, par exemple, une sphère de rayon  $R_S$  suffisamment mince pour être échauffée de manière homogène par une impulsion temporelle. Le faisceau laser, très large comparé aux dimensions de la sphère, est uniforme et à incidence normale sur celle-ci. Soit la fonction de Heaviside définie par

$$U(r) = \begin{cases} 1 & \text{pour } r \geq 0, \\ 0 & \text{pour } r < 0, \end{cases} \quad (3.59)$$

où  $r$  est la coordonnée radiale originant du centre de la sphère. La pression initiale peut s'écrire analytiquement par

$$p_0(\mathbf{r}) = p_0 U(r) U(R_s - r) \quad \text{pour } 0 \leq r < R_s. \quad (3.60)$$

La pression résultante est alors donnée par

$$p(\mathbf{r}, t) = \frac{r - c_L t}{2r} p_0(r - c_L t) + \frac{r + c_L t}{2r} p_0(r + c_L t) + \frac{r - c_L t}{2r} p_0(-r + c_L t). \quad (3.61)$$

Le premier terme de droite représente une onde sphérique divergente, le second, une onde sphérique convergente et le dernier terme représente une onde sphérique divergente qui provient de l'onde initialement convergente vers le centre de la sphère. La pression initiale se propage comme une onde de compression sphérique divergente, ce qui provoque la première

pointe de pression positive (voir figure 3.4). La perturbation de pression (augmentation locale) décroît de manière inversement proportionnelle au rayon à cause de la conservation de l'énergie. Une onde de raréfaction converge également vers le centre de la sphère, l'amplitude de la raréfaction augmentant avec la même dépendance en  $1/r$ . Après un temps de propagation  $t = R_S/c_L$ , le centre de la sphère connaît une raréfaction complète, après quoi la pression retourne à son état d'équilibre. La raréfaction se traduit à l'extérieur de la sphère par le demi-cycle de pression négative. La figure 3.5 montre les signaux théoriques et expérimentaux générés par des sources sphériques ou cylindriques homogènes, ainsi que par une source sphérique inhomogène. L'effet de filtrage produit par l'atténuation acoustique ou l'instrument de mesure se traduit par la difficulté à distinguer les signaux mesurés, contrairement aux formes d'ondes théoriques. L'ondulette canonique résultante est très similaire en forme aux ondes bipolaires utilisées en échographie, et aux splines quadratiques utilisées pour caractériser la régularité Lipschitz d'un signal (Mallat et Zhong, 1992; Mallat et Hwang, 1992).

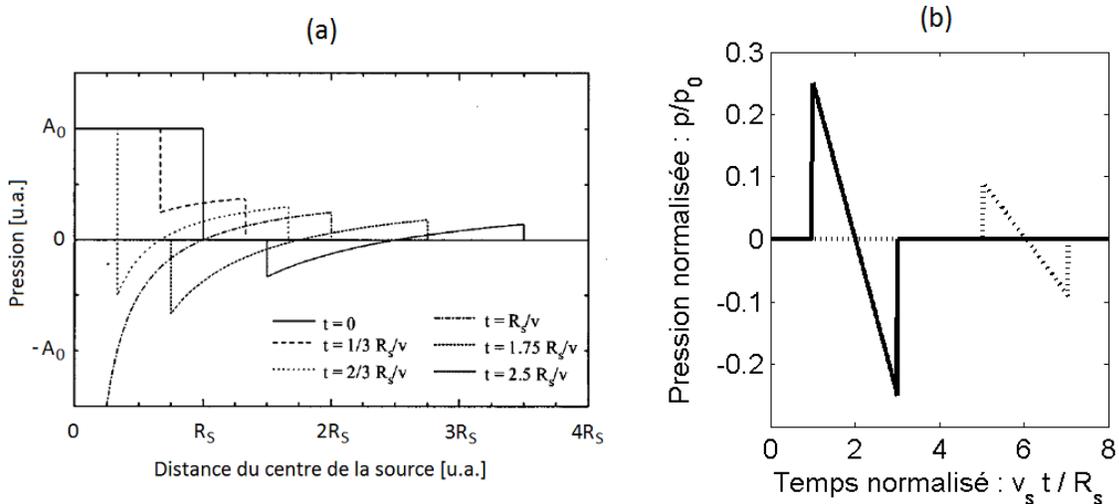


Figure 3.4 Pression acoustique théorique générée par une source photoacoustique sphérique homogène. (a) Développement de la pression sphérique transitoire. Adaptée de Hoelen et Mul (1999). (b) Profils de pression en fonction du temps à diverse positions radiales [Ligne pleine :  $2R_S$ , ligne pointillée :  $6R_S$ ] du centre de la sphère.

### 3.4.3 Solution du problème inverse

Le problème inverse mentionné ici est le problème *acoustique* et non le problème *optique* (voir section 8.3.3), qui est hors du champ d'application de cette thèse. Les signaux de pression mesurés en surface peuvent être utilisés pour calculer la distribution acoustique initiale, qui est

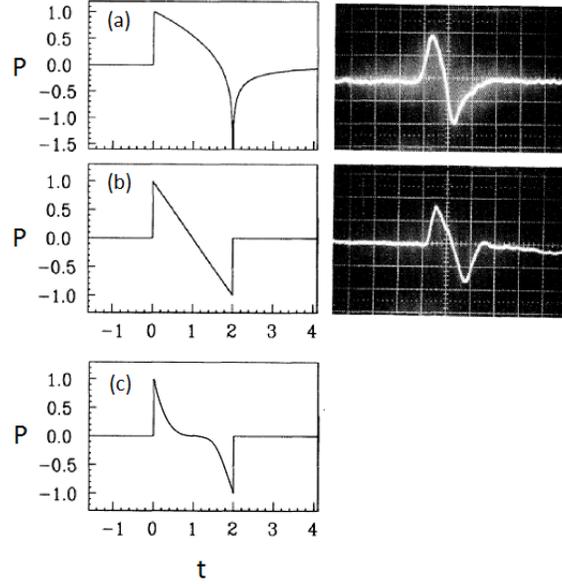


Figure 3.5 Formes d'onde photoacoustiques pour des impulsions lumineuses courtes. Colonne de gauche : Pression photoacoustique théorique  $P$  (unité arbitraire) en fonction du temps adimensionnel pour (a) un cylindre, (b) une sphère homogène et (c) une sphère avec une absorption exponentiellement décroissante. Colonne de droite : formes d'ondes expérimentales obtenues en illuminant (a) un cylindre de  $150 \mu\text{m}$  de rayon et (b) une gouttelette de  $500 \mu\text{m}$  de rayon. Les échelles temporelles et de tension sur l'oscilloscope sont respectivement de (a)  $200 \text{ ns/div}$  et  $20 \text{ mV/div}$ , (b)  $500 \text{ ns/div}$  et  $50 \text{ mV/div}$ . Les fluences laser étaient de  $60$  et  $20 \text{ J/m}^2$ , et les absorbances des fantômes étaient de  $0,5 \text{ cm}^{-1}$  et  $1,4 \text{ cm}^{-1}$ . Adapté de Diebold *et al.* (1991).

reliée aux propriétés du tissu. Différentes méthodes de reconstruction tomographique ont été envisagées, notamment la transformée de Radon dans le champ lointain (Kruger *et al.*, 1999), la sommation pondérée où les poids sont déterminés expérimentalement (Hoelen et de Mul, 2000) et des rétroprojections temporelles sur des surfaces de détection sphérique, cylindrique et planaire (Xu et Wang, 2005). La formule de reconstruction applicable dépend largement du montage utilisé et des considérations pratiques de l'imagerie telles que les caractéristiques du transducteur ultrasonore et l'accessibilité des surfaces pour l'enregistrement des décours temporels. La géométrie planaire, telle que montrée à la figure 3.6, est souvent rencontrée à cause de la géométrie typique des transducteurs d'utilisation clinique. Soit  $\mathbf{n}$  et  $\mathbf{n}_m$  les vecteurs unitaires pointants le long de l'axe des  $z$  et le long de la ligne joignant  $\mathbf{r}$  et  $\mathbf{r}_m$ , respectivement. On peut montrer que la distribution initiale de pression peut être calculée comme (Xu *et al.*, 2003)

$$h_r(\mathbf{r}) = -\frac{C_P}{\pi c^4 \beta} \int \int_{S_m} [\mathbf{n} \cdot \mathbf{n}_m] \frac{1}{t} \left. \frac{\partial p(\mathbf{r}_m, t)}{\partial t} \right|_{t=\frac{r_m-r}{c}} dS_m \quad (3.62)$$

où l'intégration se fait sur tout le plan de mesure et pour les signaux provenant de tous les angles solides de 0 à  $2\pi$ . En pratique, ces conditions ne sont jamais rencontrées. Toutefois, le facteur de pondération  $[\mathbf{n} \cdot \mathbf{n}_m]$  favorise les signaux de provenance axiale.

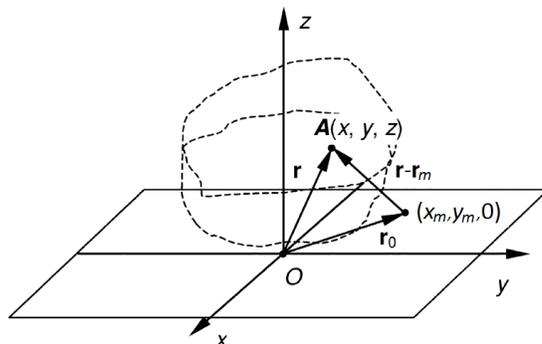


Figure 3.6 Géométrie du problème inverse. Adapté de Xu *et al.* (2003).

Il faut noter que certaines configurations de détection, par exemple les transducteurs focalisés, ne nécessitent pas d'algorithme d'inversion étant donné qu'ils sont considérés comme un échantillonnage de la distribution initiale de pression (voir section 5.1.1). En théorie, pour la plus grande qualité d'image, les points de détection devraient entourer l'objet à imager. En pratique, de bonnes images peuvent être obtenues même quand ce n'est pas le cas, par exemple pour une surface de détection plane (Cox *et al.*, 2012).

Enfin, quand on résout le problème inverse pour l'imagerie PA, on fait généralement l'hypothèse que le tissu est acoustiquement homogène, à la fois au niveau de la vitesse du son et de la masse volumique. Cette approximation peut bien fonctionner en pratique mais les hétérogénéités introduisent des distorsions de phase qui peuvent causer des aberrations géométriques (Cox *et al.*, 2012).

### 3.4.4 Conclusion

La méthode Monte-Carlo est le standard de référence pour modéliser la propagation photonique, aussi elle pourrait être utilisée pour estimer l'étendue de la distribution lumineuse dans un fantôme numérique des tissus. Les signaux PA expérimentaux ont une forme très différente des résultats analytiques suite à l'atténuation acoustique des hautes fréquences. Poursuivant l'objectif d'expérimenter cette technique, une meilleure compréhension de l'effet des paramètres expérimentaux pourrait être obtenue efficacement par un modèle prenant en compte cette atténuation, comme la simulation acoustique. Aussi, les systèmes d'imagerie PA visent d'abord à mesurer la distribution initiale de pression dans l'objet imagé. Cette pression est non seulement due à la fluence et au coefficient d'absorption, mais également aux coefficients de Grüneisen et de conversion thermique.

## CHAPITRE 4

### SIMULATION DU PROBLÈME DIRECT

L'objectif de ce chapitre est d'étudier la faisabilité et les limites de l'imagerie photoacoustique pour des applications en profondeur, et ce, par la simulation du processus de formation d'image. La simulation de signaux photoacoustiques est aisément séparable en deux parties distinctes, soit d'une part la simulation des trajectoires photoniques et d'autre part celle du champ acoustique. Les simulations photoniques visent à mesurer l'influence des paramètres optiques sur les profils de fluence, en particulier la dépendance spectrale du coefficient d'absorption pour un volume de tissu réaliste. Les simulations acoustiques ont pour but d'évaluer l'influence de diverses conditions expérimentales susceptibles d'affecter les signaux PA, notamment la taille des sources, l'inhomogénéité de la distribution de pression initiale ou de la vitesse du son ainsi que la bande passante du transducteur. Les signaux obtenus aideront grandement à formuler les attentes par rapport aux mesures dans des conditions expérimentales réelles.

#### 4.1 Simulation Monte-Carlo

La méthode de Monte-Carlo permet de simuler le transport photonique résolu en temps dans un milieu diffusant tridimensionnel. Les valeurs des distributions spatiales des propriétés des tissus, soient  $\mu_a$ ,  $\mu_s$  et  $g$ , sont alors fixées par l'utilisateur. Des photons sont lancés dans le volume et leur « destinée » est réévaluée à chaque pas temporel de calcul ; la sommation sur l'ensemble de la durée de la simulation donne alors une estimation de la fluence. Le logiciel Monte-Carlo eXtreme (MCX) a été employé à cette fin (Fang et Boas, 2009). Lorsqu'utilisé avec une carte graphique, il permet de paralléliser le lancement des photons, ce qui diminue grandement le temps de calcul par rapport à l'utilisation d'un seul processeur. Dans le contexte de ce projet, ce type de simulation permet d'abord d'estimer la profondeur de pénétration lumineuse en fonction des paramètres optiques. L'absorption dans les tissus est ici considérée comme dépendant seulement des coefficients d'extinction et des concentrations en oxyhémoglobine ( $C_{HbO_2}$ ), en désoxyhémoglobine ( $C_{Hb}$ ) et en eau ( $C_W$ ). Le coefficient d'absorption spectral  $\mu_a(\lambda)$  est approximé par la combinaison linéaire des coefficients d'absorption de ces trois principaux constituants :

$$\mu_a(\lambda) = S_B (sO_2 \cdot \mu_{a,HbO_2}(\lambda) + (1 - sO_2)\mu_{a,Hb}(\lambda)) + S_W \mu_{a,W}(\lambda) \quad (4.1)$$

où  $sO_2 = C_{HbO_2}/(C_{HbO_2} + C_{Hb})$  est la saturation en oxygène de sang mixte artério-veineux, et  $S_B$  et  $S_W$  sont les fractions volumiques de sang et d'eau, respectivement, pour chaque tissu (Brown *et al.*, 1997). Ces valeurs peuvent être choisies de manière heuristique pour assurer la correspondance avec les données d'absorption présentement disponibles dans la littérature (Alexandrakis *et al.*, 2005). Le coefficient de dispersion réduit  $\mu'_s$  est quant à lui approximé par la fonction empirique

$$\mu'_s(\lambda) = a\lambda^{-b}, \quad (4.2)$$

où  $a$  et  $b$  sont des constantes qui déterminent les variations spectrales de chaque tissu (Alexandrakis *et al.*, 2005).

Une première série de simulations ont été effectuées dans le but d'établir la profondeur de pénétration pour un cas d'absorption maximal - du sang total -, et un cas de diffusion typique. Le logiciel MCX a été utilisé avec une carte graphique GeForce GTX280 (Nvidia Corporation, Santa-Clara, Californie) et un processeur double Intel Xeon cadencé à 2,83 GHz pour simuler un domaine de taille  $50 \times 50 \times 50 \text{ mm}^3$  avec des voxels isotropiques de 1 mm. La simulation a été répétée 100 fois, et  $10^7$  photons ont été injectés à chaque répétition, et ce, pour des contraintes de mémoire de calcul. La fluence a été approximée par la sommation des intensités lumineuses sur la plage  $[0, 3 \text{ ns}]$  avec un pas de temps de 0,2 ns. Deux types d'illumination ont été utilisées, soit une source unique collimée ayant un diamètre de 0,8 mm, mais également une combinaison de sources reproduisant les positions et les angles des fibres optiques du système commercial Vevo LAZR (Visualsonics, Toronto, Ontario). Cet assemblage comprenait 24 sources collimées de 0,8 mm de diamètre disposées en rangées, au pourtour de l'emplacement du transducteur central. La séparation entre les fibres est de 2 mm à l'intérieur d'une rangée, et de 6 mm entre les rangées. Chaque rangée était dirigée vers l'intérieur de manière à former un angle d'illumination de  $30^\circ$  par rapport au plan central. Les valeurs de  $\mu_{a,HbO_2}(\lambda)$  et  $\mu_{a,Hb}(\lambda)$  ont été obtenues à partir des données tabulées pour l'absorbance à une saturation en oxygène de 99 % et une concentration en hémoglobine correspondant à 150 g/L avec un poids moléculaire de 64,5 kDa (Prahl, 1999). Les paramètres optiques de l'eau sont tirés de Hale et Querry (1973). La figure 4.1 montre la fluence moyennée telle que simulée par MCX pour deux séries de valeurs des paramètres optiques et les deux types d'illumination décrits précédemment. Les images du haut ont été réalisées avec les valeurs typiques d'un milieu diffusant dans la fenêtre proche-infrarouge (Wang et Wu, 2007), alors que les figures du bas ont été produites avec les valeurs associées au sang total à 680 nm. Le volume était considéré comme complètement homogène.

L'écart entre les voxels les plus riches en photons et les voxels défavorisés étant de plusieurs ordres de grandeur, une compression logarithmique a été appliquée sur les densités afin de pouvoir en apprécier visuellement les formes. Les résultats de simulation montrent

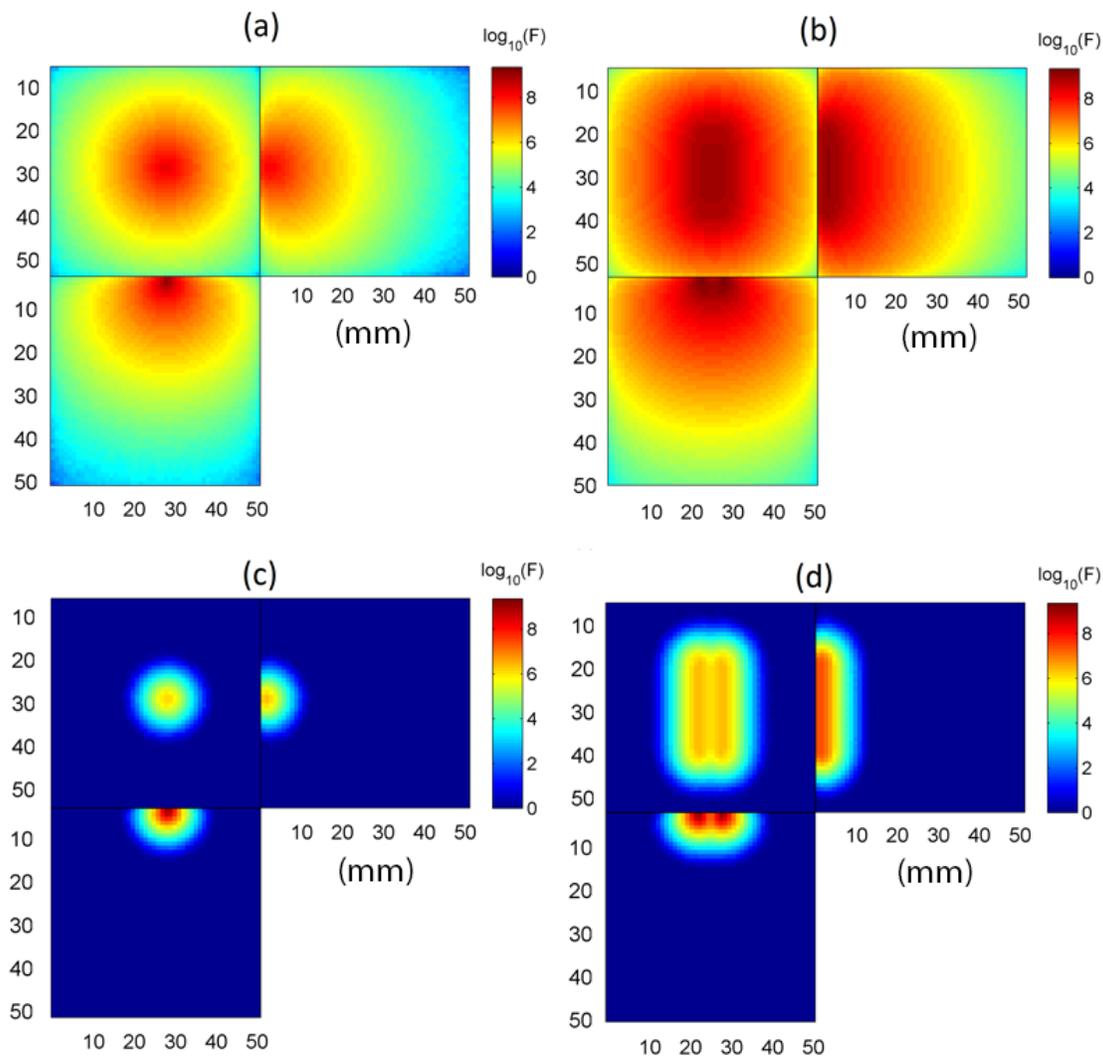


Figure 4.1 Simulation Monte-Carlo pour un volume homogène. Les images correspondent à  $\log(F(\mathbf{r}))$  vues en coupe avec une [(a), (c)] source d'illumination ponctuelle ou une [(b), (d)] source d'illumination multiple à 24 faisceaux. La disposition de cette source est indiquée dans le texte. Les paramètres optiques ont été fixés à [(a), (b)]  $g = 0,9$   $\mu_a = 0,01 \text{ mm}^{-1}$  et  $\mu_s = 10 \text{ mm}^{-1}$ ; [(c) et (d)] :  $g = 0,9$   $\mu_a = 0,434 \text{ mm}^{-1}$  et  $\mu_s = 17,98 \text{ mm}^{-1}$ . Les coupes montrées sont (coin supérieur gauche)  $z = 5 \text{ mm}$ , (coin supérieur droit)  $y = 25 \text{ mm}$  et (coin inférieur)  $x = 25 \text{ mm}$ .

une prédominance évidente de l'absorption pour les paramètres sanguins à 680 nm, où la fluence maximale se concentre à 1-2 mm sous la source. Au contraire, les paramètres optiques «typiques» entraînent une diffusion sur une distance considérablement plus grande, et la profondeur de pénétration  $y$  est augmentée. Dans l'approximation de diffusion, les photons collimés lancés dans le milieu créent un centre de diffusion apparent se trouvant à  $1/\mu'_s$  derrière le point de lancement (Jacques et Pogue, 2008), ce qui correspond bien aux résultats de la sous-figure du haut, où le centre se situe à 1-2 mm sous la surface. Bien que la fluence maximale en surface soit susceptible d'y générer un signal photoacoustique fort, un plus grand nombre de photons sont disponibles en profondeur pour des régions d'intérêt absorbantes. L'individualité des fibres de la source d'illumination multiple ressort peu pour les deux séries de paramètres, bien que les deux rangées de fibres soient beaucoup plus visibles sur les données sanguines. Au niveau de l'intensité de la fluence, elle demeure du même ordre de grandeur jusqu'à environ 1 cm de profondeur pour le milieu diffusant, comparativement à 1 mm pour le sang. Même si les vaisseaux sanguins demeurent un cas d'absorption maximale dans la fenêtre considérée, la dépendance spectrale de  $\mu_{a,HbO_2}(\lambda)$ ,  $\mu_{a,Hb}(\lambda)$  et  $\mu_{a,W}(\lambda)$  est susceptible d'affecter la fluence dans tous les tissus irrigués. Cette influence peut être

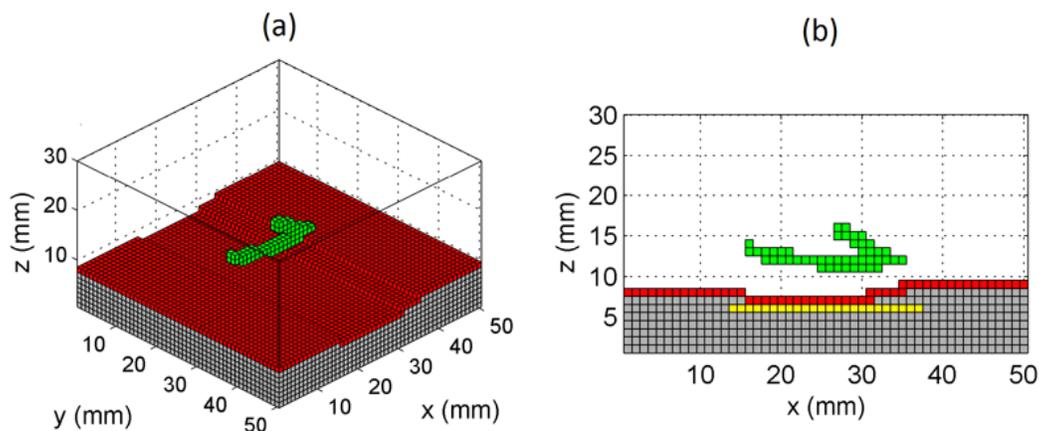


Figure 4.2 Fantôme numérique avec segment vasculaire pour simulation Monte-Carlo. (a) Représentation des segments d'air (gris), de peau (rouge) et de sang (vert). Les voxels restants du volume de 50x50x50 (mm) sont considérés comme du tissu adipeux. (b) Les sources sont disposées en deux segments parallèles dans le plan  $xy$  (jaune).

quantifiée par la création d'un fantôme numérique comprenant l'organe d'intérêt et son milieu environnant. Ainsi, la figure 4.2 montre un tel fantôme constitué d'un embranchement vasculaire situé à 4 mm sous la peau, et dont l'épaisseur a été fixée à 1 mm. Outre ces deux

régions, le volume restant a été considéré comme du tissu adipeux, relativement diffusant. Les paramètres assignés à chaque organe ont été estimés sur la base de mesures expérimentales colligées par Alexandrakis *et al.* (2005) et montrées au tableau 4.1. Les coefficients résultants  $\mu_a(\lambda)$  et  $\mu'_s(\lambda)$  sont montrés à titre indicatif au tableau 4.2 pour les longueurs d'onde minimale et maximale de 680 et 970 nm. La simulation Monte-Carlo a été effectuée avec MCX sur la plage 680-970 nm et la fluence résultante a été moyennée pour chaque segment. La figure 4.3-(a) montre les valeurs de la fluence incidente sur le tissu adipeux et le compartiment vasculaire en fonction de la longueur d'onde d'illumination, normalisées par rapport à leurs valeurs à 680 nm. La figure 4.3-(b) montre quant à elle les valeurs de la pression initiale moyenne  $p(\mathbf{r}) = \mu_a(\mathbf{r})F(\mathbf{r})$  calculée pour chaque segment et également normalisée par rapport à 680 nm. On considère alors une conversion totale de l'énergie optique en pression. La figure 4.3-(a) montre que la fluence moyenne incidente sur le vaisseau à 970 nm est environ 40 % inférieure à celle à 680 nm, tandis qu'elle est de plus de 75 % inférieure pour le tissu adipeux.

Tableau 4.1 Paramètres spectraux de simulation des tissus

Tissu	$a$	$b$	$S_B$	$sO_2$	$S_W$
Peau	2850	1,1	0,06	0,75	0,5
Sang	133	0,66	1,0	0,75	0
Tissu adipeux	38	0,53	0,0033	0,7	0,5

Tableau 4.2 Coefficients optiques des tissus

Tissu	$\lambda$ (nm)	$\mu_a$ (1/mm)	$\mu_s$ (1/mm)	$g$	$n$
Peau	680	0,0263	21,83	0,90	1,44
	970	0,0540	14,77	0,90	1,44
Sang	680	0,434	17,96	0,99	1,35
	970	0,524	14,21	0,99	1,35
Tissu adipeux	680	0,018	11,98	0,94	1,35
	970	0,0242	0,927	0,94	1,35

Une fois pondérée par  $\mu_a(\lambda)$ , la pression initiale moyenne sur le segment vasculaire demeure 30 % inférieure à sa valeur à 680 nm. La figure 4.4 montre la pression initiale calculée sur tout le volume pour ces longueurs d'ondes. Cette dernière figure montre bien l'influence spectrale de la source d'illumination indépendamment de la puissance de celle-ci, qui en pratique varie souvent selon  $\lambda$ .

Ces résultats ont une implication sur les attentes expérimentales. En effet, ils suggèrent une diminution du contraste de l'aorte par rapport aux tissus diffusants adjacents pour les longueurs d'onde élevées dans la fenêtre proche infrarouge. Conséquemment, si l'interrogation est limitée à une seule longueur d'onde, il est préférable de procéder aux environs de 680 nm, ce qui maximisera le contraste.

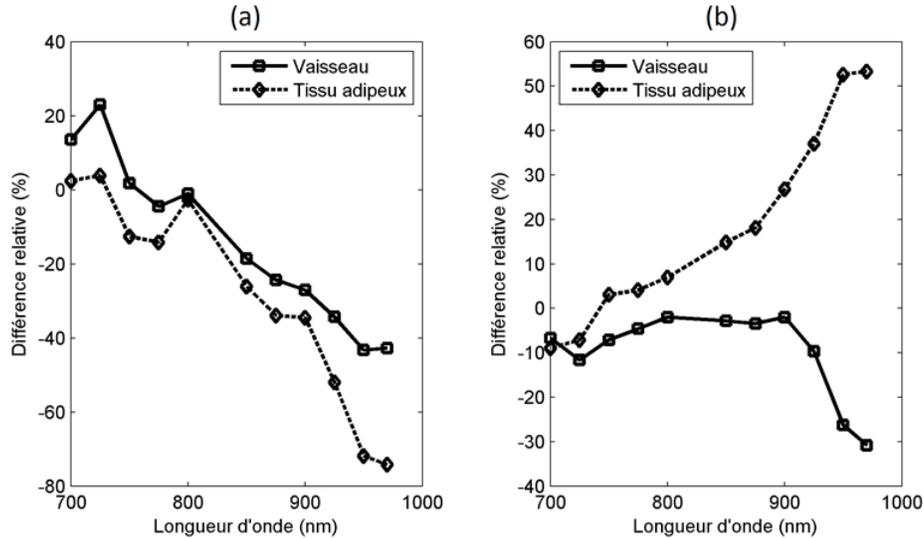


Figure 4.3 Simulation Monte-Carlo pour un fantôme numérique avec compartiment vasculaire. (a) Fluence pour deux segments en fonction de  $\lambda$ , normalisée par les valeurs correspondantes à 680 nm. (b) Pression initiale  $p(\mathbf{r}) = \mu_a(\mathbf{r})F(\mathbf{r})$  pour deux segments, normalisée par les valeurs correspondantes à 680 nm.

## 4.2 Propagation acoustique

Les simulations acoustiques ont pour but d'évaluer l'influence de diverses conditions expérimentales susceptibles d'affecter les signaux PA mesurés, et ainsi de prédire l'allure des signaux expérimentaux. Pour ce faire, les fantômes numériques offrent un accès direct au champ de pression acoustique simulé et permettent notamment d'étudier l'effet des transducteurs modélisés.

Nous avons utilisé la boîte à outils *k-Wave* pour Matlab afin de simuler la propagation ultrasonore pour le modèle direct (Treeby et Cox, 2010). L'une des forces de ce logiciel est sa capacité de pouvoir spécifier une loi de puissance arbitraire pour l'absorption acoustique. Il peut également supporter les hétérogénéités du milieu pour la masse volumique et la vitesse du son. L'utilisation de la transformée de Fourier dans le calcul des dérivées spatiales requière un espacement de la grille de calcul d'environ un tiers de la longueur d'onde, ce qui le rend efficace

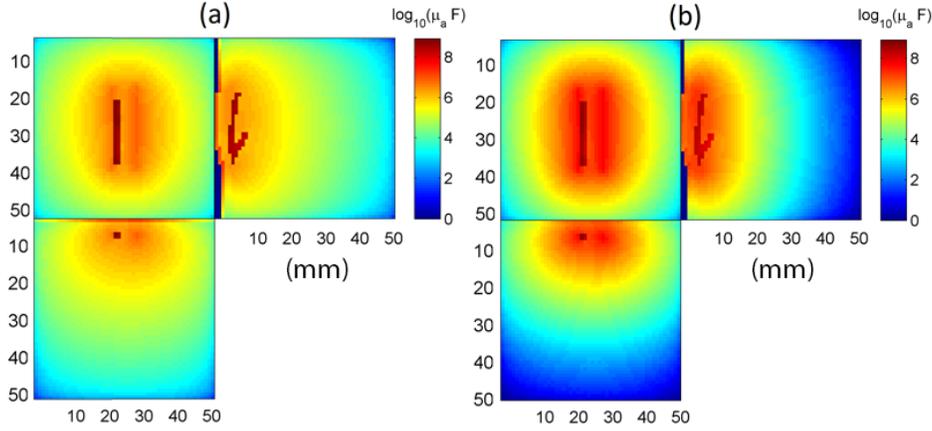


Figure 4.4 Simulation Monte-Carlo pour un volume inhomogène avec une source d'illumination multiple. Les images correspondent à  $\log(\mu_a(\mathbf{r})F(\mathbf{r}))$  vues en coupe avec une source d'illumination multiple à (a) 680 nm et (b) 970 nm. Les coupes montrées sont (coin supérieur gauche)  $z = 5 \text{ mm}$ , (coin supérieur droit)  $y = 25 \text{ mm}$  et (coin inférieur)  $x = 25 \text{ mm}$ .

au niveau du fardeau calculatoire. La vitesse du son  $c_L$  et l'espacement de la grille dans chaque direction ( $\Delta x$ ,  $\Delta y$  et  $\Delta z$ ) déterminent la fréquence maximale propagée par le milieu simulé, soit ici  $f_{max} = c_L/(2\Delta x)$  puisque l'espacement a été fixé également dans chaque direction. Les simulations acoustiques possibles sont innombrables, mais celles choisies sont destinées à simuler certaines conditions expérimentales susceptibles de survenir et à reconnaître le profil des signaux mesurés. En particulier, on simulera en trois dimensions le problème de valeur initiale représenté par l'équation 3.43 avec un espacement de la grille dans chaque dimension de  $\Delta x = 50 \mu\text{m}$  et un pas temporel de 10 ns. Soit une source de pression sphérique et trois points de mesures à diverses distances de celle-ci, tel que montré à la figure 4.5. La figure 4.6 montre les signaux de pression simulés pour une source sphérique homogène de rayon  $R_S = 8\Delta x$  et d'amplitude unitaire, avec un support fréquentiel simulé de 15 MHz et une atténuation acoustique du milieu fixée à une valeur nulle. À ce stade, le transducteur est considéré comme idéal. Le profil de pression simulé est semblable au profil théorique (voir 3.4) mis à part l'atténuation des hautes fréquences. La décroissance de l'amplitude en fonction de la distance de mesure révèle également la nature exponentielle de l'atténuation due à la géométrie. On fait d'abord varier le volume de la sphère en le diminuant à  $4\Delta x$ . Les pressions résultantes sont montrées à la figure 4.7. Les signaux sont tous normalisés par rapport au maximum du point de mesure le plus éloigné. La réduction de moitié du diamètre de la source se traduit par une augmentation de la fréquence fondamentale du spectre, d'où l'atténuation encore plus prononcée des hautes fréquences. L'augmentation du diamètre à  $12\Delta x$  produit bien l'effet inverse, tel qu'on peut le constater à la figure 4.8.

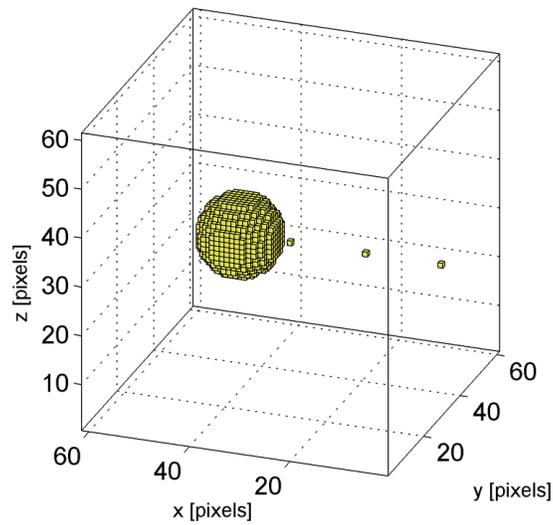


Figure 4.5 Simulation d'une source acoustique sphérique.

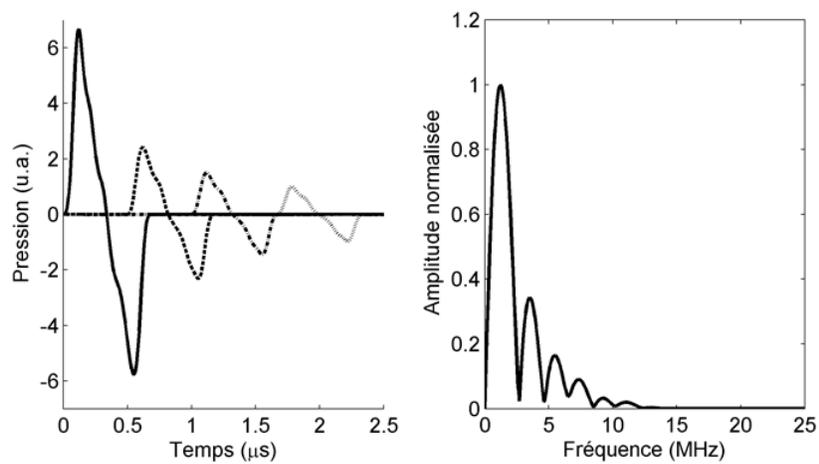


Figure 4.6 Profils de pression pour une source acoustique sphérique de  $8\Delta x$  de rayon. Gauche : Profils temporels pour des points d'observation situés à un rayon  $R_S$  égal à (de gauche à droite)  $10\Delta x$ ,  $25\Delta x$ ,  $40\Delta x$  et  $60\Delta x$ . Droite : Spectre fréquentiel pour  $R_S = 25\Delta x$ .

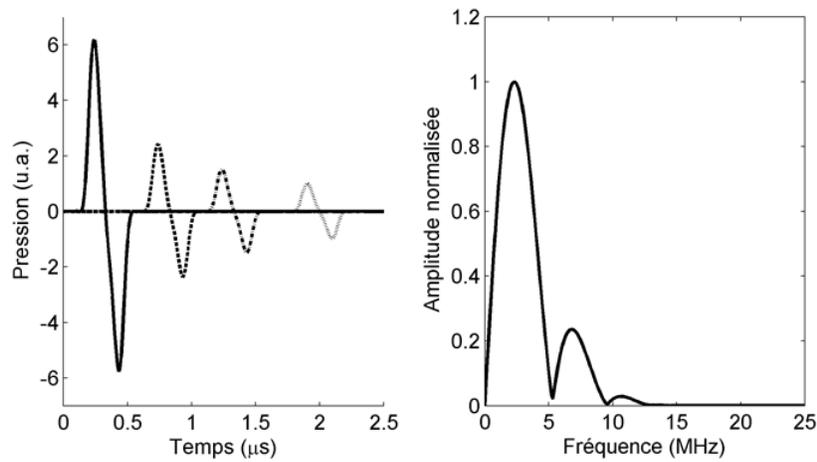


Figure 4.7 Profils de pression pour une source acoustique sphérique de  $4\Delta x$  de rayon. Gauche : Profils temporels pour les rayons  $R_S$  du point d'observation (de gauche à droite) à  $10\Delta x$ ,  $25\Delta x$ ,  $40\Delta x$  et  $60\Delta x$ . Droite : Spectre fréquentiel pour  $R_S = 25\Delta x$ .

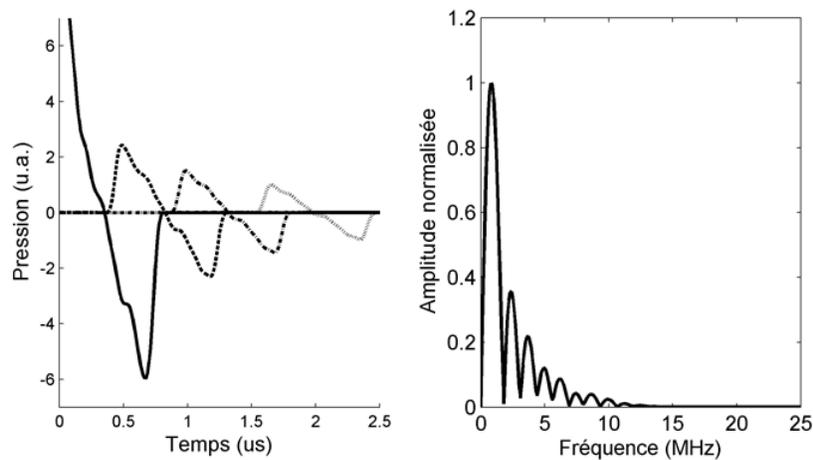


Figure 4.8 Profils de pression pour une source acoustique sphérique de  $12\Delta x$  de rayon. Gauche : Profils temporels pour les rayons  $R_S$  du point d'observation (de gauche à droite) à  $10\Delta x$ ,  $25\Delta x$ ,  $40\Delta x$  et  $60\Delta x$ . Droite : Spectre fréquentiel pour  $R_S = 25\Delta x$ .

L'effet de l'augmentation de l'exposant  $y$  pour l'atténuation acoustique peut être visualisé aux figures 4.9 et 4.10, où sont également montrés les spectres de la simulation sans atténuation à rayon égal. La figure 4.9 montre le cas où  $y = 1,5$  et  $\alpha_0 = 0,75$ , soit une atténuation réaliste des tissus mous (Duck, 1990). Pour les faibles distances considérées dans la simulation, l'amplitude de chaque signal de pression présente une différence de l'ordre de 1% avec le profil simulé sans atténuation. La figure 4.10 montre le cas d'une atténuation  $\alpha = 2$  dB/(cm · MHz<sup>1,5</sup>). Une différence d'amplitude est observable sur les profils temporels par rapport aux précédents, et celle-ci peut être attribuée à l'atténuation des hautes fréquences grâce à la comparaison des spectres. Toutefois, cette atténuation acoustique demeure relativement faible pour la gamme de fréquences considérées. Les simulations suivantes ont toutes été effectuées avec  $\alpha = 0,75$  dB/(cm · MHz<sup>1,5</sup>).

