

École Doctorale Mathématiques, Sciences de
l'Information et de l'Ingénieur

UdS – INSA – ENGEES

THÈSE

présentée pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Strasbourg

Discipline : Image, sciences et technologies de l'information

par

Franklin TELLIER

**Détection du ganglion sentinelle par des méthodes
optiques : utilisation des photons diffusés et de
fluorescence.**

Soutenue publiquement le 16 Décembre 2011

Membres du jury

Directeur de thèse :

M. Patrick Poulet, *Maître de Conférences-Praticien Hospitalier,
Université de Strasbourg.*

Rapporteur externe :

Mme. Geneviève Bourg-Heckly, *Maître de Conférences,
Université de Paris.*

Rapporteur externe :

M. Frédéric Marchal, *Professeur des Universités-Praticien Hospitalier,
Université de Nancy.*

Examineur :

M. Jean François Rodier, *Professeur des Universités-Praticien
Hospitalier, Université de Strasbourg.*

Membres invités

M. Wilfried Uhring, *Maître de Conférences, Université de Strasbourg.*

M. Hervé Simon, *Ingénieur, Eurorad SA Eckbolsheim.*

M. Jacques Chambron, *Professeur, Faculté de médecine de Strasbourg*

À ma marraine Noëlle...

Remerciements

Je suis convaincu que « chacun est avant tout riche de sa santé, de son savoir et des relations qu'il entretient avec les autres » (J. Attali) et qu'ainsi ce sont les échanges entre personnes qui nous permettent de forger notre personnalité et de faire de chacun d'entre nous ce que nous sommes. Ce travail de thèse en est un exemple criant. Durant les trois années de ce doctorat j'ai eu l'occasion de réaliser de nombreuses rencontres scientifiques, amicales et humaines qui m'ont permis d'aboutir à ce travail en y contribuant de près ou de loin.

Je tiens tout d'abord à exprimer l'expression de mes remerciements les plus chaleureux à mon directeur de thèse, Patrick Poulet. Je lui suis reconnaissant de m'avoir accueilli dans son groupe de travail et de m'avoir accordé sa confiance pour mener à bien cette thèse. J'ai beaucoup appris grâce à sa compétence scientifique et à sa rigueur. J'ai également apprécié cette collaboration lorsqu'elle s'est quelques fois transformée en oppositions...sportives ! Je tiens ici à souligner, Patrick, que le fait de finir 1 minute après toi lors d'un Bike&Run, est essentiellement dû au grand respect que je porte envers la hiérarchie et non à une défaillance de ma part.

Des remerciements particuliers vont à Geneviève Bourg-Heckly et Frédéric Marchal pour avoir accepté de rapporter mon travail de thèse. Je remercie également Jean-François Rodier d'avoir accepté d'être membre de mon jury en tant qu'examineur. Enfin je remercie les membres invités Wilfried Uhring, Hervé Simon et Jacques Chambron. Grâce à ce jury très intéressé, j'ai pu profiter de discussions pointues et fructueuses sur mon travail le jour de ma soutenance.

Je remercie l'entreprise Eurorad, sa PDG Anne Kazandjian et Paul Siffert, de m'avoir accordé leur confiance afin de mener à bien ce projet. Un remerciement particulier est bien sûr apporté à Hervé Simon avec qui j'ai travaillé conjointement durant cette thèse et, sans qui, les différents prototypes constitués n'auraient pu exister. Je n'oublie bien sûr aucunement les

différentes personnes travaillant au sein de l'entreprise, que j'ai pu côtoyer avec plaisir (Geneviève, Laurent, Malgo...).

Je n'oublie pas de remercier le centre anticancéreux Paul Strauss de Strasbourg et plus particulièrement Jean-François Rodier de m'y avoir accueilli. J'ai ainsi pu avoir la chance de me rendre au bloc opératoire et assister à de nombreuses opérations afin de saisir la « vérité du terrain ». Je remercie également l'ensemble du service d'anatomo-pathologie d'avoir accepté que je m'y installe. Je pense plus particulièrement à Marc Wilt et Jean-Pierre Ghnassia les anatomo-pathologistes et les techniciennes du laboratoire (merci Arlette !) au près de qui j'ai appris d'innombrables choses.

Je tiens également à remercier l'ensemble des membres du groupe d'optique de recherche, dirigé par Patrick Poulet, avec une attention particulière pour deux personnes. La première est Renée Chabrier « tatie », tant pour son aide précieuse au niveau du travail que pour l'attention, l'écoute et le soutien qu'elle a pu m'apporter durant ces trois années. Il est certain que l'issue de cette thèse est, en très grande partie, grâce à elle : merci Renée !

La seconde personne n'est autre que mon collègue de bureau et ami Farouk Nouizi. Notre « collocation » durant ces trois années a été jalonnée par de nombreuses péripéties et je ne le remercierai jamais assez pour tout ce qu'il a pu faire pour moi (Hide Out Paris 2009, quelque part entre Washington avenue et Collins avenue Miami 2010 ...). Nos discussions, que ce soit sur le plan professionnel, sportif, musical ou autre ont toujours réussi à générer entre nous une émulation qui nous a amené à partager d'excellents moments : thanks bro !

Un groupe de travail ne se résumant pas à deux entités je n'oublie pas les différentes personnes ayant eu une importance durant ce doctorat tel que les différents post-docs qui se sont succédés au sein du groupe: Marine Amouroux, Gilberto Diaz et François-Xavier Blé mais également les stagiaires ayant travaillé sur ce projet avec une attention particulière pour Hervé Tubaldo et l'année passée ensemble, qui m'a permis d'améliorer considérablement mes compétences en LabVIEW (...et également en squash) ; Merci à tous !

D'une manière plus générale je remercie bien évidemment le Laboratoire d'Imagerie et de Neurosciences Cognitives (LINC) de m'avoir accueilli, formé et encadré à commencer par son directeur Christian Kelche et le chef de l'équipe d'imagerie *in-vivo* Jean-Paul Armspach. Merci également à l'ensemble des personnes permanentes que j'ai pu côtoyer durant ces trois années : Daniel Grucker, Blandine Guignard, Jérôme Steibel, Julien Lamy, Frédérique Ostré, Nathalie Heider, Thierry Guiberteau, Nathalie Parizel, Lam Dao, Daniel Gounot, Joseph

Baruthio, Simone Poulet... Un laboratoire de recherche ne pouvant être ce qu'il est sans ses doctorants, je remercie l'ensemble des doctorants que j'ai rencontrés durant mon passage tels que (pardon pour ceux que j'oublie...) : Rasata, Hervé, Christelle, Bessem, Swati, Wissam, Benoit, Nico, P-H, Line et plus particulièrement Félix Renard (mon coéquipier de Bike&Run) et Antoine Grigis pour les excellents moments (« Cocoloboesque » et « Exilien » pour ne citer qu'eux...) que l'on a pu partager pendant et surtout en dehors du travail.

Je tiens à dire un grand merci à mes proches qui m'ont soutenu dans les bons comme dans les moments difficiles à commencer par Corinne qui a su encaisser mes changements d'humeur ainsi que mes absences répétées et fréquentes. Je n'oublie bien évidemment pas de remercier ma famille qui, chacun à sa façon, a su m'aider et me soutenir et plus particulièrement ma tante, Françoise, de m'avoir hébergé durant les sept années précédant cette thèse et mes parents de m'avoir soutenu durant l'ensemble de ma scolarité ; mais également ma sœur Charlotte-Sandra, mon cousin Ghislain (Hinaaro oe te pia ?), ma cousine Céline, mon petit cousin (qui n'est plus si petit que ça...) Antoine ...

Finalement, je remercie et salue l'ensemble de mes amis à commencer par ma « familia » meusienne : Anne-So, Julien, Sam, Mylène, Yoyo et Elliott le petit dernier ! J'ai également eu la chance de rencontrer et d'apprendre à connaître un grand nombre de personnes durant cette grosse dizaine d'années de fac. Je ne citerai pas tous le monde mais je mettrai en avant : la « dream team » (Glass, JM, Rachma, Touit, Fab, Till et Conut) et par ordre alphabétique (afin de ne pas faire une sorte de classement) : Andrey, Arnaud, l'exemplaire famille Custodio (Véro, Christian, Matéo et Margot), Dodo, Drop's, Chloé, la formidable famille Feltz (Thierry, Monique, Jennifer, Elodie, Audrey et Jaysonn), Fanny, François, Greg, Issam, Julien³, Julieta, Josiane Wiederkehr, Kak's, Kokosch, Laura², Léonie, l'Exil (Julien, Julie, Martin, Marjo), Maële, Marcus, Mélanie, MJ, Nathalie, Philippe², Radio Roland Garros, Rami, Raph, Rom's, Séb, Steeve, Stephanie, Rico, Tarek, Tiff. Chacun d'entre vous sait ce qu'il représente pour moi !

Enfin, je tiens à avoir une pensée pour les personnes qui comptaient pour moi et qui ne sont plus là pour lire ce manuscrit. J'aimerais leur dire que j'aurai toujours une pensée pour eux à commencer pour ma marraine Noëlle Junker qui était comme une mère pour moi et à qui je dédie l'ensemble de ce travail. Je pense également à mes grands parents Rêne et Léon Watelet et aussi à Jenny Chaillou parti bien trop tôt... Je ne vous oublie pas...