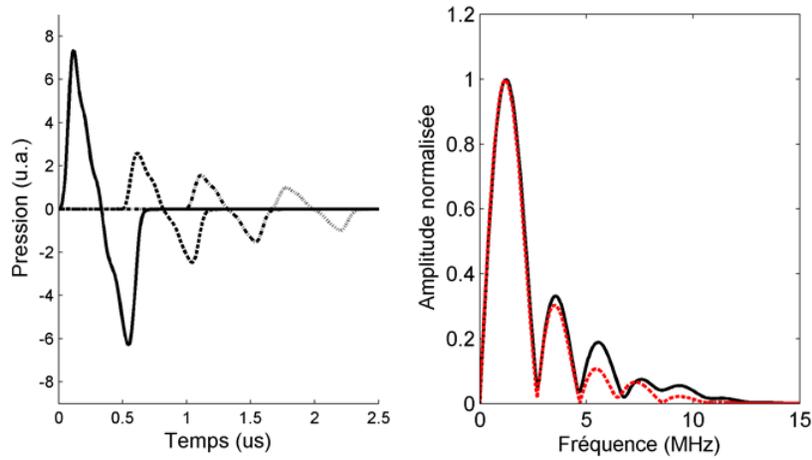


Figure 4.9 Profils de pression pour une source acoustique sphérique de  $8\Delta x$  de rayon et une atténuation acoustique de  $0,75$  dB/(cm · MHz<sup>1,5</sup>). Gauche : Profils temporels pour les rayons  $R_S$  du point d'observation (de gauche à droite) à  $10\Delta x$ ,  $25\Delta x$ ,  $40\Delta x$  et  $60\Delta x$ . Droite : Spectre fréquentiel pour  $R_S = 25\Delta x$  où l'atténuation est fixée à [Courbe noire]  $\alpha = 0$  dB/(cm · MHz<sup>1,5</sup>) et [Courbe rouge]  $\alpha = 0,75$  dB/(cm · MHz<sup>1,5</sup>).

#### 4.2.1 Limitation de la bande passante

Jusqu'à présent, le transducteur a été considéré comme idéal et sa sortie reflète exactement la pression mesurée. Toutefois, en réalité le signal électrique  $u(t)$  en sortie du transducteur est donné par le produit de convolution

$$u(t) = p(t) * h(t) + n(t) \quad (4.3)$$

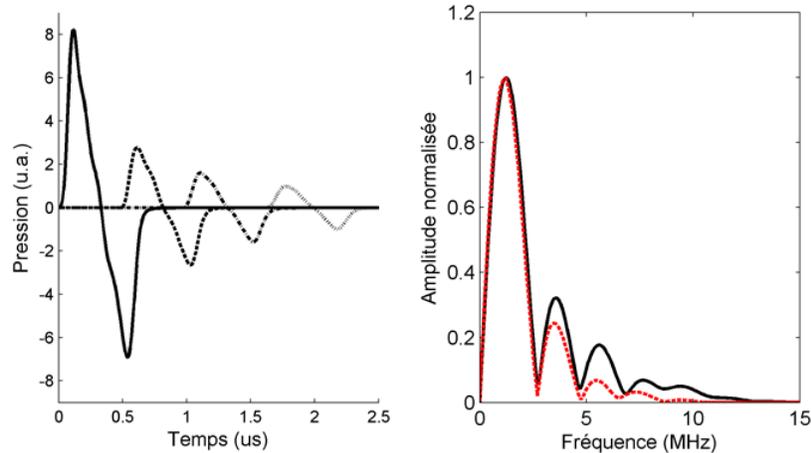


Figure 4.10 Profils de pression pour une source acoustique sphérique de  $8\Delta x$  de rayon et une atténuation acoustique  $\alpha = 2 \text{ dB}/(\text{cm} \cdot \text{MHz}^{1,5})$ . Gauche : Profils temporels pour les rayons  $R_S$  du point d'observation (de gauche à droite) à  $10\Delta x$ ,  $25\Delta x$ ,  $40\Delta x$  et  $60\Delta x$ . Droite : Spectre fréquentiel pour  $R_S = 25\Delta x$  où l'atténuation est fixée à [Courbe noire]  $\alpha = 0 \text{ dB}/(\text{cm} \cdot \text{MHz}^{1,5})$  et [Courbe rouge]  $\alpha = 2,0 \text{ dB}/(\text{cm} \cdot \text{MHz}^{1,5})$ .

où  $p(t)$  est le signal de pression incident sur le transducteur,  $h(t)$  est la réponse impulsionnelle de celui-ci et  $n(t)$  représente l'apport du bruit. En pratique, l'étroitesse de la bande passante des transducteurs est un important facteur expérimental. La simulation du filtrage des signaux de pression par la réponse fréquentielle de transducteurs a donc été effectuée. La figure 4.11 montre le résultat de la convolution d'une des ondelettes de pression précédentes, principalement centrée sur 2,5 MHz, avec deux filtres passe-bande ayant  $Q = 80\%$  centrés à 1 et 5 MHz. Les signaux résultants sont grandement distordus, particulièrement avec le filtre de 1 MHz où une plus grande part de l'énergie est perdue. Les signaux filtrés présentent des oscillations secondaires dans le domaine temporel, conséquences de l'aplatissement dans le domaine spectral. L'uniformité de la distribution initiale de pression à l'intérieur de la structure absorbante a également un impact sur la forme des signaux de pression émis. Même si l'on considère que les paramètres optiques sont homogènes pour toute une structure, l'absorption préférentielle en surface due à une plus grande fluence peut suffire à produire des effets mesurables. Par exemple, la figure 4.12 montre les résultats de simulation où la pression initiale est un gradient, ce qui peut modéliser adéquatement l'absorption progressive de la lumière lors de son passage à travers un vaisseau ou un tube. La forme générale des profils observés est semblable au profil analytique de la figure 3.5-(c), bien que des différences soient très visibles. Dans le cas expérimental, il faut donc s'attendre à ce que des structures optiquement très absorbantes influencent grandement la distribution initiale de pression à l'intérieur de la structure via le profil de fluence. La figure 4.14 montre les résultats d'autres

combinaisons entre la taille de la source, le type de source et la fréquence centrale du filtre passe-bande. En particulier, s'il était étendu dans une dimension le profil du haut résulterait en une image PA bidimensionnelle où le contraste serait surtout généré aux contours de l'objet. Ces résultats témoignent de la très grande variété des profils temporels qu'il est possible d'obtenir suite à la limitation de la bande passante.

#### 4.2.2 Vitesse du son

Aussi, tous les milieux ont été considérés comme étant homogènes par rapport à la vitesse du son. Cependant, on sait que la valeur de ce paramètre varie selon le tissu biologique. Dans le cas des fantômes d'imagerie moléculaire, souvent constitués de tubes de polymères remplis d'une solution contenant l'agent de contraste, il est raisonnable de considérer que le tube puisse affecter le signal transmis. Ainsi, la figure 4.13 montre les profils de pression d'une source constituée d'une sphère et d'une coquille extérieure. Par ailleurs, l'absorption est tout de même considérée homogène pour l'ensemble de la source. Une variation significative de la vitesse du son (cas (a) : +53 %, et (d) : -33 %) entraînent une distortion apparente du profil de pression, tandis que des variations plus faibles (cas (b) et (c), +7 % et +20 % respectivement) causent une distortion plus subtile mais tout de même perceptible visuellement.

### 4.3 Conclusion

Ce chapitre avait pour objectif d'étudier diverses conditions susceptibles de survenir expérimentalement afin de les reconnaître à partir des mesures. La simulation des profils de pression a notamment permis de constater que les signaux photoacoustiques peuvent posséder une grande largeur de bande si l'objet imagé contient des structures de tailles variables. La limitation de la bande passante des transducteurs peut donc créer une perte considérable d'énergie transmise, et par conséquent un déficit d'information sur la source. Les inhomogénéités au niveau de la vitesse du son autour de la source photoacoustique peuvent également créer des distortions apparentes. Enfin, pour un volume simulant une application vasculaire, la dépendance spectrale du coefficient d'absorption pour des tissus diffusants entraîne une variation marquée de la fluence incidente sur les structures plus profondes.

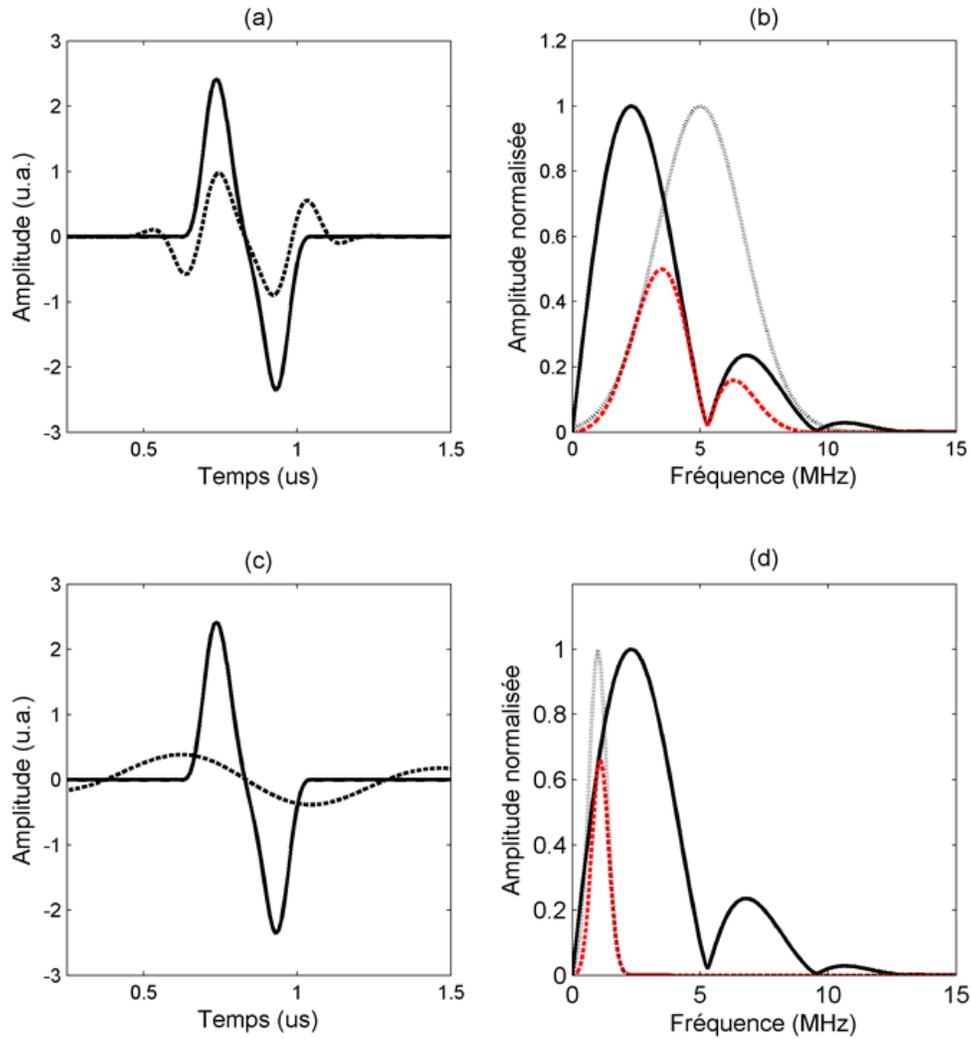


Figure 4.11 Effets de la réponse impulsionnelle du transducteur sur les profils de pression. La source est sphérique et homogène de  $4\Delta x$  de rayon. (a) et (c) : [Courbe pleine] Profil temporel de la pression mesurée à  $R_S = 25\Delta x$ , [Courbe tiretée] Profil de la pression après filtrage avec un filtre gaussien avec  $Q = 80\%$  et centré à (a) 1 MHz ou (c) 5 MHz. (b) et (d) : [Courbe noire pleine] Spectre du signal de pression simulé, [Courbe noire tiretée] Réponse fréquentielle du filtre, [Courbe rouge pointillée] Spectre du signal après filtrage.

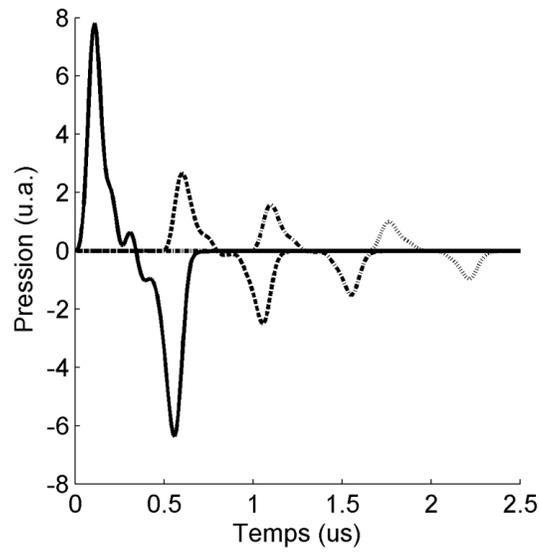


Figure 4.12 Profils de pression pour une source sphérique avec un gradient de pression. Le gradient de pression initiale était uniforme pour les valeurs de rayons variant entre 0 et  $9\Delta x$ , soit la taille de la source.

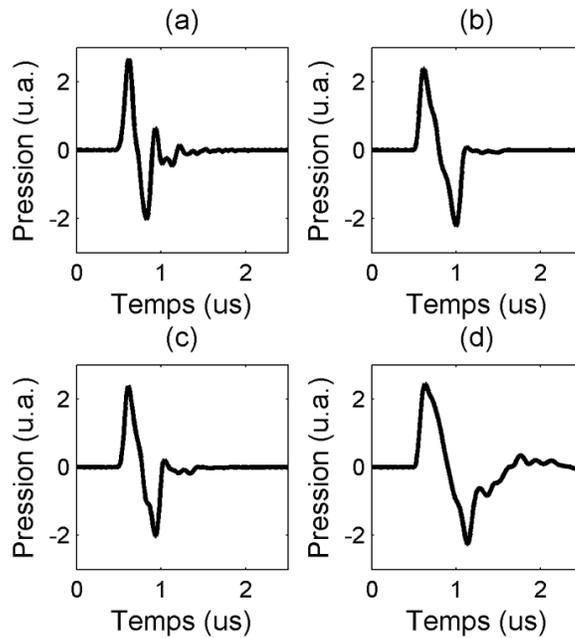


Figure 4.13 Profils de pression pour une source sphérique avec une coquille. La source est constituée d'une sphère intérieure ( $0 \leq r < 5\Delta x$ ) où  $c_L = 1500$  m/s et d'une coquille extérieure ( $5\Delta x \leq r \leq 8\Delta x$ ) avec (a)  $c_L = 2300$  m/s, (b)  $c_L = 1600$  m/s, (c)  $c_L = 1800$  m/s et (d)  $c_L = 1000$  m/s.

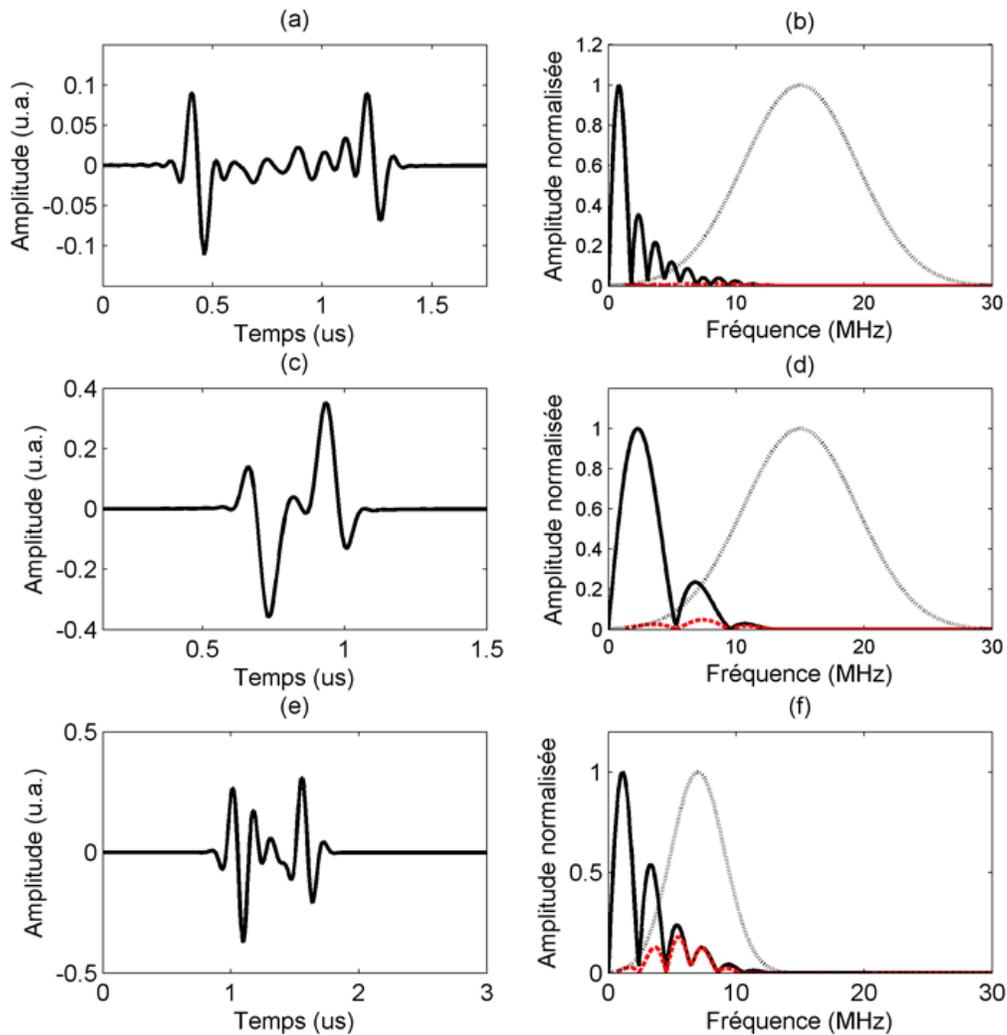


Figure 4.14 Profils de pression après filtrage passe-bande. Gauche : Profils temporels de la pression mesurée à  $R_S = 25\Delta x$ , après filtrage avec un filtre gaussien avec  $Q = 80\%$ . (a) Source sphérique et homogène de  $12\Delta x$  de rayon, filtre centré à 15 MHz. (b) Source sphérique et homogène de  $4\Delta x$  de rayon, filtre centré à 15 MHz. (c) Source sphérique de  $9\Delta x$  de rayon avec un gradient de pression, filtre centré à 8 MHz. Droite [(b) et (d) et (f)] : Spectres associés respectivement à (a), (c) et (e). [Courbe noire pleine] Spectre du signal de pression simulé, [Courbe noire tiretée] Réponse fréquentielle du filtre, [Courbe rouge pointillée] Spectre du signal après filtrage.

## CHAPITRE 5

### CONCEPTION ET DÉVELOPPEMENT DE L'INSTRUMENTATION

L'un des principaux objectifs de ce projet est de concevoir un système d'imagerie photoacoustique pour le petit animal. L'appareil conçu devra permettre d'obtenir un contraste endogène pour l'imagerie *in vivo* d'artères chez la souris, par exemple. Par ailleurs, il devra également fournir un contraste échographique afin de valider l'emplacement de la région d'intérêt.

La première section de ce chapitre consiste en une revue des principaux systèmes d'imagerie photoacoustique existants. Les contraintes liées aux dispositifs de détection et d'illumination seront notamment présentées. L'approche retenue, basée sur l'utilisation d'un transducteur monoélément commercial balayé mécaniquement, sera ensuite décrite par type de composantes.

#### 5.1 Revue de littérature

Les applications de l'effet photoacoustique sont variées. L'effet PA est le plus couramment utilisé pour l'analyse spectroscopique et calorimétrique de surfaces de solides et de traces gazeuses (Rothberg *et al.*, 1983). Dans le contexte de l'imagerie médicale, les premiers montages sont apparus au début des années 1990 et utilisaient des lampes flash au néon avec des impulsions lumineuses de l'ordre de la microseconde (Oraevsky *et al.*, 1994; Kruger *et al.*, 1995). Le remplacement de ces lampes par des lasers à impulsion de l'ordre de la nanoseconde a grandement simplifié la reconstruction d'image.

Au niveau des applications actuelles de la photoacoustique, les appareils de microscopie fonctionnelle demeurent les plus répandus, avec une résolution spatiale maximale de l'ordre de quelques  $\mu\text{m}$  (Ku *et al.*, 2010). La microscopie PA a entre autres été appliquée à l'imagerie de la microcirculation (Zhang *et al.*, 2006; Zemp *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2009), de cellules (Tan *et al.*, 2011) et de mélanomes (Oh *et al.*, 2006). Dans le contexte des appareils dédiés aux études chez le petit animal, les montages macroscopiques ont quant à eux été notamment utilisés pour l'imagerie fonctionnelle des vaisseaux abdominaux (Brecht *et al.*, 2009; Buehler *et al.*, 2010) et pour l'imagerie moléculaire (voir chapitre 7).

En tomographie photoacoustique, deux éléments principaux sont au coeur de la production et de la mesure du signal : le transducteur ultrasonore et le dispositif d'illumination. Un transducteur est notamment caractérisé par une fréquence centrale, une bande passante

et un champ acoustique propres. L'illumination, quant à elle, dépend d'un grand nombre de paramètres comme la puissance, la longueur d'onde, l'angle de pénétration, la distribution spatiale de l'intensité du faisceau et la fréquence de répétition. Le défi de l'imagerie photoacoustique consiste à agencer l'un avec l'autre afin d'optimiser le signal généré et mesuré, pour une application donnée.

### 5.1.1 Détection ultrasonore

La mesure des ondes de pression acoustique peut se faire par le biais de transducteurs électroacoustiques (p. ex. détecteur résonant piézoélectrique) ou par interférométrie. Des montages PA utilisant un interféromètre de Fabry-Perot (FP) ont été rapportés par Zhang *et al.* (2008) ou Grun *et al.* (2010), et une application *in vivo* par Laufer *et al.* (2012). Le choix de l'une ou l'autre stratégie doit être fait selon la profondeur d'imagerie désirée, le temps d'acquisition acceptable et la simplicité du montage. Pour des profondeurs de l'ordre du cm, la transparence qu'offre les senseurs FP est une caractéristique moins importante que pour les applications superficielles et le choix du détecteur est dominé par les performances acoustiques. En effet, il existe une relation critique entre la sensibilité du détecteur et la taille de l'élément de détection. Avec un transducteur piézoélectrique, la sensibilité décroît avec la taille de l'élément, tandis que les deux sont largement indépendantes pour un capteur FP. Le seuil au-dessus duquel les capteurs piézoélectriques ont une plus grande sensibilité est d'environ 1 mm (Zhang *et al.*, 2008). Par ailleurs, la bande passante des détecteurs FP peut s'étendre au-delà de 20 MHz (Laufer *et al.*, 2012). Cependant, ils ne permettent pas l'échographie et nécessitent la microfabrication sur mesure de l'élément de détection.

L'utilisation d'un transducteur piézoélectrique est actuellement la méthode la plus commune en PA, car elle permet l'utilisation de transducteurs commerciaux ainsi que l'échographie. Il existe deux formes majeures d'implémentation, soit par un transducteur mono-élément focalisé et balayé mécaniquement, ou alors une matrice d'éléments non focalisés en combinaison avec un algorithme de reconstruction (Shung, 2006). Dans le cas de l'utilisation d'un transducteur monoélément focalisé avec une petite ouverture numérique, les décours temporels peuvent être considérés comme des signaux de profondeur 1D (*balayage A*) des sources PA, où chaque ligne est alors considérée comme indépendante acoustiquement des autres (Briggs et Kolosov, 2009). La reconstruction de l'image consiste donc essentiellement à concaténer les lignes (voir figure 5.1). La région d'intérêt pour l'imagerie doit être positionnée le plus près possible de la zone focale du transducteur, qui est spécifiée par son fabricant.

Les systèmes les plus simples effectuent l'enregistrement du signal provenant d'un transducteur sur un oscilloscope numérique, en insérant possiblement un amplificateur commercial dans le chaîne d'acquisition (Wu *et al.*, 2012). Si cette stratégie permet d'obtenir rapidement

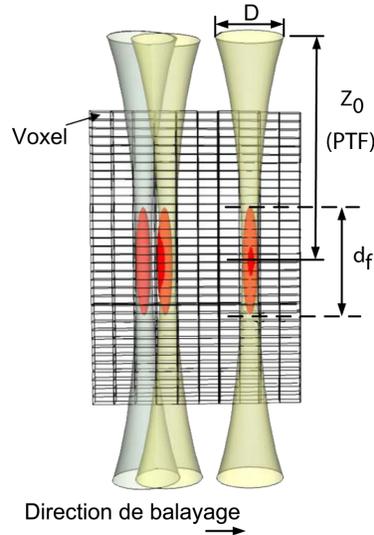


Figure 5.1 Reconstruction de l'image par concaténation des mesures du champ acoustique. ( $z_0$  : Distance focale, PTF : Point cible (*Point Target Focus*),  $d_f$  : longueur de la zone focale). Adapté de Zerouali Boukhal (2011).

des mesures expérimentales, elle ne permet pas l'enregistrement simultané du mode échographique ou un balayage contrôlé du transducteur. La plupart des montages de microscopie PA utilisent une carte d'acquisition faite sur mesure et une plate-forme micrométrique motorisée. Cependant, les balayages point à point prennent typiquement de 9 à 30 minutes pour produire une image rectangulaire de  $100 \text{ mm}^2$  (Zerda *et al.*, 2008; Laufer *et al.*, 2012). Les montages macroscopiques basés sur un transducteur à simple élément utilisent un actuateur pour déplacer rapidement ce dernier (Harrison *et al.*, 2009), à l'instar d'une génération de biomicroscopes échographiques (Foster *et al.*, 2000). Ces appareils, dits de *mode B statique*, ont un champ de vision d'environ 10 mm, avec un espacement de ligne typique de  $8\text{-}10 \mu\text{m}$ , pour atteindre un taux d'acquisition de 5-10 images/s.

Il est également possible d'utiliser certains appareils échographiques commerciaux à transducteurs matriciels pour la mesure du signal photoacoustique moyennant certaines modifications dans la séquence d'acquisition (Yin *et al.*, 2004; Guo et Yang, 2009). La fréquence centrale maximale actuelle est de 20 à 30 MHz (Zemp *et al.*, 2008), et ce, à cause de la faible sensibilité des éléments de détection de plus faible taille. De toute manière, en raison de l'atténuation des hautes fréquences acoustiques par les tissus, un compromis doit être trouvé entre la profondeur du champ de vue de l'image et la résolution spatiale du système. Ainsi, la profondeur de pénétration atteignable est de 1-2,5 cm à 15 MHz, mais est inférieure à 8 mm à 40 MHz (Foster *et al.*, 2000), et limitée à 4-5 mm à 50 MHz.

La conception des transducteurs se fait surtout de manière empirique par essais et erreurs

(Shung *et al.*, 1992). Les manufacturiers considèrent leur expertise en conception et fabrication de transducteurs comme un secret de commerce. Outre les éléments piézoélectriques comme tels, le bloc amortisseur des transducteurs influence le niveau de suroscillation pour des applications en mode écho d'impulsion, ce qui allonge la durée des impulsions et détériore la résolution spatiale. Le principal désavantage des détecteurs résonants est la restriction de la bande passante qui produit un effet de filtrage. On caractérise notamment un transducteur par sa fréquence centrale  $f_0$  et sa bande passante  $\Delta f$ . Ainsi, chaque détecteur possède un facteur de qualité  $Q = f_0/\Delta f$ . Le transducteur idéal pour des applications en imagerie photoacoustique aurait une large plage dynamique et une large réponse fréquentielle (p. ex. une bande plate de 0 à 25 MHz). Cependant, les transducteurs à la fine pointe de la technologie atteignent une largeur de bande d'environ 70-80% (Shung *et al.*, 1992) tout en gardant une bonne sensibilité par une adaptation d'impédance à l'avant et un amortissement adéquat à l'arrière. La performance d'un imageur ultrasonore est intimement liée à celle de son transducteur, aussi ces derniers ont souvent été le goulot d'étranglement limitant la résolution des systèmes.

### 5.1.2 Illumination

La stratégie d'illumination est cruciale et découle généralement du choix du transducteur à cause des contraintes géométriques du montage. Harrison *et al.* (2009) ont utilisé un transducteur focalisé central avec une illumination annulaire pour une application microscopique, tandis que Kolkman *et al.* (2003) ont plutôt opté pour un transducteur annulaire. Brecht *et al.* (2009) et Buehler *et al.* (2010) ont réalisé l'illumination avec un ensemble de fibres optiques couvrant un diamètre complet de l'animal, et en mesurant le signal PA avec un transducteur hémisphérique, alors que Agarwal *et al.* (2007) ont utilisé une fibre optique individuelle. Niederhauser *et al.* (2005) ont dirigé le faisceau du laser directement sur la cible via un système de miroirs, une approche qui a également été retenue par Laufer *et al.* (2012), lesquels utilisent un interféromètre FP. Dans ce dernier cas, la fenêtre de détection est transparente pour le laser destiné à l'effet PA, ce qui permet une illumination large et directe.

Selon la zone d'intérêt, le signal PA peut ou non être détectable de n'importe quel côté de l'animal. Lorsque le transducteur est situé du même côté que la source, on parle du mode de réflexion, alors que la détection du côté opposé est appelé le mode de transmission. Par exemple, la présence des poumons limite l'imagerie de l'arche aortique au mode réflexif (Taruttis *et al.*, 2010). Aussi, la durée d'une impulsion lumineuse doit évidemment respecter les contraintes définies à la section 3.4.1. La bande spectrale doit être choisie judicieusement, sachant que l'absorption préférentielle aux longueurs d'onde inférieures de la fenêtre proche infrarouge peut limiter la profondeur du champ de l'imagerie.

Enfin, mais non le moindre, l'obtention d'ondes PA de grande amplitude nécessite une grande fluence sur l'aire cible. La norme ANSI stipule que, chez l'humain, une impulsion lumineuse dans le partie visible du spectre doit être limitée à une fluence de  $20 \text{ mJ/cm}^2$  sur la surface de la peau (American National Standards Institute, 1993). De plus, si un point sur la peau est exposé pour une durée supérieure à 10 s, l'intensité lumineuse doit être limitée à  $200 \text{ mW/cm}^2$ . Ces valeurs se situent au moins un ordre de grandeur sous les seuils de dommage et sont généralement respectées pour les expériences animales non invasives.

Étant donné ces contraintes, le choix pour le design développé dans cette thèse s'est tourné vers l'utilisation d'un transducteur monoélément focalisé sphériquement ainsi que d'une fibre optique individuelle. Les avantages de cette approche incluent la disponibilité de transducteurs commerciaux dans une large plage de fréquences et la possibilité d'ajuster précisément l'angle d'illumination.

## 5.2 Système d'acquisition développé

Cette section décrit le système photoacoustique conçu pour ce projet, soit un appareil utilisant un transducteur monoélément focalisé sphériquement avec une illumination laser ponctuelle. La figure 5.2 montre une représentation schématique du flux d'information à travers les composantes du système. L'ordre de ce flux sera suivi pour la présentation des composantes du système, soit le montage comme tel, le logiciel d'acquisition et le logiciel de reconstruction.

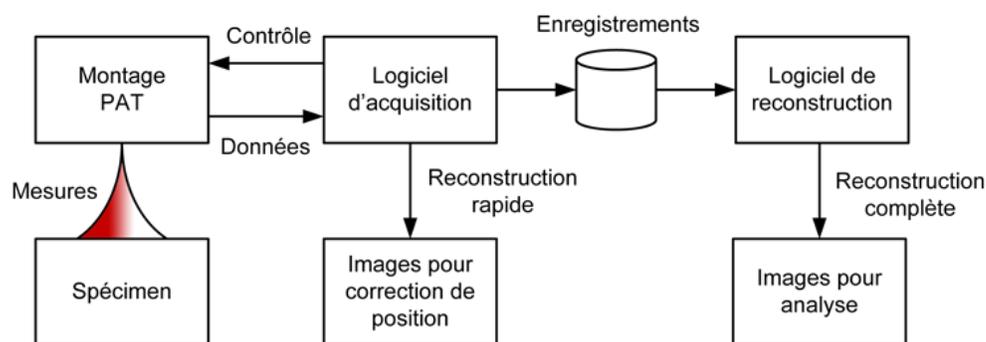


Figure 5.2 Schéma du flux d'information du système PAT.

### 5.2.1 Description générale du montage

La figure 5.3 présente l'architecture générale du système d'image photoacoustique réalisé. Sommairement, le montage peut être divisé en quatre principaux sous-blocs : optique,

mécanique, électronique et logiciel, qui constituent les sections suivantes. Le principe de fonctionnement est le suivant. Le faisceau laser pulsé quasi-monochromatique est d'abord focalisé puis couplé dans une fibre optique. Celle-ci délivre alors la puissance lumineuse dans la région d'intérêt située sous le transducteur ultrasonore. Le transducteur se meut le long de cette région par l'entremise d'une bobine mobile contrôlée par un automate programmable. Le signal électrique analogique provenant du transducteur est envoyé vers une carte électronique d'acquisition faite sur mesure, ainsi que le signal de synchronisation du laser et la position du transducteur envoyée par l'automate. Le signal RF est alors amplifié, converti en signal numérique et envoyé vers un poste de travail via un port de communication USB pour traitement, affichage immédiat et enregistrement. Une séquence d'acquisition en mode écho d'impulsion est interlacée entre chaque impulsion laser afin de produire un contraste échographique. La position du spécimen peut alors être corrigée avant d'entreprendre tout protocole d'imagerie subséquent.

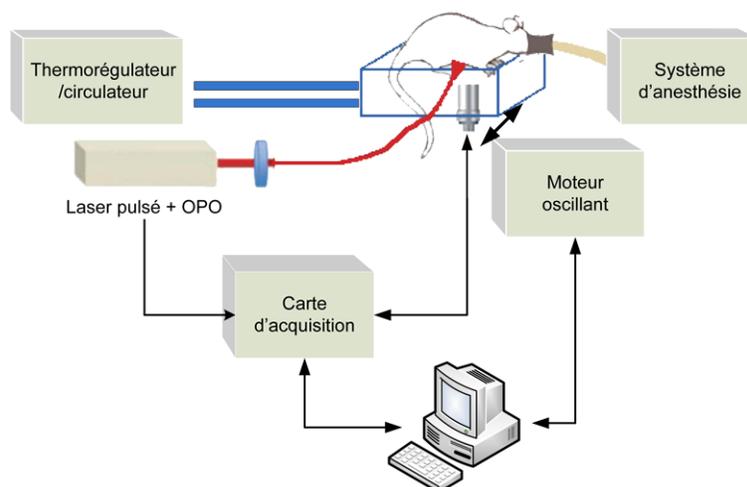


Figure 5.3 Schéma du système d'acquisition photoacoustique

## 5.2.2 Optique

La source d'illumination utilisée est un laser pulsé de classe IV Nd:YAG *Quanta Ray INDI Series* (Spectra Physics, Santa Clara, CA). Celui-ci fournit jusqu'à 2,4 W de puissance à un tripleur de fréquence pour obtenir 355 nm en sortie, avec un taux de répétition de 20 Hz. Le faisceau passe alors à travers le cristal bi-réfringent d'un oscillateur paramétrique optique (OPO) *basiScan* (GWU-Lasertechnik, Erftstadt, Allemagne) qui permet d'ajuster manuellement la longueur d'onde d'illumination. La lumière ultraviolette est convertie en

deux signaux de longueurs d'ondes plus élevées, dits *Signal* et *Idler*, liés par la relation

$$\frac{1}{\lambda_p} = \frac{1}{\lambda_s} + \frac{1}{\lambda_i} \quad (5.1)$$

où  $\lambda_p$ ,  $\lambda_s$  et  $\lambda_i$  sont les longueurs d'onde d'entrée, et des sorties *Signal* et *Idler* respectivement. La durée d'une impulsion est d'environ 7 ns, et la plage des longueurs d'onde utilisables couvre le spectre visible et proche infrarouge. L'énergie disponible à la sortie de l'OPO et partagée par les deux signaux est d'environ 25-35 mJ par impulsion, et varie selon la longueur d'onde. Le déclenchement du commutateur-Q du laser s'accompagne de l'envoi d'un front montant sur un canal électrique de sortie, ce qui permet la synchronisation de l'enregistrement sur la carte d'acquisition.

À la sortie de l'OPO, une partie des rayons peut être envoyée vers un puissance-mètre à l'aide d'un diviseur de faisceau. L'énergie de chaque impulsion peut donc être mesurée et envoyée à l'ordinateur pour enregistrement, moyennant une perte de puissance. Le faisceau principal est dirigé sur une lentille convergente puis dans un collimateur standard (Thorlabs, NJ). La lumière collimée passe ensuite dans une fibre optique multimode de 1035  $\mu\text{m}$  de coeur (BHF37-1000, Thorlabs, NJ) pour être dirigée au-dessus de la région d'intérêt sur le spécimen. Le transducteur et le connecteur de la fibre sont solidairement attachés, tel que montré à la figure 5.4, de manière à fournir une puissance uniforme pour tout le volume imagé, autant que possible. Aussi, l'angle du faisceau incident doit être ajusté de manière à ce que le centre du faisceau diffusant dans le tissu intersecte la zone focale du transducteur.

### 5.2.3 Acoustique

Les transducteurs retenus sont deux transducteurs monoéléments à immersion focalisés sphériquement ayant des fréquences centrales de 10 MHz (V312, Panametrics inc., Angleterre) et 15 MHz (V319, Panametrics inc.). Les distances d'écho maximal d'un point cible (PTF) sont respectivement de 12 mm et 19 mm, ce qui *a priori* permet un espacement suffisant pour le passage du faisceau lumineux, en considérant une cible située à quelques millimètres sous la surface du milieu à imager. La résolution d'une image ultrasonore est déterminée par la distribution du faisceau (direction latérale) et la bande passante (direction axiale). Des expressions simples pour la résolution latérale  $\delta_{lat}$  et la résolution axiale  $\delta_{ax}$  sont données pour une source sphérique au foyer d'un transducteur (Passmann et Ermert, 1996) :

$$\delta_{lat} = 1,02c_L \frac{z_0}{Df_c}, \quad (5.2)$$

$$\delta_{ax} = 2c_L \ln 2 \frac{1}{\pi \Delta f}, \quad (5.3)$$

où  $f_c$  est la fréquence centrale,  $D$  est le diamètre,  $z_0$  est la distance focale,  $c_L$  est la vitesse du son et  $\Delta f$  est la bande passante du transducteur. Les valeurs spécifiques aux transducteurs utilisés sont rapportées à la section 6.1.2.

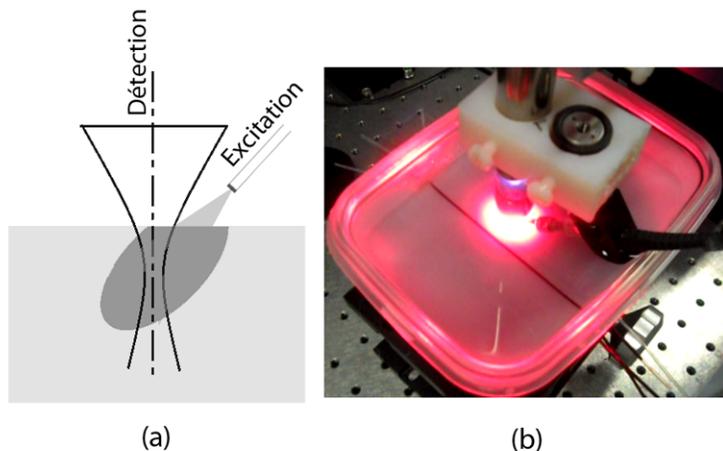


Figure 5.4 (a) Schéma d'illumination du système PAT. (b) Montage en action.

#### 5.2.4 Mécanique

Dans l'axe d'imagerie « rapide », ou du mode B, le transducteur et la fibre sont déplacées sur une distance de 10 mm par un moteur oscillant VCS05 (H2W Technologies Inc., CA). La bobine mobile est contrôlée par un automate programmable Elmo HAR-5/60 (Elmo Motion Control Ltd., IL) et la lecture de position est effectuée par un encodeur magnétique linéique LM10 (RLS d.o.o., SI) de 1  $\mu\text{m}$  de résolution. Le logiciel préprogrammé sur l'automate dans un langage propriétaire à celui-ci a pu être modifié pour inclure des séquences désirées pour l'imagerie. Ainsi, un mode d'oscillation échographique à 1 Hz a été créé, ainsi qu'un mode d'oscillation plus lent pour réaliser les acquisitions PA. Un mode point par point permettant de demeurer à une position fixe pendant une durée prédéterminée a également été programmé. La figure 5.5 montre les profils de déplacement du transducteur relevés pour les deux types d'acquisition principaux. Deux signaux numériques en quadrature de phase sont envoyés par l'encodeur magnétique pour indiquer l'incrément du mouvement et sa direction. En parallèle, ces signaux sont envoyés à la carte électronique d'acquisition afin de connaître la position des mesures. Aussi, un moteur linéaire (Zaber inc., Vancouver) permet le déplacement du dispositif précédent dans un axe supplémentaire afin de permettre l'imagerie tridimensionnelle.

Le pas du moteur peut être réduit jusqu'à  $100\ \mu\text{m}$ , dépendamment de l'espacement latéral désiré.

Bien que le transducteur soit constamment en mouvement, la durée typique du trajet aller-retour d'une onde ultrasonore est de loin inférieure au temps de déplacement latéral du transducteur, c'est pourquoi tout effet Doppler est négligé.

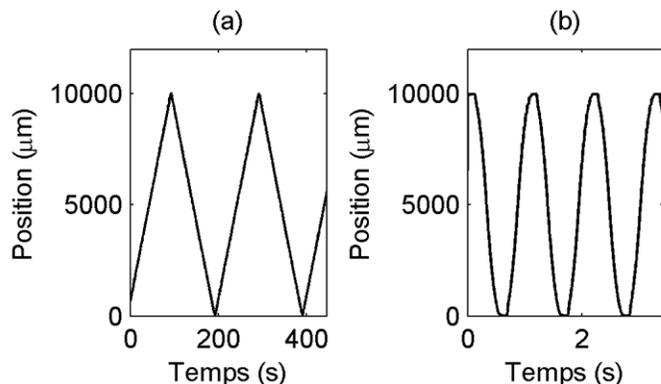


Figure 5.5 Profil de déplacement du transducteur dans une tranche en mode (a) photoacoustique et (b) échographique.

### 5.2.5 Carte électronique d'acquisition

La figure 5.6 montre un schéma fonctionnel des principales composantes du module d'acquisition que nous avons conçu et développé pour cette thèse. Physiquement, celui-ci est en fait constitué de deux cartes de circuit imprimé (PCB), soit une carte de transfert USB générique conçue au laboratoire et une carte réalisée spécifiquement pour ce projet (voir figure 5.7). Le PCB d'acquisition est composé de quatre couches comportant signaux ou plans d'alimentation et de masse. Il comprend entre autres des régulateurs de tension, les composantes d'amplification, de conversion analogique-numérique et un générateur d'impulsion bipolaire.

Au coeur du circuit, une puce à matrice prédiffusée programmable par l'utilisateur (FPGA) supporte la machine à état qui gère les entrées/sorties et synchronise les composantes du système. Les données brutes de l'acquisition transitent également par le FPGA. Un microcontrôleur ( $\mu\text{C}$ ) de la famille FX2 (CY7C68013A, Cypress Semiconductor Corp., CA) est en charge de l'interface de communication USB 2.0. Le  $\mu\text{C}$  possède une mémoire vive (*Random Access Memory* ou RAM) de 8 ko pour stocker un microprogramme ou des données. Il comprend également une mémoire de type premier entré premier sorti (*First In First Out* ou FIFO) de 4 ko utilisée pour transférer les données vers l'interface USB. Pour ce faire, le  $\mu\text{C}$  est connecté au FPGA via un bus FIFO bidirectionnel à 16 bits opérant à 48 MHz. Le code en langage C du  $\mu\text{C}$  reprend essentiellement le code du projet *FPGA4U* (EPFL,

2007), qui comprend les fonctions nécessaires aux transferts USB ainsi que la configuration des points de terminaison (*Endpoints*) USB. Le microcontrôleur permet aussi à l'ordinateur de reprogrammer la mémoire flash du FPGA en mode JTAG (*Joint Test Action Group*) en utilisant la même connexion USB.

Lors de la mise sous tension du module, le code du  $\mu\text{C}$  est téléchargé sériellement dans la RAM à partir d'une mémoire morte (*Read-Only Memory* ou ROM) *I<sup>2</sup>C*. Après avoir effectué sa routine d'initialisation, le  $\mu\text{C}$  se met en mode de transfert et devient essentiellement une passerelle FIFO, laissant le contrôle au micrologiciel du FPGA. Dans un premier temps, le FPGA se met d'abord en écoute des signaux de position de l'automate programmable. Lorsque l'utilisateur démarre une acquisition, les paramètres de celle-ci sont envoyés par l'ordinateur et stockés par le FPGA, et les états d'acquisition peuvent alors s'enchaîner. Le gain de l'amplificateur principal est notamment fixé à l'aide d'un convertisseur numérique-analogique (TLV5619, Texas Instruments, TX). Suite à une impulsion laser, le signal de synchronisation du laser est d'abord convertit en tension avec un opto-isolateur (H11L1, Motorola, IL) puis envoyé au FPGA, qui se place aussitôt en mode d'enregistrement. Le signal du transducteur traverse d'abord un limiteur puis un multiplexeur (ADG658, Analog Devices, MA) avant d'être amplifié. Le nombre de canaux d'entrée a été fixé à 8 pour des fins de prototypage et de flexibilité, bien qu'un seul canal soit utilisé dans le cadre de ce projet. Un amplificateur semi-différentiel à trois étages (AD8332, Texas Instruments) est utilisé pour fournir un gain total de 48 dB sur une largeur de bande de 100 MHz à -3 dB. Un amplificateur complètement différentiel à faible bruit (THS4509, Texas Instruments) permet un gain additionnel de 19 dB. Le couplage entre ces composantes a été réalisé avec les techniques de conception différentielle de manière à maintenir l'intégrité du signal (Karki, 2002). Un convertisseur analogique-numérique de 14 bits (ADS6145, Texas Instruments) cadencé à 125 MHz envoie alors le signal en parallèle au FPGA. Il est commun de fixer le taux d'échantillonnage quatre fois ou plus que la fréquence centrale du transducteur, ce qui permet de respecter le taux de Nyquist<sup>1</sup> tout en ayant une largeur de bande respectable. Une fois le temps d'acquisition photoacoustique écoulé, une période de latence débute, bien que sa durée soit nulle par défaut. Le gain de l'amplificateur est ensuite ajusté pour correspondre à celui du mode échographique. Deux impulsions séparées par un seul cycle d'horloge sont envoyées au générateur d'impulsions formé d'un étage d'attaque (MD1211, Supertex, CA) et d'une paire de transistors MOSFET (TC6320, Supertex) afin de produire l'impulsion ultrasonore bipolaire. Des diodes placées en extenseur permettent de laisser passer ce signal de haute tension tout en bloquant le signal écho de faible amplitude; le limiteur joue le rôle inverse.

---

1. Le taux de Nyquist, associé au théorème de Nyquist-Shannon, correspond à une fréquence d'échantillonnage égale au double de la fréquence maximale contenue dans le signal.

L'isolation électrique est complétée par un transformateur RF de rapport 1:1 (TMO-1-1+, Mini-Circuits, NY).

La carte d'acquisition est alimentée par un bloc de transformation externe fournissant une tension continue de 12V et contient des régulateurs pour fournir des tensions de +5V (78M05, Fairchild semiconductor, CA), -5V (LT1054, Linear Technology, CA) et +3.3V (LF33CDT, STMicroelectronics, CH). Le bloc d'alimentation de +/-50V servant au pulseur bipolaire a été créé sur mesure et placé dans un boîtier distinct pour limiter l'interférence électromagnétique sur le signal d'entrée analogique. Ce circuit est basé sur un régulateur à découpage (LTC1624, Linear Technology) utilisé en mode de conversion à transfert indirect (*flyback*). Enfin, un émetteur-récepteur RS-232 (MAX3237, Maxim, CA) permet également de communiquer avec la platine motorisée Zaber afin d'automatiser l'acquisition dans un axe supplémentaire, le cas échéant.

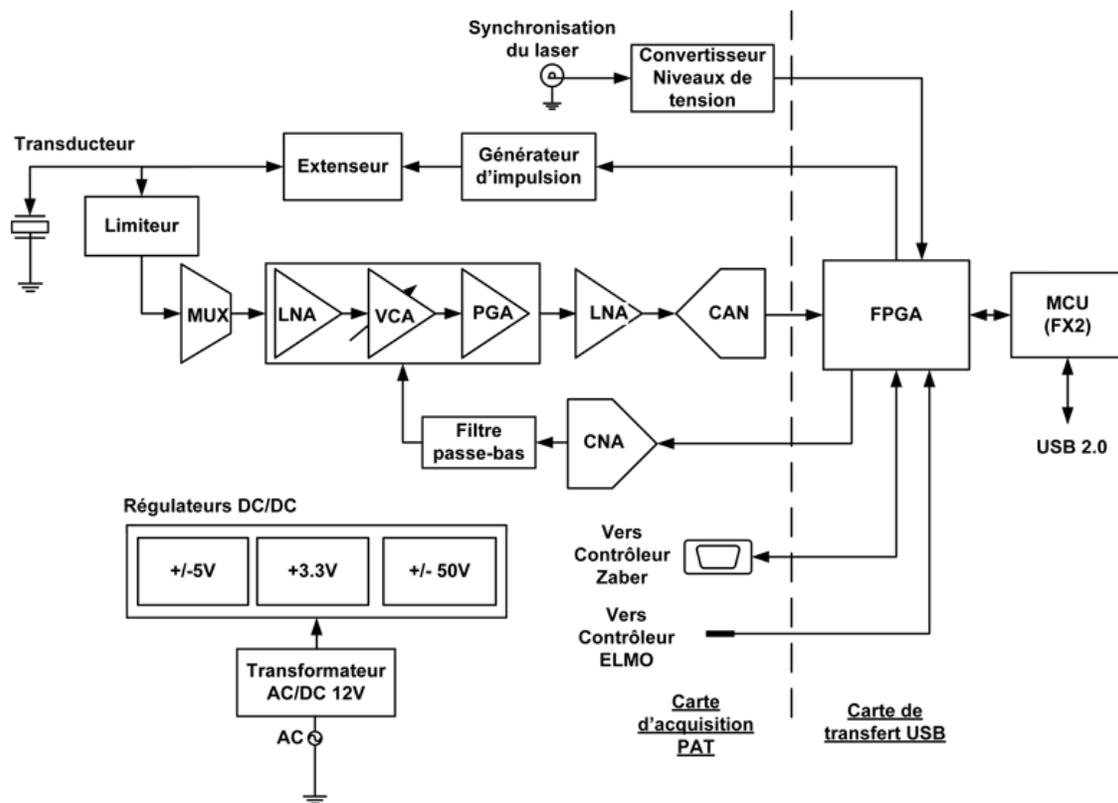


Figure 5.6 Schéma-bloc du module d'acquisition. (Gauche du pointillé) Carte d'amplification, de génération d'impulsion et de numérisation. (Droite du pointillé) Carte de contrôle et de transfert USB.

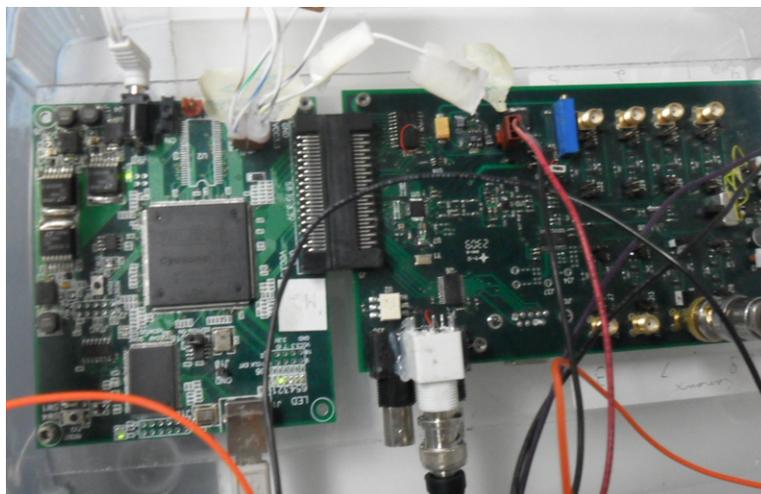


Figure 5.7 Cartes de circuit imprimé du module d'acquisition.

### 5.2.6 FPGA

La machine à états est a été implémentée à l'aide d'un FPGA Cyclone III EP3C16Q240C8 (Altera Corporation, San Jose, CA). L'architecture du FPGA a été réalisée avec le logiciel Quartus II en mode schématique. La configuration résultante a été stockée dans la mémoire flash du FPGA. La figure 5.8 présente un schéma-bloc de l'architecture modulaire du FPGA. Les principales fonctions des modules ainsi que leurs interconnexions sont décrites ci-dessous.

- **encodeur**. Dès la mise en marche de la machine à états, ce module lit les signaux en quadrature de phase provenant du contrôleur du moteur oscillant. Il incrémente ou décrémente un vecteur de position qui décrit le mouvement du transducteur.
- **conversion\_position**. Ce module permet de créer un vecteur de position absolue après quelques cycles d'oscillations du moteur. Il effectue également une conversion de type avant d'envoyer ce vecteur au bloc **acquisition**. La position est aussi envoyée directement sur des ports de sortie du FPGA pour un affichage à palier sur cinq diodes électroluminescentes (DEL). Ainsi, l'utilisateur peut confirmer immédiatement le bon fonctionnement de l'encodeur de position.
- **FIFO\_Interface**. Ce bloc lit les drapeaux indicateurs de la FIFO, qui lui indiquent si les points d'extrémités USB sont vides ou non. Il traite ainsi les requêtes de démarrage et d'arrêt d'acquisition. La requête de démarrage est suivie des différents paramètres d'une acquisition, tels que le mode d'acquisition, soit photoacoustique et échographique (PAUS) ou seulement échographique (US), le nombre d'échantillons par décours temporel, les délais éventuels entre les séquences de pulsation, le canal à multiplexer, les gains US et PA, etc. La configuration de l'acquisition est ainsi stockée dans le bloc

parametres.

- **acquisition.** Ce module contient la machine à états principale de l'acquisition. Suite à une requête de démarrage, il vérifie le type d'acquisition (PAUS ou US) et exécute la séquence appropriée. Il fixe d'abord la valeur du gain d'amplification avec le bloc *Contrôle CNA*. Dans le cas d'une séquence PAUS, le bloc attend le signal de synchronisation du laser, puis effectue une lecture du CAN. L'échantillon est envoyée à la RAM, sur 16 bits, et l'adresse de celle-ci est incrémentée. Cette opération est répétée en boucle pour une durée (profondeur d'acquisition) fixée par l'utilisateur. Le bloc active ensuite les sorties menant au pulseur ultrasonore et procède à la séquence d'acquisition US. Pour chaque impulsion laser, plusieurs échos d'impulsion peuvent être enregistrés, le nombre de ces impulsions étant déterminé par l'usager. Finalement, le système signale au bloc `selection_transfert` que la mémoire RAM doit être vidée vers la FIFO.
- **selection\_transfert** Cette structure a été implémentée afin de permettre l'utilisation éventuelle de plusieurs blocs de mémoire RAM (*Random Access Memory*). Ainsi, la mémoire active pourrait être permutée pour s'assurer qu'il n'y ait aucun temps d'attente dû aux transferts USB. Cependant, la vitesse de transfert est suffisante pour les besoins actuels.

### 5.2.7 Logiciel d'acquisition

Le logiciel de contrôle utilisé pour gérer le montage photoacoustique et effectuer les acquisitions a été programmé en langage C++ sous l'environnement Qt (Qt Development Frameworks, NO). Le logiciel développé permet d'afficher des images échographiques ou photoacoustiques en mode B au rythme du moteur oscillant (voir figure 5.9). La librairie libre Qwt a également été employée.

La figure 5.10 présente la séquence d'exécution des principales fonctions et boucles du logiciel. Tout d'abord, le constructeur de la classe de la fenêtre principale effectue les appels aux routines d'initialisation, notamment la configuration de l'interface usager, l'allocation de la mémoire tampon pour l'affichage et la création des liens de communication entre classes distantes. En effet, sous Qt, le mécanisme principal de communication entre ces classes est un modèle de type *Signal/Slot*. Un grand nombre de paramètres de l'acquisition ont été placés dans l'interface utilisateur, pour fins de prototypage et de flexibilité. Ces paramètres peuvent être sauvegardés dans un fichier de configuration pour chargement lors d'une acquisition ultérieure. L'interface du logiciel permet également de déterminer le trajet du moteur linéaire de l'axe supplémentaire.

La librairie LibUSB est utilisée pour créer une connection USB et envoyer ou recevoir les paquets de données. Suite au démarrage d'une acquisition, les données de l'interface

usager sont lues et envoyées au FPGA. Les boucles d'exécution sont également mises en route, jusqu'à ce que l'utilisateur décide d'interrompre l'acquisition. Un patron de conception de type *producteur-consommateur* a été implémenté pour réaliser le processus de réception des données. Une boucle productrice remplit donc la queue de transfert, tandis qu'une boucle indépendante la vide. Ainsi, des acquisitions longues peuvent être effectuées sans interruption pour effectuer un transfert depuis la mémoire vive. Les paquets bruts sont ensuite enregistrés immédiatement sous format binaire, et des marqueurs temporels sont insérés avec le flux de données. Un nouveau fichier est ouvert automatiquement lorsque la taille d'un fichier dépasse un seuil défini par l'utilisateur. Également, les paramètres de l'acquisition sont enregistrés avec les données sous format XML (*Extensible Markup Language (XML)*). Les paquets sont également assemblés dans un tableau d'affichage selon leur position dans l'image. Ils sont ensuite moyennés directement dans ce tableau au fur et à mesure de leur arrivée. Lorsque le transducteur a terminé un demi-cycle de son parcours, la fonction d'affichage US et/ou PA est appelée, selon le cas. Les tableaux de données subissent alors un traitement effectué par des fonctions programmées en Matlab mais compilées en langage C++. Les opérations de traitement d'image seront décrites à la section suivante.

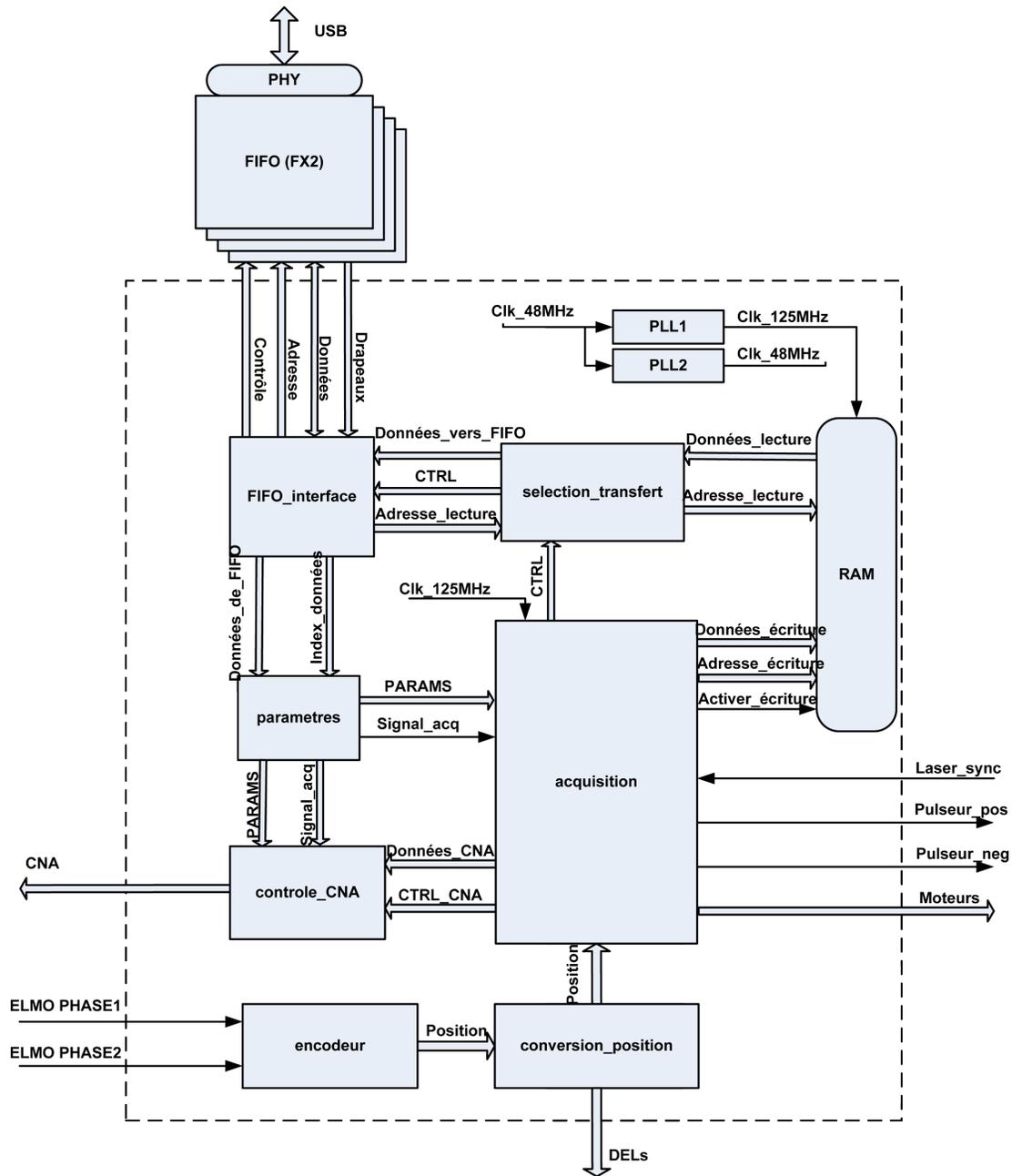


Figure 5.8 Schéma-bloc du microprogramme d'acquisition du FPGA.

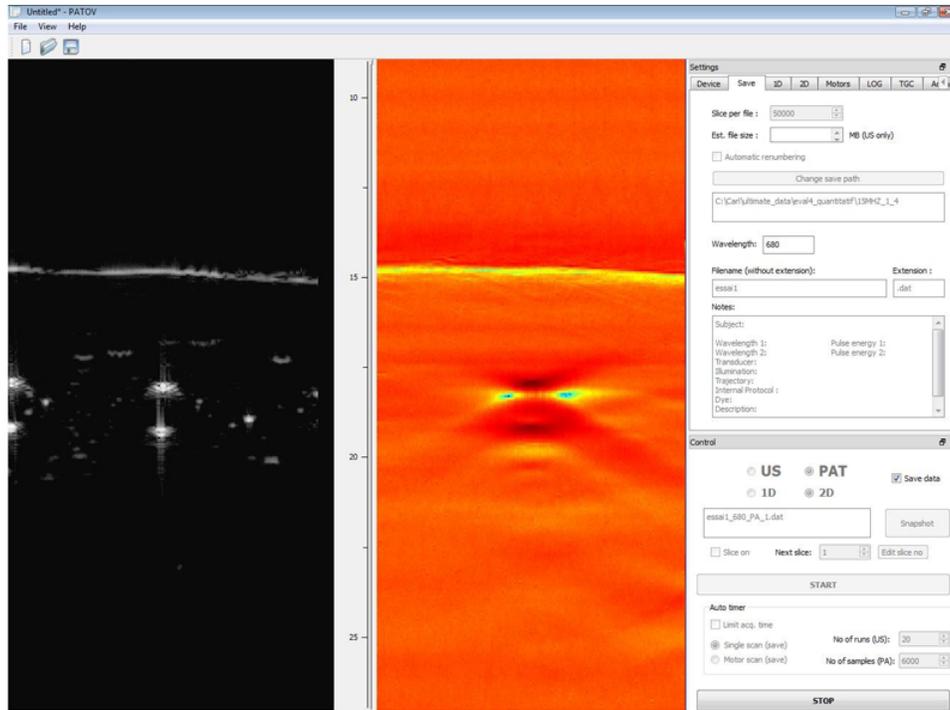


Figure 5.9 Capture d'écran du logiciel d'acquisition. Le fantôme d'imagerie utilisé est un tube de sang en coupe axiale. L'image en niveaux de gris correspond à l'échographie, tandis que l'image en couleur est l'image PA présentée sans détection d'enveloppe.

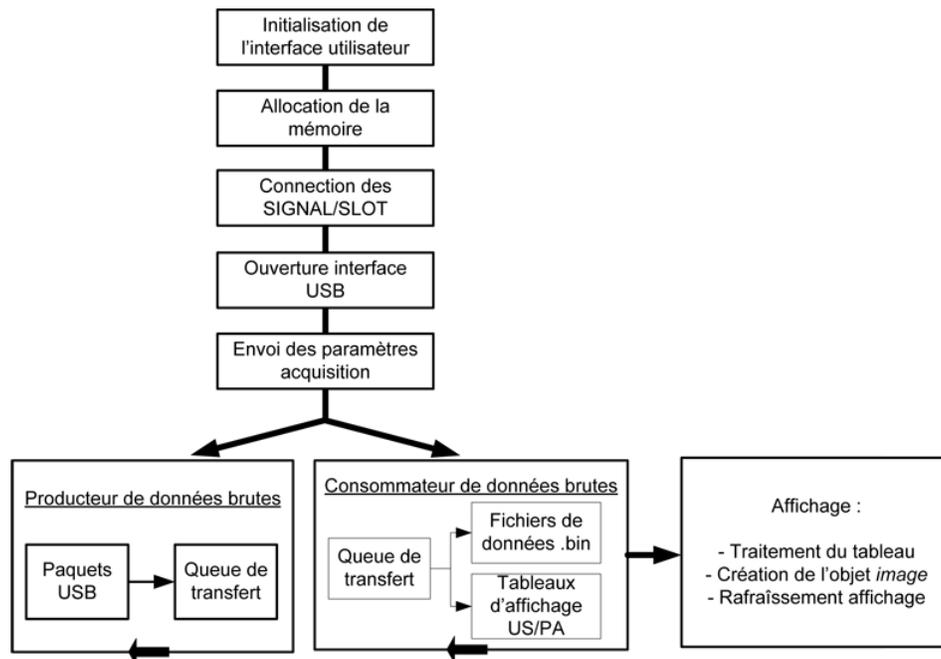


Figure 5.10 Schéma des principales fonctions du logiciel d'acquisition.

### 5.3 Reconstruction d'images

Les traitements de signaux en imagerie de mode B (photoacoustique ou échographique), peuvent être divisés en deux classes. L'étage d'entrée, destiné à la réception et la numérisation du signal, est réalisé sur la carte d'acquisition et a été décrit à la section précédente. Les traitements intermédiaires présentés ici constituent l'essentiel de la reconstruction usuelle des images PA et US avec un transducteur monoélément focalisé.

Le développement et le prototypage de nouveaux outils d'imagerie médicale ultrasonore est essentiellement basé sur le traitement des données radio-fréquences (RF) (Mari et Ca-chard, 2007), qui sont les données brutes générées par le transducteur, qu'elles soient discrétisées ou non. Dans le contexte de l'imagerie moléculaire, les traitements utilisés pour afficher les images en temps réel peuvent différer des traitements réalisés ultérieurement sur les données brutes enregistrées. En effet, dans le premier cas, l'information désirée est avant tout qualitative et sert à corriger rapidement la position du détecteur de l'appareil par rapport au sujet.

La figure 5.11 montre la cascade des opérations effectuées pour convertir les signaux RF en images échographiques en niveaux de gris. Ces traitements ont été implémentés dans le logiciel de reconstruction décrit précédemment, autant pour la partie échographique que photoacoustique. En premier lieu, chaque ligne est filtrée pour atténuer la dérive de basse fréquence induite par le bloc de réception et de numérisation. Le filtre utilisé est un filtre Butterworth passe-haut de premier ordre de fréquence de coupure  $f_c = 1$  MHz. Par la suite, l'enveloppe du signal filtré est détectée<sup>2</sup> de manière à ce que les oscillations dues à la résonance du transducteur apparaissent comme une seule et même impulsion. En pratique, ce calcul a été effectué par la représentation analytique du signal via le module de la transformée de Hilbert. Une compression logarithmique est ensuite appliquée pour réduire la plage dynamique des signaux reçus afin de visualiser simultanément les échos forts et faibles, notamment parce que l'affichage est effectué sur 8 bits. Les données sont aussi tronquées aux extrémités pour éviter d'afficher les artéfacts dus aux effets de bord. Enfin, un décalage temporel est effectué sur les échantillons photoacoustiques pour corriger le délai entre l'impulsion laser et le signal électrique de synchronisation qui lance le processus d'acquisition. Ce délai a été estimé expérimentalement à  $0,73 \mu\text{s}$ , ce qui est suffisant pour rompre l'alignement entre les images photoacoustiques et échographiques.

Un logiciel de reconstruction programmé sous l'environnement Matlab permet aussi d'effectuer la reconstruction d'image une fois l'acquisition terminée. Ce logiciel permet de charger les fichiers binaires contenant les données brutes produites par le logiciel d'acquisition. Les

---

2. Aussi appelée *rectification*.

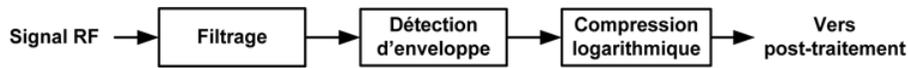


Figure 5.11 Étapes de traitement des signaux RF pour la formation d'une image en mode B.

traitements de base implémentés par ce logiciel sont les mêmes que ceux du logiciel d'acquisition. Cependant, une flexibilité accrue permet d'entrer les paramètres de filtrage du signal dans une interface graphique et de visualiser rapidement l'effet des traitements sur les signaux RF ou 2D (voir figure 5.12). Cette fonctionnalité a été très utilisée pour les fins de prototypage et de validation du système. Le logiciel permet aussi de générer les fichier *.mat* contenant les volumes de données traitées. Il permet également d'extraire les courbes temporelles moyennées sur une région d'intérêt de forme polynomiale définie par l'utilisateur.

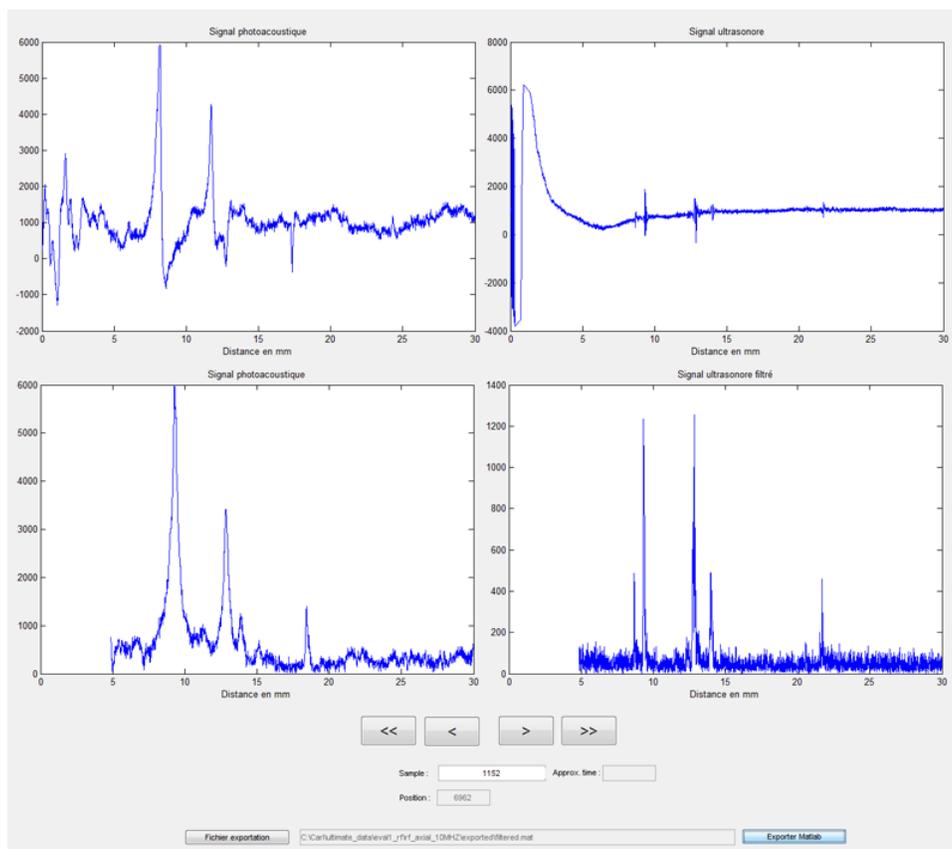


Figure 5.12 Capture d'écran du logiciel de reconstruction. Le logiciel permet de montrer le signal (haut et gauche) photoacoustique brut, (haut et droite) échographique brut, ainsi que les signaux filtrés correspondants (bas).

## 5.4 Conclusion

Un système d'imagerie photoacoustique macroscopique a été entièrement conçu et développé. L'appareil comprend également un échographe de type mode B statique. Le dispositif à faible coût est basé sur l'utilisation d'un transducteur piézoélectrique monoélément focalisé et d'un laser pulsé Nd :YAG. La machine à états d'acquisition a été implémentée sur un FPGA et les données sont transférées via un lien USB. Un logiciel d'acquisition permettant une reconstruction rapide des images a été programmé, ainsi qu'un logiciel de reconstruction post-acquisition. L'architecture retenue permet le remplacement rapide du transducteur et beaucoup de flexibilité au niveau de la séquence d'acquisition.

## CHAPITRE 6

### VALIDATION DU SYSTÈME

Ce chapitre présente la méthodologie et les résultats du processus de validation du dispositif conçu et réalisé pour ce projet. L'objectif de la validation est d'évaluer les limitations du système, mais également de fournir un entraînement à l'utilisateur du système pour la reconnaissance du contraste, et ce, sur des spécimens de géométrie et de composition connues (fantômes). Le dispositif d'imagerie sera notamment évalué au niveau de la profondeur de champ envisageable, de la résolution spatiale, de la sensibilité et de la stabilité.

#### 6.1 Caractérisation des performances

La première étape du processus de validation fut la conception d'un fantôme d'imagerie photoacoustique reproduisant le plus fidèlement possible les propriétés optiques et acoustiques des tissus biomédicaux. Une revue de littérature correspondante peut être trouvée à l'annexe B. Étant donné le besoin de produire un grand nombre de fantômes *ad hoc* réalistes mais dont la durée de vie importait peu, le choix s'est porté sur un substrat de gélatine (8 % mass., VeeGee Seeclear 275 Bloom, Vyse Gelatin Company, IL) contenant de la poudre de  $\text{TiO}_2$  (1,33 mg/mL, T1080, Spectrum, Gardena, CA) et de l'encre de Chine (0,0044 % vol., Parker, France), pour donner  $\mu_s = 1,0 \text{ mm}^{-1}$ ,  $\mu_a = 0,01 \text{ mm}^{-1}$  et une vitesse du son estimée à  $c_L = 1510 \text{ m/s}$  (Cook *et al.*, 2011). Les blocs de gélatine ont été coulés dans des contenants de plastique permettant une fixation rigide des tubes ou fils les traversant (voir figure 5.4). Le couplage acoustique a été assuré par de l'eau déminéralisée, à la température de la pièce. Sauf indication contraire, toutes les images ont été réalisées avec un moyennage correspondant à un aller-retour du transducteur, soit une durée approximative de 200 s pour environ 4 000 lignes. Le pas de reconstruction choisi était de  $20 \mu\text{m}$ , pour un total de 500 colonnes à l'affichage. La plupart des acquisitions ont été réalisées avec le transducteur de 15 MHz étant donné sa meilleure résolution et sa plus grande distance focale, qui laisse plus d'espace de manoeuvre pour le faisceau d'illumination. Sauf mention contraire, du sang entier hépariné de lapin a été employé pour remplir les tubes lors des expériences. Pour des acquisitions longues, une dilution d'encre de chine (10 % vol.), plus stable, a plutôt été utilisée.

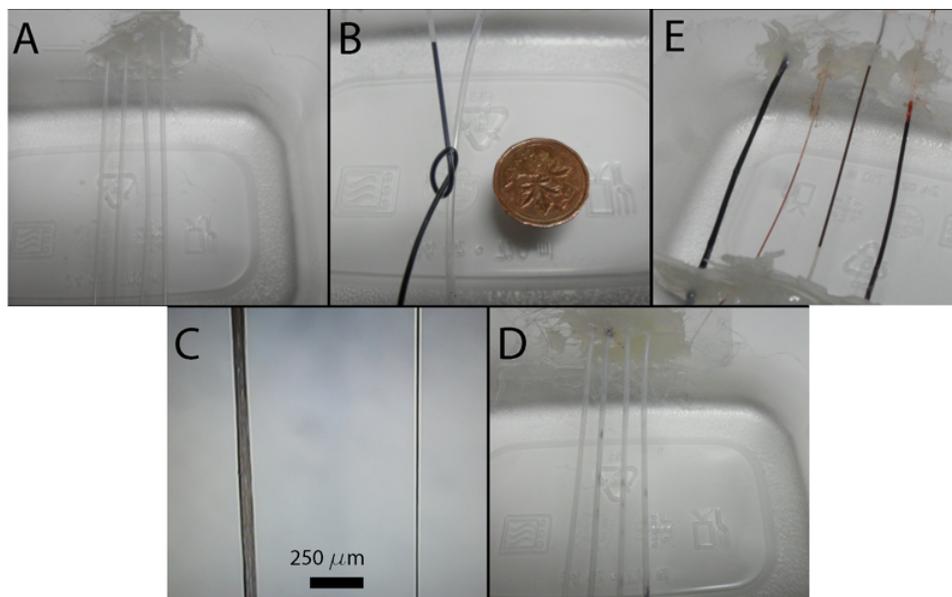


Figure 6.1 Fantômes d'imagerie utilisés pour la validation du système. Les fantômes étaient composés d'un substrat de gélatine (enlevé pour la photographie), de  $\text{TiO}_2$ , d'encre de Chine et (pour (A),(B) et (D)) de tubes de polytétrafluoroéthylène (PTFE) de 1,33 mm de diamètre externe (Extruded Sub-Lite-Wall, Zeus inc., Orangeburg, SC). (A) Tubes parallèles, (B) Tube en noeud, (C) Fantôme de résolution spatiale comprenant un cheveux et un fil de carbone (diamètre de  $10 \mu\text{m}$ ). (D) Tubes situés à différentes profondeurs : 0 mm ; 4 mm ; 8 mm ; 12 mm. (E) Tubes de différents diamètres externes : 0,60 mm ; 0,95 mm ; 1,33 mm ; 2,0 mm.

### 6.1.1 Contraste

Une première série d'expériences ont été effectuées afin d'évaluer la qualité des images produites sur une géométrie simple. Le fantôme utilisé pour ces mesures est un tube droit placé à 4 mm sous la surface du fantôme (voir figure 6.1-(A)), rempli de sang et imagé en coupe transversale. Nous définissons le tube ayant un diamètre externe de 1,33 mm comme le tube « standard » pour ces acquisitions car il s'agit de la taille la plus similaire à celle de l'aorte chez la souris, soit 1,2 à 1,5 mm (voir section 7.2).

En premier lieu, la figure 6.2 montre la juxtaposition des images PA et US suite à l'ajustement du délai pour la correction du signal de synchronisation du laser. Le signal PA a été l'objet d'un seuillage afin de permettre la visualisation simultanée des deux types de contraste. Le résultat confirme l'alignement des signaux.

Les mesures suivantes visaient à évaluer la position de la fibre d'illumination par rapport au transducteur. L'hypothèse de travail avancée est que la position radiale de la fibre autour de celui-ci influence peu la qualité des images produites étant donné la profondeur de l'absorbant principal dans ce milieu diffusant. La figure 6.3 montre les images obtenues avec la fibre placée

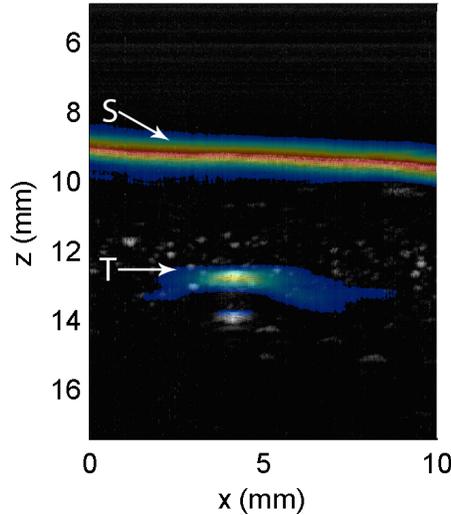


Figure 6.2 Alignement des images PA et US. L'image PA (couleur) est interposée à l'image US (niveaux de gris). Le fantôme utilisé pour ces mesures est un tube droit rempli de sang placé à 4 mm sous la surface du fantôme. L'acquisition est réalisée en coupe axiale. S : Surface du fantôme. T : Tube.

en position axiale, c'est-à-dire dans l'axe de balayage rapide du transducteur, et en position perpendiculaire. Le signal obtenu en surface du fantôme est légèrement plus large pour la position perpendiculaire, tandis que le signal du tube est peu affecté. La position choisie pour la suite des mesures est la position perpendiculaire, car elle offre plus d'espace de manoeuvre pour des mesures *in vivo*. L'image échographique obtenue pour des tubes droits correspond bien aux résultats attendus pour un transducteur monoélément, c'est-à-dire un signal fort obtenu dans la direction axiale du transducteur (dessus et dessous du tube) et peu ou pas d'échos sur les côtés. Un signal de grande amplitude est produit par la surface du fantôme étant donné que la fluence  $y$  est maximale. La figure 6.4 montre les résultats obtenus avec un tube droit placé dans l'axe de mouvement rapide du transducteur, soit en vue longitudinale. Le tube génère un grand contraste, autant en PA qu'en échographie.

Le rapport signal à bruit (RSB) a été estimé pour cette dernière image afin de quantifier la sensibilité du système. Le RSB a été défini comme le rapport entre l'amplitude maximale du signal de la cible et le niveau de bruit électronique, qui comprend le bruit thermique et le bruit de quantification :

$$RSB = 20 \log_{10} \left( \frac{\max_{x,y} \{|s(x,y)|\}}{\hat{\sigma}_{bruit}} \right), \quad (6.1)$$

où  $s(x,y)$  est l'image et  $\hat{\sigma}_{bruit}$  est l'écart type du bruit (Ustuner et Holley, 2003). Une image de

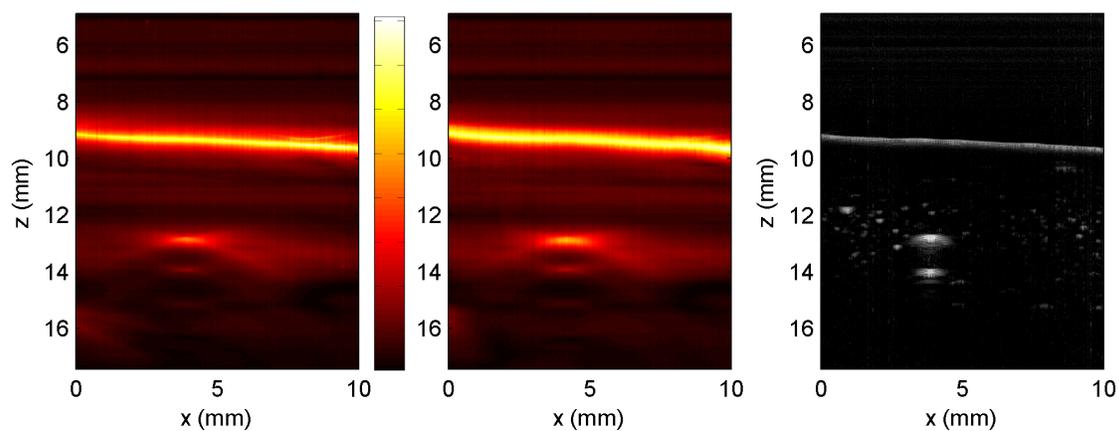


Figure 6.3 Tranche PAUS d'un fantôme pour deux angles d'illumination. L'axe de la fibre optique est (gauche) parallèle à l'axe de mouvement du transducteur, ou (centre) perpendiculaire à l'axe du transducteur. Droite : Image US correspondante.