Introduction	1
1 Synthèse bibliographique concernant le cancer du sein et le ganglion sentinelle	5
1.1 Epidémiologie et risques du cancer du sein.....	5
1.1.1 Epidémiologie du cancer sein : quelques données chiffrées	5
1.1.2 Risques de cancer du sein.....	5
1.2 Anatomie et histologie.....	6
1.2.1 Le sein	6
1.2.2 Le système lymphatique.....	7
1.2.3 Le ganglion.....	9
1.3 La technique du ganglion sentinelle	10
1.3.1 Historique : du curage axillaire au ganglion sentinelle	10
1.3.2 Méthodologie	11
1.3.3 Autres méthodes de détections.....	12
1.3.3.1 L'imagerie par Résonance Magnétique (IRM) :.....	12
1.3.3.2 Echographie ultrasonore	14
1.3.3.3 Tomographie à émission de positons.....	15
1.3.3.4 Imagerie photoacoustique.....	16
1.3.3.5 Imagerie optique avec des grains quantiques	17
1.3.3.6 Imagerie de Fluorescence	18
1.4 Bibliographie	20
2 Optique des milieux biologiques: théorie et propriétés	27
2.1 Interaction lumière/tissus biologiques	28
2.1.1 Indice de réfraction.....	28
2.1.2 L'absorption.	29
2.1.3 Diffusion.....	31
2.1.3.1 Le phénomène de diffusion	31
2.1.3.2 La diffusion d'un point de vue macroscopique	32
2.1.4 Propriétés optiques des tissus	35
2.1.4.1 L'eau	36
2.1.4.2 L'hémoglobine.....	36
2.1.4.3 La mélanine	37
2.2 Fluorescence	37
2.2.1 Caractéristiques de l'émission.....	37

2.2.1.1	Conversion Interne	38
2.2.1.2	Croisement intersystème et phosphorescence	39
2.2.1.3	La fluorescence	39
2.2.2	Temps de vie de fluorescence	41
2.2.3	L'intensité de fluorescence	42
2.2.4	Rendement quantique de fluorescence	42
2.3	Bibliographie	44
3	Caractérisation physicochimique du colorant Bleu Patenté V	47
3.1	Préambule	47
3.2	Propriétés physico chimiques du Bleu Patenté V	48
3.2.1	Nomenclature du Bleu Patenté	48
3.2.2	Solubilité du Bleu Patenté V	49
3.2.3	Spectrométrie du Bleu Patenté V	49
3.2.4	Interactions Bleu Patenté V / Albumines	52
3.2.4.1	Le sérum d'albumine humaine	52
3.2.4.2	Choix du Bleu Patenté V pour la détection du Ganglion sentinelle	53
3.2.5	Etude spectroscopique	54
3.3	Etude fluorimétrique du Bleu Patenté V	55
3.3.1	Méthode	55
3.3.2	Résultats	57
3.3.2.1	Rendement quantique du Bleu Patenté V libre	57
3.3.2.2	Rendement quantique du Bleu Patenté V lié à l'albumine	58
3.4	L'utilisation du Bleu Patenté V en médecine et ses risques	60
3.5	Bibliographie	62
4	Méthodes et instrumentations pour la détection optique du ganglion sentinelle	67
4.1	Détection des photons diffusés à deux puis quatre longueurs d'onde	67
4.1.1	I.1 Principe de fonctionnement	67
4.1.2	Présentation des différents éléments	70
4.1.2.1	Les diodes lasers	70
4.1.2.2	Le détecteur	72
4.1.2.3	Les sondes de détection	73
4.1.2.4	Les cartes entrée/sortie et leur logiciel de commande	74
4.1.3	Implémentation logiciel	78

4.2	Détection des photons de fluorescence.....	79
4.2.1	Principe de fonctionnement.....	79
4.2.2	Présentation des différents éléments	80
4.2.2.1	Laser	80
4.2.2.2	Le détecteur	83
4.2.2.3	Les filtres	85
4.2.3	Traitement des données et implémentation logiciel.....	87
4.3	Objets tests.....	88
4.3.1	Caractérisation des objets tests.....	88
4.3.2	Conception des fantômes optiques.....	90
4.3.2.1	Fantômes optiques solides	90
4.3.2.2	Fantômes optiques liquides	93
4.4	Modèle animal	96
4.4.1	Préparation de l'émulsion.....	96
4.4.2	Immunisation des animaux.....	96
4.4.3	Protocole expérimental.....	97
4.5	Expérimentation clinique.....	99
4.6	Bibliographie	100
5	Détection du ganglion sentinelle : utilisation des photons diffusés	105
5.1	Introduction	105
5.2	Détection à deux longueurs d'onde	105
5.2.1	Rappel rapide sur la méthode	105
5.2.2	Analyse sur fantômes solides	106
5.2.3	Analyse des performances sur modèle liquide.....	108
5.2.3.1	Validation du modèle théorique : comparaison entre les modèles de Beer-Lambert et de Patterson.....	109
5.2.3.2	Détermination du seuil de détection de l'instrumentation.....	111
5.2.4	Expérimentation animale.....	112
5.2.4.1	Détection de la cinétique du colorant au sein d'un ganglion.....	114
5.2.4.2	Recherche de ganglions marqués par le colorant	116
5.2.4.3	Discussion.....	118
5.2.5	Détection ex-vivo sur pièces d'exérèse	118
5.2.6	Conclusion et discussion concernant le prototype à deux longueurs d'onde...	121
5.3	Détection à quatre longueurs d'onde	122

5.3.1	Rappel rapide sur la méthode	122
5.3.2	Détection d'inclusions sur fantômes solides	122
5.3.3	Caractérisation sur objets tests liquides.....	125
5.3.4	Expérimentation animale.....	129
5.3.5	Validation clinique	130
5.3.5.1	Méthode et patients.....	130
5.3.5.2	Résultats de détection	131
5.3.6	Conclusion et discussion concernant le prototype à quatre longueurs d'onde.	135
5.4	Conclusion sur la méthodologie de détection des photons diffusés	135
5.5	Bibliographie	137
6	Détection du ganglion sentinelle : utilisation des photons de fluorescence.....	139
6.1	Introduction	139
6.2	Détection à l'aide d'une sonde	139
6.3	Imagerie de fluorescence du Bleu Patenté V.....	143
6.3.1	Instrumentation.....	143
6.3.2	Détection du colorant Bleu Patenté V fixé à l'albumine humaine.....	144
6.3.2.1	Bleu Patenté V Fixé à l'albumine humaine Sigma-Aldrich	144
6.3.2.2	Bleu Patenté V fixé à l'albumine humaine Vialebex	146
6.3.3	Bleu Patenté V fixé à l'albumine de sérum de rat.....	149
6.3.3.1	Imagerie de fluorescence	149
6.3.3.2	Analyse spectroscopique	152
6.3.3.3	Expérimentation animale.....	153
6.3.4	Bleu Patenté V fixé à l'albumine colloïdale.....	156
6.3.4.1	Inclusions à différentes concentrations.....	157
6.3.4.2	Discussion.....	158
6.4	Conclusion sur la détection de fluorescence.....	158
6.5	Bibliographie	159
7	Conclusion	161
	Bibliographie.....	164

En matière de santé, le cancer occupe une place importante parmi les préoccupations des Français. En effet, selon une étude récente de l'Institut National de Prévention et d'Éducation pour la Santé (Inpes), lorsque l'on demande aux Français de nommer trois maladies qu'ils estiment graves, le cancer est cité spontanément dans ce trio à 92 %, loin devant le SIDA (65 %) et les maladies cardiovasculaires (30 %). Cette étude nous indique également que 85 % des individus interrogés pensent que personne n'est à l'abri d'un cancer. Cette peur, liée à la gravité perçue, s'accompagne d'un sentiment de crainte, puisque 55 % des Français craignent à titre personnel le cancer. Quelque soit l'enquête, plus de 60 % du public interrogé dit avoir un ou plusieurs proches qui a été atteint ou qui est atteint par un cancer. Ce sentiment est à mettre en parallèle avec les statistiques publiées par l'Institut National de Veille Sanitaire qui dénombre, en 2011, 365.500 nouveaux cas de cancer (207.000 hommes et 158.500 femmes). Avec 65 millions d'habitants en France, cela représente environ 1 personne sur 180. Le nombre de décès associé aux cancers est lui estimé à 147.500 en 2011.

Alors que le cancer de la prostate est celui le plus répandu chez l'homme, avec 53.500 nouveaux cas diagnostiqués en 2011, le cancer du sein est le plus fréquent chez la femme. Les décès liés à ce cancer sont estimés à 11.500 pour l'année en cours. Ces données démontrent la nécessité de développer les moyens de recherche afin de réduire la mortalité de ce cancer (et du cancer en général). En France, près de 5.000 chercheurs, rattachés aussi bien aux hôpitaux, aux universités ou à d'autres organismes comme le CNRS ou l'Inserm, travaillent pour la lutte contre le cancer.

L'un des enjeux de la recherche actuelle repose sur l'équilibre nécessaire entre la recherche fondamentale et la recherche appliquée. En effet, s'il est important de cibler au préalable le bénéfice diagnostique et l'application clinique d'un projet, il reste indispensable de donner aux chercheurs les moyens d'explorer de nouveaux espaces pour que la créativité, née de l'union des cliniciens et des fundamentalistes, soit génératrice d'un projet pertinent, construit aboutissant à une amélioration des moyens de lutte contre le cancer.

L'imagerie médicale développée, et améliorée sans cesse, par des collaborations entre spécialistes de domaines différents, s'est imposée comme un outil de diagnostic et de suivi thérapeutique incontournable. Il est possible de classer les techniques d'imagerie médicale en deux types. Les méthodes d'imagerie anatomique permettent de localiser des lésions avec précision et un bon contraste. Les méthodes d'imagerie fonctionnelle permettent d'apporter

une information sur la fonction des organes et sur le métabolisme cellulaire. Le second type d'imagerie s'appuie sur l'utilisation de marqueurs et/ou traceurs permettant de visualiser un organe, une lésion ou une tumeur, à l'aide de rayonnements pénétrant profondément dans le corps humain. Les avancées incessantes de la technologie amènent les chercheurs à développer des méthodes diagnostiques de plus en plus précises et de moins en moins invasives afin d'améliorer le confort du patient.

La méthode du ganglion sentinelle dans le cadre du traitement du cancer du sein, repose sur le principe simple selon lequel ce ganglion est le premier ganglion drainant la tumeur primaire. Il est donc le premier relais à risque d'invasion métastatique. Ainsi, le but du chirurgien est de détecter ce ganglion afin de cibler son geste opératoire et d'éviter un retrait de la totalité de la chaîne ganglionnaire du sein, la chaîne axillaire. Cette méthode, encore récente, elle date de moins de 30 ans, a depuis fait ses preuves et s'est imposée lors du traitement chirurgical du cancer du sein.

Il existe actuellement deux méthodes cliniques pour la détection du ganglion sentinelle. La première repose sur la détection d'un isotope radioactif. La seconde est basée sur la détection d'un colorant : généralement de couleur bleue, tel que le Bleu Patenté V. La détection isotopique se déroule en deux étapes. L'injection de l'isotope radioactif dans le système lymphatique de la patiente, la veille de l'opération, accompagnée d'un examen par tomographie d'émission monophotonique (TEMP) permet au chirurgien de localiser les ganglions sentinelles. Puis le jour de l'opération, à l'aide d'une sonde per-opératoire, il détecte et localise l'activité résiduelle des ganglions dans le creux axillaire et réalise leur exérèse. La seconde méthode consiste à injecter le colorant en périaréolaire à la patiente peu avant l'opération et à détecter visuellement les ganglions bleutés. Le taux de détection de la première méthode est d'environ 90 %, celui de la seconde est de 70 %. La méthode dite de double détection est de plus en plus utilisée car elle permet d'améliorer très nettement le diagnostic, avec un taux supérieur à 95 %.

Afin d'objectiver la détection optique du ganglion sentinelle, la société Eurorad a envisagé de développer un équipement couplant les deux méthodes de détection (Europrobe optonuclear). Mais il est apparu rapidement que le fonctionnement de cet instrument n'est pas satisfaisant. Les difficultés inhérentes à la détection d'un colorant in-vivo sont principalement dues aux variations importantes de couleur des tissus excisés. L'absorption des colorants bleus est maximale dans un domaine spectral, le rouge, où l'hémoglobine du sang absorbe encore fortement, en particulier sous sa forme non oxygénée. Une réelle amélioration de la détection optique du ganglion sentinelle par une instrumentation adaptée passe donc par une

meilleure connaissance de la propagation de la lumière dans les tissus et des modes d'interaction lumière-matière.