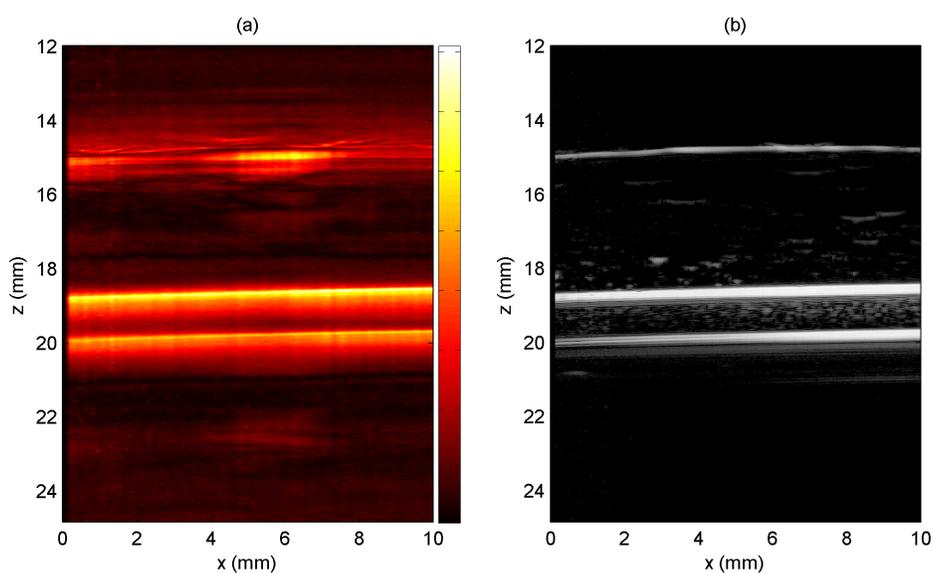


Figure 6.4 Tranche latérale d'un tube droit. (a) Contraste PA. (b) Contraste US. Le rapport signal à bruit (RSB) mesuré en PA est de 34,54 dB.

bruit a été produite en effectuant une acquisition photoacoustique sans impulsion lumineuse. Le signal PA présenté à la figure 6.4 correspond à un rapport signal à bruit de 34,54 dB.

Le dispositif de mesure a ensuite été testé sur un fantôme où quatre tubes ont été placés à différentes profondeurs (voir figure 6.1-(A)). Cette expérience visait à évaluer l'impact de l'absorption du milieu sur l'intensité du signal dans la région d'intérêt. Étant donné la haute fréquence du transducteur, l'atténuation acoustique par le milieu de propagation n'est pas négligeable. Une forte absorption optique est également attendue. La distance entre le transducteur et la surface du fantôme a été ajustée pour chaque tube afin qu'il soit bien situé dans la zone focale. Les résultats sont présentés à la figure 6.5. L'objectif étant de comparer l'intensité de chaque tube par rapport au signal de surface, les sous-figures ne sont pas normalisées sur le maximum du groupe. Le tube le plus haut était exposé à l'eau de couplage acoustique, tel que montré à la figure 5.4. Le signal produit par ce tube était plus fort que le signal de surface et couvrait toute la section du tube. Le tube adjacent, situé à 4 mm sous la surface, produisait également un signal de forte intensité, notamment sur la surface supérieure du tube, où la lumière était incidente. Le signal produit par les deux tubes plus profonds est considérablement plus faible par rapport à la surface du bloc. En effet, l'absorption par la surface est prédominante pour le tube situé à 8 mm sous la surface, tandis que le tube situé à 12 mm est à peine discernable en PA. Le contraste échographique demeure très fort pour toutes les profondeurs étudiées. Une distortion de la section du tube est discernable pour le tube le plus profond. En effet, celui-ci était situé au-delà de la zone focale du transducteur, causant un élargissement de la réponse impulsionnelle spatiale (PSF) qui se répercute sur l'image du fantôme.

Le contraste a été quantifié à l'aide du rapport contraste à bruit (RCB) (Ustuner et Holley, 2003), défini par

$$RCB = 20 \log_{10} \left( \frac{\hat{\mu}_{tube} - \hat{\mu}_{fond}}{\hat{\sigma}_{fond}} \right), \quad (6.2)$$

où  $\hat{\mu}_{tube}$  est la moyenne du signal du tube,  $\hat{\mu}_{fond}$  est la moyenne du signal dans une région autour du tube et  $\hat{\sigma}_{fond}$  est son écart type. La figure 6.6 montre le RCB et le RSB correspondant aux quatre tubes du fantôme de profondeur. Le RCB et RSB maximal est atteint pour le tube situé à 4 mm, et non au tube de surface, qui n'est pas dans une région diffuse considérant sa profondeur nulle. Le RCB est systématiquement plus faible que le RSB, étant donné qu'une grande partie du signal de fond est du signal photoacoustique et non du bruit électronique. La profondeur visée pour l'application à la région aortique chez la souris est d'environ 4-5 mm, ce qui nous permet d'envisager un contraste d'environ 26 dB sur la base des mesures faites sur fantômes. Il faut noter que le contraste varie selon la définition du fond de l'image. En pratique, la visibilité des structures peut être affectée par la taille de la

région de normalisation du contraste. Ainsi, la figure 6.7 montre les quatre tubes précédents mais avec une fenêtre de visualisation réduite où la surface du fantôme a été exclue autant que possible de la région d'intérêt. Les tubes les plus profonds apparaissent plus clairement que pour la fenêtre plus large de la figure 6.5. Dans le cas de l'expérimentation *in vivo*, le choix de la fenêtre devra être fait selon le contexte mais en considérant que la visualisation de la surface est généralement nécessaire pour reconnaître les artefacts d'imagerie (voir section 6.1.5).

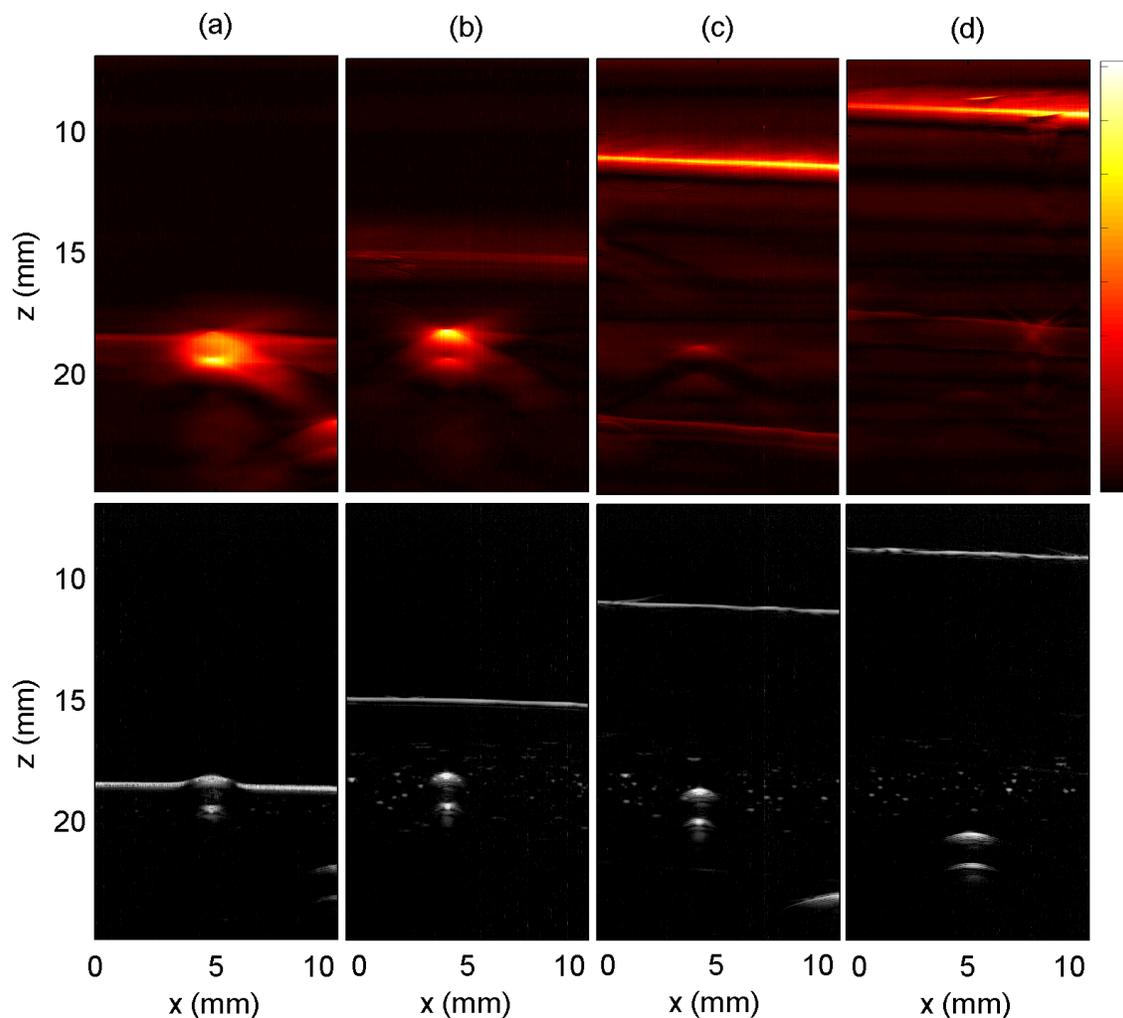


Figure 6.5 Influence de la profondeur des fantômes sur le contraste PAUS. Les tubes étaient situés à (a) 0 mm, (b) 4 mm, (c) 8 mm et (d) 12 mm sous la surface du fantôme.

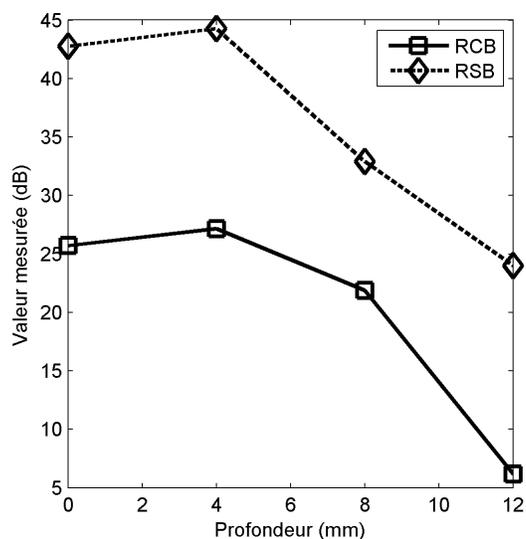


Figure 6.6 Rapport signal à bruit (RSB) et rapport contraste à bruit (RCB) en fonction de la profondeur du fantôme. (Ligne pleine : RCB. Ligne tiretée : RSB).

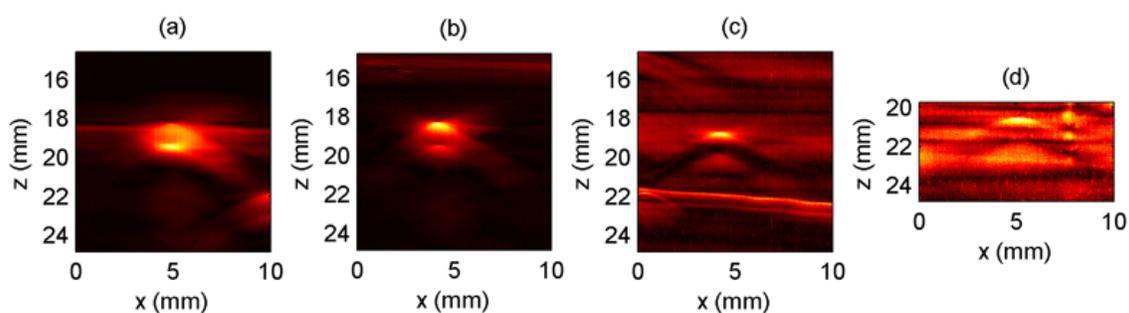


Figure 6.7 Influence de la profondeur des fantômes sur le contraste PAUS avec une fenêtre de visualisation réduite. Les tubes étaient situés à (a) 0 mm, (b) 4 mm, (c) 8 mm et (d) 12 mm sous la surface du fantôme.

Sachant que l'appareil développé est destiné à des applications sur des vaisseaux sanguins à l'échelle macroscopique, il est crucial d'évaluer l'influence de la taille des absorbants sur le contraste produit. L'intérêt pour ces mesures est avant tout de nature qualitative. En effet, dans le contexte *in vivo*, il s'agira de reconnaître le contraste vasculaire de l'aorte avant de procéder à l'imagerie moléculaire. Quatre tubes de différentes tailles contenant du sang ont donc été imagés en coupe transversale. Les contrastes obtenus sont présentés à la figure 6.8. D'abord, le tube de plus grand diamètre produit un fort contraste du côté où la lumière est incidente, et un faible contraste du côté opposé. Le tube de dimension standard produit un contraste des deux côtés, mais préférentiellement du côté incident. En deça de ce diamètre, les régions sont unifiées et le contraste PA couvre toute la section des tubes. Le contraste produit par le tube de plus faible dimension est relativement semblable à celui obtenu avec un cheveu foncé de  $50\ \mu\text{m}$  de diamètre, tel que montré à la figure 6.9. Le contraste US permet alors clairement de les distinguer. La dimension estimée de l'aorte étant de 1,2-1,5 mm, le contraste attendu *in vivo* correspond à deux « lobes » de part et d'autre de la structure, présents pour les tubes de 1,33 mm et 2 mm. L'explication mécanistique de ces observations est discutée spécifiquement à la section 6.2.

Enfin, le déplacement du transducteur dans l'axe latéral a été testé avec un fantôme constitué d'un noeud de tube rempli d'une solution d'encre (voir 6.1-(D)). Le pas du moteur linéaire a été fixé à  $500\ \mu\text{m}$  afin de limiter le temps d'acquisition. Les tranches ont été seuillées, puis recadrées dans la région d'intérêt. Les images ont ensuite été segmentées de manière semi-automatisée avec le logiciel 3D-Doctor (Able Software Corp., MA) afin de produire une représentation tridimensionnelle (voir figure 6.10). Les courbures les plus prononcées n'ont pas été captées par le détecteur, causant l'apparition d'un trou dans la segmentation. Également, les deux tubes apparaissent comme un seul dans les portions où ils sont collés.

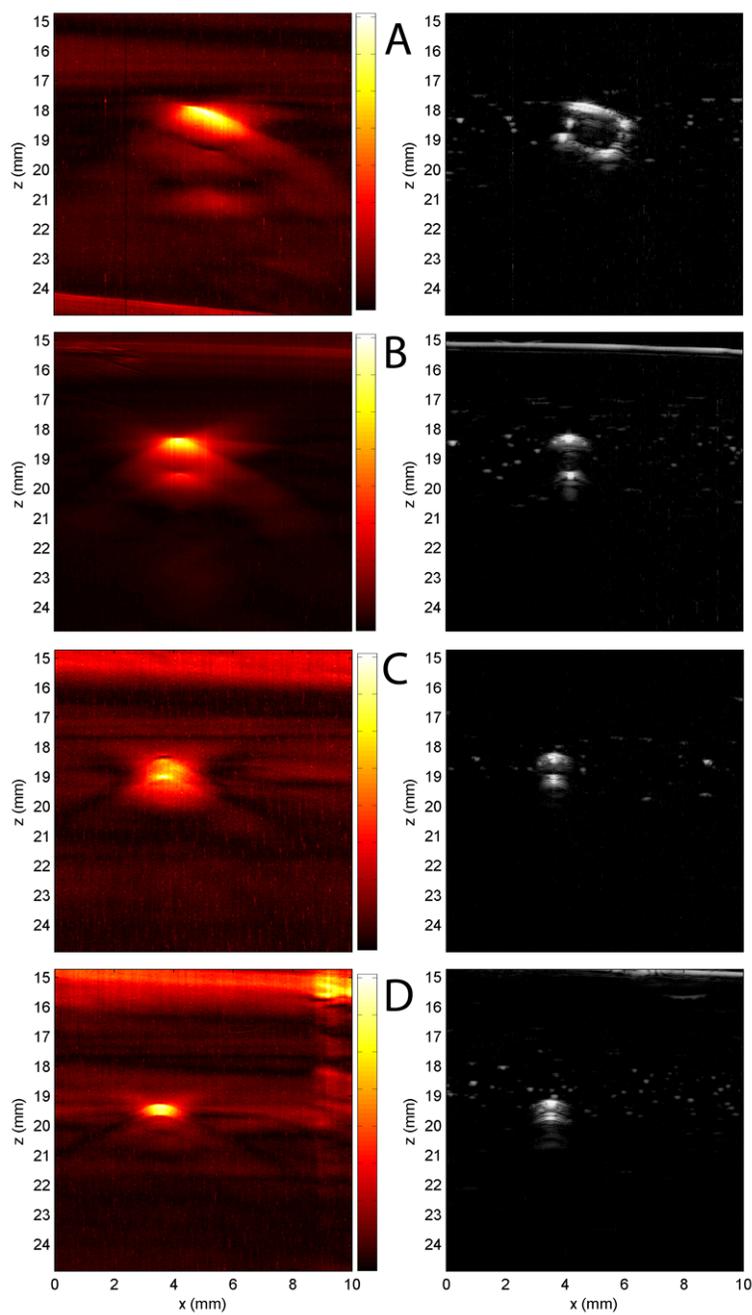


Figure 6.8 Influence de la taille des tubes sur le contraste PAUS. Colonne de gauche : contraste PA. Colonne de droite : contraste US. Diamètre externe des tubes : (A) 2,0 mm, (B) 1,33 mm, (C) 0,95 mm et (D) 0,60 mm.

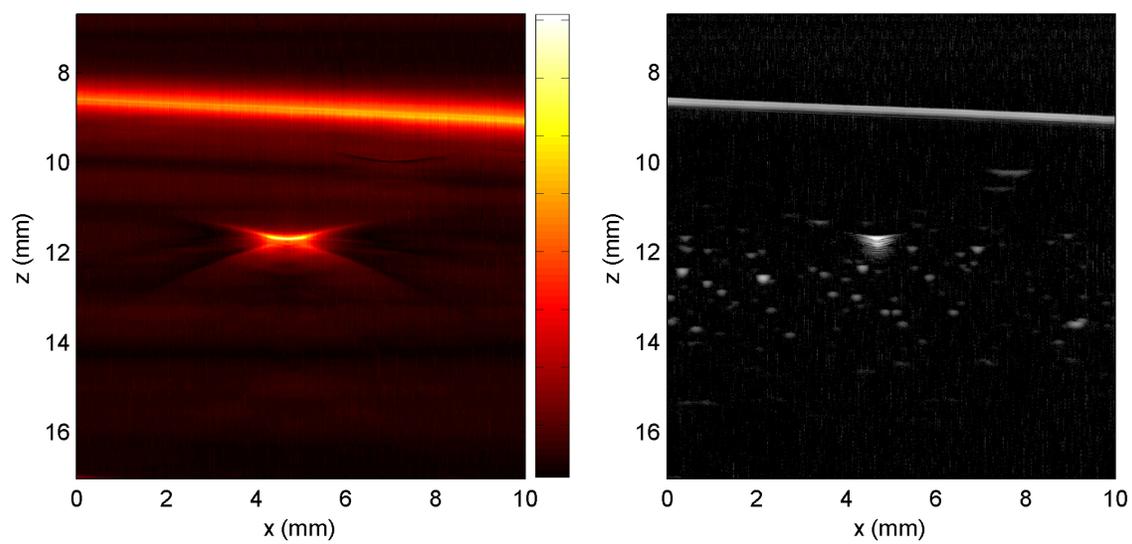


Figure 6.9 Tranche PAUS d'un cheveux.

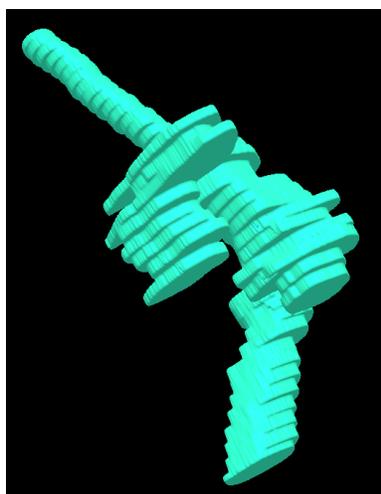


Figure 6.10 Volume PA segmenté d'un noeud absorbant.

### 6.1.2 Résolution spatiale

Suite à la validation qualitative, un fantôme de résolution a été utilisé afin de mesurer la résolution spatiale du système, et ainsi évaluer la séparabilité des contrastes pour des absorbants de petite taille. La plupart des systèmes d'imagerie agissent comme des filtres passe-bas, résultant en une diminution de la netteté des images des structures fines. En pratique, on peut mesurer, par exemple, la résolution FWHM (*Full Width at Half Maximum*), définie comme la mi-hauteur du profil équivalent à une réponse impulsionnelle spatiale (ici la LSF, ou *Line Spread Function*) obtenue dans les directions axiale et latérale (Xu et Wang, 2003). La résolution peut être limitée par le pas du balayage, c'est pourquoi celui-ci a été fixé à  $10 \mu\text{m}$ , soit un ordre de grandeur inférieur à la résolution estimée. La figure 6.11 montre les images PA et US d'une coupe transversale d'un fil de carbone suspendu dans un fantôme diffusant (correspondant à la figure 6.1-(C).) Le diamètre du fil a été estimé à  $10 \mu\text{m}$  à l'aide d'un microscope optique conventionnel (Edmund Optics, Barrington, NJ). Même si un point cible géométrique idéal ne peut pas être construit ou détecté en réalité, un point cible a seulement besoin d'être beaucoup plus petit que la résolution spatiale. Les profils mesurés sont présentés à la figure 6.12. Pour le transducteur de 15 MHz, la résolution FWHM mesurée est de  $91 \mu\text{m}$  dans la direction axiale, et de  $277 \mu\text{m}$  dans la direction latérale. Similairement, pour le transducteur de 10 MHz, la résolution axiale a été estimée à  $135 \mu\text{m}$  et la résolution latérale à  $484 \mu\text{m}$ .

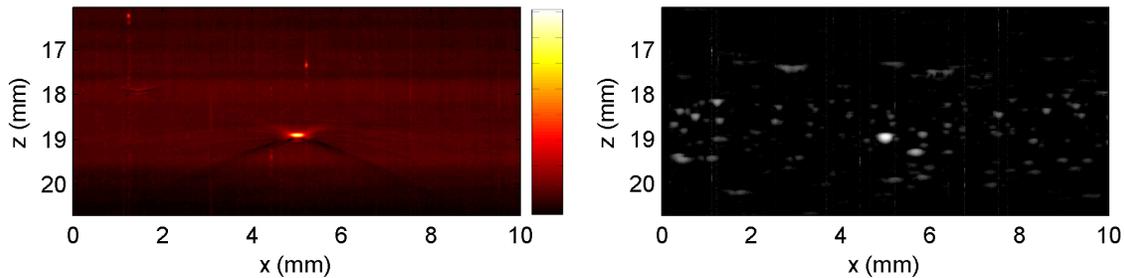


Figure 6.11 Tranches PA (gauche) et US (droite) d'un fil de carbone de  $10 \mu\text{m}$  de diamètre utilisé pour estimer la résolution spatiale du système.

Tableau 6.1 Résolution spatiale du système selon le transducteur utilisé.

No de modèle	$f_c$ (MHz)	$\hat{\delta}_{ax}$ ( $\mu\text{m}$ )	$\hat{\delta}_{lat}$ ( $\mu\text{m}$ )	$z_0$ (mm)
V312	10	135	484	12,5
V319	15	91	277	19,1

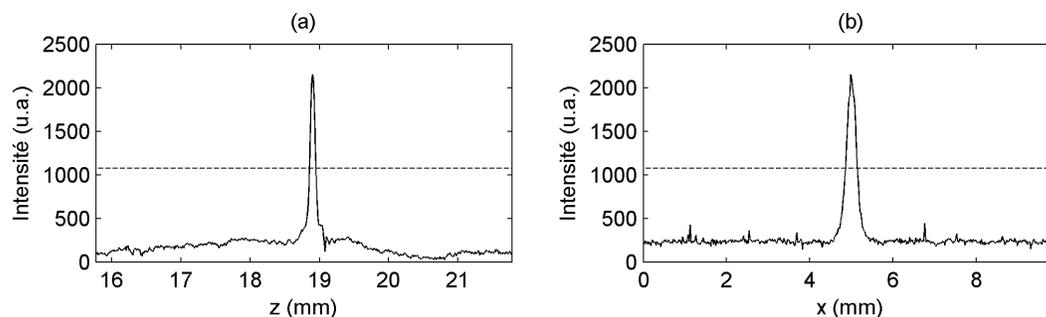


Figure 6.12 Réponse impulsionnelle spatiale du système. (a) Profil dans la direction axiale. (b) Profil dans la direction latérale. Pointillés : mi-hauteur des profils.

### 6.1.3 Stabilité et dérive

Généralement, la dérive d'un système d'instrumentation est l'effet sur les mesures des changements de gain provoqués par le réchauffement des composantes. Puisque l'appareil d'instrumentation photoacoustique comprend également une source laser, le réchauffement des composantes de cette source peut également avoir un impact important.

Une expérience a été effectuée afin d'estimer cette dérive. Pour ce faire, un fantôme contenant un tube droit rempli d'une solution diluée d'encre de Chine a été utilisée. Une acquisition a été démarrée 20 minutes après l'initialisation de la pompe à eau du laser, mais sans préchauffage de la lampe. L'acquisition a été interrompue après de 58 minutes de fonctionnement normal et d'enregistrement des données. La figure 6.13 montre la valeur moyenne de deux régions d'intérêt, soient le tube et la surface du fantôme, en fonction du temps. La valeur calculée est normalisée par rapport à la première période de mesure. Le système prend environ 20 minutes pour se stabiliser, puis le signal mesuré en surface du fantôme devient relativement constant. Après 30 minutes, le signal du tube, qui amplifie les variations de fluence, reste dans une plage de moins de 5% de variabilité. Ces résultats suggèrent donc de procéder une période de préchauffage d'au moins 30 minutes avant de procéder à des acquisitions de longue durée. L'écart entre le signal de surface et celui du tube pourrait être expliqué par le réchauffement du fantôme, en considérant que la température initiale du fantôme n'a pas été contrôlée pour être à la température de la pièce. Tel que revu à la section 3.4.1, le signal PA est sensible à la température de nombreux spécimens.

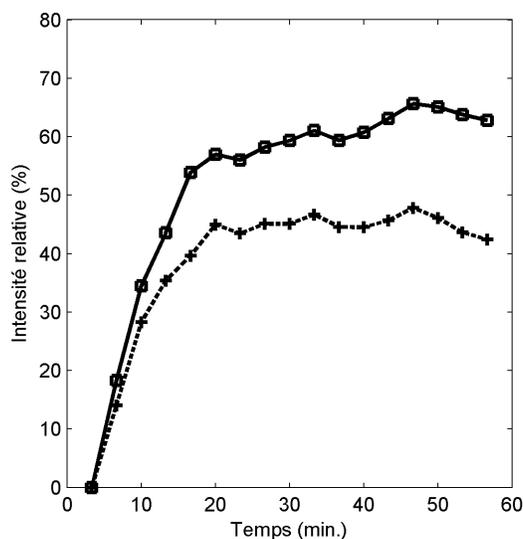


Figure 6.13 Évaluation de la dérive au démarrage du système. Courbe pleine : Signal PA moyenné sur la ROI d'un tube fixe rempli d'une dilution d'encre. Courbe tiretée : Signal PA moyenné de la surface.

#### 6.1.4 Sensibilité

La sensibilité du dispositif se traduit par sa capacité à discriminer un écart plus ou moins grand entre deux concentrations d'émetteurs photoacoustiques. Cette caractéristique a été mesurée à l'aide d'un tube droit. L'agent de contraste choisi pour cette expérience est une sonde moléculaire ciblée à base de nanoparticules d'or, dont il sera question au chapitre 7. Le tube a été rempli successivement avec différentes dilutions de nanoparticules, en ordre croissant de concentration. Le tube a aussi été lavé avec de l'eau déminéralisée entre chaque acquisition, mais n'a pas été bougé par rapport au système d'imagerie, de manière à éviter les biais de quantification. La première acquisition a été faite avec de l'eau, tandis que la dernière a été effectuée avec une solution ayant une densité optique (OD) estimée à 50. L'intensité maximale du signal PA dans la région d'intérêt en fonction de la densité optique est rapportée à la figure 6.14. Étant donné la présence d'un bruit de mesure non nul, la plage des concentrations a été divisée en deux groupes. Une régression linéaire avec un coefficient de détermination  $R^2 = 0,987$  indique une bonne linéarité entre les concentrations les plus élevées et l'intensité des signaux mesurés. Cependant, on peut se demander si un tel estimateur est robuste pour des concentrations plus faibles étant donné le bruit de mesure. La figure 6.15 présente la courbe équivalente à la précédente pour les valeurs OD variant entre 0 et 0,5; on remarque que l'estimation par l'intensité maximale, dénotée « M1 », est aberrante sous OD = 0,5. L'estimation par la moyenne des  $n_s$  plus grandes valeurs dans la région d'intérêt

a donc été tentée; les résultats sont dénotés M100, M1000 et M10000, indiquant  $n_s$ . Ces deux derniers estimateurs permettent notamment de distinguer le tube rempli d'eau et la solution à  $OD = 0,05$ . Par ailleurs, ces moyennes ont aussi été appliquées aux solutions plus concentrées, tel que montré à la figure 6.16. Les barres d'erreur indiquent l'écart type sur les pixels du calcul; elles n'ont pas été montrées pour la figure 6.15 car les écarts types sont très grands étant donné le niveau de bruit. La linéarité ne semble pas affectée par M100, bien que la pente diminue. Un plus grand nombre de moyennages conduit à une perte de la linéarité. La figure 6.17 présente les images PAUS à partir desquelles les courbes précédentes ont été tirées. Les images montrent clairement que le contraste obtenu n'est pas spatialement uniforme entre les concentrations et dépend de l'absorbance dans la région d'intérêt. Cet effet sera discuté en détails à la section 6.2.

Une seconde expérience d'évaluation de la sensibilité a consisté à imager un mélange de sang et de nanoparticules. L'objectif de ces acquisitions était d'évaluer la quantité minimale de nanoparticules nécessaire pour distinguer le mélange du sang pur, sur la seule base de l'amplitude du signal. Les résultats, présentés à la figure 6.18, montrent une augmentation linéaire du signal PA en fonction de la fraction volumique en nanoparticules. Toutefois, la fraction volumique minimale disponible était de 0,05 % V/V, et non du sang pur; l'objectif de l'expérience n'a donc pas pu être atteint. Néanmoins, une expérience semblable a été répétée ultérieurement avec un autre système et les résultats seront présentés au chapitre suivant.

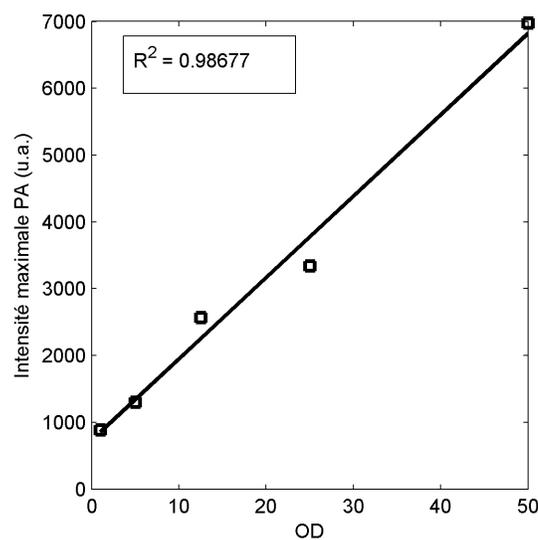


Figure 6.14 Intensité maximale du signal PA en fonction de la concentration de nanoparticules d'or. La courbe pleine est une régression linéaire sur les données.

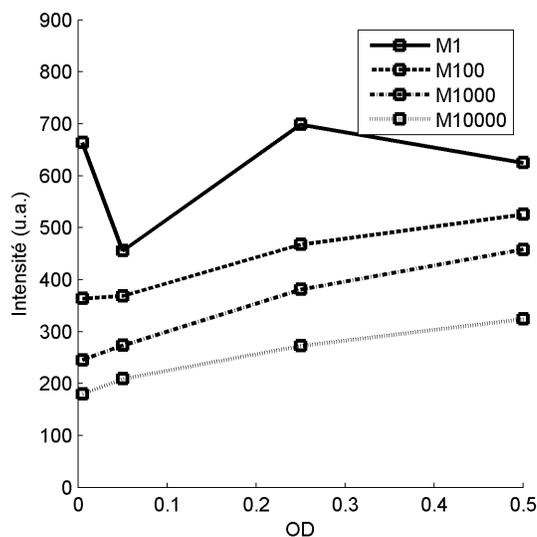


Figure 6.15 Intensité du signal PA en fonction de la concentration de nanoparticules d'or pour  $OD < 1$ . La courbe M1 correspond à l'intensité maximale de la ROI. Les courbes M100, M1000 et M10000 correspondent aux moyennes des  $n_s$  pixels les plus forts ; les barres d'erreur reflètent l'écart type.

### 6.1.5 Artéfact d'imagerie

L'artéfact le plus important apparaissant dans les images prend la forme de la surface du fantôme et apparaît systématiquement au double de la profondeur de celui-ci. Étant donné le délai, il s'agit probablement d'une réflexion spéculaire de l'illumination en surface du fantôme. Le faisceau se dirige alors directement sur le transducteur, et la paroi externe de l'élément actif subit l'effet photoacoustique. L'onde ultrasonore ainsi émise est réfléchiée à la surface du fantôme, ce qui provoque l'apparition d'un artéfact ayant la même forme. Cet effet est visible sur la figure 6.7-(c) à environ 22 mm de profondeur. À certaines occasions, l'artéfact apparaît dans la région d'intérêt ; il faut donc ajuster la profondeur du transducteur, dans la mesure du possible. Il n'est pas exclus que, si l'impulsion photoacoustique émise par le transducteur est très forte, d'autres impulsions d'écho puissent survenir.

## 6.2 Discussion

Une des particularités de ce projet est que les vaisseaux ciblés sont relativement larges. La bande fréquentielle des ondes de pression générées est donc assez basse et susceptible d'être filtrée par les transducteurs résonants. Or, cette situation est mal caractérisée dans la littérature photoacoustique. En effet, jusqu'à présent la plupart des applications ont été

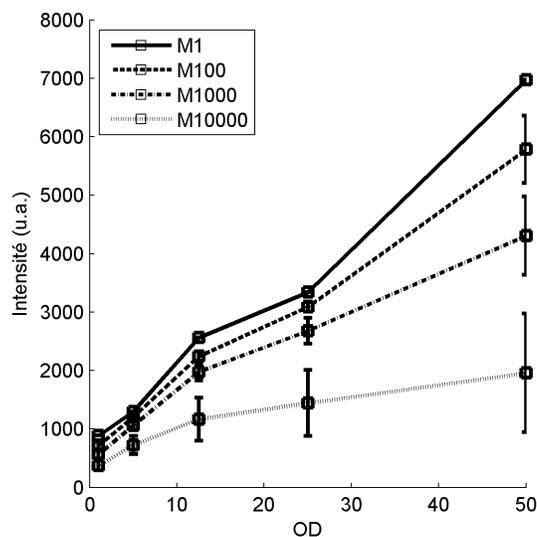


Figure 6.16 Intensité du signal PA en fonction de la concentration de nanoparticules d'or pour  $OD \geq 1$ . La courbe M1 correspond à l'intensité maximale de la ROI. Les courbes M100, M1000 et M10000 correspondent aux moyennes des  $n_s$  pixels les plus forts.

effectuées sur des artérioles de faible diamètre ou des capillaires, où l'effet de convolution est grandement diminué. Par exemple, la figure 6.19 montre une ligne d'acquisition centrale extraite de l'image PA d'un cheveu. La seconde ondelette, produite par le cheveu, est relativement fine et l'image reconstruite du cheveu (voir figure 6.9) apparaît comme une seule région relativement bien définie et de taille comparable à celui-ci.

Or, nous avons observé à la figure 6.17 que la forme des sous-régions d'intérêt pouvait varier grandement selon le coefficient d'absorption de l'objet imagé. Nous pouvons aisément faire l'hypothèse qu'un absorbant fort limitera la propagation subséquente du faisceau lumineux dans le reste du tube et génèrera une amplitude beaucoup forte du côté incident de l'illumination, à l'instar de l'image 6.17-(A). Pour confirmer cette hypothèse, la ligne RF centrale de l'image PA dans la ROI du tube a été extraite et comparée à la forme d'onde simulée pour une illumination en gradient, déjà présentée à la section 4.2. Les formes d'ondes sont très similaires, tel qu'on peut le constater aux figures 6.20-(a) et 6.20-(b). Les paramètres de simulation utilisés demeurent une approximation de la géométrie du spécimen, de la distribution de pression initiale et de la bande passante du transducteur, c'est pourquoi ces signaux ne sont pas identiques. Nous avons effectué la même comparaison (voir figures 6.20-(c) et 6.20-(d)) pour les signaux correspondants à un absorbant moyen (tube de sang montré en 6.17-(J)) et le résultat de la simulation acoustique pour une pression initiale uniforme avec un filtrage passe-bande. Dans ce cas, les résultats de simulation suffisent également à expliquer

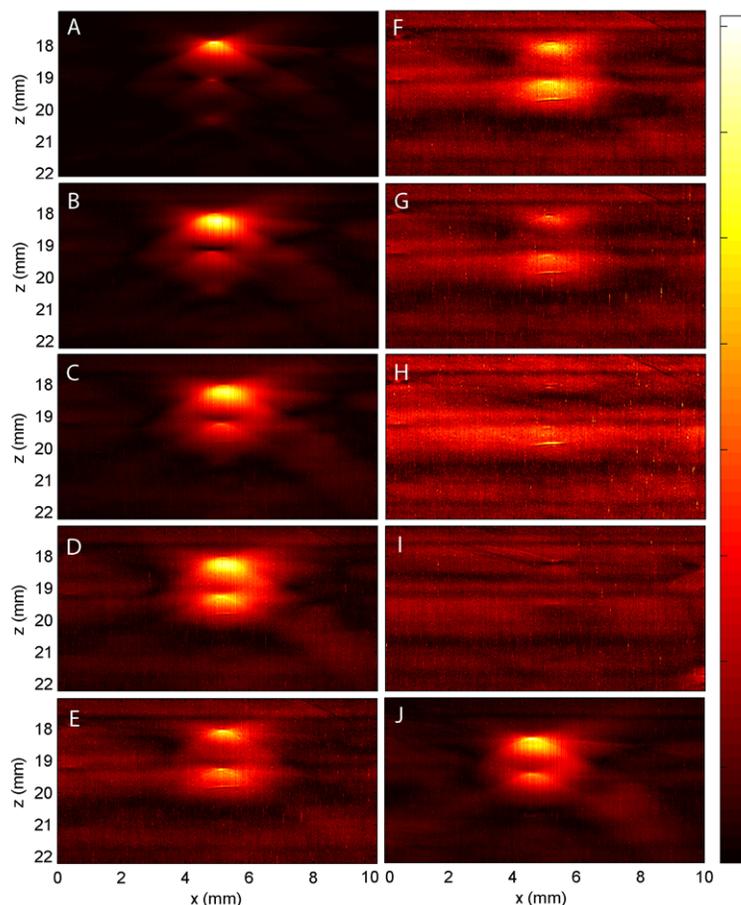


Figure 6.17 Tranches PAUS de tubes avec différentes concentrations de nanoparticules d'or : (A) OD=50, (B) OD=25, (C) OD=12,5, (D) OD=5, (E) OD=0,5, (F) OD=0,25, (G) OD=0,1; (H) OD=0,05; (I) Eau et (J) Sang. Les images ne sont pas normalisées au niveau du groupe.

les formes d'onde mesurées.

### 6.3 Conclusion

Le contraste a d'abord été apprécié de manière qualitative, car il ne constitue pas une limitation fondamentale de la visualisation étant donné qu'il peut être augmenté par des techniques de traitement d'images. Qui plus est, l'ajustement du contraste est une étape essentielle de la visualisation des images échographiques. Dans une majorité des expériences effectuées, le contraste PA, présenté sur une échelle de couleur linéaire, a permis de déceler les contours des spécimens imagés, la juxtaposition des images US permettant cette validation. Aussi, le système conçu a permis d'obtenir un très bon contraste sur des tubes situés à 4-5 mm sous la surface d'un milieu optiquement diffusant et absorbant, soit la profondeur et les

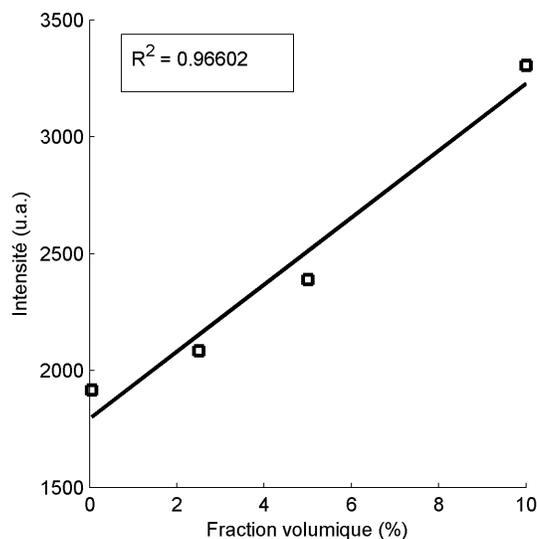


Figure 6.18 Intensité maximale du signal PA en fonction de la fraction volumique en nanoparticules d'or d'un mélange AuNS/sang.

conditions estimées pour l'application finale du système. Le système a également permis de détecter et de différencier des solutions de nanoparticules pour une large plage de concentrations. Au niveau des limitations, les montées ou descentes abruptes du tube n'ont pas été relevées par le système lors du balayage tridimensionnel. Cependant, le pas de balayage dans l'axe latéral, très grossier par rapport à la taille de la structure imagée, pourrait contribuer à expliquer partiellement cette observation. Aussi, les régions où deux sections de tubes étaient pratiquement collées ont été perçues comme une seule section large. Néanmoins, la capacité du système à effectuer des acquisitions sur des volumes 3D a été validée. Enfin, les résultats expérimentaux ont été revus à la lumière des résultats de simulation obtenus précédemment.

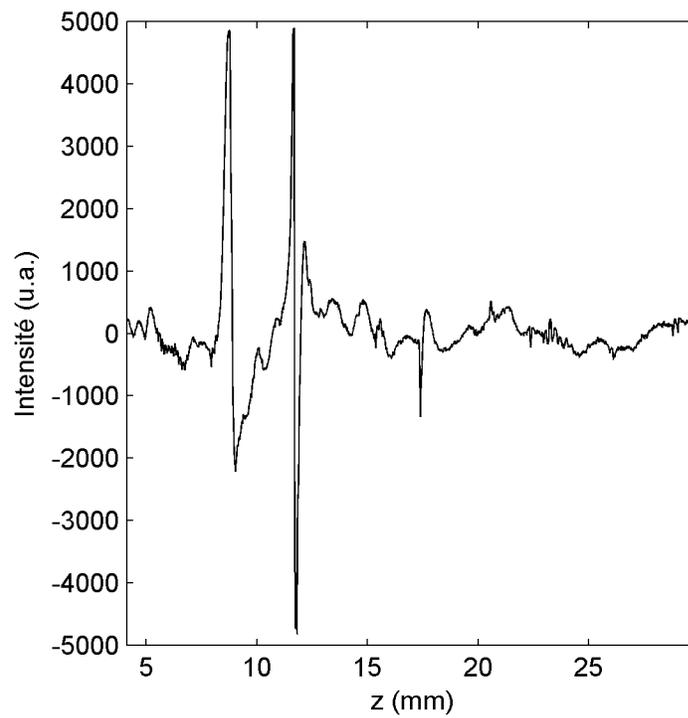


Figure 6.19 Signal photoacoustique RF mesuré au centre d'un cheveux lors d'une acquisition en coupe transversale. L'ondelette la plus à gauche ( $z \approx 8$  mm) correspond à la surface du fantôme, tandis que l'ondelette située à environ 12 mm correspond au cheveux.

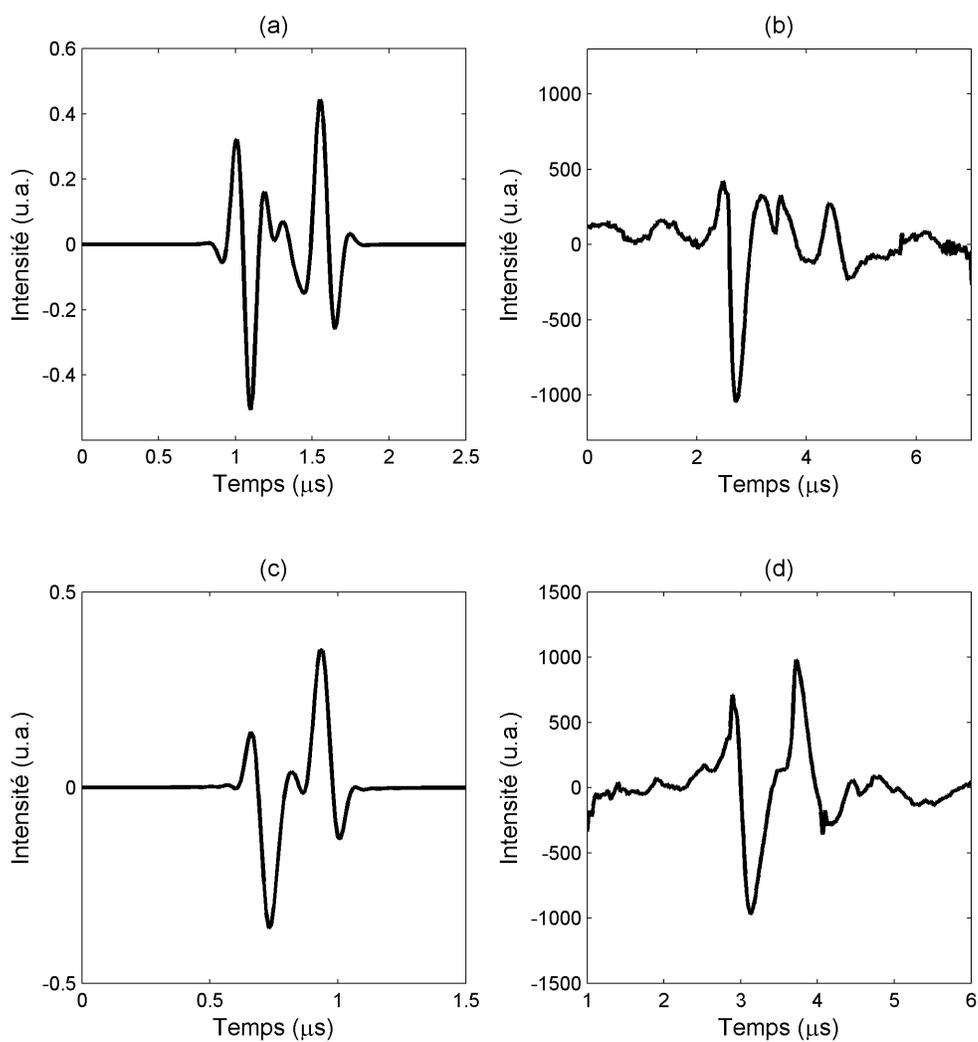


Figure 6.20 Comparaison des signaux PA RF simulés et expérimentaux. (a) Signal de pression simulé pour une pression initiale uniforme avec filtrage passe-bande. (b) Signal PA expérimental pour une solution concentrée de nanoparticules d'or. (c) Signal de pression simulé pour une pression initiale en gradient avec filtrage passe-bande. (d) Signal PA expérimental pour une solution diluée de nanoparticules d'or.

## CHAPITRE 7

### EXPÉRIENCES *IN VIVO*

Ce chapitre présente les expériences animales effectuées dans le cadre de ce projet au Centre de recherche de l'Institut de Cardiologie de Montréal. La première section présente une brève revue de littérature des sondes moléculaires photoacoustiques, ainsi que la sonde utilisée pour ce projet. La section suivante expose les caractéristiques du système vasculaire de la souris et de la fenêtre d'imagerie envisagée. Le protocole suivi pour les acquisitions animales et les résultats obtenus avec le système d'imagerie développé seront décrits dans la troisième section. Enfin, la quatrième section présente la méthodologie et les résultats d'une étude de groupe effectuée avec un système d'imagerie photoacoustique commercial.

#### 7.1 Sondes moléculaires photoacoustiques

##### 7.1.1 Revue de littérature

Parmi les caractéristiques les plus désirables d'une sonde moléculaire, citons un fort contraste, une haute stabilité et une toxicité nulle (Weissleder *et al.*, 2010). Bien que l'imagerie du petit animal ait des contraintes différentes du milieu clinique, la stabilité est l'une des caractéristiques les plus appréciées car le relâchement de traces de métaux potentiellement toxiques à certains niveaux d'acidité peut compromettre des études longitudinales. En effet, certains métaux sont biologiquement compatibles mais peuvent être potentiellement toxiques en fonction du microenvironnement biochimique et de l'état d'oxydation. Dans le cas idéal, les particules devraient être biodégradables ou avoir des routes d'élimination (Weissleder *et al.*, 2010).

#### Nanoparticules d'or

Les avancées en nanotechnologies ont beaucoup contribué au développement d'agents de contraste, fournissant des nanoparticules de diamètre variant entre quelques nanomètres à quelques centaines de nanomètres (Jana *et al.*, 2001). Les nanoparticules dont le mécanisme d'absorption est basé sur la résonance des plasmons de surface (SPR) sont en popularité croissante dans le domaine de l'imagerie optique moléculaire, incluant les nanocages, les nanotiges et les nanocoquilles d'or (Jennings et Strouse, 2007). Ce phénomène leur confère de nouvelles propriétés (Murphy *et al.*, 2008), notamment la possibilité d'absorber la lumière

avec beaucoup plus d'avidité que les matériaux de plus grande taille. Leur pointe d'absorption peut être déplacée dans les régions visible et proche infrarouge par le contrôle des dimensions physiques de leur couche métallique ; elles sont également très stables. Les nanocoquilles d'or (AuNS) sont généralement robustes et offrent une résistance à la dénaturation chimique ou thermique et au photoblanchissage. Pour l'usage *in vivo*, elles sont généralement recouvertes de polyéthylène glycol (PEG) avant injection. L'application initiale des nanocoquilles comme agent de contraste photoacoustique visait à augmenter le contraste proche infrarouge de vaisseaux corticaux dans le cerveau du rat *in vivo* (Wang *et al.*, 2004b). Des nanoparticules d'or (AuNP) ont été utilisées en photoacoustique intravasculaire *ex vivo* (Wang *et al.*, 2009) et sur des cellules de mélanomes ciblées par un anti-EGFR (récepteur du facteur de croissance de l'épiderme) (Li *et al.*, 2008; Mallidi *et al.*, 2009). La détection de AuNP injectées par voie sous-cutanée dans la région abdominale est rapportée dans Eghtedari *et al.* (2007). Le ciblage *in vitro* de cellules du cancer de la prostate humain a également été effectué (Agarwal *et al.*, 2007). La mesure de réponses inflammatoires par des AuNP conjuguées a été montrée *ex vivo* (Kim *et al.*, 2007b). Des nanotiges d'or ont alors été conjuguées à l'anti-ICAM1 (*intercellular adhesion molecule-1*), et des cellules stimulées ciblées par la sonde ont été balayées avec un transducteur à haute fréquence. Les résultats montrent que l'imagerie PA peut différencier les cellules inflammées des cellules de contrôle. Des nanocages d'argent similaires à celles en or ont aussi été développées et testées *ex vivo* (Homan *et al.*, 2010). Une tentative de multiplexage de AuNP a été effectuée par Bayer *et al.* (2011). Bien qu'en général les AuNP ne soient pas considérées comme toxiques (Connor *et al.*, 2005; Shukla *et al.*, 2005), elles peuvent s'accumuler indéfiniment dans le foie et des observations de toxicité ont été rapportées (Chithrani et Chan, 2007; Pan *et al.*, 2007; Cho *et al.*, 2009). La taille des AuNP, leur fonctionnalisation et leur forme influencent notamment la toxicité.

### Nanoparticules porteuses de fluorophores

Des nanoparticules encapsulant des fluorophores usuels sont également fréquemment utilisées en photoacoustique. La classe des cyanines (p. ex. ICG, Cy5 et Cy5.5) est peut-être la classe de fluorophores la plus polyvalente pour l'imagerie *in vivo*, car elles sont disponibles à pratiquement toutes les longueurs d'ondes du visible au proche infrarouge, et donc pour l'imagerie superficielle et de profondeur. L'ICG a été approuvé dans les années 1960 pour évaluer la fonction hépatique et redécouvert dans les années 1990 comme agent d'imagerie. Il possède une forte absorption optique dans la région proche infrarouge, et un contraste photoacoustique par l'ICG sous forme libre a été observé (Wang *et al.*, 2004a). Toutefois, l'ICG a une demi-vie de seulement quelques minutes dans le flot sanguin (Landsman *et al.*, 1976) et son encapsulation en nanoparticules peut stabiliser les molécules du colorant contre

les effets du milieu aqueux. De plus, elle augmente significativement le temps de circulation dans le sang, augmentant la probabilité de liaison des ligands, s'il y a lieu. Kim *et al.* (2007a) ont utilisé des nanoparticules comptant environ 23 000 molécules d'ICG par paquet pour parvenir à un meilleur contraste. En comparaison, l'absorption de nanoparticules d'or est typiquement de 4 à 5 ordres de grandeur plus forte que celle de l'ICG libre (Yang *et al.*, 2009). Également, des nanotubes de carbone porteurs d'ICG ont été conjugués avec des peptides Arg-Gly-Asp (RGD) ciblant l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  pour l'imagerie de souris portant des tumeurs xénogreffées (Zerda *et al.*, 2010). Des sondes photoacoustiques activables commencent aussi à faire leur apparition. Levi *et al.* (2010) ont conçu une sonde photoacoustique à base de deux extincteurs de luminescence (BHQ3 et QXL680) activables par MMP-2 et l'ont testée sur des cultures cellulaires. Indépendamment, Green *et al.* (2010) ont conçu et testé *in vitro* une sonde « désactivable » par MMP-2, étant donné que le signal de la sonde complète est considérablement plus faible que celui de la sonde rompue.

Enfin, il faut noter que le spectre d'absorption et d'émission de tous les chromophores organiques tend à décaler dans chaque solvant ; il faut donc le mesurer dans toutes les conditions expérimentales envisagées. Outre la stabilité, un problème commun et majeur est l'agrégation et la perte des propriétés colloïdales (Weissleder *et al.*, 2010).

### 7.1.2 Sonde utilisée

La sonde moléculaire utilisée pour ce projet est basée sur des nanocoquilles d'or (AuNS) ciblant VCAM-1 chez la souris. L'implication précoce de VCAM-1 ainsi que sa localisation spatiale en surface des vaisseaux ont motivé ce choix (Ley et Reutershan, 2006). La synthèse, caractérisation et validation de la sonde sont rapportées dans Rouleau *et al.* (2013). La sonde est constituée de nanocoquilles ayant un diamètre d'environ 40 nm, d'un anticorps anti-VCAM-1 et de PEG pour augmenter la biocompatibilité. La pointe spectrale d'absorption se situait entre 710 et 735 nm, selon la série produite. La figure 7.1 présente les résultats d'une expérience que nous avons réalisé pour évaluer la sensibilité d'un système d'imagerie PA aux sondes AuNS dans un environnement sanguin. Les fantômes contenaient différentes solutions composées de sang de lapin entier et de AuNS à différentes concentrations. Le système d'acquisition utilisé est un système commercial (Vevo Lazr, Visualsonics, Toronto), tel que justifié à la section 7.4. Le signal de sang entier à OD = 7 (tube 1) était comparable en amplitude à des nanocoquilles à OD=1 (tube 3). Le tube 2, contenant AuNS à environ OD=10, montre un pic à 710 nm dans les mesures multispectrales, ce qui correspond à la pointe de de résonance AuNS (figure 7.1-B).

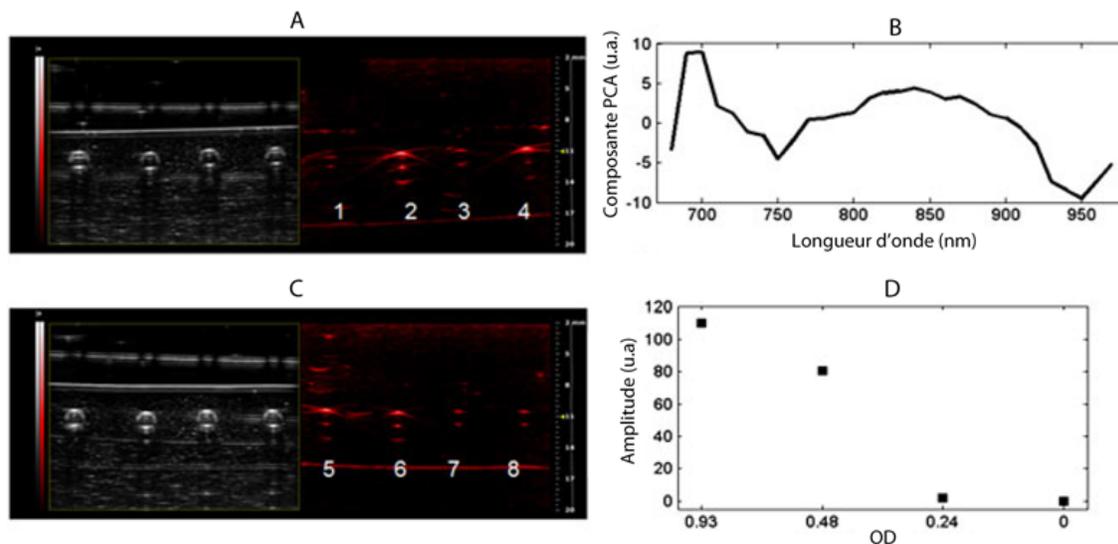


Figure 7.1 Validation *in vitro* de la sonde dans un milieu sanguin. (A,C) Gauche : Échogramme. Droite : Photoacoustique,  $\lambda = 710$  nm. (B) Intensité du signal PA multispectral du tube 2. (D) Intensité du signal PA pour une ROI définie pour les tubes 5-8. Le signal de la ROI du tube 8 a été soustrait de toutes les données. La limite de détection du système est estimée à environ  $OD = 0,24$ . Les tubes contiennent : 1-Sang de lapin entier (sang)  $OD=7$ , 2-AuNS  $OD=10$ , 3-AuNS  $OD=1$ , 4-Sang+AuNS  $OD=2,5$ , 5-Sang+AuNS  $OD=0,93$ , 6-Sang+AuNS  $OD=0,48$ , 7-Sang+AuNS  $OD=0,24$ , 8-Sang seul.

## 7.2 Échocardiographie de la souris

L'étude *post mortem* de l'aorte est l'une des premières applications de l'effet PA pour la caractérisation des tissus (Beard et Mills, 1997). Plus récemment, Taruttis *et al.* (2010) ont investigué la dynamique cardiovasculaire de la souris *in vivo*, montrant le contraste sanguin de l'arche aortique en vue transversale avec un transducteur hémisphérique centré à 5 MHz. Une injection de nanotiges d'or non ciblées a également été réalisée lors d'une acquisition sur la veine jugulaire chez la souris (Taruttis *et al.*, 2010). Chez la souris, le coeur a été ciblé pour l'imagerie PA du contraste sanguin en temps réel (Zemp *et al.*, 2008). Taruttis *et al.* (2012) ont implémenté le recalage des mouvements de la systole et de la diastole pour cette application. Le système cardiovasculaire de la souris est très similaire à celui de l'humain, hormis la taille, le rythme cardiaque - dont la valeur typique est de 500-600 battements par minute au repos - et des petites différences anatomiques (Michael *et al.*, 2004). Les différences se situent surtout au niveau du système veineux du coeur, dont la surface est couverte par un grand nombre de veines. Celles-ci sont beaucoup plus faciles à voir que les artères coronariennes, plus profondes et cachées (Michael *et al.*, 2004). Les branches principales de l'aorte des souris sont similaires à celles des humains (Green, 1966). L'artère brachiocéphalique quitte l'arche

aortique et se divise elle-même en deux embranchements, soient l'artère carotide commune droite et l'artère subclavienne droite. À une distance d'environ 1 mm distalement sur l'arche se trouve la carotide commune gauche, suivie latéralement par l'artère subclavienne gauche (voir figure 7.4). Le diamètre de l'aorte chez la souris est d'environ 1,2-1,5 mm, selon le type et l'âge (Foster *et al.*, 2000).

La figure 7.2 montre l'anatomie d'une souris tel qu'obtenu en imagerie par résonance magnétique par Zhou *et al.* (2004b), tandis que la figure 7.3 présente la structure du coeur et ses principaux embranchements. Dans une section transversale au niveau de l'arche aortique, le faisceau lumineux ou ultrasonore doit traverser la peau, les muscles pectoraux, les côtes ou les muscles intercostaux ainsi que le thymus pour parvenir à l'aorte. Dans les conditions normales, la taille du thymus varie en fonction de l'âge de l'animal. Chez la souris jeune, le thymus est bien développé, tandis que chez la souris adulte ou âgée il est atrophié et difficile à détecter macroscopiquement (Covelli, 2006). Des variations de taille sont observables pour certaines maladies, en particulier les lymphomes localisés. Dans ces cas, le thymus devient très large, plus rigide et de couleur blanche. Ces variations sont susceptibles d'affecter la transmission du signal optique ou acoustique dans cette région.

Il existe environ 15 coupes différentes pour l'échographie transthoracique chez la souris (Zhou *et al.*, 2004b), dont deux permettent de voir très clairement l'aorte ascendante en vue longitudinale (« grand-axe ») (voir figure 7.4). Les vaisseaux sanguins sont échogènes parce qu'ils contiennent beaucoup de tissu conjonctif, qui a une haute impédance acoustique. La vue complète de l'arche aortique (RL4) permet notamment de distinguer les bifurcations de trois principales artères, lieux susceptibles de la formation précoce de la plaque athéroscléreuse. La vue RL3 est plus facile à obtenir *in vivo* étant donné l'angle moins prononcé du transducteur. Les détails du positionnement sont rapportés dans le tableau 7.1. Les axes et plans de référence sont présentés à la figure 7.5.

Tableau 7.1 Sommaire des coupes d'échocardiographie transthoracique pour une vue de l'aorte ascendante/arche aortique chez la souris.

Code	Position du transducteur	Direction axe central	Orientation du plan
RL3	Milieu 1/3 du thorax	Légèrement vers la gauche et postérieur, $\approx 70^\circ$ avec plan coronal	Parallèle à l'axe central
RL4	Milieu 1/3 du thorax	Vers la gauche et postérieur, $\approx 40^\circ$ avec plan coronal	Parallèle à l'axe central

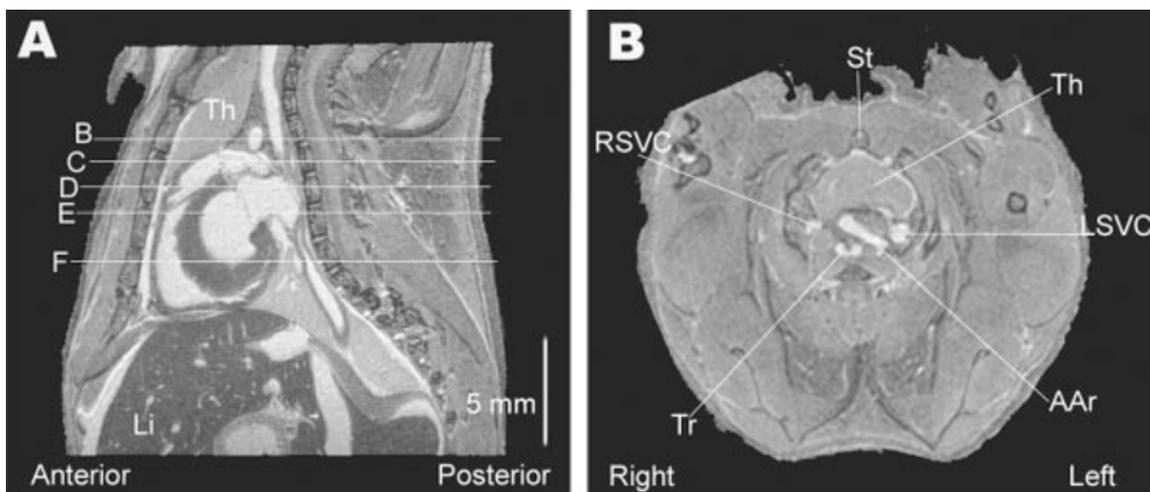


Figure 7.2 Images en résonance magnétique d'une souris adulte C57BL/6 *post mortem*. (A) Section sagittale à mi-largeur. (B) Section transversale au niveau de l'arche aortique (AAr). (LSVC : veine cave supérieure gauche, RSVc : veine cave supérieure droite, St : sternum, Th : thymus, Tr : trachée.). Tiré de Zhou *et al.* (2004b).

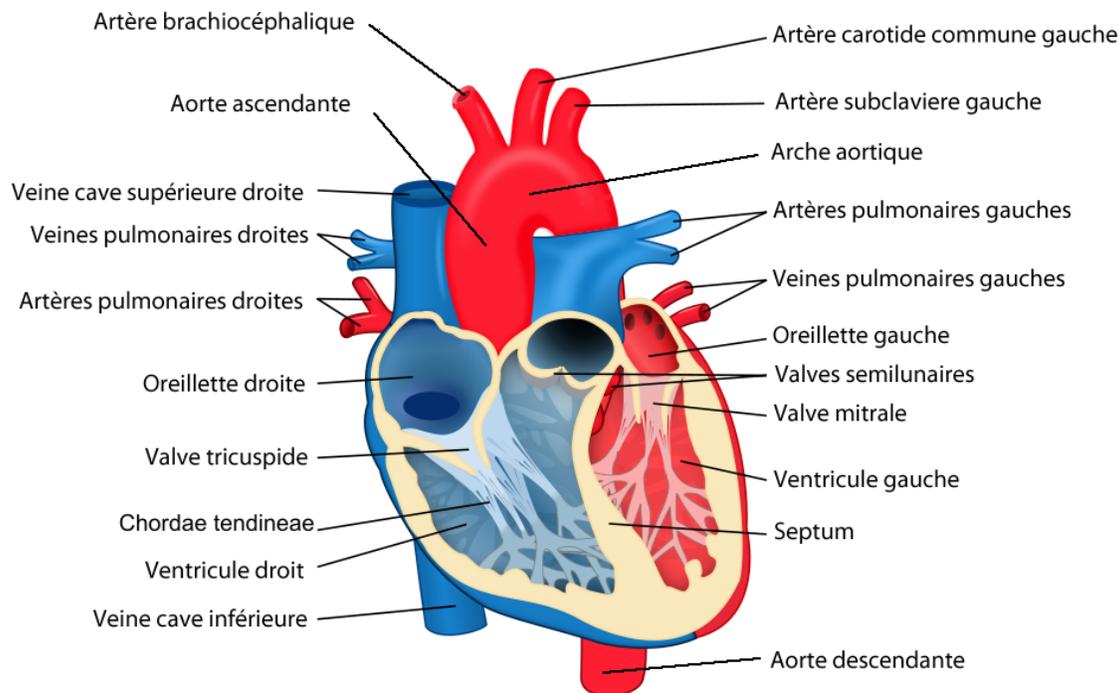


Figure 7.3 Coeur et ses principaux embranchements. Adaptée de Zoofari (2011).

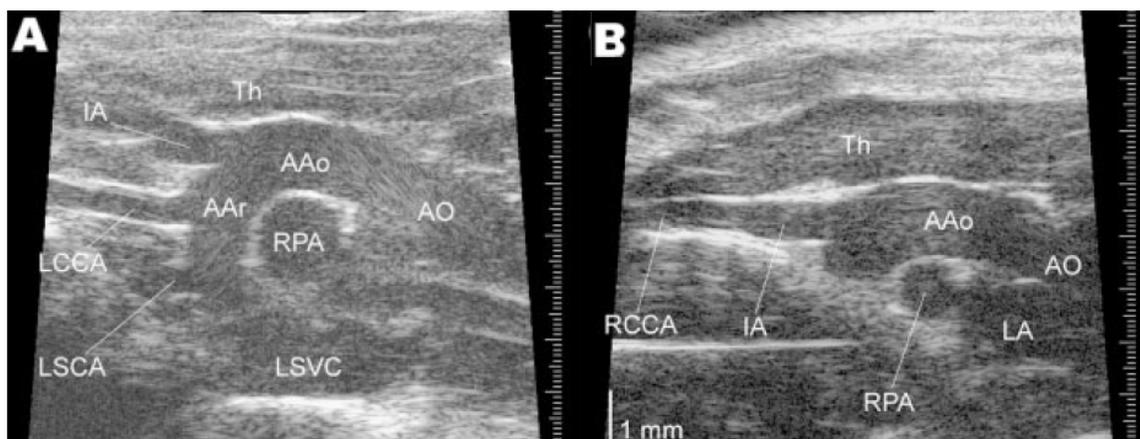


Figure 7.4 Coupes échographiques pour une vue de l'aorte ascendante. (A) Vue parasternale longitudinale droite RL4. (B) Vue parasternale longitudinale droite RL3. (AAo : aorte ascendante, AAr : arche aortique, AO : orifice aortique, IA : artère brachiocéphalique (*innominate artery*), LA : oreillette gauche, LCCA : Artère carotide commune gauche, LSCA : artère subclavière gauche, LSVC : veine cave supérieure gauche, RSVC : veine cave supérieure droite, St : sternum, Th : thymus, Tr : trachée.). Tiré de Zhou *et al.* (2004b).

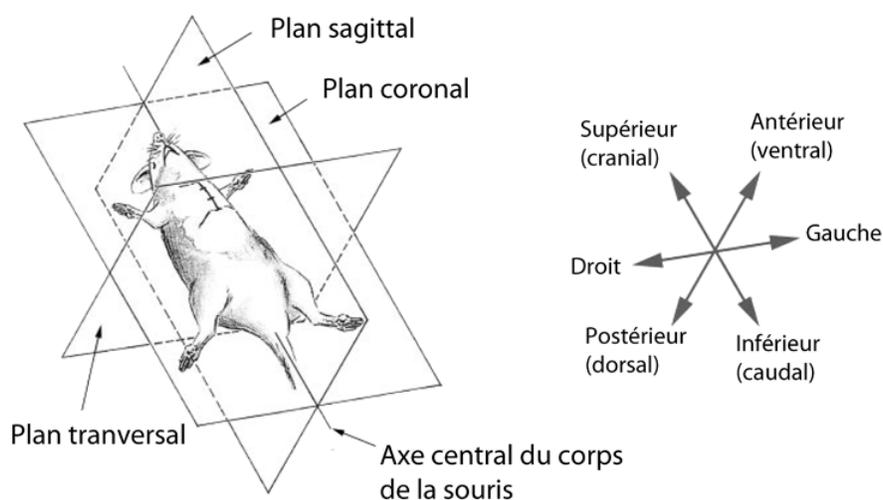


Figure 7.5 Plans et axes de référence pour l'échocardiographie. Adapté de Zhou *et al.* (2004b).

## 7.3 Acquisitions avec transducteur monoélément

### 7.3.1 Méthodologie

Le protocole d'imagerie a été approuvé au préalable par le Comité d'éthique du Centre de recherche de l'Institut de Cardiologie de Montréal. Toutes les manipulations animales ont été effectuées sous anesthésie à l'isoflurane (induction : 2,5% ; maintien 1,3-1,5%) via un cône respiratoire (induction : 1,0 L/min O<sub>2</sub> ; maintien : 0,6 L/min. O<sub>2</sub>). L'isoflurane permet des acquisitions d'une durée de plusieurs heures (Szczyzny *et al.*, 2004) ; il est inotrope négatif mais produit généralement une dépression cardiaque minimale chez la souris (Tanaka *et al.*, 1996). Du gel protecteur a d'abord été étendu sur les yeux de l'animal (Lacri-Lube, Allergan Inc., CA). À l'aide d'une crème épilatoire (Veet, Reckitt Benckiser, UK), l'animal est ensuite épilé au niveau du thorax pour éviter les artéfacts dus à des poches d'air dans les poils, mais aussi la génération de signal PA par ces derniers. Dans le cas où une injection est nécessaire, l'animal est réveillé pendant au moins une heure afin de faire remonter la pression artérielle pour faciliter le placement de l'aiguille. L'animal est anesthésié à nouveau et placé en position couchée, sur le dos ou le ventre selon la configuration choisie. Dans le cas des acquisitions avec injection de la sonde moléculaire, une aiguille (30G) reliée à la seringue par un tube flexible est insérée dans une des veines caudales. Du gel ultrasonore est appliqué sur la région à imager, puis un bassin d'eau tiède contenu dans une membrane de polyéthylène (Saran Premium Wrap, SC Johnson) est abaissé. De l'eau tiède doit être substituée dans le contenant à intervalle périodique. Dans le cas de la position ventrale, l'eau du bassin est régulée à l'aide d'un élément chauffant et d'une pompe de circulation. L'eau est chauffée à l'avance pendant plusieurs heures pour enlever le maximum d'oxygène solubilisé dans l'eau et éviter la cavitation ou la formation de bulles sous le transducteur.

### 7.3.2 Résultats

Étant donné que le sang est un absorbant dominant dans la fenêtre proche infrarouge, il est la première source de contraste en imagerie photoacoustique *in vivo*. Le contraste vasculaire doit donc être étudié préalablement à toute imagerie moléculaire, sachant qu'il dominera l'amplitude du signal pour les concentrations envisageables pour les expériences *in vivo*, tel que montré lors d'acquisitions sur fantôme au chapitre précédent.

Une première série d'expériences ont d'abord été menées dans le but de valider le contraste échographique généré aux interfaces des tissus mous. Pour des raisons de simplicité, la première coupe choisie est l'axe parasternal court, dans le mode ventral. La figure 7.6 montre un exemple d'image US obtenue dans la région cardiaque, en comparaison avec celle prise avec un système échographique commercial. Les différents tissus mous peuvent être distingués,

ainsi qu'un bruit granulaire (*speckle*) qui leur est typique.

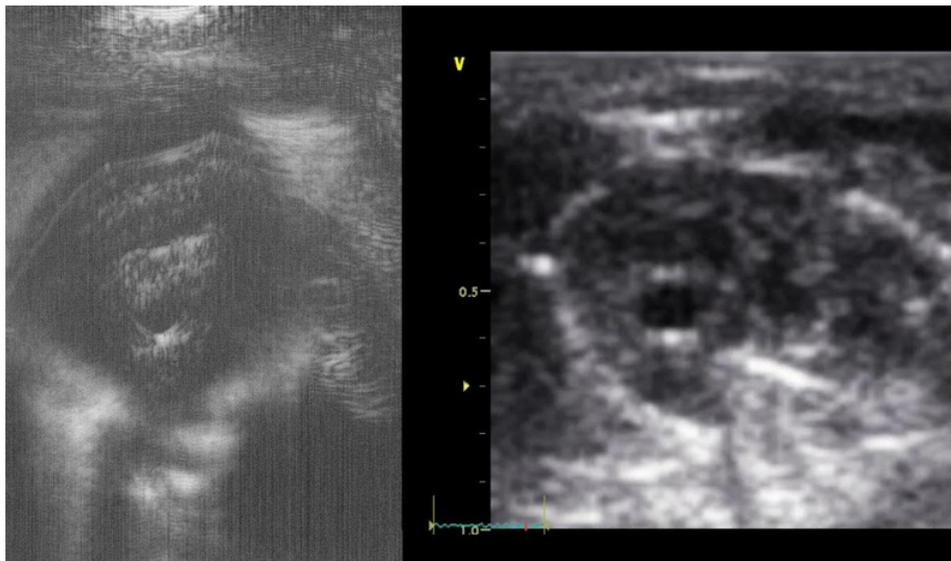


Figure 7.6 Validation *in vivo* du contraste échographique. (A) Image du coeur prise avec le système oscillant avec transducteur de 10 MHz. (B) Image du coeur prise avec un système commercial à 13 MHz (Vivid 5, GE Healthcare).

Une seconde série d'acquisitions ont été effectuées dans cette configuration afin de distinguer un contraste sanguin, mais également la présence d'une sonde moléculaire. Toutefois, la position des tranches n'a pas pu être répétée de manière systématique. La figure 7.7-A montre une image PAUS obtenue dans la région aortique en coupe transversale, où l'aorte et la veine cave supérieure gauche ont pu être identifiées. Les résultats montrent la présence de nanocoquilles dans les segments vasculaires immédiatement après l'injection. Aucune augmentation de contraste n'a été observée en dehors des vaisseaux. Des comparaisons de groupes n'ont pas été possibles suite aux difficultés liées à l'alignement du système pour obtenir une vue cohérente pour tous les animaux.

Une série d'expériences ont été entreprises dans l'axe parasternal long, dans le mode où la souris était couchée sur le dos. Les résultats des acquisitions échographiques ont permis de reconnaître aisément l'arche aortique et l'aorte ascendante, tel que montré à la figure 7.8. Les résultats de l'imagerie photoacoustique, dont un exemple est présenté à la figure 7.9, montrent qu'un grand nombre de structures absorbantes difficiles à reconnaître génèrent du contraste entre la surface et la région d'intérêt. Cette différence par rapport à la position transversale, présenté précédemment, pourrait être expliquée par la combinaison de l'angle prononcé du transducteur et de la présence au milieu du thorax de nombreuses structures dont les poumons, le coeur et de nombreux vaisseaux sanguins artériels et veineux.

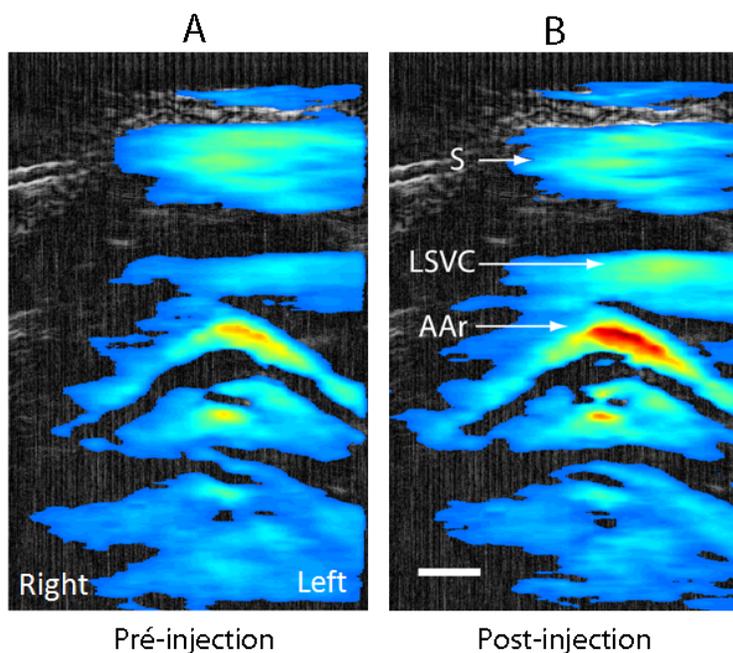


Figure 7.7 Image PA à 710 nm dans la région de l'arche aortique (AAr), en coupe parasternale court-axe. (A) Pré-injection. (B) Post-injection ( $t = 3 \text{ min } 20 \text{ s. p.i.}$ ). (S : sternum, LSVC : veine cave supérieure gauche. Barre : 1 mm.).

Les limitations principales du système développé pour l'application envisagée sont donc un faible taux d'acquisition comparé au rythme cardiaque de la souris ainsi que les difficultés liées au positionnement du transducteur dans le plan d'imagerie.

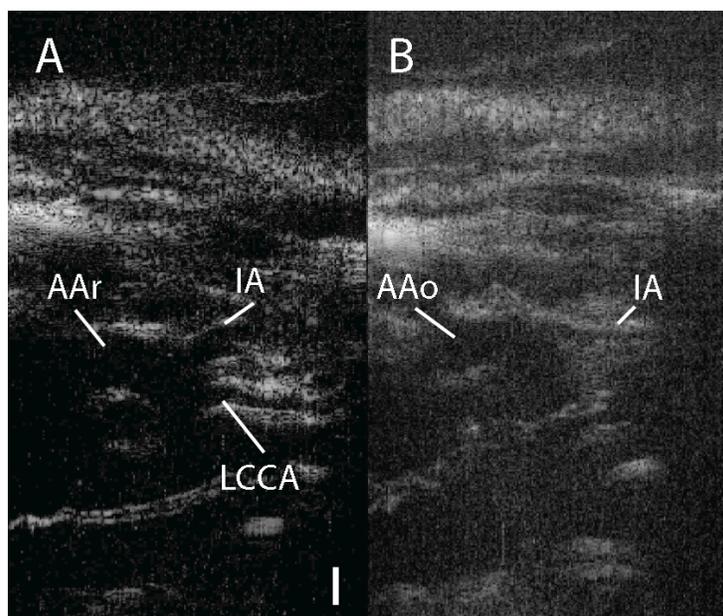


Figure 7.8 Échographie de la région aortique, en coupe parasternale grand-axe. (A) Coupe RL4 montrant l'arche aortique, l'artère brachiocéphalique et la carotide commune gauche. (B) Coupe RL3 montrant l'aorte ascendante et l'artère brachiocéphalique. Barre : 1 mm.