L'objectif premier de ce travail de thèse consiste en la détection du ganglion sentinelle par une méthode optique objective basée sur la mesure des photons diffusés par les tissus, après injection d'un colorant utilisé en routine clinique.

Parallèlement à cela, un second axe de recherche a été initié, reposant sur la détection de molécules fluorescentes migrant et se fixant dans le ganglion sentinelle. De nouvelles sondes fluorescentes ont été proposées dans ces dernières années, mais aucune ne dispose actuellement d'autorisation d'usage thérapeutique ou diagnostique permettant son injection dans le système lymphatique, voie d'administration nécessaire à la détection du ganglion sentinelle. Le second objectif de cette thèse a porté sur la recherche d'un marqueur fluorescent injectable chez l'homme et sur la mise en œuvre d'une méthode de mesure, et d'imagerie, des photons de fluorescence.

La rédaction de cette thèse est organisée en 6 chapitres.

Le premier chapitre présente quelques données chiffrées concernant le cancer du sein et une étude bibliographique sur l'anatomie et l'histologie du sein, du système lymphatique et du ganglion lymphatique. La suite de ce chapitre est consacrée à une explication détaillée de la technique du ganglion sentinelle et des différentes méthodes d'imagerie utilisées pour sa détection.

Le deuxième chapitre traite des différentes théories et propriétés liées à une détection optique dans les milieux biologiques. Une première partie consacrée à l'étude des interactions entre la lumière et les tissus biologiques permet de comprendre les phénomènes optiques à la base de ce travail de thèse, tels que l'absorption ou la diffusion. Une seconde partie porte sur l'explication physique du phénomène de fluorescence et ses paramètres caractéristiques. Cette analyse a permis de déterminer le domaine spectral utilisé pour mener à bien ce travail et atteindre ses objectifs.

Le troisième chapitre est consacré au colorant Bleu Patenté V, utilisé en clinique pour la détection du ganglion sentinelle. Ce colorant a également été utilisé dans l'ensemble de ce travail. La première partie de ce chapitre traite de sa caractérisation physicochimique : nomenclature, solubilité, spectrométrie d'absorption ... Une deuxième partie détaille l'étude fluorimétrique de ce colorant, en particulier lors de son interaction avec l'albumine humaine. Ce chapitre se conclut sur un état de l'art de l'utilisation du Bleu Patenté V en chirurgie et sur les risques associés.

Le quatrième chapitre détaille les méthodes utilisées et les instruments réalisés durant cette thèse. Ce chapitre traite successivement de la détection du ganglion sentinelle en utilisant les photons diffusés puis en utilisant les photons de fluorescence. Il est divisé en cinq parties. La première explique comment ce travail a mené à la réalisation de deux prototypes successifs pour la détection du Bleu Patenté V par mesure des photons diffusés, afin de séparer l'absorption du colorant de celle des tissus, et en particulier du sang. La deuxième partie expose la faisabilité de la détection de la fluorescence du Bleu Patenté V par une instrumentation appropriée. La troisième partie de ce chapitre présente les différents objets tests ayant servi à la caractérisation des équipements développés. La partie suivante décrit le modèle animal employé afin de réaliser une première validation in-vivo. Ce chapitre s'achève sur la présentation du protocole mis en place avec le centre anti-cancéreux Paul Strauss de Strasbourg afin d'évaluer notre instrumentation sur des pièces opératoires.

Le cinquième chapitre présente les résultats obtenus avec les deux dispositifs de détection des photons diffusés. Les expériences ont été menées selon différentes conditions: objets tests, rats et pièces opératoires. Ce chapitre démontre le potentiel d'application de ce type de méthodologie, pour la détection du ganglion sentinelle du cancer du sein.

L'utilisation des photons de fluorescence est abordée dans le chapitre 6. La validation de l'appareil pour une détection ponctuelle du colorant, sur des modèles simples, constitue la première étape de ce chapitre. Des résultats d'imagerie de fluorescence, en utilisant un prototype existant adapté à nos besoins, sont ensuite exposés. Ce chapitre s'achève par une conclusion sur un possible système d'imagerie dédié à la détection du ganglion sentinelle par fluorescence du Bleu Patenté V.

La conclusion de ce manuscrit contient une discussion générale du travail effectué, s'appuyant sur l'ensemble des résultats obtenus. Elle s'achève sur les perspectives d'applications pratiques de ce travail dans le cas de la chirurgie du cancer du sein.

1 Synthèse bibliographique concernant le cancer du sein et le ganglion sentinelle

1.1 Epidémiologie et risques du cancer du sein

1.1.1 Epidémiologie du cancer sein : quelques données chiffrées

Un rapport récent de l'Institut de Veille Sanitaire (INVS) concernant la « projection de l'incidence et de la mortalité par cancer en France » permet d'apporter quelques données chiffrées concernant le cancer (1). Ces données sont bien entendu des estimations et issues de modélisations. Il est à noter qu'afin d'obtenir ces résultats différents scénarii ont été utilisés mais que nous ne résumons ici que les données issues du scénario retenu par l'Institut. En 2010, 154642 nouveaux cas de cancers ont été répertoriés en France. Avec 52588 cas, le cancer du sein est de loin le plus répandu chez la femme devant le cancer du colon (18930 cas) et des poumons (10016 cas). De plus avec 11289 décès, il est également celui connaissant le plus fort taux de mortalité. L'étude de la répartition de l'incidence du cancer du sein par tranche d'âge indique une apparition de cas pour des femmes jeunes et atteint un maximum entre 50 et 64 ans (tableau 1.1).

Classe d'âge	Nombre de cas de cancer du sein	
	Incidence	Mortalité
[0:14]	0	0
[15:49]	10349	1075
[50:64]	20982	3038
[65:74]	10447	2081
[75:84]	7625	2777
[84:++]	3185	2318
TOTAL	52588	11289

Tableau 1.1 : épistémologie du cancer du sein (données INVS)

1.1.2 Risques de cancer du sein

Le principal facteur de risque concernant le cancer du sein est le sexe. En effet, 99% des cancers du sein concernent des femmes (2) (3). L'âge est également à prendre en considération. En effet, les chiffres montrent que la tranche d'âge entre 50 et 64 ans est plus sujette à ce cancer. De plus même si le cancer ne touche que peu les femmes jeunes il est bon

de signaler que les chiffres montrent une augmentation du nombre de cas entre 15 et 49 ans. Cela est essentiellement dû au fait que les méthodes de dépistage mises en place ces dernières années ont permis une détection plus précoce de la maladie. En effet, des dépistages sont systématiquement proposés tous les deux ans aux femmes de 50 à 74 ans (4). Cette recommandation n'est pas appliquée pour les femmes jeunes. Mais depuis quelques années, si un antécédent familial de cancer du sein est connu, un suivi spécialisé est effectué. Toutes ces avancées permettent donc une prise en charge de la maladie plus jeune augmentant ainsi le nombre de cas observés chez ces femmes jeunes et les diminuant parallèlement pour les femmes de plus de 50ans.

1.2 Anatomie et histologie

1.2.1 Le sein

Les seins formés de tissu conjonctif superficiel et de peau recouvrant la région pectorale sont situés de chaque côté de la paroi thoracique antérieure (figure 1.1).

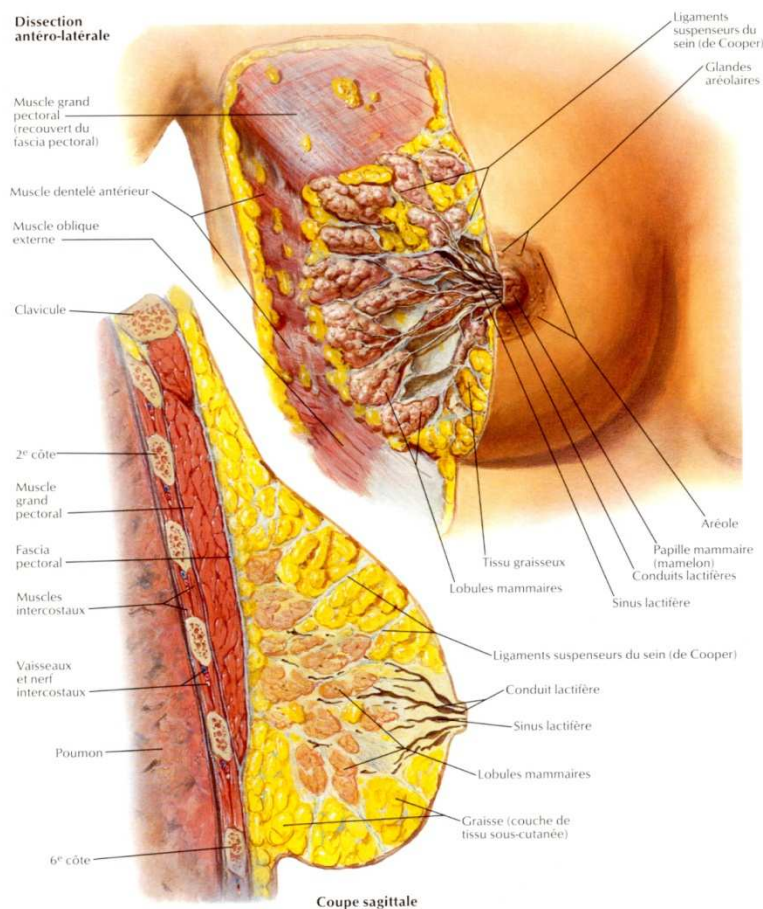


Figure 1.1: anatomie de la région pectorale (5)

Les glandes mammaires sont des glandes sudoripares apocrines modifiées situées dans le tissu conjonctif superficiel antérieur du muscle pectoral dans la paroi thoracique antérieure. La glande mammaire est constituée d'une série de canaux associés à des lobules sécrétoires qui convergent pour former 15 à 50 canaux galactophores en direction du mamelon. Le mamelon est entouré d'une zone circulaire de peau appelée aréole.

La graisse est le principal composant du sein, alors que le tissu glandulaire est plus dominant chez une femme allaitant.

Le sein occupe transversalement une région allant du bord latéral du sternum à la ligne axillaire antérieure, et s'étend verticalement entre la seconde et la sixième côte, au dessus du muscle du grand pectoral. De plus, par leurs prolongements axillaires, les tissus mammaires s'étendent jusqu'aux aisselles. Le sein est soutenu au thorax par des bandes de tissus conjonctifs qui sont des ligaments périphériques, dits de Cooper. Une couche de tissu conjonctif (l'espace retro mammaire) sépare la poitrine du fascia profond et permet un certain degré de mouvement des structures sous jacentes (6).

1.2.2 Le système lymphatique

Le système lymphatique (en vert sur la figure 1.2) est directement lié au système veineux (en bleu sur la figure 1.2) et regroupe trois sous ensembles distincts qui sont : les capillaires lymphatiques, les vaisseaux lymphatiques et le canal thoracique (7).

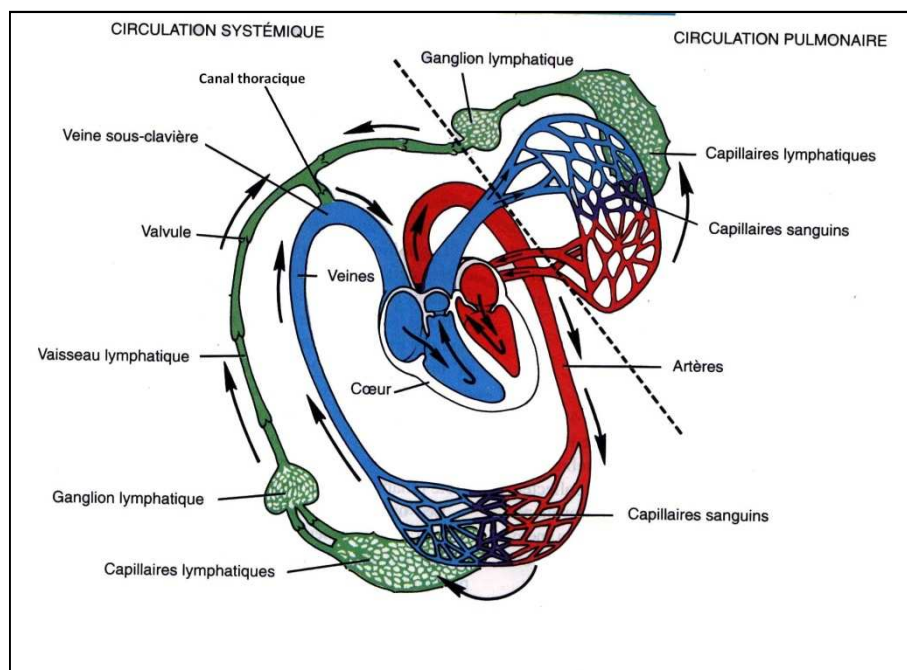


Figure 1.2: Relation entre les circulations lymphatique et sanguine (8).

Les capillaires lymphatiques commencent dans l'espace interstitiel des tissus. Ils sont constitués d'une seule couche de cellules endothéliales, dotées de filaments qui ont pour fonction de les retenir au tissu conjonctif (figure 1.3).

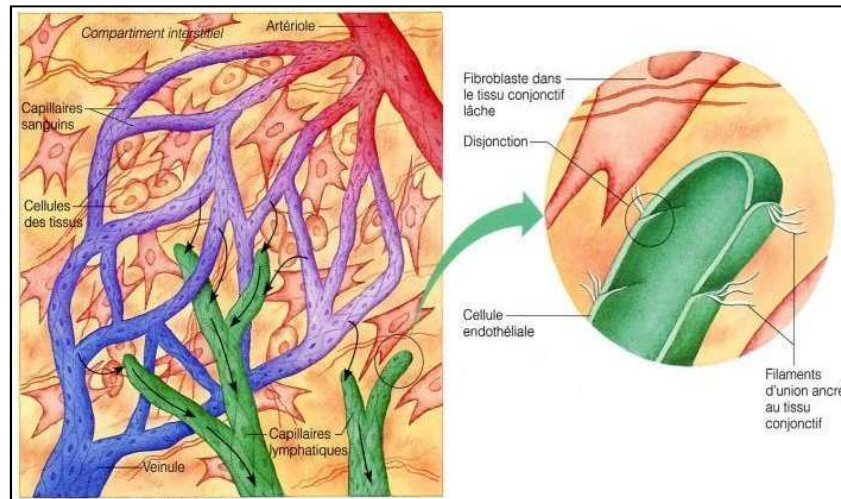


Figure 1.3: Description des capillaires lymphatiques (9)

Les vaisseaux lymphatiques sont la continuation des capillaires, ils ont pour rôle de drainer la lymphe qui est présente dans ces vaisseaux. La lymphe résulte d'une filtration du sang à partir des petits vaisseaux de l'organisme (capillaires), qui forme un liquide incolore, transparent et riche en eau. Elle est composée de deux parties :

- Une partie plasmatique qui contient entre autre des protéines, du glucose et des enzymes.
- Une partie corpusculaire composée de lymphocytes utilisés par l'organisme comme moyen de défense.

Ces vaisseaux lymphatiques convergent vers les ganglions lymphatiques. La lymphe arrive en périphérie du ganglion, puis s'écoule lentement à travers un système de ramifications de petits vaisseaux. Elle pénètre ensuite à l'intérieur même du ganglion pour y être filtrée. Nous reviendrons plus en détail sur l'anatomie et la fonction des ganglions dans le paragraphe II.3. A la sortie de ces ganglions, les canaux se regroupent dans le canal thoracique. Long de 35 à 45 cm, il possède des valvules dans sa partie initiale et dans sa partie terminale près de la veine sous-clavière gauche (7) (10).

Le réseau lymphatique du sein peut être regroupé en trois sous régions lymphoïdales. Les ganglions inter-pectoraux, centraux et brachiaux constituent la chaîne axillaire qui est la voie de drainage principale (75%). Les ganglions axillaires apicaux et subscapulaires appartiennent

à la chaîne sus-claviculaire (10%) et les ganglions parasternaux composent la chaîne mammaire interne (5%) (Figure 1.4) (11).

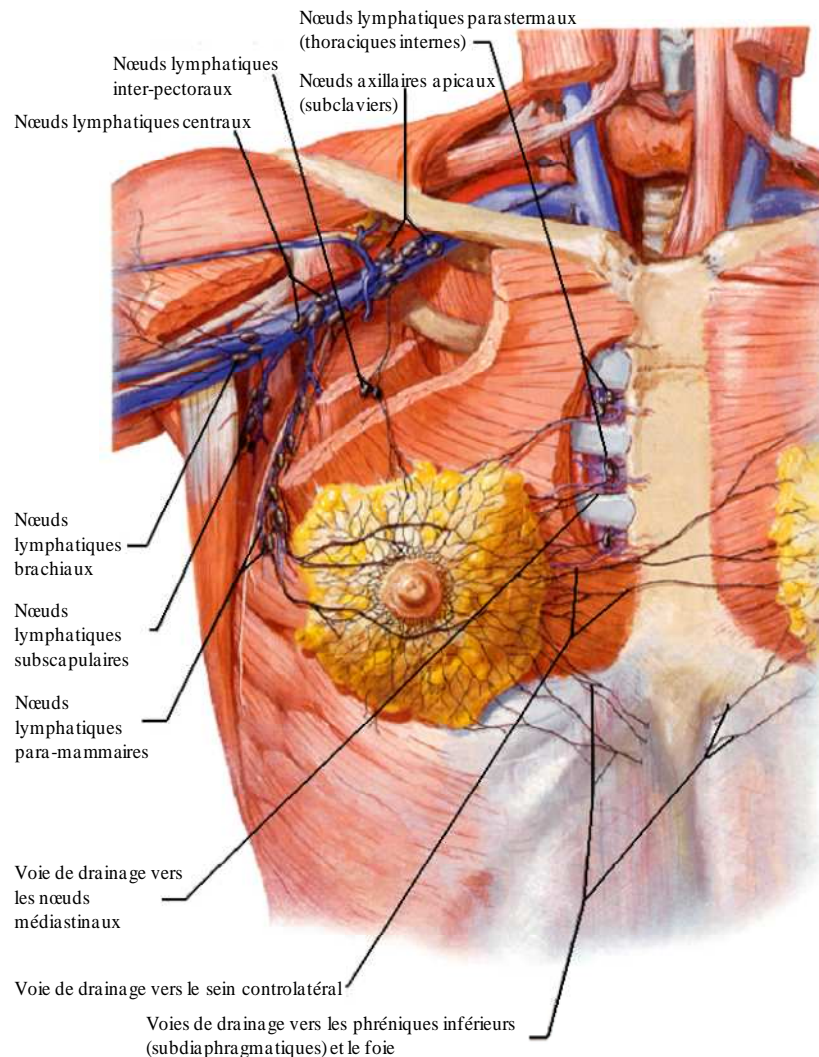


Figure 1.4: Vue générale du réseau lymphatique du sein (5)

1.2.3 Le ganglion

Les vaisseaux lymphatiques convergent vers les ganglions lymphatiques, aussi appelés nœuds lymphatiques. Il existe environ un millier de ganglions dans le corps. Leur rôle est d'assurer continuellement la filtration naturelle de la lymphe qui arrive en périphérie du ganglion puis qui s'écoule à travers un système de petites ramifications appelées sinus.

Il est possible de distinguer deux types de ganglions :

- Les ganglions superficiels dont les plus volumineux sont situés au niveau du pli de l'aîne, sous les aisselles et au niveau du cou.
- Les ganglions profonds situés au niveau du bassin du poumon et de l'aorte.

Un ganglion lymphatique est de forme ovoïde. Lorsque celui-ci est normal il possède un diamètre variable allant de 1 à 15 mm. Mais il peut atteindre une taille plus importante (quelques centimètres de diamètre) dans certaines situations pathologiques : on parle alors d'adénopathie ou d'adénomégalie (13). Il est entouré d'une capsule contenant un tissu lymphatique où se réalise la maturation des lymphocytes. L'intérieur du ganglion est constitué de deux zones : la zone médullaire contenant les macrophages et la zone corticale superficielle où siègent les lymphocytes (figure 1.5).

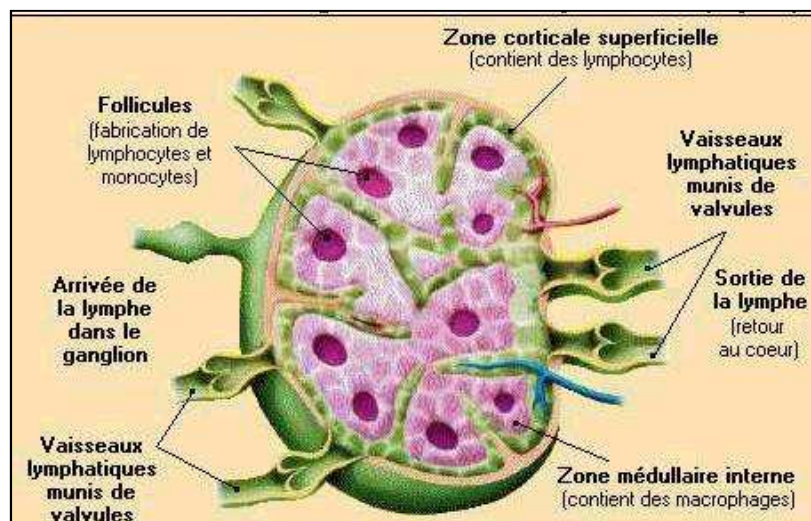


Figure 1.5: structure du ganglion lymphatique (12)

1.3 La technique du ganglion sentinelle

1.3.1 Historique : du curage axillaire au ganglion sentinelle

Lorsque la tumeur cancéreuse détectée est jugée invasive, la première approche considérée dans le cas du cancer du sein est celle du curage axillaire qui consiste en une intervention chirurgicale amenant à enlever l'ensemble de la chaîne ganglionnaire (14).