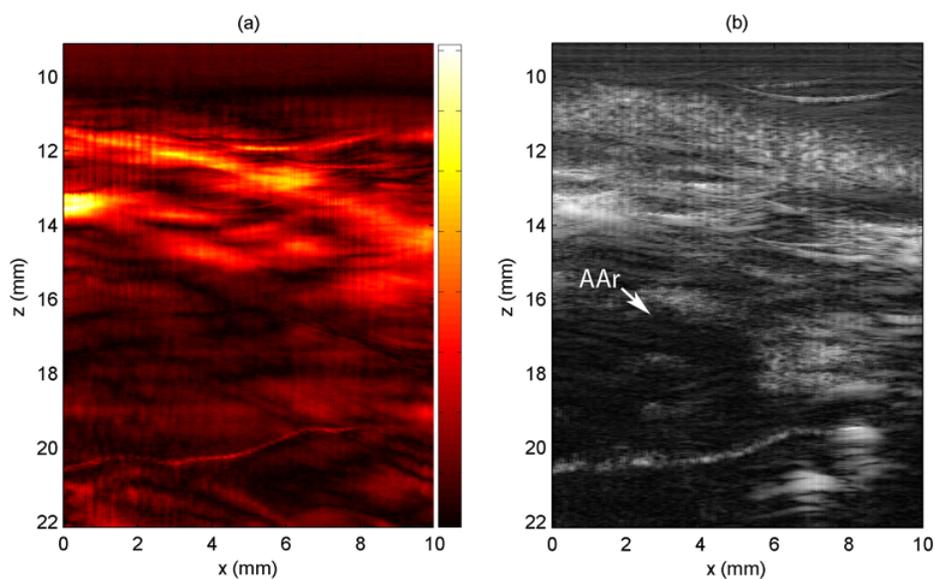


Figure 7.9 Images PA à 680 nm de la région aortique dans l'axe parasternal long. (A) Contraste PA. (B) Contraste échographique montrant l'arche aortique (AAr).

## 7.4 Acquisitions avec système commercial

Cette section présente une étude *in vivo* réalisée sur un groupe de souris à l'aide d'un système d'imagerie photoacoustique commercial (Vevo Lazr, VisualSonics, Toronto). Les principales améliorations par rapport au système précédent sont un taux de répétition élevé dû au transducteur matriciel, le monitoring continu de la puissance du laser ainsi que l'automatisation de l'OPO. Le transducteur utilisé (LZ-250) a une largeur de bande de 13-24 MHz. Les dimensions maximales d'une région d'intérêt en imagerie 2D sont de 23 X 30 mm avec une résolution spatiale de  $\approx 75 \mu\text{m}$  (axial) par  $\approx 165 \mu\text{m}$  (latéral). La figure 7.10 montre le transducteur de l'appareil. L'énergie par impulsion a été mesurée à 25 mJ à 680 nm.

Le protocole d'expérience animale décrit dans la section suivante est lui-même le fruit d'un long processus d'expérimentation. En effet, nous avons été les premiers au laboratoire à effectuer des acquisitions *in vivo* sur des souris. Qui plus est, le savoir-faire de régulation de la température de l'animal ainsi que du contrôle du niveau d'anesthésie sous isoflurane par la surveillance continue des signaux vitaux est difficile à acquérir autrement que par l'expérience. Cela s'applique aussi à la reconnaissance du contraste échographique et photoacoustique *in vivo*. Également, les acquisitions d'imagerie moléculaire sont longues comparativement aux séances d'échographie servant à relever les paramètres anatomiques CV communs, c'est pourquoi l'ajustement précis de la concentration d'anesthésiant est d'autant plus critique. Enfin, il faut noter que chez la souris le placement d'aiguille pour injection caudale est une procédure très délicate qui est rendue difficile par la chute de pression artérielle due à l'anesthésie.

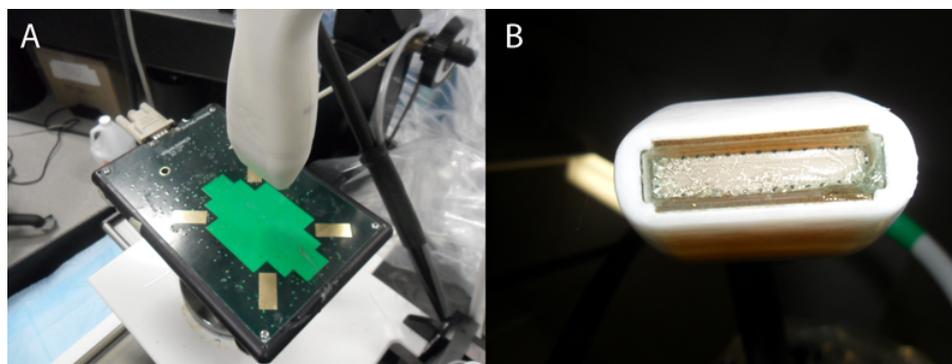


Figure 7.10 Transducteur matriciel du système Vevo. (A) Vue avec une plate-forme de régulation de la température (Visualsonics, Toronto). (B) Vue de la cavité du transducteur. L'élément de détection est au centre ; les fibres de l'illumination sont disposées au pourtour.

### 7.4.1 Méthodologie et résultats

Le système a d'abord été caractérisé sur fantômes pour produire les résultats montrés aux figures 7.1 et 7.11. Le contraste obtenu pour des tubes est similaire au contraste obtenu avec le système conçu sur mesure. En effet, la bande fréquentielle du transducteur matriciel est très haute par rapport à la taille des structures, ce qui se traduit par un filtrage passe-haut. L'effet de l'augmentation du gain du système révèle les déphasages utilisés par l'algorithme de reconstruction d'image (figure 7.11-B). La figure 7.12 montre que le système a permis de localiser l'aorte ascendante et l'arche aortique dans les coupes échographiques standards.

Le protocole d'imagerie a été approuvé au préalable par le Comité d'éthique du Centre de recherche de l'Institut de Cardiologie de Montréal. Les manipulations animales ont été effectuées sous anesthésie à l'isoflurane (induction : 2,5% ; maintien 1,3-1,5%) à l'aide d'un cône respiratoire (induction : 1,0 L/min O<sub>2</sub> ; maintien : 0,6 L/min. O<sub>2</sub>) ; les animaux sont aussi placés sur un coussin chaud dont la température initiale est fixée à 37°C (SnuggleSafe, Lenric C21, UK). D'abord, du gel a été étendu sur les yeux des animaux afin de les protéger (Lacri-Lube, Allergan Inc., CA). Les animaux ont ensuite été épilés (Veet, Reckitt Benckiser, UK) au niveau du thorax, puis réveillés pendant au moins une heure afin de rehausser la pression artérielle pour faciliter le placement de l'aiguille servant à l'injection. Chaque animal a été anesthésié à nouveau et placé en position couchée sur le dos sur le coussin chaud. Comme celui-ci ne permettait pas la régulation électronique de la température, une lampe a également été utilisée pour aider au maintien de la température de l'animal. Une aiguille (30G) reliée à une seringue de 1 cm<sup>3</sup> par un tube flexible a été insérée dans une des veines caudales. Du gel ultrasonore a ensuite été appliqué sur la région à imager ainsi que dans la cavité du transducteur.

Une première série d'expériences non terminales ont été effectuées sur des souris C57BL/6 (n=6) afin de révéler le contraste photoacoustique endogène du système vasculaire dans la région aortique. Ces acquisitions étaient destinées à évaluer la capacité de détection du système photoacoustique commercial, ainsi qu'à l'entraînement sur ce système. Pour chaque souris, le transducteur a été positionné dans l'axe longitudinal RL3 et RL4 à l'aide de la validation échographique. Le contraste PA a été enregistré pour chaque position, en faisant varier la longueur d'onde d'illumination.

La figure 7.13 montre les résultats typiques obtenus pour ces expériences. Dans la quasi-totalité des cas, un signal PA est généré à l'interface supérieure de l'aorte ascendante, ainsi qu'à la bifurcation de l'artère brachiocéphalique (voir figure 7.14). La surface du coeur est aussi bien visible, à gauche et en haut du signal aortique. Dans certains cas, l'artéfact de doublement de la surface apparaît dans la région d'intérêt, créant ce qu'on pourrait appeler un *faux positif* (voir figure 7.15). Cet artéfact apparaît souvent comme un signal puissant à

une grande profondeur, ce qui est peu probable pour une acquisition dans une région très perfusée. La vérification des distances au transducteur permet de les discriminer, sachant qu'ils apparaissent au double de la distance de la surface. Bien que ces artefacts semblent inévitables pour les systèmes actuels, une correction de la distance du transducteur par rapport à l'animal durant l'acquisition permet généralement de les sortir de la région d'intérêt. Le signal PA observé est similaire au « lobe » proximal au vaisseau visualisé lors des expériences sur fantômes avec un tube de taille comparable à l'aorte. Une différence importante observée *in vivo* est que le lobe distal n'apparaît pas pour l'aorte ascendante, ce qui pourrait traduire une absorption plus importante que prévue ou une fluence plus faible.

Par la suite, une étude de groupe a été réalisée sur des souris ApoE<sup>-/-</sup> (n=6) et des souris de contrôle C57BL/6 (n=6). Cette série d'expériences de type pharmacocinétique ont été menées en utilisant la sonde moléculaire à base d'AuNS. L'objectif de cette étude était de mesurer l'activité temporelle de la sonde ciblant VCAM-1 dans la région aortique suite à l'injection, et ce, pour chaque groupe de souris. Pour ce faire, chaque animal a été préparé suivant le protocole décrit précédemment. Le transducteur a été placé en position RL4 et une première acquisition PA a été effectuée à 680 nm pour s'assurer de la présence d'un contraste vasculaire dans la région aortique. Deux longueurs d'ondes ( $\lambda_1 = 734$  nm et  $\lambda_2 = 950$  nm) ont été alternées en continu pour les acquisitions subséquentes, la pointe spectrale de la sonde ayant été mesurée comme étant 735 nm. Un enregistrement de référence pré-injection d'une durée de 9 minutes a été effectué, suivi de l'injection ; la durée de l'injection a varié entre 1 et 2 minutes selon l'animal. L'acquisition a été réalisée de manière continue durant l'injection. La durée moyenne d'enregistrement post-injection était de 30 minutes, bien qu'une acquisition ait été interrompue après 15 minutes. Deux souris de contrôle ont également été exclues de l'étude à cause du mouvement du transducteur hors de la région d'intérêt durant les acquisitions. La figure 7.16 montre les résultats moyennés par groupe de souris. Pour chaque sujet, le signal PA a été moyenné dans une région d'intérêt polygonale couvrant la portion identifiable de l'aorte ascendante et l'artère brachiocéphalique définie pour chaque décours temporel. Pour chaque acquisition, le signal a été normalisé par rapport à la moyenne du décours temporel pré-injection. La barre d'erreur indique l'écart type divisé par  $\sqrt{n}$ . Les courbes de certaines acquisitions sur Apoe à 734 nm ont montré une forte hausse du signal après injection, tel que montré à la figure 7.17 pour les sujets Apoe7 et Apoe8. Cette hausse a contribué à produire la tendance visible sur la moyenne des signaux. Toutefois, cet effet n'a pas été observé chez toutes les souris, par exemple les sujets Apoe3 et Apoe5 de la figure 7.17. Cela s'est traduit par un grand écart type sur les courbes de groupe. Le signal à 950 nm était destiné à fournir une base de comparaison loin de la pointe d'absorption maximale de la sonde. Toutefois, la puissance du laser est réduite à cette longueur d'onde.

Bien que cette disparité spectrale soit partiellement compensée par l'utilisation d'un diviseur de faisceau/puissancemètre, le rapport signal à bruit demeure évidemment plus faible. À la lumière de ces résultats, nous ne pouvons donc conclure à une différence significative entre groupe, ou causée par l'injection de la sonde.

Plusieurs facteurs pourraient expliquer ces observations. En premier lieu, le transducteur filtre une grande portion du signal photoacoustique, tel que montré en simulation et lors des expériences sur fantômes. Le système possède la sensibilité nécessaire pour visualiser un contraste purement vasculaire mais le rapport contraste à bruit pourrait être insuffisant pour mesurer l'activité d'une sonde diluée dans un absorbant aussi fort que le sang. Également, une fluence trop faible dans la région de l'arche aortique pourrait diminuer l'amplitude de la pression initiale. En effet, la région cardiaque située immédiatement sous l'arche est très absorbante et rediffuse peu les photons vers les régions adjacentes. La région supérieure à l'arche contient aussi de nombreux vaisseaux sanguins. La fenêtre de transmission optique est donc limitée au thymus, qui recouvre l'aorte ascendante et l'arche. Cette fenêtre est étroite comparativement à la surface d'illumination du transducteur, et une majorité de la distribution initiale de pression se trouve hors de la région d'intérêt. Enfin, les vaisseaux connectés au coeur bougent suivant le rythme cardiaque, ce qui est observable autant en échographie qu'en PA avec le contraste sanguin. Ainsi, le contraste varie en fonction du cycle cardiaque, ce qui pourrait contribuer à la variabilité observée sur les décours temporels PA. Les mouvements respiratoires, de forte amplitude, sont également très présents et provoquent le soulèvement du thorax par rapport au transducteur.

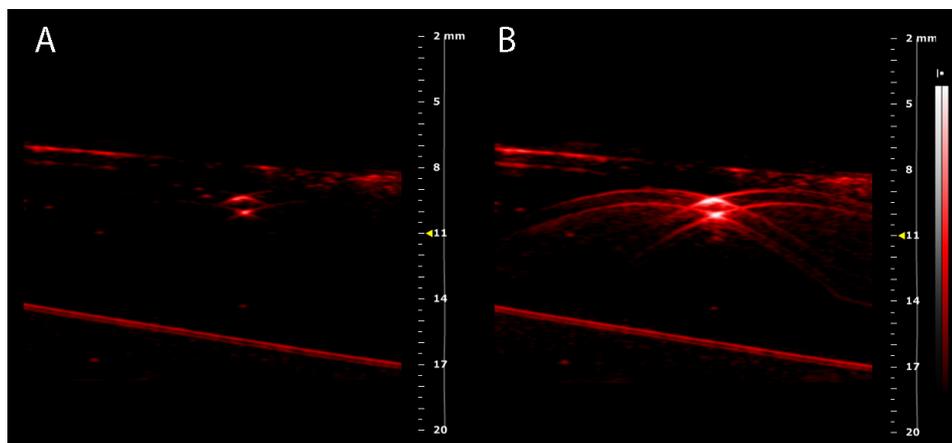


Figure 7.11 Contraste PA d'un fantôme avec le système Vevo. (A) Gain moyen. (B) Gain maximal. L'artéfact de dédoublement de la surface est visible sur les deux images.

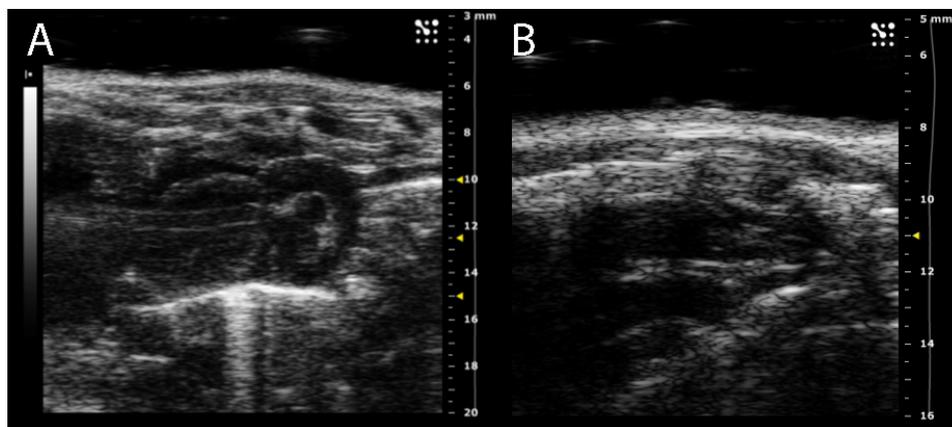


Figure 7.12 Échographie de la région aortique avec le système Vevo, en coupe parasternale grand-axe. (A) Coupe RL4 montrant l'arche aortique, l'artère brachiocéphalique et la carotide commune gauche. (B) Coupe RL3 montrant l'aorte ascendante et l'artère brachiocéphalique.

## 7.5 Conclusion

La présence des poumons limite l'imagerie ultrasonore de l'arche aortique à certaines fenêtres, utilisées entre autres pour l'échocardiographie. Le système conçu et développé pour ce projet a permis d'obtenir un contraste échographique *in vivo* pour valider le positionnement du transducteur. Des expériences préliminaires ont permis de mesurer une augmentation de contraste vasculaire à la suite de l'injection d'une sonde moléculaire photoacoustique. Un système d'acquisition photoacoustique commercial a permis d'obtenir des résultats supplémentaires avec un taux de répétition supérieur. Un contraste sanguin de l'aorte ascendante et de l'artère brachiocéphalique a alors été observé de manière répétable. Une étude pharmacocinétique a été menée sur un groupe de souris ApoE<sup>-/-</sup> et un groupe de souris contrôle afin de mesurer l'activité temporelle suite à l'injection d'une sonde moléculaire ciblant VCAM-1 dans la région de l'aorte ascendante et de l'artère brachiocéphalique. Les résultats de cette étude n'ont pas permis de mesurer une augmentation significative du signal PA moyen suivant l'injection. La bande passante réduite du transducteur, une fluence limitée dans la région aortique ainsi que les mouvements respiratoires et cardiaques sont les principaux facteurs envisagés pour expliquer ces résultats.

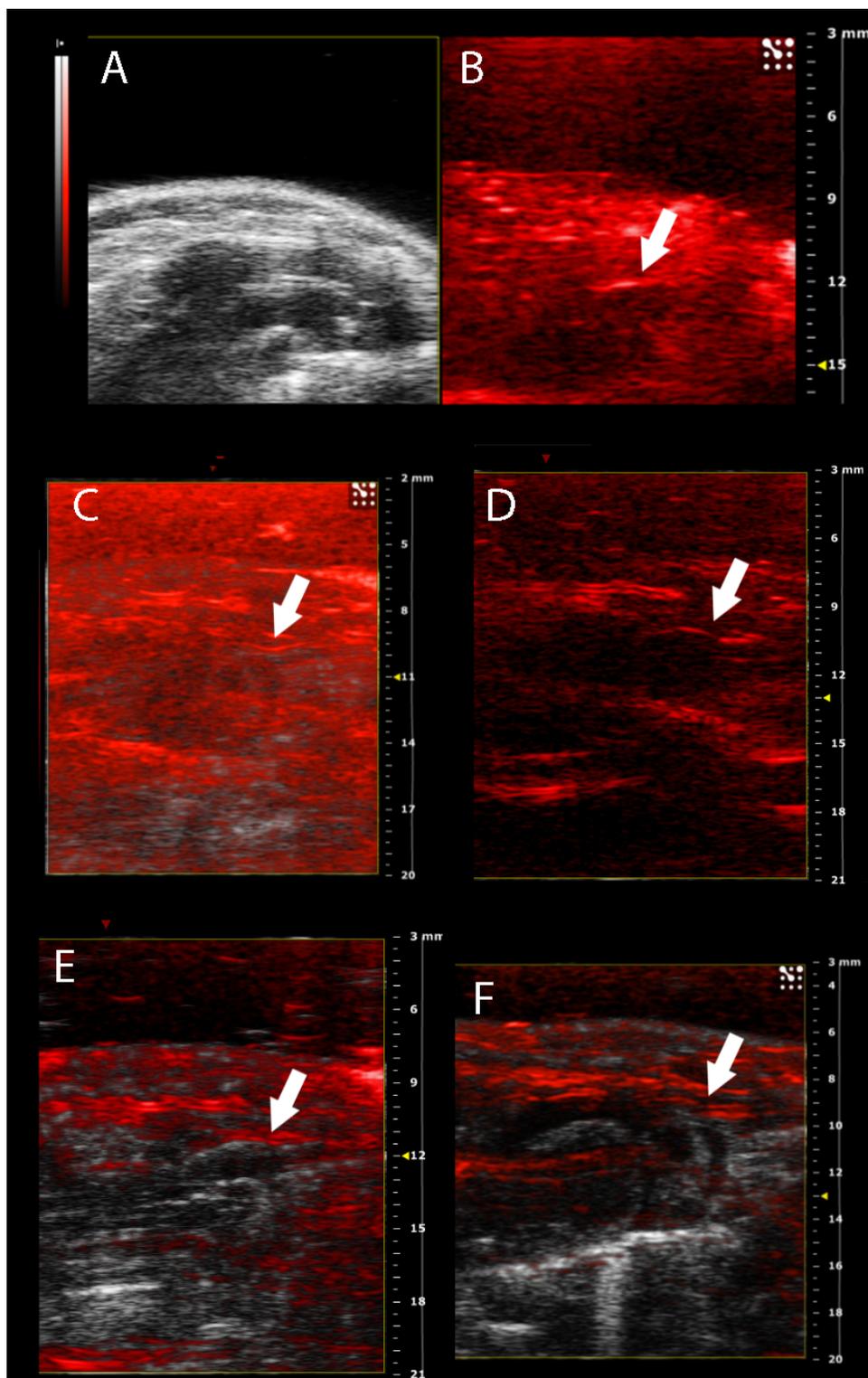


Figure 7.13 Contraste PA endogène de l'arche aortique à 734 nm. (A) Échographie associée à l'image B. (B)-(F) Images PA obtenues *in vivo* sur 5 souris distinctes C57BL/6.

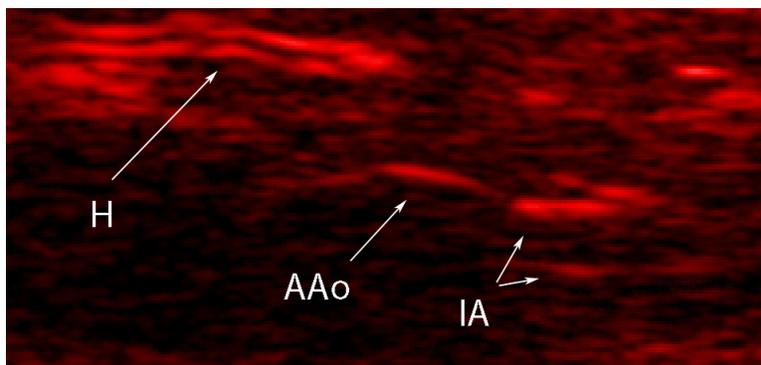


Figure 7.14 Détail d'une image PA de l'arche aortique d'une souris C57BL/6. (AAo : aorte ascendante, H : coeur, IA : artère brachiocéphalique.).

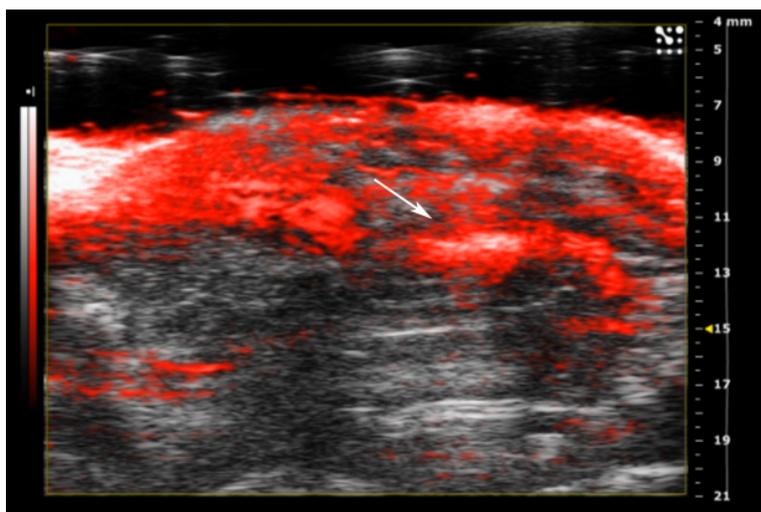


Figure 7.15 Artéfact de dédoublement lors d'une expérience *in vivo*. Flèche : L'artéfact apparaît dans la région aortique et masque le signal véritable.

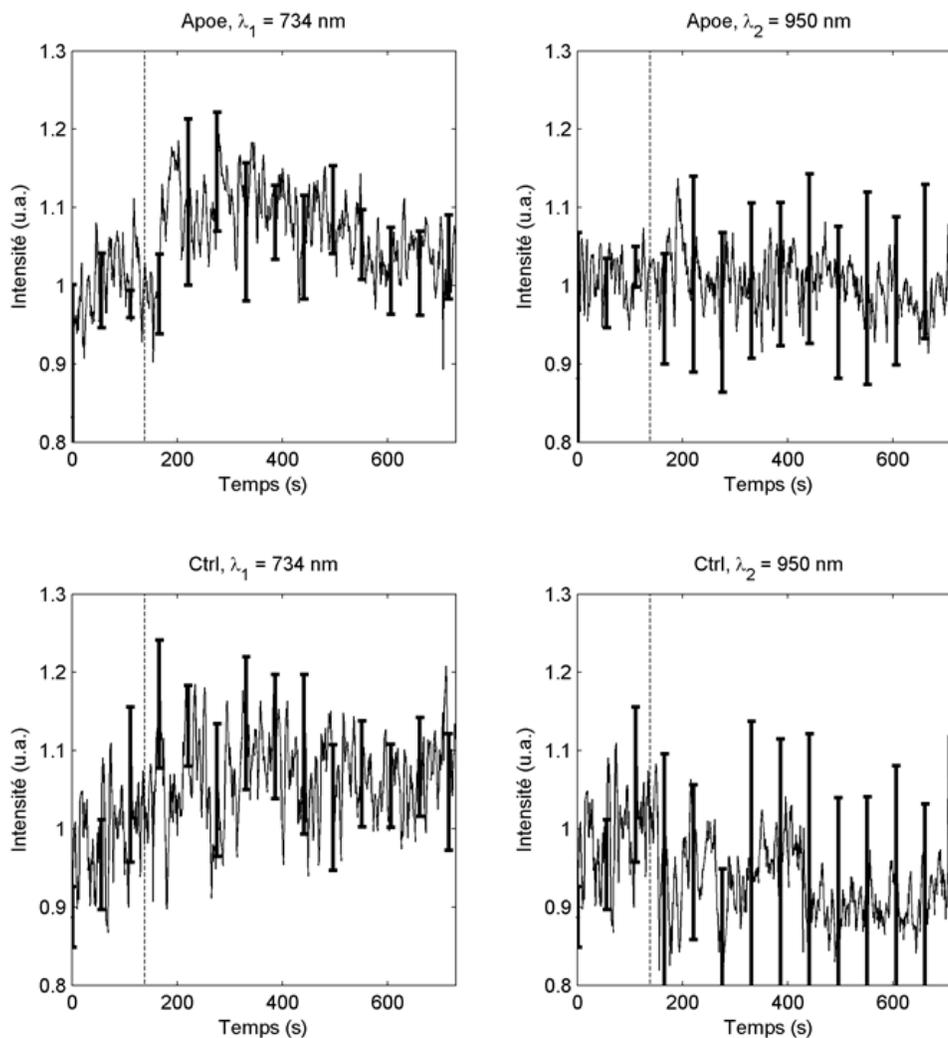


Figure 7.16 Moyenne des signaux PA dans la région aortique avec injection de AuNS. Le transducteur a été positionné dans l'axe parasternal long et l'acquisition a été effectuée en continu avec deux longueurs d'ondes ( $\lambda_1 = 734$  nm et  $\lambda_2 = 950$  nm). Les décours temporels sont normalisés par la moyenne du segment précédant l'injection. Les courbes montrées sont les moyennes sur 6 (Apoe) et 4 (Ctrl) animaux; les barres d'erreur correspondent à l'écart type normalisé. Ligne pointillée : Événement du début d'injection.

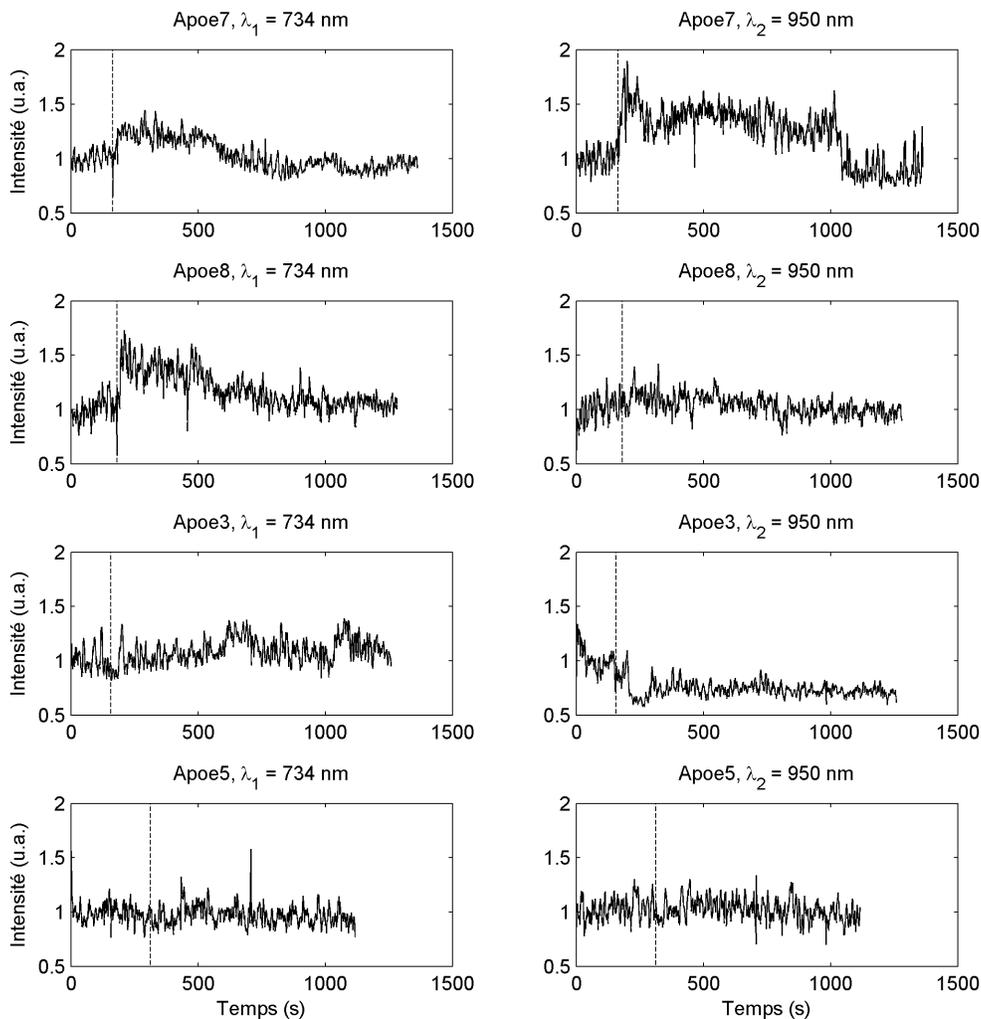


Figure 7.17 Signaux PA sélectionnés dans la région aortique avec injection de AuNS. Le transducteur a été positionné dans l'axe parasternal long et l'acquisition a été effectuée en continu avec deux longueurs d'ondes (Gauche :  $\lambda_1 = 734$  nm, Droite :  $\lambda_2 = 950$  nm). Les décours temporels sont normalisés par la moyenne du segment précédant l'injection. Ligne pointillée : Événement du début d'injection. Les données des sujets Apoe7 et Apoe8 montrent une hausse rapide du signal après injection, contrairement à Apoe3 et Apoe5.

## CHAPITRE 8

### DISCUSSION GÉNÉRALE

L'objet de ce chapitre est une discussion critique sur la méthodologie suivie et les résultats obtenus. Dans un premier temps, nous effectuerons un retour sur les objectifs spécifiques définis en début de projet et présentés en introduction. Ces objectifs serviront de fil conducteur pour la synthèse des travaux. Les limitations spécifiques pour chaque objectif seront également exposées dans cette section. La liste des contributions reliées à ces travaux peut être trouvée à l'annexe A. Au moment d'écrire ces lignes, un article est également en préparation. La section 8.2 présente un retour sur l'objectif global du projet ainsi que les limitations qui s'y rapportent. Enfin, la section 8.3 présente une discussion des principales considérations et avenues de recherche qui contribueraient selon nous à améliorer la technologie photoacoustique pour des applications moléculaires.

#### 8.1 Synthèse des travaux et limitations spécifiques

##### **Objectif 1. Effectuer des simulations du problème direct en photoacoustique.**

Ce premier objectif visait principalement à effectuer des simulations de la propagation photonique et acoustique dans les tissus afin de prédire l'allure des signaux observables et ainsi faciliter et accélérer le développement de l'appareil. Des simulations Monte-Carlo ont été effectuées pour deux configurations de l'illumination, soit une fibre seule ainsi qu'un ensemble de fibres disposées en colonnes. Les photons simulés ont été lancés dans un fantôme numérique reproduisant les propriétés des tissus biologiques diffusants, ainsi que purement sanguins. Les résultats qualitatifs ont mis en évidence l'influence de l'absorption sanguine sur la distribution spatiale de la fluence. Pour le fantôme diffusant, la fluence demeure du même ordre de grandeur jusqu'à environ 1 cm sous la surface, suggérant que le rapport signal à bruit pourrait demeurer suffisamment élevé pour l'imagerie d'une structure profonde comme l'aorte chez des modèles murins.

Du point de vue acoustique, la revue du cadre théorique de l'effet photoacoustique a permis de présenter les formes d'ondes de pression attendues suite à l'excitation de géométries simples. Les simulations de la propagation acoustique ont notamment permis de montrer l'influence de la taille des structures sur le spectre fréquentiel des signaux mesurés. La simulation de conditions expérimentales plus réalistes, telles que des inhomogénéités dans la distribution de l'absorption lumineuse et la vitesse du son, ont révélé une influence appa-

rente sur les pressions mesurables. La simulation de la limitation de la bande passante du transducteur a également permis d'expliquer le contraste obtenu expérimentalement sur des fantômes d'imagerie à l'échelle macroscopique.

Les simulations optiques et acoustiques sont souvent utilisées pour améliorer la quantification dans le cadre du problème photoacoustique inverse, soit l'estimation des paramètres optiques à partir des pressions mesurées. Une simulation multispectrale effectuée a montré l'influence de la dépendance spectrale de l'absorption du milieu sur la pression initiale générée ; les techniques applicables au problème photoacoustique inverse devraient donc tenir compte de cette variabilité spectrale. Toutefois, ce domaine complexe mérite et reçoit généralement une attention à part entière (voir section 8.3.3), tandis que les simulations effectuées dans le cadre de ce projet visaient davantage à expliquer le contraste obtenu expérimentalement avec un appareil créé sur mesure. Les simulations ont permis d'établir que le contraste maximal pouvait être obtenu aux faibles longueurs d'onde de la fenêtre permise avec l'appareil utilisé.

Au niveau des limitations, il faut noter que le temps de simulation peut s'élever jusqu'à plusieurs jours selon la fréquence maximale simulée (pour l'acoustique) et la taille de la grille de calcul. Aussi, ce facteur pourrait limiter l'utilisation systématique des simulations dans le problème inverse, en particulier pour un pas de calcul très fin nécessaire pour simuler les ondes ultrasonores de hautes fréquences associées à l'imagerie des structures fines du petit animal. Également, la mémoire limitée des ordinateurs utilisés pour la simulation Monte-Carlo optique doit être considérée dans la réalisation de ce type de calcul.

### **Objectif 2. Développer un appareil d'imagerie photoacoustique.**

Cet objectif visait à concevoir et fabriquer un système d'imagerie PA visant des applications macroscopiques chez la souris, en particulier la région aortique. L'architecture du système a été conçue en fonction de l'élément de détection, soit un transducteur monoélément commercial disponible dans plusieurs modèles. Le transducteur est balayé mécaniquement à l'aide d'un moteur oscillant. Les signaux amplifiés et numérisés sont envoyés vers un poste de travail via un lien de communication USB ; la reconstruction des images s'effectue sur l'ordinateur. Le système comprend également un générateur d'impulsion afin de produire un contraste échographique.

Les résultats ont montré que le système permettait d'obtenir un très bon contraste avec des fantômes d'imagerie reproduisant les propriétés des tissus, autant en PA qu'en US. Le dispositif d'imagerie a également été en mesure d'acquérir des volumes à l'aide d'un moteur pas à pas. La surface des fantômes s'est d'abord révélée être une grande source de signal PA, étant donné que la fluence incidente y est maximale. L'appareil a permis d'imager des tubes au-delà de 8 mm de profondeur, soit bien plus que la profondeur envisagée pour l'imagerie *in*

*in vivo* de la région aortique. Le système a aussi permis de produire un contraste pour des structures de tailles variées allant de  $10\ \mu\text{m}$  à  $2\ \text{mm}$ . Les résultats des simulations effectuées pour satisfaire au précédent objectif ont permis d'expliquer précisément la forme des structures reconstruites en utilisant un modèle de filtrage et d'absorption non homogène, et ce, malgré l'aspect approximatif de ces simulations. Ces effets sont rendus visibles par le grandissement des structures absorbantes et ne sont pas apparus pour les expériences menées sur des cheveux ou les plus petits tubes, par exemple. Jusqu'à présent, la plupart des applications en photoacoustique ont été réalisées en microscopie ou en spectroscopie, ce qui pourrait expliquer le peu d'observations rapportées dans la littérature sur ce phénomène. Aussi, la linéarité de l'amplitude maximale du signal PA en fonction de la concentration de la sonde AuNS a été observé. Le système a permis de distinguer de faibles différences de concentrations en AuNS, malgré la présence d'un absorbant non négligeable dans la matrice du fantôme.

Malheureusement, il n'a pas été possible de tester le système avec un transducteur mono-élément de plus basse fréquence centrale que  $10\ \text{MHz}$ . Une telle expérience pourrait s'avérer profitable pour la caractérisation du système et certaines applications macroscopiques. Toutefois, nous estimons qu'une fréquence centrale de  $13\text{-}15\ \text{MHz}$  représente un strict minimum pour une application en échocardiographie chez la souris, de sorte qu'un transducteur de basse fréquence n'aurait pas eu d'utilité pour la validation anatomique *in vivo*. De plus, les amplificateurs à hautes fréquences utilisés sur la carte d'acquisition sont eux-mêmes des filtres ayant une fréquence de coupure passe-haut d'environ  $900\ \text{kHz}$ . L'amplification supplémentaire des basses fréquences nécessiterait donc potentiellement un sacrifice de la bande supérieure.

Le système conçu permet la connection à un puissance-mètre commercial pour la mesure de l'énergie de chaque impulsion laser. Cependant, la division du faisceau nécessaire pour ce monitoring exige une perte d'énergie importante dans le faisceau principal, aussi cette possibilité n'a pas été retenue. L'utilisation d'un laser plus puissant ou d'un diviseur de faisceau avec un meilleur rendement pourrait remédier à ce problème. Également, le changement de la longueur d'onde entraîne une translation latérale du faisceau en sortie du laser. Or, l'entrée de la fibre optique est relativement étroite par rapport à la largeur du faisceau ; le faisceau se retrouve donc incident sur le connecteur de la fibre plutôt que sur le noyau de celle-ci. La variation de longueur d'onde dans toute la plage proche infrarouge peut donc causer de l'ablation sur le connecteur ainsi qu'une perte de puissance en sortie de la fibre. Cet effet serait possiblement atténué par l'utilisation d'un ensemble de fibres fusionnées avec une entrée de grand diamètre plutôt qu'une seule fibre. Sachant que la puissance du laser varie énormément en fonction de la longueur d'onde, il n'a pas été possible d'appliquer le concept d'imagerie multispectrale avec ce système. Ce type d'imagerie est souhaitable afin d'aider à augmenter la spécificité du contraste dû aux sondes par rapport au contraste san-

guin. Le monitoring de la puissance laser pourrait remédier à cet inconvénient. Nous croyons également que l'automatisation de l'OPO est essentielle pour les acquisitions *in vivo* afin de limiter la perte de temps due à l'ajustement de la longueur d'onde et à sa vérification.

Au niveau de l'illumination, l'énergie collimée dans la fibre optique ainsi que la puissance moyenne correspondent à la norme ANSI chez l'humain. Il serait possible d'augmenter le volume de tissu illuminé en augmentant le nombre de fibres et en les répartissant sur une plus grande surface (Brecht *et al.*, 2009; Taruttis *et al.*, 2010). Ceci nécessiterait évidemment un laser plus puissant avec une fibre multiple, ou alors plusieurs lasers. Cependant, seule une illumination en transmission pourrait permettre cette configuration sans dépasser le seuil maximal d'exposition par unité de surface. L'hypothèse nécessaire serait donc que la section du corps soit suffisamment mince pour que les autres sources disposées sur le diamètre du corps contribuent au signal de profondeur.

### **Objectif 3. Réaliser des expériences *in vivo* en imagerie photoacoustique.**

Le dernier objectif de ce projet consistait à appliquer les techniques d'imagerie photoacoustique au système cardiovasculaire chez la souris. L'imagerie a d'abord été tentée avec l'appareil conçu, et ce, en coupe transversale afin de faciliter les manipulations, en particulier avec l'angle du transducteur. L'aorte ascendante a pu être identifiée et une augmentation de contraste a été observée lors de l'injection d'une sonde AuNS. Toutefois, il a été difficile de répéter cette observation sachant que les vaisseaux sanguins sont beaucoup plus difficiles à identifier formellement en coupe transversale qu'en vue longitudinale. L'imagerie échographique en vue parasternale grand-axe a permis d'identifier les vaisseaux beaucoup plus facilement, bien que les expériences préliminaires dans cette configuration n'aient pas permis de trouver le contraste PA attendu. L'arrivée d'un système photoacoustique commercial, non disponible en début de projet, a permis de faciliter l'identification des régions d'intérêt étant donné le taux de répétition supérieur possible avec les transducteurs matriciels. Pour les fins de la recherche, il existe cependant des inconvénients associés à ce type d'appareil, notamment l'impossibilité de faire varier l'angle et la géométrie de l'illumination ainsi que sa puissance, et l'impossibilité d'effectuer des modifications sur le logiciel d'acquisition. Par contre, l'automatisation de l'OPO et la compensation des fluctuations de l'énergie des impulsions laser ont apporté un gain d'efficacité et de précision par rapport au système fait sur mesure.