Depuis une cinquantaine d'années, une nouvelle technique s'est développée : la technique dite du ganglion sentinelle. En 1960, Gould est le premier à introduire la notion de ganglion sentinelle dans le cas du cancer de la parotide (glande salivaire) (15). Puis en 1977 Cabanas introduit le concept de prélèvement du ganglion sentinelle lorsqu'il identifia le premier relai lymphatique dans le cas d'un cancer de la verge (16). Une avancé majeure se produisit au début des années 90 lorsque Krag en 1993 (17) et Giuliano en 1994 (18) transpose la technique du ganglion sentinelle dans le cancer du sein.

Selon ce concept la tumeur se draine de façon préférentielle vers un ganglion qui est le premier à risque d'invasion métastatique. Si ce ganglion, appelé ganglion sentinelle, n'est pas envahi, l'ensemble des ganglions axillaires est négatif. En effet son état histologique est

représentatif des autres ganglions de la chaîne (15). L'intérêt est d'éviter un curage axillaire à la patiente dans 70% des cas lorsque la tumeur est inférieure à 20 mm. Il permet également d'éviter un certain nombre de morbidités comme des troubles sensitifs et moteurs ou encore des lymphoedèmes (19) (20) (21) (22) (23) (24) (tableau 1.2).

Auteurs	Recul [mois]	Nombre de cas		Lymphodèmes		Douleurs bras	
		GS	CA	GS	CA	GS	CA
Schijven 2003	20	180	213	1%	7%	8%	23%
Veronesi 2003	24	100	100	0%	12%	8%	39%
Barranger 2005	24	54	51	0%	22%	20%	53%
Del Bianco 2008	24	336	341	4%	9%	7%	10%
Madsen 2008	18	164	57	7%	44%	18%	40%
Blanchard 2009	24	683	91	5.6%	34%	14%	38%

Tableau 1.2 : Comparaison de morbidités associées à la méthode du ganglion sentinelle (GS) comparativement au curage axillaire (CA) selon différentes études

1.3.2 Méthodologie

La méthode permettant de mettre en évidence le ganglion sentinelle est clairement définie. En pratique clinique, sa détection est faite après l'injection, en péri-tumoral ou en péri-aréolaire (25) (26), d'un radio-colloïde marqué (27) ou d'un colorant lymphotrope (28) ou en combinant les deux techniques (25) (26) (29).

La détection du ganglion sentinelle se déroule en deux étapes. Premièrement, l'injection d'un isotope radioactif dans le système lymphatique, un colloïde, tel que le sulfure de rhénium est marqué au technétium 99 métastable (^{99m}Tc) avant d'être injecté dans la région périaréolaire 24 heures avant la chirurgie. Le sein est alors massé pendant 2 à 3 minutes pour améliorer la diffusion du radio-colloïde. Puis un examen par lymphoscintigraphie est réalisé en pré-opératoire entre 30 minutes à 2 heures après l'injection afin de localiser l'emplacement du ou des ganglions. Deuxièmement, après anesthésie, un colorant lymphotrope, classiquement le Bleu Patenté V (ampoule de 2mL, Guerbet, Aulnay-Sous-Bois, France), est injecté en péri-aréolaire 10 à 15 minutes avant l'incision. Le sein est massé durant 2 à 3 minutes pour faciliter la diffusion et l'absorption du colorant. La peau est ensuite incisée au niveau du creux axillaire et une dissection minutieuse est réalisée pour rechercher les ganglions lymphatiques colorés en bleu. Une sonde nucléaire peut être utilisée pour rechercher le radio-colloïde et ainsi aider et guider l'excision de ces ganglions.

La détection visuelle d'un ganglion opacifié par un colorant lymphotrope implique une part de subjectivité et nécessite un apprentissage pour le chirurgien (30). Quelle que soit la méthode de détection utilisée, la palpation axillaire per opératoire reste une étape essentielle à la recherche d'une adénomégalie suspecte qui sera obligatoirement prélevée.

1.3.3 Autres méthodes de détections

Les systèmes d'imagerie varient dans leurs propriétés physiques, y compris leur sensibilité, leurs résolutions spatiales et temporelles. La figure 1.6 montre la sensibilité relative de différentes technologies d'imagerie.

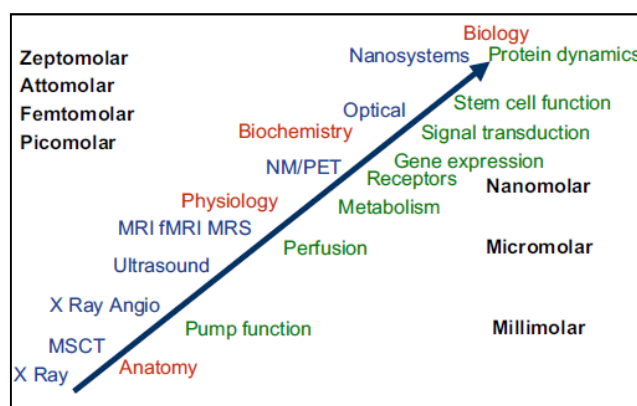


Figure 1.6: Sensibilité relative de différentes technologies d'imagerie médicale (31)

Nous présentons à la suite un état de l'art des méthodes de détection et d'imagerie du ganglion sentinelle les plus communément développées.

1.3.3.1 L'imagerie par Résonance Magnétique (IRM) :

Cette technique repose sur l'interaction des moments magnétiques des noyaux atomiques, principalement les protons des molécules d'eau du corps humain, orientés par un champ magnétique, avec une onde radiofréquence. L'IRM présente des résultats remarquables pour certaines pathologies du fait de son bon contraste, des orientations adaptées des plans de coupe et d'une bonne résolution spatiale de l'ordre de millimètre.

L'IRM est une technologie relativement nouvelle. C'est au cours de l'année de 1946 que Felix Bloch et Edward Purcell ont découvert le phénomène de résonance magnétique nucléaire (RMN). Cette découverte leur a valu par la suite le prix Nobel, remis en 1952. Jusqu'aux années 1970, la RMN a été utilisée pour l'analyse chimique et physique. En 1971, Raymond Damadian montre que les temps de relaxation nucléaire des tissus et des tumeurs diffèrent, incitant les scientifiques à utiliser l'IRM à but médical. Les premières images IRM

ont été produites peu après par Paul Lauterbur (Prix Nobel de médecine en 2003). Les méthodes d'IRM actuelles utilisent la transformée de Fourier bi-dimensionnelle. Elles ont été proposées dès les années 1970 par Peter Mansfield (prix Nobel de médecine 2003) et Richard Ernst (prix Nobel de chimie 1991). Depuis, de nombreuses innovations ont fait progresser l'IRM vers la méthode d'imagerie très performante et proposant de nombreux facteurs de contraste que nous connaissons aujourd'hui.

Plusieurs axes de recherches ont mis en évidence la possibilité de repérer et caractériser les ganglions axillaires par IRM, après des injections d'agents de contrastes, de façon similaire aux techniques utilisant un colorant ou un radio colloïde.

Torchia a établi la faisabilité de la méthode sur des modèles animaux en utilisant soit des nano particules de fer superparamagnétiques, appelées USPIO (Ultra-small Superparamagnetic of Iron oxide) (32), soit un agent de contraste paramagnétique à base d'ions Gadolinium (33). Des études faites par Stets (34) (figure 1.7), Murray (35) ou Luciani (36) ont permis de transposer la technique IRM à la détection du ganglion sentinelle chez l'Homme, en utilisant ces mêmes agents de contraste.

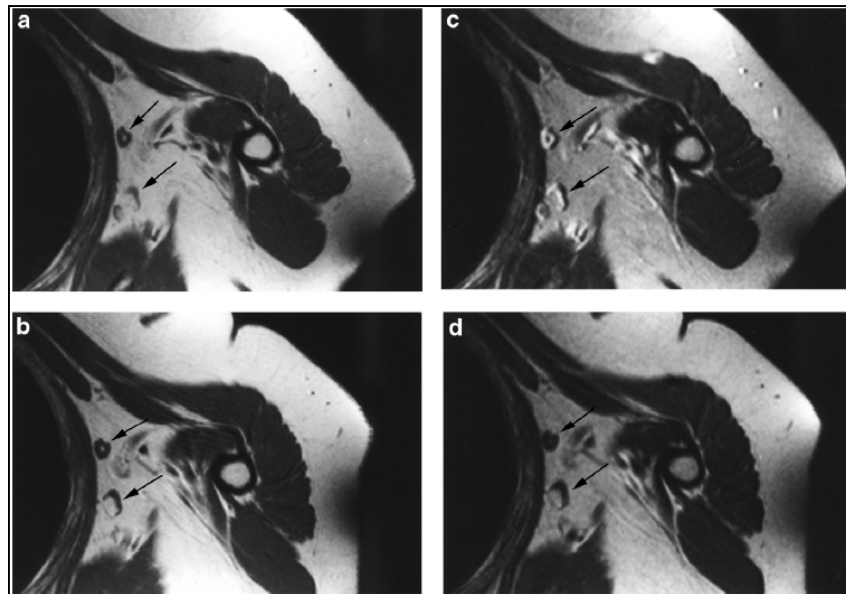


Figure 1.7: Variation d'intensité du signal IRM avant (a) et après (b, c, d) injection d'USPIO pour la localisation de ganglions sentinelles (34)

De plus des études comme celle faite par Ymagami (37) démontrent la possibilité de réaliser des prélèvements du ganglion sentinelle sous guidage par IRM. Malgré cela il faut souligner les inconvénients majeurs sous-jacents à cette méthodologie avec en premier lieu le coût qui est relativement élevé ainsi que la grande taille de l'installation nécessitant un espace conséquent.

1.3.3.2 Echographie ultrasonore

L'imagerie ultrasonore repose sur la réflexion et la diffusion des ondes ultrasonores afin de générer une image, par échographie. Celle-ci représente la cartographie spatiale des contours d'objets possédant des propriétés acoustiques différentes, l'image de ces objets présentant une texture caractéristique. La première expérience ayant permis d'étudier la propagation des ondes ultrasonores date de 1822 par D. Colladen qui utilisa une cloche sous marine afin de mesurer la vitesse du son dans l'eau du lac de Genève. La première application ayant suivi cette découverte, a eu lieu en 1922, suite au naufrage du Titanic, lorsque L.F. Richardson déposa un brevet pour un écho-radar sous-marin : le SONAR (38). La première application médicale date de 1942 lorsque K. T. Dussik publie un article sur "l'hyperphography" du cerveau (39). Considéré comme le premier médecin à utiliser les ultrasons pour le diagnostic médical, il publia en 1958 également le premier rapport utilisant l'échographie afin de mesurer l'atténuation acoustique lors de mesures sur plusieurs types de tissus (40). Les premières images 2D cliniques furent publiées par J. J. Wild sur des échantillons chirurgicaux d'intestins et de seins contenant des tumeurs malignes (41). Puis entre 1975 et 1985 de nombreuses études portant sur l'utilisation des ultrasons pour la détection de cancer du sein ont été menées sur des populations de patients de plus en plus importantes : J. Jellins en 1975 avec 43 patients (42), C. Cole-Beuglet en 1975 également avec 75 patients (43) puis 104 patients en 1983 (44) ... Depuis le début des années 2000, l'imagerie ultrasonore tend à s'imposer comme un complément à la mammographie afin de caractériser de mieux en mieux les masses tumorales (45) (figure 1.8). L'apport d'agent de contraste, composés de micro-bulles réfléchissant fortement les ultrasons, a dernièrement permis d'améliorer la détection des ganglions sentinelles et de pouvoir suivre le circuit lymphatique (46).

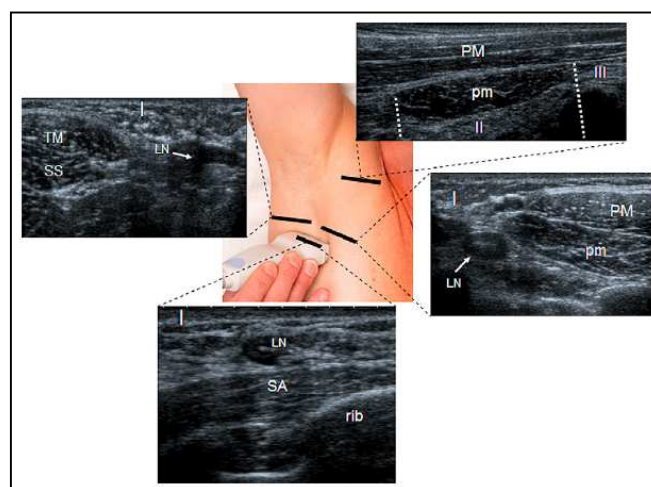


Figure 1.8: Recherche de ganglion sentinelles (LN) par imagerie ultrasonore suivant différents niveaux anatomiques (I, II et III) (47)

1.3.3.3 Tomographie à émission de positons

La tomographie à émission de positons (TEP) est une méthode d'imagerie médicale dite fonctionnelle, la fixation de l'agent imagé étant déterminée par la fonction de l'organe exploré. Elle permet d'obtenir des informations pour le diagnostic et le suivi thérapeutique en suivant la distribution d'une molécule marquée par un radio-isotope émetteur de positons. Après administration au patient de la source radioactive, les détecteurs du tomographe collectent la radioactivité émise générant ensuite une image. Le positon émis lors de la désintégration de l'isotope va interagir avec un électron pour former deux photons de 511 keV émis en coïncidence à 180 degrés. Il existe un grand nombre d'isotopes émetteurs de positons comme le fluor 18 (^{18}F), le carbone 11 (^{11}C) ou encore l'oxygène 15 (^{15}O). Le principal inconvénient à leur utilisation est lié au fait que la majorité de ces isotopes ont des périodes de vie courtes : environ 2 heures pour ^{18}F , 21 minutes pour le ^{11}C et 120 secondes pour ^{15}O . Ainsi un cyclotron doit être installé à proximité de la caméra TEP.

Le traceur le plus utilisé est un sucre, le fluorodeoxyglucose (FDG), sur lequel est fixé un isotope de ^{18}F (48). Celui-ci permet de détecter des cellules cancéreuses, qui présentent souvent une augmentation du métabolisme glucidique (49).

Les examens lymphoscintigraphiques au FDG marqué par le ^{18}F sont de plus en plus souvent effectués à l'aide de scanners TEP/CT (CT : *Computerized Tomography*) permettant la visualisation simultanée anatomique (CT) et métabolique (TEP) des organes (50) (figure 1.9).

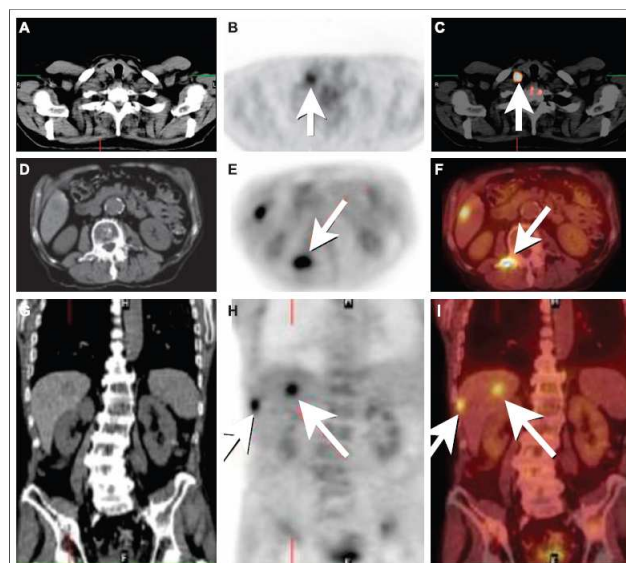


Figure 1.9: Exemple d'imagerie multimodale après marquage au ^{18}F -FDG. A, D et G: images CT. B, E et H: images TEP. C, F et I: images TEP/CT (51)

L'état de l'art effectué en 2011, par K. Cooper (48) regroupant 7 études évaluant la sensibilité et la spécificité de la méthode TEP/CT pour la détection du ganglion sentinelle a permis de démontrer que cette technique conduit à un mode d'examen robuste. La sensibilité moyenne obtenue pour la détection des métastases ganglionnaires était faible (56%) mais une grande spécificité moyenne (96%) a été recensée.

1.3.3.4 Imagerie photoacoustique

La technique photoacoustique a été observée pour la première fois par A.G. Bell en 1881 (52). En envoyant un faisceau lumineux modulé et focalisé à l'intérieur d'une ampoule contenant un gaz, il a détecté un signal audible à la fréquence de la modulation lumineuse. Le principe de fonctionnement repose sur le fait que si l'on éclaire un milieu (gaz, tissu...) avec un rayonnement optique (à la longueur d'onde d'absorption de l'échantillon) modulé, il y a échauffement du milieu d'étude et ainsi création d'un signal acoustique qu'un microphone peut détecter. L'amplitude du signal détecté est proportionnelle à la puissance du rayonnement d'excitation et au coefficient d'absorption de l'environnement illuminé.

L'application de la méthode photoacoustique au domaine médical est depuis longtemps établie comme en témoigne par exemple l'étude menée par A. Rosencwaig en 1977 qui étudia les effets de l'hydratation et l'altération chimique de la couche cornée chez de jeune rats par photoacoustique (53). A. A. Oraevsky en 1999 démontre la possibilité d'utiliser l'imagerie photoacoustique afin de détecter des tumeurs cancéreuses dans le cas du cancer du sein (54). De plus l'utilisation croissante d'une grande variété d'agents de contraste comme le bleu de méthylène, les nano tubes de carbone (55) ou encore diverses nano particules d'or (56) a permis ces dernières années d'obtenir des cartographies précises de ganglions sentinelles en imagerie photoacoustique (figure 1.10) sur des modèles animaux.

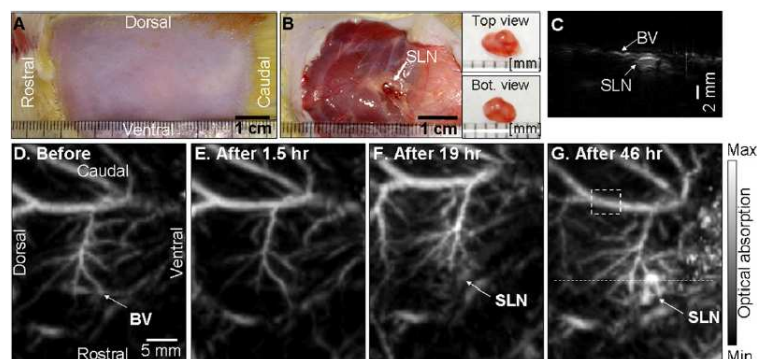


Figure 1.10: Cartographie photoacoustique chez le rat. (A) et (B) photographies couleur de la région axillaire. (C) à (G) cartographie photoacoustique du système lymphatique montrant les ganglions sentinelles (SLN) marqués par des nanoparticules d'or (57)

1.3.3.5 Imagerie optique avec des grains quantiques

Les grains quantiques ou quantum dots (QDs) sont des nanocristaux de semi-conducteur qui émettent de la fluorescence lors de leur excitation par une source de lumière. Ils ont des propriétés optiques remarquables, comprenant une grande sensibilité et une résistance au photoblanchiment. Leurs propriétés spectroscopiques peuvent être modulées par beaucoup de facteurs. Des progrès récents dans le développement des QDs permettent le contrôle de la taille, de la forme et de la surface fonctionnelle de ces nanoparticules avec des applications potentielles dans l'imagerie du cancer. Ainsi de nombreuses études ont été publiées concernant la détection du ganglion sentinelle dans le cas de cancer du sein (58) (figure 1.11) mais également pour la détection de cancer de la peau ou encore du système digestif (59). Cette technique, bien que prometteuse, n'en n'est qu'au stade expérimental et n'est pas encore applicable chez l'homme.

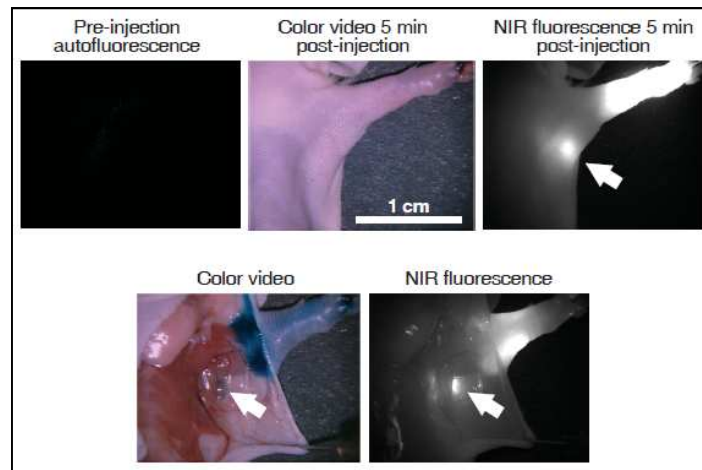


Figure 1.21: Détection du ganglion sentinelle sur un modèle de rat avec utilisation de grain quantique (58)

Ces études démontrent la possible utilisation des QDs en per-opératoire, permettant une localisation et une excision précise. Leur intérêt majeur réside dans le fait que leur utilisation en remplacement du colloïde marqué et du colorant bleu supprime l'utilisation de traceurs radioactifs. Leur utilisation est simple, nécessitant uniquement, soit une caméra pour l'imagerie, soit une sonde pour la détection per-opératoire (60). Un des problèmes lié à leur utilisation, réside dans le fait que ces QDs forment très souvent des agrégats au sein des tissus fixés et par conséquent ne sont pas éliminés par l'organisme comme le souligne par exemple J. O. Winter (61). De plus, ces QDs contiennent du cadmium ou des métaux lourds très toxiques. La génération de QD's moins dangereux et les études de toxicité associées repoussent à un horizon lointain leur possibles applications médicales.