Les résultats des expériences effectuées sur des fantômes contenant un mélange de sang entier et de nanocoquilles ont montré un effet d'amplification, observé auparavant par Lu *et al.* (2010). Ceci a démontré la possibilité d'obtenir un signal significativement plus puissant pour AuNS que pour du sang, sans même utiliser le potentiel de techniques avancées de démultiplexage spectral. Le coefficient de Grüneisen  $\Gamma$ , qui décrit la proportionnalité entre l'énergie

thermique et la pression PA générée, pourrait expliquer une grande partie du comportement PA des différentes molécules à la source du contraste. Bien que des études investiguant les coefficients de Grüneisen de tissus et de certains matériaux aient été publiées, peu de travaux se sont intéressés à des molécules comme les chromophores. Pour une majorité de ces molécules, les paramètres qui déterminent les propriétés PA sont inconnus ou inaccessibles, et leur comportement doit être déterminé empiriquement (Levi *et al.*, 2010). Les facteurs suggérés pour expliquer la dissemblance des valeurs de  $\Gamma$  incluent la cinétique de la relaxation non radiative, la contribution de l'état triplet et le photoblanchissage (Boguta et Wrobel, 2001; Buschmann *et al.*, 2003).

Un contraste PA d'origine sanguine a pu être observé dans une grande majorité des expériences réalisées *in vivo*, ouvrant une fenêtre d'opportunité pour l'imagerie moléculaire avec une sonde ciblée. Cependant, l'injection d'une sonde AuNS n'a pas été suivie d'une augmentation significative concluante de l'amplitude du signal dans la région d'intérêt. Les hypothèses pour expliquer ces résultats sont multiples. Bien que le contraste ait été visible, il demeure faible en intensité en comparaison avec le signal de surface ou celui provenant des grandes structures vascularisées comme le coeur, par exemple. Bien que la puissance totale d'illumination du système Vevo soit supérieure à celle du système fait sur mesure, le faisceau est distribué sur une surface beaucoup plus large, réduisant la profondeur pour une valeur du RSB donnée. Aussi, la limite inférieure de la bande fréquentielle du transducteur matriciel (13 MHz) est élevée par rapport au contenu fréquentiel des ondes de pression d'une source de la taille de l'aorte. Bien que la linéarité du signal par rapport à la concentration de la sonde soit conservée, les fréquences basses ne sont pas transmises par le transducteur, réduisant ainsi le contraste.

Les défis associés à l'acquisition *in vivo* non invasive ont été très nombreux. D'abord, l'utilisation de gel ultrasonore en lieu et place d'un bassin d'eau a facilité grandement les manipulations. En effet, l'animal peut être placé en position dorsale sur un tapis chauffant à température régulée. Toutefois, le gel favorise l'emprisonnement des bulles d'air, ce qui génère des artefacts très visibles étant donné l'échelle d'imagerie. En second lieu, les mouvements respiratoires sont très visibles chez la souris et apparaissent dans les enregistrements. En effet, le corps de la souris étant naturellement parallèle au sol, le coeur ne s'appuie pas sur le diaphragme comme chez l'humain et a donc plus de place pour bouger dans la cavité péricardique. La grande résolution spatiale de l'imagerie PA entraîne évidemment une sensibilité à ces déplacements ainsi qu'aux battements cardiaques. En échographie, ces mouvements permettent en fait de reconnaître plus aisément les artères connectées à l'arche aortique. Cependant, ils doivent être pris en compte au moment de fixer les limites de la région d'extraction d'information quantitative, par exemple une courbe d'activité temporelle. Pour ce

faire, nous avons sélectionné les pixels de plus grande intensité dans une région délimitant l'amplitude des déplacements à travers toutes les images.

## 8.2 Limitations de la solution proposée

L'objectif global du projet était d'évaluer le potentiel de la PAT appliquée à la détection de la plaque d'athérosclérose chez la souris. En particulier, le projet visait à mesurer le contraste PA sanguin endogène au site de la plaque avec localisation anatomique (US) et l'activité PA temporelle au site de la plaque suite à l'injection d'une sonde moléculaire. Ces deux objectifs ont été atteints mais ont révélé les limitations actuelles de l'imagerie PA pour l'imagerie *in vivo* des tissus vasculaires profonds. Le système de type *mode B statique* a permis l'imagerie anatomique mais celle-ci était peu aisée à cause du taux d'acquisition faible comparativement au mouvement cardiaque ainsi que de l'angle prononcé de l'ensemble transducteur-moteur. Un système d'imagerie photoacoustique de type matriciel a permis d'obtenir une validation anatomique beaucoup plus facilement mais a également révélé des limitations au niveau de la bande passante par rapport à la bande du signal d'intérêt. Cependant, le choix d'un transducteur de plus faible fréquence centrale pourrait favoriser le signal photoacoustique au détriment du signal échographique produit notamment aux interfaces des tissus. Aussi, la fluence dans la région aortique a été réduite par l'absorption sanguine dans les structures moins profondes, entraînant une diminution du contraste photoacoustique. La source de signal endogène que constitue le sang lui-même contribue également à la baisse du contraste dû aux sondes moléculaires, de même que les mouvements cardiaque et respiratoire ainsi que l'angle et la courbure des vaisseaux. En somme, l'imagerie moléculaire de la plaque d'athérome chez la souris demeure actuellement un défi pour l'imagerie PA.

## 8.3 Perspectives

À l'heure actuelle, aucune technologie n'est en mesure de dominer tous les aspects d'une acquisition d'imagerie moléculaire. Le choix d'une modalité pour une application particulière doit donc être évalué au cas par cas ; une combinaison de technologies, par l'intermédiaire de sondes multimodales, est parfois appropriée. Gambhir (2010) ont décrit la technologie idéale d'imagerie moléculaire comme ayant

le pouvoir de détecter des concentrations faibles de la cible moléculaire (picomolaire), l'habileté de suivre quelques cellules plutôt que des milliers ou des millions, une haute résolution spatiale (sous-millimétrique), une haute résolution temporelle (milliseconde), avoir un coût faible, offrir un grand débit de traitement, être totalement quantitative, permettre un examen à toutes les couches de

profondeur, et à tout emplacement dans le sujet ou dans une cellule, et une dose faible voire nulle.

Au moment d'écrire ces lignes, relativement peu de centres d'imagerie possèdent toutes les modalités disponibles. Le coût d'achat, d'installation et de maintenance de plusieurs de ces équipements n'est donc certainement pas négligeable. À ce titre, la technologie photoacoustique est considérée comme étant peu coûteuse. Toutefois, la multiplication du nombre de canaux de détection et d'illumination est susceptible de hausser le prix de revient des systèmes.

### 8.3.1 Détection ultrasonore

L'effet photoacoustique permet de générer un ensemble complet de données volumétriques du spécimen imagé en utilisant une seule impulsion laser. Cette possibilité unique ne se retrouve pas chez les autres modalités tomographiques, où il est habituellement nécessaire que la source excite séquentiellement l'objet à partir de positions multiples. Des limitations techniques multiples, reliées aux technologies de détection, de traitement et d'illumination, ont jusqu'à présent retardé l'implémentation efficace de la tomographie PA tridimensionnelle. Le coût des lasers d'impulsion nanoseconde, par exemple, limite pour le moment l'illumination à un diamètre du corps de l'animal, alors qu'on peut aisément imaginer en couvrir une plus grande surface. Un argument similaire s'applique à la chaîne de détection.

La fréquence centrale du transducteur utilisé pour les acquisitions *in vivo* (LZ-250) est d'environ 20 MHz. Bien qu'il existe des transducteurs matriciels ayant un support fréquentiel supérieur, ceux-ci peuvent difficilement être utilisés en imagerie PA car l'amplitude des signaux est trop faible. En effet, les éléments de détection de plus faible taille ont une sensibilité réduite. Pour les applications macroscopiques, la bande recherchée est au contraire vers les basses fréquences. À court terme, il est peu probable que la bande passante limitée des détecteurs piézoélectriques soit augmentée dramatiquement, de sorte qu'il faut faire un compromis entre l'information photoacoustique et la résolution spatiale de l'échographie. La détection par interférométrie représente une solution alternative à large bande qui est maintenant applicable *in vivo* (Laufer *et al.*, 2012). La grande sensibilité de cette technique constitue également l'un de ses principaux avantages. Cependant, elle ne permet pas l'échographie et donc la validation anatomique du spécimen. Aussi, elle est basée sur la reconstruction du volume entier par inversion temporelle et de type point à point, ce qui limite les possibilités de visualisation rapide et donc de correction du positionnement de l'animal.

### 8.3.2 Acquisitions *in vivo*

Le positionnement de l'animal est critique, autant dans les études longitudinales que transversales. Dans la plupart des cas, le positionnement est seulement partiellement reproductible, à l'exception du cerveau (Cherry et Fox, 2007), spécialement si la fenêtre d'imagerie est à un angle prononcé comme en échocardiographie. L'utilisation d'un support corporel pourrait favoriser la reproductibilité des mesures, bien que ceux-ci ne garantissent pas un alignement total des surfaces corporelles et des organes internes. Leur emploi n'a pas été possible pour les acquisitions (mode dorsal) étant donné la nécessité du tapis chauffant. En effet, un dispositif précis de régulation de la température de l'animal est crucial pour le bien-être animal durant ces longues sessions d'imagerie. À ce titre, une source d'air chaud pourrait compléter le tapis chauffant ou s'y substituer par l'utilisation d'une chambre thermique (Laufer *et al.*, 2012).

Également, les mouvements physiologiques dus à la respiration, à la contraction cardiaque et l'écoulement sanguin pulsatile peuvent causer un déplacement de la région d'intérêt d'une image à l'autre. On peut toutefois tenter de remédier à cette situation par un recalage anatomique, par exemple la synchronisation cardiaque. L'électrocardiogramme (ECG) et la fréquence respiratoire devraient donc être monitorés systématiquement.

L'une des difficultés majeures de l'imagerie chez des sujets vivants par rapport à l'imagerie de cellules *ex vivo* est la difficulté de contrôler le comportement du sujet et de la sonde moléculaire une fois introduite dans celui-ci. Si les études *ex vivo* permettent d'introduire la sonde et d'évacuer ensuite l'excès, il n'y a pas de procédure équivalente chez le vivant. La plupart du temps, les nanoparticules sont administrées par voie intraveineuse, leur permettant ainsi de trouver le chemin menant à leur cible ; l'injection doit être totalement réussie. Au premier ordre, la fonction d'entrée artérielle est souvent approximée comme une impulsion de Dirac, c'est-à-dire que l'on considère que l'injection de la sonde s'est faite instantanément. En réalité, elle peut prendre jusqu'à plusieurs minutes si la viscosité de la solution est importante. Si les ressources le permettent, la mesure de l'activité injectée dans la queue de chaque animal avec un calibrateur (spectroscopique et multispectral) PA pourrait certainement améliorer la précision des analyses pharmacocinétiques avancées, similairement à ce qui a été développé en TEP (Convert *et al.*, 2007).

### 8.3.3 Imagerie photoacoustique quantitative

L'extraction des concentrations absolues de chromophores à partir des mesures photoacoustiques multispectrales est un aspect non trivial de l'imagerie photoacoustique qui représente un défi à part entière. Le problème inverse de type acoustique, consistant à obtenir la

distribution initiale de pression à partir des mesures, a été l'objet de nombreux travaux et résultats mathématiques (Kostli *et al.*, 2001; Xu et Wang, 2005; Kuchment et Kunyansky, 2008; Treeby *et al.*, 2010). Le problème inverse optique demeure un sujet de recherche actif dont une revue récente peut être trouvée dans Cox *et al.* (2012).

Bien que ce domaine demeure hors de la portée du présent travail, plusieurs aspects de celui-ci effleurent le problème de la quantification, en particulier les simulations Monte-Carlo effectuées au chapitre 4. Les méthodes de Monte-Carlo pourraient permettre de corriger les signaux photoacoustiques mesurés à l'aide des densités photoniques simulées, qu'il s'agisse de fantômes simples ou de segmentations complexes de modèles murins. Kim *et al.* (2011) ont notamment produit une segmentation des données US pour corriger la fluence dans le problème photoacoustique inverse. Une telle simulation pourrait aussi se baser sur un fantôme numérique 4D tel que MOBY (Segars *et al.*, 2004), créé à partir d'une segmentation des données IRM du projet *Visible mouse* (Johnson *et al.*, 2002) et de la reconstruction des mouvements respiratoires et cardiaques. Des simulations de la fluence à partir de la segmentation de souris imagées ont par exemple été réalisées par Ntziachristos *et al.* (2002) et Chaudhari *et al.* (2005). Cependant, à ce jour les propriétés optiques des tissus vivants ne sont toujours pas bien établies et la littérature est considérée comme incomplète (Suzaki *et al.*, 2005). Également, la grande variabilité des propriétés optiques rend difficile la construction d'un fantôme universel. Bien qu'ils ne constituent pas des fantômes *stricto sensu*, les cadavres non embaumés sont les spécimens les plus proches des tissus vivants. Dans le contexte de l'imagerie cardiovasculaire, la plus grande difficulté avec les cadavres est l'absence d'anatomie vasculaire normale car les vaisseaux sont généralement effondrés. Des techniques d'infusion de gélatine peuvent être utilisées pour supporter la paroi des artères tout en s'assurant de la présence post-mortem d'un agent de contraste dans la région d'intérêt (Zhou *et al.*, 2004a; Weyers *et al.*, 2012). Ces techniques pourraient être employées pour faire le pont entre les fantômes traditionnels et le monde des vivants, donnant ainsi un spécimen d'imagerie plus contrôlé tout en augmentant le réalisme.

## CONCLUSION

L'imagerie cardiovasculaire a un futur prometteur, et un large éventail de modalités d'imagerie auront l'occasion d'y contribuer. Les techniques d'imagerie moléculaire chez le petit animal sont notamment susceptibles de contribuer à la caractérisation des maladies cardiovasculaires ou au développement d'agents thérapeutiques. La tomographie photoacoustique pourrait potentiellement permettre l'extraction d'information quantitative sur l'activité d'une sonde moléculaire au site de lésion inflammatoire. Les avantages de cette modalité incluent notamment une grande résolution spatiale et une forte sensibilité, tout en demeurant non invasive. Les défis amenés par cette dernière contrainte, combinées à la profondeur de certains organes ciblés, sont des enjeux actifs de recherche en imagerie PA.

Les travaux réalisés dans le cadre de ce projet ont permis de visualiser un contraste photoacoustique endogène *in vivo* dans la région de l'arche aortique chez la souris. Ces résultats ont été observés de manière répétable et à l'aide d'une validation échographique dans une position standardisée. À notre connaissance, aucune étude précédente n'a rapporté des résultats similaires. Les simulations acoustiques effectuées ont également permis de confirmer les limitations du système au niveau de la bande passante. Un système d'imagerie PA comprenant un échographe a également été développé. Bien que le taux de répétition de celui-ci soit inférieur aux systèmes matriciels commerciaux, il demeure flexible au niveau matériel et logiciel. Également, il a permis l'observation *in vivo* de l'augmentation du contraste lors de l'injection d'une sonde moléculaire AuNS. Nous n'avons pas pu conclure à une augmentation significative du signal pour une étude de groupe suite à l'injection d'une sonde moléculaire visant la paroi inflammée de l'aorte chez la souris. Cette observation pourrait traduire une fluence trop faible à la profondeur ciblée, ainsi qu'une perte d'information due à la bande passante limitée du transducteur. Cependant, l'amélioration des composantes des systèmes d'imagerie photoacoustiques se répercutera sans aucun doute sur la profondeur de champ envisageable, la fréquence d'acquisition ainsi que la bande passante. En effet, la tomographie photoacoustique demeure une technologie émergente autant du point de vue matériel que logiciel et bénéficierait d'un maximum de flexibilité au niveau des composantes des dispositifs d'imagerie. Aussi, nous croyons qu'elle ne pourra dévoiler son plein potentiel que lorsque de nombreux défis techniques auront été relevés. En particulier, l'augmentation de la bande passante des transducteurs pourrait permettre l'étude simultanée de structures de tailles variées. Une augmentation de la puissance optique totale disponible pourrait également se traduire par un gain en termes de profondeur d'imagerie ou de champ de vision.

## BIBLIOGRAPHIE

- AGARWAL, A., HUANG, S. W., O'DONNELL, M., DAY, K. C., DAY, M., KOTOV, N. et ASHKENAZI, S. (2007). Targeted gold nanorod contrast agent for prostate cancer detection by photoacoustic imaging. *Journal of Applied Physics*, 102, 064701.
- AKARCA, H. G., PREISSER, S., FRENZ, M. et RICKA, J. (2012). Determining the optical properties of a gelatin-TiO<sub>2</sub> phantom at 780 nm. *Biomedical Optics Express*, 3, 418–434.
- ALEXANDRAKIS, G., RANNOU, F. R. et CHATZIIHOANNOU, A. F. (2005). Tomographic bioluminescence imaging by use of a combined optical-PET (OPET) system : a computer simulation feasibility study. *Physics in Medicine and Biology*, 50, 4225–4241.
- ALEXANDROV, M. D., REMIZOVICH, V. S. et ROGOZKIN, D. B. (1993). Multiple light scattering in a two-dimensional medium with large scatterers. *Journal of the Optical Society of America A*, 10, 2602–2610.
- ALLAM, A. H., THOMPSON, R. C., WANN, L. S., MIYAMOTO, M. I., NUR EL DIN, A. E.-H., EL MAKSOU, G. A., AL-TOHAMY SOLIMAN, M., BADR, I., EL RAHMAN AMER, H. A., SUTHERLAND, M. L., SUTHERLAND, J. D. et THOMAS, G. S. (2011). Atherosclerosis in ancient egyptian MummiesThe horus study. *JACC : Cardiovascular Imaging*, 4, 315–327.
- AMERICAN NATIONAL STANDARDS INSTITUTE (1993). American national standard for the safe use of lasers.
- ARONSON, R. (1984). Subcritical problems in spherical geometry. *Nucl. Sci. Eng. ; (United States)*, 86 :2.
- ARRIDGE, S. (1999). Optical tomography in medical imaging. *Inverse Problems*, 15, R41–R93.
- AZAR, F. S., INTES, X., JIANG, S. et POGUE, B. W. (2008). Optical phantoms for multimodality imaging. *Translational Multimodal Optical Imaging*, Artech House, Norwood, MA. 241–254.
- BAMBER, J. et HILL, C. (1979). Ultrasonic attenuation and propagation speed in mammalian tissues as a function of temperature. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 5, 149–157.
- BANERJEE, S. et SHARMA, S. K. (2010). Use of monte carlo simulations for propagation of light in biomedical tissues. *Applied Optics*, 49, 4152–4159.

- BAYER, C. L., CHEN, Y.-S., KIM, S., MALLIDI, S., SOKOLOV, K. et EMELIANOV, S. (2011). Multiplex photoacoustic molecular imaging using targeted silica-coated gold nanorods. *Biomedical Optics Express*, 2, 1828–1835.
- BEARD, P. et MILLS, T. (1997). Characterization of post mortem arterial tissue using time-resolved photoacoustic spectroscopy at 436, 461 and 532 nm. *Physics in Medicine and Biology*, 42, 177–198.
- BECK, G., AKGUN, N., RUCK, A. et STEINER, R. (1998). Design and characterisation of a tissue phantom system for optical diagnostics. *Lasers in Medical Science*, 13, 160–171.
- BELL, A. G. (1880). Upon the production of sound by radiant energy. *American Journal of Science*, 20, 305–320.
- BOGUTA, A. et WROBEL, D. (2001). Fluorescein and phenolphthalein-correlation of fluorescence and photoelectric properties. *Journal of Fluorescence*, 11, 129–137.
- BRECHT, H.-P., SU, R., FRONHEISER, M., ERMILOV, S. A., CONJUSTEAU, A. et ORAEVSKY, A. A. (2009). Whole-body three-dimensional optoacoustic tomography system for small animals. *Journal of Biomedical Optics*, 14, 064007–8.
- BRIGGS, A. et KOLOSOV, O. (2009). *Acoustic Microscopy : Second Edition*. Oxford University Press.
- BROWN, R. P., DELP, M. D., LINDSTEDT, S. L., RHOMBERG, L. R. et BELILES, R. P. (1997). Physiological parameter values for physiologically based pharmacokinetic models. *Toxicology and industrial health*, 13, 407–484. PMID : 9249929.
- BUEHLER, A., HERZOG, E., RAZANSKY, D. et NTZIACHRISTOS, V. (2010). Video rate optoacoustic tomography of mouse kidney perfusion. *Optics Letters*, 35, 2475–2477.
- BUSCHMANN, V., WESTON, K. D. et SAUER, M. (2003). Spectroscopic study and evaluation of red-absorbing fluorescent dyes. *Bioconjugate Chemistry*, 14, 195–204.
- CASE, K. M. et ZWEIFEL, P. (1967). *Linear transport theory*. Addison-Wesley, Reading, Mass.
- CHANDRASEKHAR, S. (1960). *Radiative Transfer*. Courier Dover Publications.
- CHAUDHARI, A. J., DARVAS, F., BADING, J. R., MOATS, R. A., CONTI, P. S., SMITH, D. J., CHERRY, S. R. et LEAHY, R. M. (2005). Hyperspectral and multispectral bioluminescence optical tomography for small animal imaging. *Physics in Medicine and Biology*, 50, 5421–5441.
- CHEONG, W. F., PRAHL, S. A. et WELCH, A. J. (1990). A review of the optical properties of biomedical tissues. *IEEE Journal of Quantum Electronics*, 26, 2166–2185.

- CHERRY, S. R. et FOX, J. G. (2007). In vivo whole-body imaging of the laboratory mouse. *The Mouse in Biomedical Research*, Academic Press, vol. 3. 489–512.
- CHITHRANI, B. D. et CHAN, W. C. W. (2007). Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes. *Nano Letters*, 7, 1542–1550.
- CHO, W.-S., CHO, M., JEONG, J., CHOI, M., CHO, H.-Y., HAN, B. S., KIM, S. H., KIM, H. O., LIM, Y. T., CHUNG, B. H. et JEONG, J. (2009). Acute toxicity and pharmacokinetics of 13Å nm-sized PEG-coated gold nanoparticles. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 236, 16–24.
- CLINTHORNE, N. H. et MENG, L.-J. (2010). Small animal SPECT, SPECT/CT, and SPECT/MRI. R. Weissleder, B. D. Ross, A. Rehemtulla et S. S. Gambhir, éditeurs, *Molecular Imaging : Principles and Practice*, PMPH-USA. 76–95.
- COATNEY, R. W. (2001). Ultrasound imaging : principles and applications in rodent research. *ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources*, 42, 233–247. PMID : 11406722.
- COBBOLD, R. S. C. (2007). *Foundations of Biomedical Ultrasound*. Oxford University Press.
- COLLINS, K. A., KORCARZ, C. E. et LANG, R. M. (2003). Use of echocardiography for the phenotypic assessment of genetically altered mice. *Physiological Genomics*, 13, 227–239.
- CONG, W., SHEN, H., CONG, A., WANG, Y. et WANG, G. (2007). Modeling photon propagation in biological tissues using a generalized delta-eddington phase function. *Physical Review E*, 76, 051913.
- CONNOR, E. E., MWAMUKA, J., GOLE, A., MURPHY, C. J. et WYATT, M. D. (2005). Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity. *Small*, 1, 325–327.
- CONVERT, L., MORIN-BRASSARD, G., CADORETTE, J., ROULEAU, D., CROTEAU, E., ARCHAMBAULT, M., FONTAINE, R. et LECOMTE, R. (2007). A microvolumetric #946 ; blood counter for pharmacokinetic PET studies in small animals. *IEEE Transactions on Nuclear Science*, 54, 173–180.
- COOK, J. R., BOUCHARD, R. R. et EMELIANOV, S. Y. (2011). Tissue-mimicking phantoms for photoacoustic and ultrasonic imaging. *Biomedical Optics Express*, 2, 3193–3206.
- COPE, M. (1991). *The application of near infrared spectroscopy to non invasive monitoring of cerebral oxygenation in the newborn infant*. Thèse de doctorat, University College London, London.

- CORMODE, D. P., ROESSL, E., THRAN, A., SKAJAA, T., GORDON, R. E., SCHLOMKA, J.-P., FUSTER, V., FISHER, E. A., MULDER, W. J. M., PROKSA, R. et FAYAD, Z. A. (2010). Atherosclerotic plaque composition : Analysis with multicolor CT and targeted gold nanoparticles1. *Radiology*, 256, 774–782. PMID : 20668118 PMCID : PMC2923725.
- COVELLI, V. (2006). Guide to the necropsy of the mouse.
- COX, B., LAUFER, J. G., ARRIDGE, S. R. et BEARD, P. C. (2012). Quantitative spectroscopic photoacoustic imaging : a review. *Journal of Biomedical Optics*, 17, 061202–1.
- DANSKY, H. M., CHARLTON, S. A., SIKES, J. L., HEATH, S. C., SIMANTOV, R., LEVIN, L. F., SHU, P., MOORE, K. J., BRESLOW, J. L. et SMITH, J. D. (1999). Genetic background determines the extent of atherosclerosis in ApoE-Deficient mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 19, 1960–1968.
- DAVISON, B. (1957). *Neutron transport theory*. Clarendon Press, Oxford.
- DIEBOLD, G. J., SUN, T. et KHAN, M. I. (1991). Photoacoustic monopole radiation in one, two, and three dimensions. *Physical Review Letters*, 67, 3384–3387.
- DING, H., LU, J. Q., WOODEN, W. A., KRAGEL, P. J. et HU, X.-H. (2006). Refractive indices of human skin tissues at eight wavelengths and estimated dispersion relations between 300 and 1600 nm. *Physics in Medicine and Biology*, 51, 1479.
- DUCK, F. A. (1990). *Physical properties of tissue : a comprehensive reference book*. Academic Press.
- EGHTEDARI, M., ORAEVSKY, A., COPLAND, J. A., KOTOV, N. A., CONJUSTEAU, A. et MOTAMEDI, M. (2007). High sensitivity of in vivo detection of gold nanorods using a laser optoacoustic imaging system. *Nano Letters*, 7, 1914–1918. PMID : 17570730.
- EPFL (2007). FPGA4U main page.
- FALK, E., SHAH, P. K. et FUSTER, V. (1995). Coronary plaque disruption. *Circulation*, 92, 657–671.
- FANG, Q. et BOAS, D. A. (2009). Monte carlo simulation of photon migration in 3D turbid media accelerated by graphics processing units. *Optics Express*, 17, 20178–20190.
- FAYAD, Z. A. et FUSTER, V. (2001). Clinical imaging of the high-risk or vulnerable atherosclerotic plaque. *Circ Res*, 89, 305–316.
- FERRARA, K., POLLARD, R. et BORDEN, M. (2007). Ultrasound microbubble contrast agents : Fundamentals and application to gene and drug delivery. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 9, 415–447.

- FINN, A. V., NAKANO, M., NARULA, J., KOLODZIE, F. D. et VIRMANI, R. (2010). Concept of Vulnerable/Unstable plaque. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 30, 1282–1292.
- FITZGERALD, S. M., GAN, L., WICKMAN, A. et BERGSTROM, G. (2003). Cardiovascular and renal phenotyping of genetically modified mice : A challenge for traditional physiology. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 30, 207–216.
- FOSTER, F., LIU, G., MEHI, J., STARKOSKI, B., ADAMSON, L., ZHOU, Y., HARASIECOWICZ, K. et ZAN, L. (2000). High frequency ultrasound imaging : from man to mouse. *Ultrasonics Symposium, 2000 IEEE*. vol. 2, 1633–1638 vol.2.
- FUNK, T., SUN, M. et HASEGAWA, B. H. (2004). Radiation dose estimate in small animal SPECT and PET. *Medical Physics*, 31, 2680–2686.
- FURUTSU, K. et YAMADA, Y. (1994). Diffusion approximation for a dissipative random medium and the applications. *Physical Review E*, 50, 3634–3640.
- GAMBHIR, S. S. (2010). General principles of molecular imaging. R. Weissleder, B. D. Ross, A. Rehemtulla et S. S. Gambhir, éditeurs, *Molecular Imaging : Principles and Practice*, PMPH-USA. 1–9.
- GENG, Y.-J. et LIBBY, P. (2002). Progression of atheroma a struggle between death and procreation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 22, 1370–1380.
- GERSZTEN, R. E., MACH, F., SAUTY, A., ROSENZWEIG, A. et LUSTER, A. D. (2000). Chemokines, leukocytes, and atherosclerosis. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 136, 87–92.
- GLASS, C. K. et WITZTUM, J. L. (2001). Atherosclerosis : : The road ahead. *Cell*, 104, 503–516.
- GLASSTONE, S. (1952). *The elements of nuclear reactor theory*. D. Van Nostrand, Princeton.
- GOLDSTEIN, L. J. et BROWN, S. M. (1977). The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. *Annual Review of Biochemistry*, 46, 897–930.
- GREEN, A. H., NORRIS, J. R., WANG, J., XIE, Z., ZHANG, H. F. et LA RIVIERE, P. J. (2010). In vitro testing of a protease-sensitive contrast agent for optoacoustic imaging. *Journal of Biomedical Optics*, 15, 021315–8.
- GREEN, E. (1966). *Biology of the Laboratory Mouse*. McGraw-Hill, New-York, seconde édition.
- GRUN, H., BERER, T., BURGHOLZER, P., NUSTER, R. et PALTAUF, G. (2010). Three-dimensional photoacoustic imaging using fiber-based line detectors. *Journal of Biomedical Optics*, 15, 021306–8.

- GUO, H. et YANG, S. (2009). Photoacoustic tomography imaging system based on digital b-mode ultrasound diagnosis equipment. *The Review of Scientific Instruments*, 80, 014903. PMID : 19191456.
- GUSEV, V. E. et KARABUTOV, A. A. (1991). Laser optoacoustics.
- HALE, G. M. et QUERRY, M. R. (1973). Optical constants of water in the 200-nm to 200-um wavelength region. *Applied Optics*, 12, 555–563.
- HAMILTON, A. J., HUANG, S.-L., WARNICK, D., RABBAT, M., KANE, B., NAGARAJ, A., KLEGERMAN, M. et MCPHERSON, D. D. (2004). Intravascular ultrasound molecular imaging of atheroma components in vivo. *Journal of the American College of Cardiology*, 43, 453–460.
- HANSSON, G. K. et HERMANSSON, A. (2011). The immune system in atherosclerosis. *Nature Immunology*, 12, 204–212.
- HARRISON, T., RANASINGHESAGARA, J. C., LU, H., MATHEWSON, K., WALSH, A. et ZEMP, R. J. (2009). Combined photoacoustic and ultrasound biomicroscopy. *Optics Express*, 17, 22041–22046.
- HOCKING, G., HEBARD, S. et MITCHELL, C. H. (2011). A review of the benefits and pitfalls of phantoms in ultrasound-guided regional anesthesia. *Regional Anesthesia and Pain Medicine*, 36, 162–170.
- HOELEN, C. G. A. et DE MUL, F. F. M. (2000). Image reconstruction for photoacoustic scanning of tissue structures. *Applied Optics*, 39, 5872–5883.
- HOELEN, C. G. A. et MUL, F. F. M. D. (1999). A new theoretical approach to photoacoustic signal generation. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 106, 695–706.
- HOIT, B. D. et WALSH, R. A. (1997). In vivo echocardiographic assessment of left ventricular function in transgenic and gene-targeted mice. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 7, 129–134.
- HOMAN, K., SHAH, J., GOMEZ, S., GENSLER, H., KARPIOUK, A., BRANNON-PEPPAS, L. et EMELIANOV, S. (2010). Silver nanosystems for photoacoustic imaging and image-guided therapy. *Journal of Biomedical Optics*, 15, 021316–9.
- HU, S., MASLOV, K. et WANG, L. V. (2009). Noninvasive label-free imaging of microhemodynamics by optical-resolution photoacoustic microscopy. *Optics Express*, 17, 7688–7693. PMID : 19399148.
- HUANG, S.-C., WEISSLEDER, R., PH.D, B. D. R., REHEMTULLA, A. et GAMBHIR, S. S. (2010). Pharmacokinetic modeling. *Molecular Imaging : Principles and Practice*, PMPH-USA. 1284–1289.

- HYAFIL, F., CORNIFY, J.-C., FEIG, J. E., GORDON, R., VUCIC, E., AMIRBEKIAN, V., FISHER, E. A., FUSTER, V., FELDMAN, L. J. et FAYAD, Z. A. (2007). Noninvasive detection of macrophages using a nanoparticulate contrast agent for computed tomography. *Nature Medicine*, 13, 636–641.
- ISHIBASHI, S., BROWN, M. S., GOLDSTEIN, J. L., GERARD, R. D., HAMMER, R. E. et HERZ, J. (1993). Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *Journal of Clinical Investigation*, 92, 883–893. PMID : 8349823 PMCID : PMC294927.
- JACQUES, S. L. et POGUE, B. W. (2008). Tutorial on diffuse light transport. *Journal of biomedical optics*, 13, 041302. PMID : 19021310.
- JAFFER, F. A., LIBBY, P. et WEISSLEDER, R. (2006a). Molecular and cellular imaging of atherosclerosis : Emerging applications. *Journal of the American College of Cardiology*, 47, 1328–1338.
- JAFFER, F. A., NAHRENDORF, M., SOSNOVIK, D., KELLY, K. A., AIKAWA, E. et WEISSLEDER, R. (2006b). Cellular imaging of inflammation in atherosclerosis using magnetofluorescent nanomaterials. *Molecular imaging*, 5, 85–92. PMID : 16954022.
- JAFFER, F. A. et WEISSLEDER, R. (2004). Seeing within : Molecular imaging of the cardiovascular system. *Circ Res*, 94, 433–445.
- JANA, N. R., GEARHEART, L. et MURPHY, C. J. (2001). Seeding growth for size control of 5-40 nm diameter gold nanoparticles. *Langmuir*, 17, 6782–6786.
- JENNINGS, T. et STROUSE, G. (2007). Past, present, and future of gold nanoparticles. *Bio-Applications of Nanoparticles*, Springer. 34–47.
- JOHNSON, G. A., COFER, G. P., GEWALT, S. L. et HEDLUND, L. W. (2002). Morphologic phenotyping with MR microscopy : The visible mouse1. *Radiology*, 222, 789–793.
- JOSEPH, J. H., WISCOMBE, W. J. et WEINMAN, J. A. (1976). The delta-eddington approximation for radiative flux transfer. *Journal of Atmospheric Sciences*, 33, 2452–2459.
- KARKI, J. (2002). Fully differential amplifier design in high-speed data acquisition systems. *Analog Applications Journal*.
- KAUFMANN, B. A. (2009). Ultrasound molecular imaging of atherosclerosis. *Cardiovascular Research*, 83, 617–625.
- KAUFMANN, B. A., SANDERS, J. M., DAVIS, C., XIE, A., ALDRED, P., SAREMBOCK, I. J. et LINDNER, J. R. (2007). Molecular imaging of inflammation in atherosclerosis with targeted ultrasound detection of vascular cell adhesion molecule-1. *Circulation*, 116, 276–284.

- KELLY, K. A., ALLPORT, J. R., TSOURKAS, A., SHINDE-PATIL, V. R., JOSEPHSON, L. et WEISSLEDER, R. (2005). Detection of vascular adhesion molecule-1 expression using a novel multimodal nanoparticle. *Circ Res*, 96, 327–336.
- KERKER, M. (1969). *The scattering of light, and other electromagnetic radiation*. Academic Press.
- KHARINE, A., MANOHAR, S., SEETON, R., KOLKMAN, R. G. M., BOLT, R. A., STEENBERGEN, W. et MUL, F. F. M. D. (2003). Poly(vinyl alcohol) gels for use as tissue phantoms in photoacoustic mammography. *Physics in Medicine and Biology*, 48, 357–370.
- KIM, G., HUANG, S.-W., DAY, K. C., O'DONNELL, M., AGAYAN, R. R., DAY, M. A., KOPELMAN, R. et ASHKENAZI, S. (2007a). Indocyanine-green-embedded PEBBLEs as a contrast agent for photoacoustic imaging. *Journal of Biomedical Optics*, 12, 044020–8.
- KIM, K., HUANG, S.-W., ASHKENAZI, S., O'DONNELL, M., AGARWAL, A., KOTOV, N. A., DENNY, M. F. et KAPLAN, M. J. (2007b). Photoacoustic imaging of early inflammatory response using gold nanorods. *Applied Physics Letters*, 90, 223901–3.
- KIM, S., CHEN, Y.-S., LUKE, G. P. et EMELIANOV, S. Y. (2011). In vivo three-dimensional spectroscopic photoacoustic imaging for monitoring nanoparticle delivery. *Biomedical Optics Express*, 2, 2540–2550.
- KIRCHER, M. F., GRIMM, J., SWIRSKI, F. K., LIBBY, P., GERSZTEN, R. E., ALLPORT, J. R. et WEISSLEDER, R. (2008). Noninvasive in vivo imaging of monocyte trafficking to atherosclerotic lesions. *Circulation*, 117, 388–395.
- KOLKMAN, R., HONDEBRINK, E., STEENBERGEN, W. et DE MUL, F. (2003). In vivo photoacoustic imaging of blood vessels using an extreme-narrow aperture sensor. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, 9, 343 – 346.
- KOOI, M., HEENEMAN, S., DAEMEN, M., ENGELSHOVEN, J. V. et CLEUTJENS, K. (2008). The emerging role of USPIOs for MR imaging of atherosclerosis. J. W. M. Bulte et M. M. J. J. Modo, éditeurs, *Nanoparticles in biomedical imaging : emerging technologies and applications*, Springer, New York, no. v. 3 Fundamental biomedical technologies. 63–90.
- KOSTLI, K. P., FRENZ, M., BEBIE, H. et WEBER, H. P. (2001). Temporal backward projection of photoacoustic pressure transients using fourier transform methods. *Physics in Medicine and Biology*, 46, 1863–1872. PMID : 11474930.
- KREUZER, L. B. et PATEL, C. K. N. (1971). Nitric oxide air pollution : Detection by photoacoustic spectroscopy. *Science*, 173, 45–47.
- KRUGER, R. A., LIU, P., FANG, Y. R. et APPLIEDORN, C. R. (1995). Photoacoustic ultrasound (PAUS)—Reconstruction tomography. *Medical Physics*, 22, 1605–1609.

- KRUGER, R. A., REINECKE, D. R. et KRUGER, G. A. (1999). Thermoacoustic computed tomography—technical considerations. *Medical physics*, 26, 1832–1837. PMID : 10505871.
- KU, G., MASLOV, K., LI, L. et WANG, L. V. (2010). Photoacoustic microscopy with 2- $\mu$ m transverse resolution. *Journal of Biomedical Optics*, 15, 021302–5.
- KUCHMENT, P. et KUNYANSKY, L. (2008). Mathematics of thermoacoustic tomography. *European Journal of Applied Mathematics*, 19, 191–224.
- KUMAR, V., ABBAS, A. K., FAUSTO, N. et MITCHELL, R. (2007). *Robbins Basic Pathology, Eighth Edition*. Saunders/Elsevier, 8th édition.
- KUSTERS, D. H. M., TEGTMEIER, J., SCHURGERS, L. J. et REUTELINGSPERGER, C. P. M. (2012). Molecular imaging to identify the vulnerable plaque—from basic research to clinical practice. *Molecular Imaging and Biology*, 14, 523–533.
- LANDAU, L. D. et LIFSHITZ, E. M. (1987). *Fluid Mechanics, Second Edition : Volume 6*. Butterworth-Heinemann, seconde édition.
- LANDSMAN, M. L., KWANT, G., MOOK, G. A. et ZIJLSTRA, W. G. (1976). Light-absorbing properties, stability, and spectral stabilization of indocyanine green. *J Appl Physiol*, 40, 575–583.
- LAUFER, J., JOHNSON, P., ZHANG, E., TREEBY, B., COX, B., PEDLEY, B. et BEARD, P. (2012). In vivo preclinical photoacoustic imaging of tumor vasculature development and therapy. *Journal of Biomedical Optics*, 17, 056016–1.
- LEE, S., XIE, J. et CHEN, X. (2010). Peptide-based probes for targeted molecular imaging. *Biochemistry*, 49, 1364–1376.
- LEITINGER, N. (2003). Oxidized phospholipids as modulators of inflammation in atherosclerosis. *Current Opinion in Lipidology*, 14, 421–430. PMID : 14501580.
- LEVI, J., KOTHAPALLI, S. R., MA, T.-J., HARTMAN, K., KHURI-YAKUB, B. T. et GAMBHIR, S. S. (2010). Design, synthesis and imaging of an activatable photoacoustic probe. *Journal of the American Chemical Society*, 132, 11264–11269. PMID : 20698693 PMCID : PMC2922742.
- LEY, K. et REUTERSHAN, J. (2006). Leucocyte-endothelial interactions in health and disease. S. Moncada et A. Higgs, éditeurs, *The Vascular Endothelium II*, Springer Berlin Heidelberg, vol. 176/II de *Handbook of Experimental Pharmacology*. 97–133.
- LI, P.-C., WANG, C.-R. C., SHIEH, D.-B., WEI, C.-W., LIAO, C.-K., POE, C., JHAN, S., DING, A.-A. et WU, Y.-N. (2008). In vivo photoacoustic molecular imaging with simultaneous multiple selective targeting using antibody-conjugated gold nanorods. *Optics Express*, 16, 18605–18615.

- LINK, S. et EL-SAYED, M. A. (2000). Shape and size dependence of radiative, non-radiative and photothermal properties of gold nanocrystals. *International Reviews in Physical Chemistry*, 19, 409–453.
- LOCHAB, J. et SINGH, V. R. (2004). Acoustic behaviour of plastics for medical applications. *Indian journal of pure & applied physics*, 42, 595–599.
- LU, W., HUANG, Q., KU, G., WEN, X., ZHOU, M., GUZATOV, D., BRECHT, P., SU, R., ORAEVSKY, A., WANG, L. V. et LI, C. (2010). Photoacoustic imaging of living mouse brain vasculature using hollow gold nanospheres. *Biomaterials*, 31, 2617–2626. PMID : 20036000.
- MACNEILL, B. D., LOWE, H. C., TAKANO, M., FUSTER, V. et JANG, I.-K. (2003). Intravascular modalities for detection of vulnerable plaque : Current status. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23, 1333–1342.
- MACOVSKI, A. (1983). *Medical imaging systems*. Prentice Hall.
- MADSEN, E. L., ZAGZEBSKI, J. A., BANJAVIE, R. A. et JUTILA, R. E. (1978). Tissue mimicking materials for ultrasound phantoms. *Medical Physics*, 5, 391–394. PMID : 713972.
- MADSEN, S. J., PATTERSON, M. S. et WILSON, B. C. (1992). The use of india ink as an optical absorber in tissue-simulating phantoms. *Physics in Medicine and Biology*, 37, 985–993.
- MAEDA, N., GIVENS, R. C. et REDDICK, R. L. (2007). Cardiovascular disease : Mouse models of atherosclerosis. J. G. Fox, éditeur, *The Mouse in Biomedical Research*, Academic Press, vol. 3. 535–564.
- MAHLEY, R. W. (1988). Apolipoprotein e : Cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science*, 240, 622–630.
- MALLAT, S. et HWANG, W.-L. (1992). Singularity detection and processing with wavelets. *IEEE Transactions on Information Theory*, 38, 617–643.
- MALLAT, S. et ZHONG, S. (1992). Characterization of signals from multiscale edges. *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.*, 14, 710–732.
- MALLIDI, S., LARSON, T., TAM, J., JOSHI, P. P., KARPIOUK, A., SOKOLOV, K. et EMELIANOV, S. (2009). Multiwavelength photoacoustic imaging and plasmon resonance coupling of gold nanoparticles for selective detection of cancer. *Nano Letters*, 9, 2825–2831.
- MARI, J. M. et CACHARD, C. (2007). Acquire real-time RF digital ultrasound data from a commercial scanner. *Technical Acoustics*. Article.
- MASSBERG, S., BRAND, K., GRUNER, S., PAGE, S., MULLER, E., MULLER, I., BERGMEIER, W., RICHTER, T., LORENZ, M., KONRAD, I., NIESWANDT, B. et GAWAZ,

- M. (2002). A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. *The Journal of Experimental Medicine*, 196, 887–896.
- MASSOUD, T. F. et GAMBHIR, S. S. (2003). Molecular imaging in living subjects : Seeing fundamental biological processes in a new light. *Genes & Development*, 17, 545–580.
- MEIR, K. S. et LEITERSDORF, E. (2004). Atherosclerosis in the apolipoprotein e deficient mouse. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 24, 1006–1014.
- MICHAEL, L., TAFFET, G., FRANGOIANNIS, N., ENTMAN, M. et HARTLEY, C. (2004). The cardiovascular system. *The laboratory mouse*, H.J. Hedrick, G.Bullock. 207–224.
- MORENO, P. R., PURUSHOTHAMAN, K.-R., SIROL, M., LEVY, A. P. et FUSTER, V. (2006). Neovascularization in human atherosclerosis. *Circulation*, 113, 2245–2252.
- MOROS, E. (2012). *Physics of Thermal Therapy : Fundamentals and Clinical Applications*. CRC Press.
- MORSE, P. M. et INGARD, K. U. (1968). *Theoretical Acoustics*. McGraw-Hill.
- MULDER, W. J., CORMODE, D. P., HAK, S., LOBATTO, M. E., SILVERA, S. et FAYAD, Z. A. (2008). Multimodality nanotracers for cardiovascular applications. *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine*, 5, S103–S111.
- MULDER, W. J. M., STRIJKERS, G. J., BRILEY-SABOE, K. C., FRIAS, J. C., AGUINALDO, J. G. S., VUCIC, E., AMIRBEKIAN, V., TANG, C., CHIN, P. T. K., NICOLAY, K. et FAYAD, Z. A. (2007). Molecular imaging of macrophages in atherosclerotic plaques using bimodal PEG-micelles. *Magnetic Resonance in Medicine*, 58, 1164–1170.
- MURPHY, C. J., GOLE, A. M., STONE, J. W., SISCO, P. N., ALKILANY, A. M., GOLD-SMITH, E. C. et BAXTER, S. C. (2008). Gold nanoparticles in biology : Beyond toxicity to cellular imaging. *Accounts of Chemical Research*, 41, 1721–1730.
- MYERBURG, M., INTERIAN, A., MITRANI, M., KESSLER, M. et CASTELLANOS, M. (1997). Frequency of sudden cardiac death and profiles of risk. *The American Journal of Cardiology*, 80, 10F–19F.
- NAGHAVI, M., LIBBY, P., FALK, E., CASSCELLS, S. W., LITOVSKY, S., RUMBERGER, J., BADIMON, J. J., ... et WILLERSON, J. T. (2003). From vulnerable plaque to vulnerable patient : A call for new definitions and risk assessment strategies : Part i. *Circulation*, 108, 1664–1672.
- NAHRENDORF, M., JAFFER, F. A., KELLY, K. A., SOSNOVIK, D. E., AIKAWA, E., LIBBY, P. et WEISSLEDER, R. (2006). Noninvasive vascular cell adhesion molecule-1 imaging identifies inflammatory activation of cells in atherosclerosis. *Circulation*, 114, 1504–1511.

- NAHRENDORF, M., ZHANG, H., HEMBRADOR, S., PANIZZI, P., SOSNOVIK, D. E., AIKAWA, E., LIBBY, P., SWIRSKI, F. K. et WEISSLEDER, R. (2008). Nanoparticle PET-CT imaging of macrophages in inflammatory atherosclerosis. *Circulation*, 117, 379–387.
- NAKASHIMA, Y., PLUMP, A. S., RAINES, E. W., BRESLOW, J. L. et ROSS, R. (1994). ApoE deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 14, 133–140.
- NEUBAUER, A. M., MYERSON, J., CARUTHERS, S. D., HOCKETT, F. D., WINTER, P. M., CHEN, J., GAFFNEY, P. J., ROBERTSON, J. D., LANZA, G. M. et WICKLINE, S. A. (2008). Gadolinium-modulated  $^{19}\text{F}$  signals from perfluorocarbon nanoparticles as a new strategy for molecular imaging. *Magnetic Resonance in Medicine*, 60, 1066–1072.
- NIEDERHAUSER, J. J., JAEGER, M., LEMOR, R., WEBER, P. et FRENZ, M. (2005). Combined ultrasound and optoacoustic system for real-time high-contrast vascular imaging in vivo. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 24, 436–440. PMID : 15822801.
- NIEMZ, M. H. (2007). *Laser-Tissue Interactions : Fundamentals and Applications*. Springer.
- NTZIACHRISTOS, V., TUNG, C.-H., BREMER, C. et WEISSLEDER, R. (2002). Fluorescence molecular tomography resolves protease activity in vivo. *Nature Medicine*, 8, 757–761.
- OH, J.-T., LI, M.-L., ZHANG, H. F., MASLOV, K., STOICA, G. et WANG, L. V. (2006). Three-dimensional imaging of skin melanoma in vivo by dual-wavelength photoacoustic microscopy. *Journal of Biomedical Optics*, 11, 034032–4.
- OMS (2011). OMS - maladies cardio-vasculaires. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/fr/>.
- ORAEVSKY, A., JACQUES, S. L., ESENALIEV, R. et TITTEL, F. K. (1994). Time-resolved optoacoustic imaging in layered biological tissues. *Advances in Optical Imaging*, Academic Press, New-York. 161–165.
- OSADA, J., JOVEN, J. et MAEDA, N. (2000). The value of apolipoprotein e knockout mice for studying the effects of dietary fat and cholesterol on atherogenesis. *Current Opinion in Lipidology*, 11, 25–29. PMID : 10750690.
- PAIGEN, B., MORROW, A., BRANDON, C., MITCHELL, D. et HOLMES, P. (1985). Variation in susceptibility to atherosclerosis among inbred strains of mice. *Atherosclerosis*, 57, 65–73.
- PAN, Y., NEUSS, S., LEIFERT, A., FISCHLER, M., WEN, F., SIMON, U., SCHMID, G., BRANDAU, W. et JAHNEN-DECHENT, W. (2007). Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. *Small*, 3, 1941–1949.

- PASSMANN, C. et ERMERT, H. (1996). A 100-MHz ultrasound imaging system for dermatologic and ophthalmologic diagnostics. *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control*, 43, 545–552.
- PATEL, C. K. N. et TAM, A. C. (1981). Pulsed optoacoustic spectroscopy of condensed matter. *Reviews of Modern Physics*, 53, 517. Copyright (C) 2009 The American Physical Society; Please report any problems to prola@aps.org.
- PATTERSON, M. S., CHANCE, B. et WILSON, B. C. (1989). Time resolved reflectance and transmittance for the non-invasive measurement of tissue optical properties. *Applied Optics*, 28, 2331–2336.
- PIEDRAHITA, J. A., ZHANG, S. H., HAGAMAN, J. R., OLIVER, P. M. et MAEDA, N. (1992). Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein e gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89, 4471–4475.
- PLUMP, A. S., SMITH, J. D., HAYEK, T., AALTO-SETALA, K., WALSH, A., VERTUYFT, J. G., RUBIN, E. M. et BRESLOW, J. L. (1992). Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein e-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell*, 71, 343–353.
- POGUE, B. W. et PATTERSON, M. S. (2006). Review of tissue simulating phantoms for optical spectroscopy, imaging and dosimetry. *Journal of Biomedical Optics*, 11, 041102–16.
- PRAHL, S. A. (1999). Optical properties compiled by scott prahl. <http://omlc.ogi.edu/spectra/>.
- REDDICK, R. L., ZHANG, S. H. et MAEDA, N. (1994). Atherosclerosis in mice lacking apo e. evaluation of lesional development and progression. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 14, 141–147.
- ROBERTS, J., STRAUS, R. et COOPER, M. (1965). *Comparative atherosclerosis : the morphology of spontaneous and induced atherosclerotic lesions in animals and its relation to human disease*. [s.n.], New York [etc.].
- ROMER, T. J., BRENNAN, J. F., PUPPELS, G. J., ZWINDERMAN, A. H., DUINEN, V., G, S., VAN DER LAARSE, A., STEEN, V. D., W, A. F., BOM, N. A. et BRUSCHKE, A. V. G. (2000). Intravascular ultrasound combined with raman spectroscopy to localize and quantify cholesterol and calcium salts in atherosclerotic coronary arteries. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 20, 478–483.
- ROSENCWAIG, A. (1980). *Photoacoustics and photoacoustic spectroscopy*. John Wiley & Sons, New York.

- ROSENCWAIG, A. et GERSHO, A. (1976). Theory of the photoacoustic effect with solids. *Journal of Applied Physics*, 47, 64–69.
- ROTHBERG, L. J., SIMON, J. D., BERNSTEIN, M. et PETERS, K. S. (1983). Pulsed laser photoacoustic calorimetry of metastable species. *J. Am. Chem. Soc.*, 105, 3464–3468.
- ROTZIUS, P., THAMS, S., SOEHNLEIN, O., KENNE, E., TSENG, C.-N., BJORKSTROM, N. K., MALMBERG, K.-J., LINDBOM, L. et ERIKSSON, E. E. (2010). Distinct infiltration of neutrophils in lesion shoulders in ApoE mice. *The American Journal of Pathology*, 177, 493–500.
- ROULEAU, L., BERTI, R., NG, V. W. K., MATTEAU-PELLETIER, C., LAM, T., SA-BOURAL, P., KAKKAR, A. K., LESAGE, F., RHEAUME, E. et TARDIF, J.-C. (2013). VCAM-1-targeting gold nanoshell probe for photoacoustic imaging of atherosclerotic plaque in mice. *Contrast Media & Molecular Imaging*, 8, 27–39.
- ROUSE, S. et SIMONS, S. (1978). A non-linear boltzmann equation with analytic solutions. *Journal of Physics A : Mathematical and General*, 11, 423–434.
- RUDD, J. H., MYERS, K. S., BANSILAL, S., MACHAC, J., RAFIQUE, A., FARKOUH, M., FUSTER, V. et FAYAD, Z. A. (2007). 18Fluorodeoxyglucose positron emission tomography imaging of atherosclerotic plaque inflammation is highly reproducible : Implications for atherosclerosis therapy trials. *Journal of the American College of Cardiology*, 50, 892–896.
- RUDIN, M. et WEISSLEDER, R. (2003). Molecular imaging in drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov*, 2, 123–131.
- SALOMATINA, E., JIANG, B., NOVAK, J. et YAROSLAVSKY, A. N. (2006). Optical properties of normal and cancerous human skin in the visible and near-infrared spectral range. *Journal of Biomedical Optics*, 11, 064026–064026–9.
- SANZ, J. et FAYAD, Z. A. (2008). Imaging of atherosclerotic cardiovascular disease. *Nature*, 451, 953–957. PMID : 18288186.
- SARASTE, A., NEKOLLA, S. G. et SCHWAIGER, M. (2009). Cardiovascular molecular imaging : an overview. *Cardiovasc Res*, cvp209.
- SARVAZYAN, A. P., RUDENKO, O. V., SWANSON, S. D., FOWLKES, J. et EMELIANOV, S. Y. (1998). Shear wave elasticity imaging : a new ultrasonic technology of medical diagnostics. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 24, 1419–1435.
- SCHAAR, J. A., MULLER, J. E., FALK, E., VIRMANI, R., FUSTER, V., SERRUYS, P. W., COLOMBO, A., STEFANADIS, C., WARD CASSCELLS, S., MORENO, P. R., MASERI, A. et VAN DER STEEN, A. F. W. (2004). Terminology for high-risk and vulnerable coronary artery plaques. report of a meeting on the vulnerable plaque, june 17 and 18, 2003, santorini, greece. *European Heart Journal*, 25, 1077–1082. PMID : 15191780.

- SCHERRER-CROSBIE, M., STEUDEL, W., HUNZIKER, P. R., FOSTER, G. P., GARRIDO, L., LIEL-COHEN, N., ZAPOL, W. M. et PICARD, M. H. (1998). Determination of right ventricular structure and function in normoxic and hypoxic mice : A transesophageal echocardiographic study. *Circulation*, 98, 1015–1021.
- SCHLOMKA, J. P., ROESSL, E., DORSCHIED, R., DILL, S., MARTENS, G., ISTELE, T., BAUMER, C., HERRMANN, C., STEADMAN, R., ZEITLER, G., LIVNE, A. et PROKSA, R. (2008). Experimental feasibility of multi-energy photon-counting k-edge imaging in pre-clinical computed tomography. *Physics in medicine and biology*, 53, 4031–4047. PMID : 18612175.
- SEGARS, W., TSUI, B. M., FREY, E. C., JOHNSON, G. et BERR, S. S. (2004). Development of a 4-d digital mouse phantom for molecular imaging research. *Molecular Imaging & Biology*, 6, 149–159.
- SHAH, J., PARK, S., AGLYAMOV, S., LARSON, T., MA, L., SOKOLOV, K., JOHNSTON, K., MILNER, T. et EMELIANOV, S. Y. (2008). Photoacoustic imaging and temperature measurement for photothermal cancer therapy. *Journal of Biomedical Optics*, 13, 034024–9.
- SHAW, S. Y. (2009). Molecular imaging in cardiovascular disease : targets and opportunities. *Nature Reviews Cardiology*, 6, 569–579.
- SHUKLA, R., BANSAL, V., CHAUDHARY, M., BASU, A., BHONDE, R. R. et SASTRY, M. (2005). Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment : A microscopic overview. *Langmuir*, 21, 10644–10654.
- SHUNG, K. K. (2006). *Diagnostic ultrasound*. CRC Press.
- SHUNG, K. K., SMITH, M. et TSUI, B. (1992). *Principles of Medical Imaging*. Academic Press, San Diego.
- SIGRIST, M. W. (1986). Laser generation of acoustic waves in liquids and gases. *Journal of Applied Physics*, 60, R83–R122.
- SKALEN, K., GUSTAFSSON, M., RYDBERG, E. K., HULTEN, L. M., WIKLUND, O., INNERARITY, T. L. et BOREN, J. (2002). Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. *Nature*, 417, 750–754.
- SOSNOVIK, D. E., SCHELLENBERGER, E. A., NAHRENDORF, M., NOVIKOV, M. S., MATSUI, T., DAI, G., REYNOLDS, F., GRAZETTE, L., ROSENZWEIG, A., WEISSELEDER, R. et JOSEPHSON, L. (2005). Magnetic resonance imaging of cardiomyocyte apoptosis with a novel magneto-optical nanoparticle. *Magnetic Resonance in Medicine*, 54, 718–724.
- SPLINTER, R. et HOOPER, B. A. (2007). *An Introduction to Biomedical Optics*. Taylor & Francis.

- STEINBERG, D. (2004). Thematic review series : The pathogenesis of atherosclerosis. an interpretive history of the cholesterol controversy : Part i. *Journal of Lipid Research*, 45, 1583–1593.
- STRYER, L., TASKER, R., RHODES, C. et STRYER, L. (2000). *Biochemistry*. W.H. Freeman, New York.
- SUZAKI, H., TAKEDA, S., KOBAYASHI, N., KUBOTA, H., AOMI, T., NAGAOKA, T., IWASAKI, K., UMEZU, M. et UCHIYAMA, A. (2005). Relation between hematocrit and optical density in pulse oximetry -in vitro study with waseda mock circulatory system-. *Conference proceedings : ... Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Conference*, 3, 2626–2629. PMID : 17282777.
- SZABO, T. L. (2004). *Diagnostic Ultrasound Imaging : Inside Out*. Academic Press.
- SZCZESNY, G., VEIHELMANN, A., MASSBERG, S., NOLTE, D. et MESSMER, K. (2004). Long-term anaesthesia using inhalatory isoflurane in different strains of mice - the haemodynamic effects. *Laboratory Animals*, 38, 64–69.
- TABAS, I., WILLIAMS, K. J. et BOREN, J. (2007). Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis. *Circulation*, 116, 1832–1844.
- TAM, A. C. (1986). Applications of photoacoustic sensing techniques. *Reviews of Modern Physics*, 58, 381. Copyright (C) 2009 The American Physical Society ; Please report any problems to prola@aps.org.
- TAN, Z., TANG, Z., WU, Y., LIAO, Y., DONG, W. et GUO, L. (2011). Multimodal subcellular imaging with microcavity photoacoustic transducer. *Optics Express*, 19, 2426–2431.
- TANAKA, N., DALTON, N., MAO, L., ROCKMAN, H. A., PETERSON, K. L., GOTTSALL, K. R., HUNTER, J. J., CHIEN, K. R. et ROSS, J. (1996). Transthoracic echocardiography in models of cardiac disease in the mouse. *Circulation*, 94, 1109–1117.
- TARUTTIS, A., CLAUSSEN, J., RAZANSKY, D. et NTZIACHRISTOS, V. (2012). Motion clustering for deblurring multispectral optoacoustic tomography images of the mouse heart. *Journal of biomedical optics*, 17, 016009. PMID : 22352659.
- TARUTTIS, A., HERZOG, E., RAZANSKY, D. et NTZIACHRISTOS, V. (2010). Real-time imaging of cardiovascular dynamics and circulating gold nanorods with multispectral optoacoustic tomography. *Optics Express*, 18, 19592–19602.
- TREEBY, B. E. et COX, B. T. (2010). k-wave : MATLAB toolbox for the simulation and reconstruction of photoacoustic wave fields. *Journal of Biomedical Optics*, 15, 021314–12.

- TREEBY, B. E., ZHANG, E. Z. et COX, B. T. (2010). Photoacoustic tomography in absorbing acoustic media using time reversal. *Inverse Problems*, 26, 115003.
- TSAI, C.-L., CHEN, J.-C. et WANG, W.-J. (2001). Near-infrared absorption property of biological soft tissue constituents. *Journal of Medical and Biological Engineering*, 21, 7–14.
- TUCHIN, V. V. (2002). Tissue phantoms. V. V. Tuchin, A. B. Pravdin, S. P. Chernova et T. G. Papazoglou, éditeurs, *Handbook of Optical Biomedical Diagnostics*, SPIE Press, Bellingham (Washington, USA). 312–346.
- USTUNER, K. F. et HOLLEY, G. L. (2003). Ultrasound imaging system performance assessment.
- VAN STAVEREN, H. J., MOES, C. J. M., VAN MARIE, J., PRAHL, S. A. et VAN GERMERT, M. J. C. (1991). Light scattering in intralipid-10% in the wavelength range of 400–1100 nm. *Applied Optics*, 30, 4507–4514.
- VERGEER, M., HOLLEBOOM, A. G., KASTELEIN, J. J. P. et KUIVENHOVEN, J. A. (2010). The HDL hypothesis : does high-density lipoprotein protect from atherosclerosis? *Journal of Lipid Research*, 51, 2058–2073.
- VILLANUEVA, F. S. et WAGNER, W. R. (2008). Ultrasound molecular imaging of cardiovascular disease. *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine*, 5, S26–S32.
- WANG, B., YANTSEN, E., LARSON, T., KARPIOUK, A. B., SETHURAMAN, S., SU, J. L., SOKOLOV, K. et EMELIANOV, S. Y. (2009). Plasmonic intravascular photoacoustic imaging for detection of macrophages in atherosclerotic plaques. *Nano Letters*, 9, 2212–2217.
- WANG, L., JACQUES, S. L. et ZHENG, L. (1995). MCML—Monte carlo modeling of light transport in multi-layered tissues. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, 47, 131–146.
- WANG, L. V. et WU, H.-I. (2007). *Biomedical optics*. Wiley-Interscience.
- WANG, X., KU, G., WEGIEL, M. A., BORNHOP, D. J., STOICA, G. et WANG, L. V. (2004a). Noninvasive photoacoustic angiography of animal brains in vivo with near-infrared light and an optical contrast agent. *Optics Letters*, 29, 730–732.
- WANG, Y., XIE, X., WANG, X., KU, G., GILL, K. L., O'NEAL, D. P., STOICA, G. et WANG, L. V. (2004b). Photoacoustic tomography of a nanoshell contrast agent in the in vivo rat brain. *Nano Letters*, 4, 1689–1692.
- WEBER, C. et NOELS, H. (2011). Atherosclerosis : current pathogenesis and therapeutic options. *Nature Medicine*, 17, 1410–1422.
- WEISSLEDER, R. (2001). A clearer vision for in vivo imaging. *Nature Biotechnology*, 19, 316–317.

- WEISSLEDER, R. et PITTET, M. J. (2008). Imaging in the era of molecular oncology. *Nature*, 452, 580–589. PMID : 18385732.
- WEISSLEDER, R., ROSS, B. D., REHEMTULLA, A. et GAMBHIR, S. S., éditeurs (2010). *Molecular Imaging : Principles and Practice*. PMPH-USA.
- WELLS, P. N. T. (1999). Ultrasonic imaging of the human body. *Reports on Progress in Physics*, 62, 671–722.
- WEYERS, J. J., CARLSON, D. D., MURRY, C. E., SCHWARTZ, S. M. et MAHONEY, JR., W. M. (2012). Retrograde perfusion and filling of mouse coronary vasculature as preparation for micro computed tomography imaging. *Journal of Visualized Experiments*.
- WU, J. C., BENDEL, F. M. et GAMBHIR, S. S. (2007). Cardiovascular molecular imaging. *Radiology*, 244, 337–355.
- WU, N., TIAN, Y., ZOU, X., SILVA, V., CHERY, A. et WANG, X. (2012). High-efficiency optical ultrasound generation using one-pot synthesized polydimethylsiloxane-gold nanoparticle nanocomposite. *Journal of the Optical Society of America B*, 29, 2016–2020.
- XU, M. et WANG, L. V. (2003). Analytic explanation of spatial resolution related to bandwidth and detector aperture size in thermoacoustic or photoacoustic reconstruction. *Physical Review E*, 67, 056605.
- XU, M. et WANG, L. V. (2005). Universal back-projection algorithm for photoacoustic computed tomography. *Physical Review E*, 71, 016706. Copyright (C) 2009 The American Physical Society ; Please report any problems to prola@aps.org.
- XU, M. et WANG, L. V. (2006). Photoacoustic imaging in biomedicine. *Review of Scientific Instruments*, 77, 041101–22.
- XU, M., XU, Y. et WANG, L. (2003). Time-domain reconstruction algorithms and numerical simulations for thermoacoustic tomography in various geometries. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 50, 1086 –1099.
- YANG, X., STEIN, E. W., ASHKENAZI, S. et WANG, L. V. (2009). Nanoparticles for photoacoustic imaging. *Wiley Interdisciplinary Reviews : Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 1, 360–368.
- YAO, D.-K. et WANG, L. V. (2013). Measurement of  $\text{gr}\tilde{\text{A}}_{\frac{1}{4}}^{\text{neisen}}$  parameter of tissue by photoacoustic spectrometry. International Society for Optics and Photonics.
- YAO, L. et JIANG, H. (2011). Photoacoustic image reconstruction from few-detector and limited-angle data. *Biomedical Optics Express*, 2, 2649–2654.
- YIN, B., XING, D., WANG, Y., ZENG, Y., TAN, Y. et CHEN, Q. (2004). Fast photoacoustic imaging system based on 320-element linear transducer array. *Physics in Medicine and Biology*, 49, 1339–1346.

- ZADELAAR, S., KLEEMANN, R., VERSCHUREN, L., WEIJ, J. D. V.-V. D., HOORN, J. V. D., PRINCEN, H. M. et KOOISTRA, T. (2007). Mouse models for atherosclerosis and pharmaceutical modifiers. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 27, 1706–1721.
- ZELL, K., SPERL, J., VOGEL, M., NIESSNER, R. et HAISCH, C. (2007). Acoustical properties of selected tissue phantom materials for ultrasound imaging. *Physics in Medicine and Biology*, 52, N475–N484.
- ZEMANSKY, M. W. (1996). *Heat and Thermodynamics*. McGraw-Hill Science/Engineering/Math, 7th édition.
- ZEMP, R. J., BITTON, R., LI, M.-L., SHUNG, K. K., STOICA, G. et WANG, L. V. (2007). Photoacoustic imaging of the microvasculature with a high-frequency ultrasound array transducer. *Journal of Biomedical Optics*, 12, 010501. PMID : 17343475.
- ZEMP, R. J., SONG, L., BITTON, R., SHUNG, K. K. et WANG, L. V. (2008). Real-time photoacoustic microscopy in vivo with a 30-MHz ultrasound array transducer. *Optics Express*, 16, 7915–7928.
- ZERDA, A. D. L., LIU, Z., BODAPATI, S., TEED, R., VAITHILINGAM, S., KHURI-YAKUB, B. T., CHEN, X., DAI, H. et GAMBHIR, S. S. (2010). Ultrahigh sensitivity carbon nanotube agents for photoacoustic molecular imaging in living mice. *Nano Letters*, 10, 2168–2172.
- ZERDA, A. D. L., ZAVALETA, C., KEREN, S., VAITHILINGAM, S., BODAPATI, S., LIU, Z., LEVI, J., SMITH, B. R., MA, T.-J., ORALKAN, O., CHENG, Z., CHEN, X., DAI, H., KHURI-YAKUB, B. T. et GAMBHIR, S. S. (2008). Carbon nanotubes as photoacoustic molecular imaging agents in living mice. *Nature nanotechnology*, 3, 557–562. PMC2562547.
- ZEROUALI BOUKHAL, K. (2011). Conception et caractérisation d'un outil de neuronavigation pour le rat. <http://publications.polymtl.ca/705/>.
- ZHANG, E., LAUFER, J. et BEARD, P. (2008). Backward-mode multiwavelength photoacoustic scanner using a planar fabry-perot polymer film ultrasound sensor for high-resolution three-dimensional imaging of biological tissues. *Applied optics*, 47, 561–577. PMID : 18239717.
- ZHANG, H. F., MASLOV, K., STOICA, G. et WANG, L. V. (2006). Functional photoacoustic microscopy for high-resolution and noninvasive in vivo imaging. *Nature Biotechnology*, 24, 848–851. PMID : 16823374.
- ZHANG, S. H., REDDICK, R. L., PIEDRAHITA, J. A. et MAEDA, N. (1992). Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein e. *Science*, 258, 468–471.

ZHOU, Y.-Q., DAVIDSON, L., HENKELMAN, R. M., NIEMAN, B. J., FOSTER, F. S., YU, L. X. et CHEN, X. J. (2004a). Ultrasound-guided left-ventricular catheterization : a novel method of whole mouse perfusion for microimaging. *Lab Invest*, 84, 385–389.

ZHOU, Y.-Q., FOSTER, F. S., NIEMAN, B. J., DAVIDSON, L., CHEN, X. J. et HENKELMAN, R. M. (2004b). Comprehensive transthoracic cardiac imaging in mice using ultrasound biomicroscopy with anatomical confirmation by magnetic resonance imaging. *Physiological Genomics*, 18, 232 –244.

ZOOFARI (2011). Relations of the aorta, trachea, esophagus and other heart structures. [http://en.wikipedia.org/wiki/File:Relations\\_of\\_the\\_aorta,\\_trachea,\\_esophagus\\_and\\_other\\_heart\\_structures.png](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Relations_of_the_aorta,_trachea,_esophagus_and_other_heart_structures.png).

## ANNEXE A

## CONTRIBUTIONS SCIENTIFIQUES

**Articles avec arbitrage**

L. Rouleau, R. Berti, V. W. K. Ng, C. Matteau-Pelletier, T. Lam P. Saboural, A. Kakkar, F. Lesage, E. Rhéaume, J.-C. Tardif, VCAM-1-targeting gold nanoshell probe for photoacoustic imaging of atherosclerotic plaque in mice, *Contrast Media and Molecular Imaging*, vol. 8, no 1, pp. 27-39, Jan/Feb 2013.

B. Li, M. Abran, C. Matteau-Pelletier, L. Rouleau, T. Lam, R. Sharma, E. Rheaume, A. Kakkar, J. Tardif, and F. Lesage, Low-cost three-dimensional imaging system combining fluorescence and ultrasound, *J. Biomed. Opt.* 16, 126010 (2011).

**Actes de conférences avec comité de lecture**

R. Berti, C. Matteau Pelletier, E. Guevara Codina, I. Londono, P. Pouliot, F. Lesage, G. A Lodygensky, Locoregional cortical oxygen saturation and resting state assessment by photoacoustic imaging following an inflammatory injury in the neonatal rat brain, soumis à *Pediatric Academic Societies' Annual Meeting 2013*.

L. Rouleau, P. Saboural, C. Matteau-Pelletier, L. Baoqiang, K. Zerouali, T. Lam, V. Ng, A. Kakkar, E. Rheaume, J. Tardif, F. Lesage, Development of Targeted Probes Against VCAM-1 for Photoacoustic Imaging in Atherosclerotic Mice. World Molecular Imaging Congress 2011.

M. Abran, C Matteau-Pelletier, K. Zerouali-Boukhal, J.-C. Tardif, F. Lesage, Combined acoustic-photoacoustic and fluorescence imaging catheter for the detection of the atherosclerotic plaque, *Proceedings of SPIE*, volume 789918, Feb 2011.

**TRAVAUX DE MAÎTRISE****Articles avec arbitrage**

J.-M. Lina, C. Matteau-Pelletier, M. Dehaes, M. Desjardins, F. Lesage, Wavelet-based estimation of the hemodynamic responses in diffuse optical imaging. *Medical Image Analysis*, vol. 14, no. 4, pp. 606-16, Aug 2010.

C. Matteau-Pelletier, M. Dehaes, F. Lesage et J.-M. Lina, 1/f Noise in Diffuse Optical Imaging and Wavelet-Based Response Estimation, *IEEE Transactions on Medical Imaging*, vol. 28, no.3, pp. 415-22, Mar 2009.

J.-M. Lina, M. Dehaes, C. Matteau-Pelletier et F. Lesage, Complex wavelets applied to diffuse optical spectroscopy for brain activity detection, *Optics Express*, vol. 16, no. 2, pp. 1029-1050, 2008.

**Actes de conférences avec comité de lecture**

C. Matteau-Pelletier, M. Dehaes, F. Lesage et J.-M. Lina, Wavelet-based estimation of long-memory noise in diffuse optical imaging, *5th International Symposium on Biomedical Imaging*, IEEE, 2008.

## ANNEXE B

### FANTÔMES D'IMAGERIE PHOTOACOUSTIQUE

Outre le réalisme des propriétés spécifiques, les considérations supplémentaires qui guident le choix des matériaux sont la stabilité physique (température, humidité, dégradation bactérienne ou évaporation des solvants), la stabilité chimique (photoblanchissage), la simplicité de fabrication et de manipulation, la compatibilité des composantes ainsi que le coût de fabrication. Les procédures de préparation influencent fortement les caractéristiques des fantômes, c'est pourquoi les valeurs trouvées de la littérature s'écartent souvent des valeurs expérimentales. Des revues de littérature peuvent être trouvées pour les fantômes optiques (Pogue et Patterson, 2006; Tuchin, 2002; Azar *et al.*, 2008), acoustiques (Zell *et al.*, 2007) et photoacoustiques (Kharine *et al.*, 2003; Cook *et al.*, 2011). Sans surprise, des fruits et légumes variés ainsi que certaines coupes de viande offrent souvent les propriétés les plus réalistes à peu de frais Hocking *et al.* (2011). Les inclusions constituées de tubes de plastique remplis de liquides pour reproduire la circulation des vaisseaux sanguins doivent être utilisés avec prudence car la rigidité des polymères influence énormément le coefficient de transmission acoustique (Lochab et Singh, 2004).

#### B.1 Substrats

Les substrats généralement utilisés pour constituer la base des fantômes sont l'eau, les hydrogels physiques, obtenus par chauffage et refroidissement, les hydrogels chimiques, obtenus par des réactions chimiques telle la polymérisation, et d'autres polymères.

##### B.1.1 Émulsion lipidique

Les fantômes aqueux sont rapides et simples de fabrication mais ils sont limités à la forme du contenant, et donc souvent d'une complexité irréaliste, particulièrement en imagerie ultrasonore. Un des fantômes optiques les plus communs est une émulsion lipidique connue sous le nom commercial d'Intralipide (Il 20% Pharmacia Corp.). L'Intralipide est utilisée comme diffusant optique, surtout pour les fantômes liquides (van Staveren *et al.*, 1991). Son homogénéité dure quelques heures et son contenu lipidique est légèrement fluorescent. Le désavantage majeur des fantômes liquides est l'agrégation des colloïdes et leur sédimentation.

### B.1.2 Hydrogels

Les hydrogels sont des polymères réticulés expansés dans l'eau, évidemment hydrophiles ; ils ont des propriétés acoustiques similaires à celles de l'eau. Les hydrogels physiques comme l'agar et la gélatine sont utilisés en IRM et en imagerie ultrasonore depuis des décennies, et en optique depuis le milieu des années 1990. Ils sont également utilisés en CT et TEP, et sont donc particulièrement adaptés pour l'imagerie multimodale. Ils sont généralement transparents aux ultrasons et optiquement translucides. Ils doivent donc être mélangés à des purs absorbants et diffusants en proportions appropriées. Un hydrogel physique typique (0-2% agar, 8% gélatine) a une vitesse du son et une impédance acoustique semblable aux tissus mous humains. Du formaldéhyde (0,2 %) peut être ajouté pour hausser le point de fusion en augmentant la réticulation tout en préservant un faible module de Young. La gélatine et l'agar ont un faible coût et sont faciles à fabriquer, mais ils se dégradent rapidement au bout de quelques semaines. Ces fantômes tendent à sécher, et il faut donc les protéger avec de l'huile ou une pellicule alimentaire. La dégradation bactérienne est rapide mais peut être ralentie par l'utilisation d'un agent de conservation (p. ex. EDTA). Leur manipulation est délicate mais ils permettent néanmoins de réaliser des inclusions avec un bon couplage acoustique.

Les hydrogels chimiques, comprenant le gel polyacrylamide (PAA) et le gel à base d'alcool polyvinylique (PVA), sont beaucoup plus stables que les précédents et sont appropriés, entre autres, pour la calibration. Les gels de PVA sont aussi appelés *cryogels* car leur coefficient de diffusion (acoustique et optique) et de rigidité augmente avec le nombre de cycles de congélation et de décongélation. Cette propriété peut compliquer l'ajustement indépendant des propriétés acoustiques et optiques. Les gels de PVA possèdent un coefficient d'atténuation acoustique intermédiaire entre les tissus et l'agar et de meilleures propriétés mécaniques que la gélatine, ce qui les rends moins fragiles une fois préparés. Il faut noter que le PAA est potentiellement neurotoxique.

### B.1.3 Silicone

Le silicone RTV (*room temperature vulcanizing*, p. ex. Elastosil 604) peut être stable pendant des années. Il est robuste aux manipulations indéliques ce qui lui donne un avantage net pour les études de répétabilité. Sa préparation est cependant plus longue et plus complexe. Un moulage de forme peut être réalisé, mais le couplage acoustique n'est pas évident pour des fantômes multicouches. La vitesse du son dans le silicone est significativement plus basse que pour les tissus mous humains et avec un plus grand coefficient d'atténuation acoustique ; l'impédance acoustique est également plus basse. Il est donc beaucoup moins approprié pour imagerie US que pour l'optique.

## B.2 Agents diffusants et absorbants

### B.2.1 Propriétés optiques

Dans le cas de l'imagerie optique en régime de diffusion, on s'intéresse aux valeurs de  $\mu_a$  et  $\mu'_s$  dans la fenêtre proche infrarouge. À cette fin, divers matériaux ou substances peuvent être ajoutés au substrat. Le coefficient  $\mu'_s$  varie énormément dans les tissus mous, passant de  $3,84 \text{ cm}^{-1}$  Cheong *et al.* (1990) dans le sang à  $4000 \text{ cm}^{-1}$  dans l'épiderme (Salomatina *et al.*, 2006). L'absorption typique varie de  $0,09 \text{ cm}^{-1}$  dans le gras à  $6600 \text{ cm}^{-1}$  dans l'épiderme Cheong *et al.* (1990). L'eau et les hydrogels sont souvent compatibles avec l'addition de molécules organiques, ce qui favorise ces bases pour les études de laboratoire. Toutefois, la gélatine tend à interagir avec les solutés pour causer un élargissement des pics d'absorption et une translation vers le rouge (Akarcay *et al.*, 2012). La stabilité des chromophores dans le silicone varie selon le cas. Le composé le plus commun pour augmenter l'absorption est l'encre de chine. Celle-ci est relativement plate spectralement mais elle a l'inconvénient d'être légèrement diffusante (Madsen *et al.*, 1992). Des agents absorbants plus sophistiqués permettent un comportement spectral semblable à celui de l'hémoglobine (p. ex. Epolight, Epolin Inc., Newark, New Jersey). Trois choix principaux s'offrent pour servir d'agents diffusants : les microparticules lipidiques, les poudres blanches métal-oxyde ou les microparticules polymériques. Les microparticules lipidiques (p. ex. Intralipide diluée) sont biologiquement similaires aux membranes lipidiques des organelles, mais doivent être utilisées à court terme parce qu'elle se décomposent rapidement. Dans le cas où l'Intralipide serait ajoutée à un gel, le substrat a une grande influence sur  $\mu'_s$  (Beck *et al.*, 1998), soit par les modifications induites par la température durant la préparation ou par des changements structurels des colloïdes interagissant avec la matrice. Les poudres d'oxyde d'aluminium ou de titane (p. ex.  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{SiO}_2$  ou  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) sont les plus utilisées car elles sont stables dans les milieux hydrophiles et hydrophobes. Cependant, ces particules précipitent rapidement dans les gels le temps que ceux-ci soient fixés ; il y a donc presque systématiquement un gradient de diffusion vertical dans ces fantômes. L'Intralipide cause, quant à elle, une remontée des colloïdes, mais il y a aussi présence d'un gradient vertical. Les microsphères de polymères (p. ex. polystyrène) sont les plus stables, et offrent une excellente reproductibilité au niveau de la taille et de l'index de réfraction. Elles reflètent également bien à la théorie de Mie. Par contre, elles sont chères, surtout lorsque utilisées avec des fantômes jetables en gélatine/agar. Les microsphères de polystyrènes peuvent se dissoudre dans les solvants organiques ; elle ne sont donc pas conseillées pour les gels chimiques. À l'instar des autres diffusants, elles peuvent aussi s'agréger.

### B.2.2 Propriétés acoustiques

Les propriétés acoustiques de base recherchées sont la vitesse du son, le coefficient d'atténuation et le coefficient de rétrodiffusion acoustique. Dans les tissus mous, la vitesse moyenne du son est de 1 540 m/s (Madsen *et al.*, 1978) et le coefficient d'atténuation acoustique est de 0,5-3,3 dB/(cm · MHz) mais il peut être aussi bas que 0,18 dB/(cm · MHz) pour le sang. Les particules de graphite, de silice et les microsphères de polystyrène ou de verre sont généralement utilisés comme diffusants acoustiques pour les fantômes d'imagerie US. Toutefois, les diffusants optiques comme les poudres de TiO<sub>2</sub> ou l'Intralipide peuvent également produire une échogénicité réaliste. En particulier, l'Intralipide introduit de la rétrodiffusion de l'ordre de  $10^{-4} \text{ cm}^{-1} \text{ sr}^{-4}$  (Cook *et al.*, 2011), valeur assez commune aux tissus. L'utilisation d'alcool peut moduler la vitesse du son dans le milieu, si désiré. Si le substrat est l'Intralipide, les deux interagissent ce qui entraîne une variation des propriétés optiques et acoustiques. La concentration d'Intralipide affecte aussi grandement le coefficient d'atténuation. Or, des variations dans l'atténuation et le coefficient de rétrodiffusion affectent l'échogénicité de l'image ; si la rétrodiffusion est trop faible, la visibilité des inclusions sera grandement exagérée. Si des variations dans la vitesse du son causent des aberrations géométrique, il faut toutefois noter que la vitesse du son dans les tissus peut elle-même varier de 1 350 m/s (gras) à 1 700 m/s (peau) dans la bande fréquentielle 1-10 MHz (Cobbold, 2007).