1.3.3.6 Imagerie de Fluorescence

La première observation rapportée concernant la fluorescence fut faite par un médecin espagnol, N. Monardes, en 1565. Celui-ci a décrit le phénomène de fluorescence à la surface d'une décoction de copeaux de bois de *Lignum Nephriticum* sans en citer le nom. Le terme de fluorescence a été introduit par Sir G. G. Stokes, physicien et professeur de mathématiques à Cambridge en 1852 qui l'intitule « fluorescence » venant du nom des cristaux fluorspar qu'il étudie. Par une expérience simple il montra un phénomène d'émission lumineuse faisant suite à une absorption. Il déplaça un tube rempli d'une solution de sulfate de quinine dans la partie visible du spectre et rien ne se passa: la solution resta transparente. Mais, au-delà de la partie violette du spectre, à savoir dans la zone correspondant aux rayonnements ultraviolets, la solution brillait d'une lumière bleue. Cette expérience a fourni la preuve convaincante qu'il y avait absorption de la lumière suivie par une émission posant ainsi les bases physiques de la fluorescence (qui s'appela dans un premier temps « réflexions dispersives »). La première moitié du XX^{ème} siècle marque les principales avancées concernant la caractérisation de nombreux colorants fluorescents. Puis, l'utilisation de ces marqueurs, permettant le suivi en temps réel de processus biologiques directement au sein d'un organisme vivant, a amené de nombreuses recherches à s'orienter vers une adaptation médicale.

L'imagerie en fluorescence est donc basée sur la détection de la lumière émise par un fluorophore en réponse à une excitation d'une longueur d'onde donnée. Celui-ci peut être une protéine exprimée directement au sein des cellules, ou une petite molécule organique greffée sur un composé d'intérêt. L'atout majeur de ce type d'imagerie repose sur la possibilité de suivre en temps réel et de façon non invasive la biodistribution d'une sonde fluorescente dans un organe. Ainsi de nombreuses sondes se sont développées, montrant sur des modèles animaux la faisabilité de l'application, comme par exemple U. Mahmood (62) ou P. Wunderbaldinger (63) qui ont utilisé des molécules de cyanine chez le rat. Il est à signaler que l'utilisation de ces marqueurs fluorescents n'est actuellement pas autorisée. En France, les seuls composés fluorescents injectables chez l'Homme sont la fluorescéine et le vert d'indocyanine (ICG). Tous deux ne peuvent être injectés que par voie intraveineuse. L'ICG présente l'avantage majeur d'absorber dans le proche infrarouge et d'être ainsi détectable dans des tissus profonds. L'utilisation du vert d'indocyanine, injecté à de très faibles doses par voie transcutanée, est possible après autorisation d'essais thérapeutiques. Il a donné lieu à de premières images en chirurgie oncologique chez l'Homme. En Allemagne, C. Hirche a imagé des ganglions sentinelles concernant deux pathologies : le cancer du sein pour 43 patientes

(64) et 20 patients ayant un cancer anal (65). Au Japon deux études utilisant également l'ICG ont permis de détecter en per-opératoire des ganglions sentinelles dans le cas de cancer du sein, avec une sensibilité moyenne de 99% sur des populations de 141 et 411 patientes (66) (67). Enfin, une équipe de l'université de Groningen aux Pays-Bas a réalisé une étude comparative de trois méthodes pour la détection du ganglion sentinelle sur 10 patientes atteintes d'un cancer de la vulve. Ils ont comparé les détections par radio-isotope, par fluorescence (en utilisant de l'ICG) et visuelle avec le colorant bleu. 100% des ganglions ont été détectés par la sonde isotopique, 90% à l'aide d'une caméra de fluorescence et 72% visuellement montrant ainsi la faisabilité in-vivo de la technique fluorescente (68) (figure 1.12).

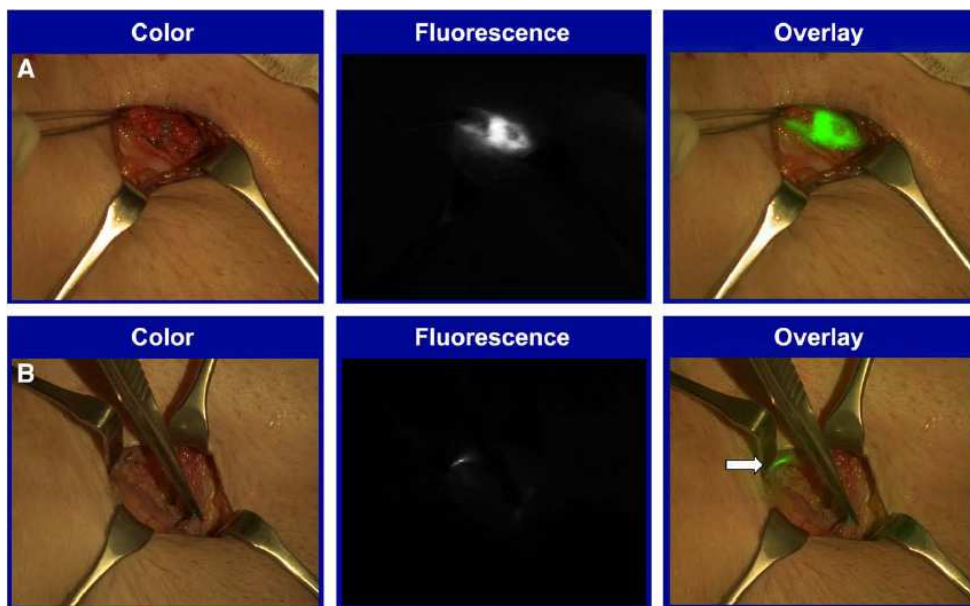


Figure 1.3: Comparaison entre la détection visuelle et de fluorescence du ganglion sentinelle avant (A) et après (B) excision (68)

1.4 Bibliographie

1. <http://www.invs.sante.fr/>. [En ligne]
2. **C. Gómez-Raposo, F. Z. Tévar, M. S. Moyano, M. L. Gómez, E. Casado.** Male breast cancer. *Cancer Treatment Reviews*. 2010, Vol. 36, pp. 451-457.
3. **A. Yoney, A. Kucuk, M. Unsal.** Male breast cancer: A retrospective analysis. *Cancer/Radiothérapie*. 2009, Vol. 13, pp. 103-107.
4. **Cancer, Institut National du.** *Plan Cancer 2009/2013*. Marseille : s.n., 2009.
5. **F.H. Netter.** *Atlas d'anatomie humaine*. s.l. : Masson, 2006. pp. 120-124.
6. **M. Espié, A. Gorins.** *Le sein normal et ses explorations. Le sein - Du Normal au pathologique : état de l'art*. s.l. : ESKA, 2007. pp. 38-53.
7. **K. Alitalo, T. Tammela, T. V. Petrova.** Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature*. Nature Publishing Group, 2005, Vol. 438, pp. 946-953.
8. <http://bio.m2osw.com/gcartable/cardiologie/lymphe.htm>. [En ligne]
9. http://www.freewebs.com/sciencevtt/systeme_lymphatique.html. [En ligne]
10. **T. Tammela, T. V. Petrova, K. Alitalo.** Molecular lymphangiogenesis: new players. *Trends in Cell Biology*. Elsevier, 2005, Vol. 15, 8, pp. 434-441.
11. **J. B. Oliver, J. L. Verhaeghe, M. Butarelli, F. Marchal, G. Houvenaeghel.** Functional anatomy of the lymphatic drainage of the breast: contribution of sentinel lymph node biopsy. *Annales de Chirurgie*. Elsevier, 2006, Vol. 131, pp. 608-615.
12. <http://www.cegep-rimouski.qc.ca/dep/biologie/>. [En ligne]
13. **A. Sachithanandan, B. Badmanaban, A. Graham, H. O'Kane.** Malignant internal mammary lymph nodes during mobilization of the internal mammary artery. *European Journal of Cardio-thoracic Surgery*. ELSEVIER, 2002, Vol. 22, pp. 847-848.
14. **A. Goldhirsch, J. H. Glick, R. D. Gelber, A. S. Coates, B. Thürlimann, H. J. Senn, P. Members.** Meeting Highlights: International expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2005. *Annals of Oncology*. 2005, Vol. 16, 10, pp. 1569-1583.
15. **E. A. Gould, T. Winship, P. H. Philibin, H. Hyland Kerr.** observations on a "sentinel node" in cancer of the parotid. *Cancer*. 1960, Vol. 13, pp. 77-78.
16. **R. M. Cabanas.** An approach for the treatment of penile carcinoma. *Cancer*. 1977, Vol. 39, pp. 456-466.
17. **D. N. Krag, D. L. Weaver, J. C. Alex, J. T. Fairbank.** Surgical resection and radiolocalization of the sentinel lymph node in breast cancer using a gamma probe. *Surgical Oncology*. 1993, Vol. 2, pp. 335-340.

18. **A. E. Giuliano, D. M. Kirgan, J. M. Guenther, D. L. Morton.** Lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for breast cancer. *Annals of Surgery*. 1994, Vol. 220, 3, pp. 391-401.
19. **M. P. Schijven, A. J. J. M. Vingerhoets, H. J. T. Rutten, G. A. P. Nieuwenhuijzen, R. M. H. Roumen, M. E. van Bussel, A. C. Voogd.** Comparison of morbidity between axillary lymph node dissection and sentinel node biopsy. *European Journal of Surgical Oncology*. 2003, Vol. 29, pp. 341-350.
20. **U. Veronesi, G. Paganelli, G. Viale, A. Luini, S. Zurrida, V. Galimberti, M. Intra, P. Veronesi, C. Robertson, P. Maisonneuve, G. Renne, C. De Cicco, F. De Lucia, R. Gennari.** A randomized comparison of sentinel node biopsy with routine axillary dissection in breast cancer. *New England Journal of Medicine*. 2003, Vol. 349, 6, pp. 546-553.
21. **E. Barranger, C. Coutant, A. Flahault, Y. Delpech, E. Darai, S. Uzan.** An axilla scoring system to predict non-sentinel lymph node status in breast cancer patients with sentinel lymph node involvement. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2005, Vol. 91, pp. 113-119.
22. **P. Del Bianco, G. Zavagno, P. Burelli, G. Scalco, L. Barutta, P. Carraro, P. Pietrarota, G. Meneghini, T. Morbin, G. Tacchetti, P. Pecoraro, V. Belardinelli, G. L. De Salvo.** Morbidity comparison of sentinel lymph node biopsy versus conventional axillary lymph node dissection for breast cancer patients: Results of the sentinella-GIVOM Italian randomised clinical trial. *European Journal of Surgery and Oncology*. 2008, Vol. 34, pp. 508-513.
23. **A. H. Madsen, K. Haugaard, J. Soerensen, S. Bokmand, E. Friis, H. Holtveg, J. P. Garne, J. Horby, P. Christiansen.** Arm morbidity following sentinel lymph node biopsy or axillary lymph node dissection: a study from the Danish breast Cancer Cooperative Group. *The Breast*. Elsevier, 2008, Vol. 17, pp. 138-147.
24. **D. Kay Blanchard, J. H. Donohue, C. Reynolds, C. S. Grant.** Relapse and morbidity in patients undergoing sentinel lymph node biopsy alone or with axillary dissection for breast cancer. *Archives of Surgery*. 2009, Vol. 138, pp. 482-488.
25. **J. F. Rodier, M. Velten, M. Wilt, P. Martel, G. Ferron, V. Vaini-Eilies, H. Mignotte, A. Brémond, J. M. Classe, F. Dravet, T. Routinot, C. Tunon de Laura, A. Avril, G. Lorimier, E. Fondrinier, G. Houvenaeghel, S. Avigdor.** Propective Multicentric randomized study comparing periareolar and peritumoral unjection of radiotracer and blue dye for the detection of sentinel lymph node in breast sparing procedures: FRANSENODE Trial. *Journal of Clinical Oncology*. 2007, Vol. 25, 24, pp. 3664-3669.
26. **M. Garcia-Manero, B. Olartecoechea, P. Royo.** Different injection sites of radionuclide for sentinel lymph node detection in breast cancer: single institution experience. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2010, Vol. 153, 2, pp. 185-187.

27. **D. N. Krag, D. L. Weaver, J. C. Alex, J. T. Fairbank.** Surgical resection and radiolocalisation of the sentinel node in breast cancer using a gamma probe. *Surgical Oncology*. 1993, Vol. 2, pp. 335-340.
28. **R. J. Salmon, C. Nos, F. Lojodice, O. Languille, Y. Remvikos, J. R. Vilcoq, K. B. Clough.** Ganglion sentinelle et cancer opérable du sein: utilisation du bleu patent. Etude pilote. *Annals de Chirurgie*. 2000, Vol. 125, pp. 253-258.
29. **T. Hoyek, L. Benoit, J. Fraisse.** Le ganglion sentinelle: une expérience dijonnaise. *Journal de gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction*. 2002, Vol. 31, pp. 565-571.
30. **J. F. Rodier.** Detection of the sentinel node by the surgeon. *Bulletin du Cancer*. 2002, Vol. 89, 10, pp. 840-844.
31. **L. Fass** Imaging and cancer: A review. *Molecular Oncology*. 2008, Vol. 2, pp. 115-152.
32. **M. G. Torchia, R. Nason, R. Danzinger, J. M. Lewis, J. A. thliveris.** Interstitial MR ltmphangiography for the detection of sentinel lymphnodes. *journal of Surgical Oncology*. 2001, Vol. 78, pp. 151-157.
33. **M. G. Torchia, B. Misselwitz.** Combined MR lymphangiography and MR imaging guided Needle localization of sentinel lymph nodes using Gadomer 17. *American Journal of Roentgenology*. 2002, Vol. 179, 6, pp. 1561-1565.
34. **C. Stets, S. Brandt, F. Wallis, J. Buchmann, F. J. Gilbert, S. H. Heywang-Kobrunner.** Axillary lymph node metastases: a statistical analysis of various parameters in MRI with USPIO. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*. 2002, Vol. 16, pp. 60-68.
35. **A. D. Murray, R. T. Staff, T. W. redpath, F. J. Gilbert, A. K. Ah-See, J. A. Brookes, I. D. miller, S. Payne.** Dynamic contrast enhanced MRI of the axilla in women with breast cancer: comparison with pathology of excised nodes. *the British journal of Radiology*. 2002, Vol. 75, pp. 220-228.
36. **A. Luciani, T. H. Dao, M. Lapeyre, M. Schwarzinger, C. Debaecque, L. Lantieri, G. Revelon, M. Bouanane, H. Kobeiter, A. Rahmouni.** Simultaneous bilateral breast and high-resolution axillary MRI of patients with breast cancer: preliminary results. *American Journal of Roentgeneology*. 2004, Vol. 182, 4, pp. 1059-1067.
37. **T. Yamagami, S. Yuen, K. Sawai, T. Nishimura.** MR imaging-guided axillary node biopsy for breast cancer: initial findings. *European Radiology*. 2004, Vol. 14, pp. 151-156.
38. **D. Kane, W. Grassi, R. Sturrock, P. V. Balint.** A brief history of musculoskeletal ultrasound: from bats and ships to babies and hips. *Rheumatology*. 2004, Vol. 43, pp. 931-933.
39. **K. T. Dussik** On the possibility of using ultrasound waves as a diagnostic aid. *Neurology and Psychiatry*. 1942, Vol. 174, pp. 153-158.

40. **K. T. Dussik, D. J. Fritch, M. Kyriazidou, R. S. Sear.** Measurements of articular tissues with ultrasound. *American journal of Physical Medicine.* 1958, Vol. 37, 3, pp. 160-165.
41. **M. A. Shampo, R. A. Kyle.** John Julian Wild: pioneer in ultrasonography. *Mayo Clinical Proceeding.* 1994, Vol. 72, p. 234.
42. **J. Jellins, G. Kossof, T. S. Reeve, B. H. Barraclough.** Ultrasonic grey scale visualization of breast disease. *Ultrasound in medicine & Biology.* 1975, Vol. 1, 4, pp. 393-404.
43. **C. Cole-Beuglet, R. A. Beique.** Continuous ultrasound B-Scanning of palpable breast masses. *Ultrasound.* 1975, Vol. 117, pp. 123-128.
44. **C. Cole-Beuglet, R. Z. Soriano, A. B. Kurtz, B. B. Goldberg.** Ultrasound analysis of 104 primary breast carcinomas classified according to histopathologic type. *Ultrasound.* 1983, Vol. 147, pp. 191-196.
45. **K. J. W. Taylor, C. Merritt, C. Piccoli, R. Schmidt, G. Rouse, B. Fornage, E. Rubin, D. Georgian-Smith, F. Winsberg, B. Goldberg, E. Mendelson.** Ultrasound as a complement to mammography and breast examination to characterize breast masses. *Ultrasound in medicine & Biology.* Elsevier, 2002, Vol. 28, 1, pp. 19-26.
46. **Y. Wang, Z. Cheng, J. LI, J. Tang.** Gray-scale contrast enhanced ultrasonography in detecting sentinel lymph nodes: an animal study. *European Journal of Radiology.* Elsevier, 2009, Vol. 74, 3, pp. 55-59.
47. **P. Britton, P. Moyle, J. R. Benson, A. Goud, R. Sinnatamby, S. Barter, M. Gaskarth, E. Provenzano, M. Wallis.** Ultrasound of the axilla: where to look for the sentinel lymph node. *Clinical Radiology.* Elsevier, 2010, Vol. 65, pp. 373-376.
48. **K. L. Cooper, S. Harnan, Y. Meng, S. E. Ward, P. Fitzgerald, D. Papaioannou, L. Wyld, C. Ingram, I. D. Wilkinson, E. Lorenz.** Positron emission tomography (PET) for assessment of axillary lymph node status in early breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *European Journal of Surgery and Oncology.* Elsevier, 2011, Vol. 37, pp. 187-198.
49. **K. Facey, I. Bradbury, G. Laking, E. Payne.** Overview of a clinical effectiveness of positron emission tomography imaging in selected cancers. *Health technology assessment.* 2007, Vol. 11, 44, p. 85.
50. **C. Messa, V. Bettinardi, M. Picchio, E. Pelosi, C. Landoni, L. Gianolli, M. C. Gilardi, F. Fazio.** PET/CT in diagnostic oncology. *Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging.* 2004, Vol. 48, 2, pp. 66-75.
51. **J. Barentsz, S. Takahashi, W. Oyem, R. Mus, P. De Mulder, R. Reznik, M. Oudkerk, W. Mali.** Commonly used imaging techniques for diagnosis and staging. *Journal of clinical Oncology.* 2006, Vol. 24, 20, pp. 3234-3244.

52. **A. G. Bell.** On the production and reproduction of sound by light. *American Journal of Sciences*. 1880, Vol. 3, 20, pp. 305-324.
53. **A. Rosencwaiga, E. Pinesb.** A photoacoustic next term study of newborn rat stratum corneum. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure*. 1977, Vol. 493, 1, pp. 10-23.
54. **A. A. Oraevsky, V. A. Andreev, A. A. Karabutov, R. D. Fleming, Z. Gatalica, H. Singh, R. O. Esenaliev.** Laser optoacoustic imaging of the breast: detection of cancer angiogenesis. *Proceeding SPIE San José*. 1999, Vol. 3597, doi:10.1117/12.356829.
55. **W. J. Akers, C. Kim, M. Berezin, K. Guo, R. Fuhrhop, G. M. Lanza, G. M. Fisher, E. Daltrozzo, A. Zumbush, X. Cai, L. V. Wang, S. Achilefu.** Noninvasive photoacoustic and fluorescence sentinel lymph node identification using dye-loaded perfluorocarbon nanoparticles. *American Chemical Society & Nanoparticles*. 2011, Vol. 5, 1, pp. 173-182.
56. **D. Pan, M. Pramanik, A. Senpan, S. Ghosh, S. A. Wickline, L. V. Wang, G. M. Lanza.** Near infrared photoacoustic detection of sentinel lymph nodes with gold nanobeacons. *Biomaterials*. 2010, Vol. 31, pp. 4088-4093.
57. **K. H. Song, C. Kim, K. Maslov, L. V. Wang.** Noninvasive in vivo spectroscopic nanorod-contrast photoacoustic mapping of sentinel lymph nodes. *European Journal of Radiology*. 2009, Vol. 70, pp. 227-231.
58. **S. Kim, Y. T. Lim, E. G. Soltesz, A. M. De Grand, J. Lee, A. Nakayama, J. A. Parker, T. Mihaljevic, R. G. Laurence, D. M. Dor, L. H. Cohn, M. G. Bawendi, J. V. Frangioni.** Near infra red fluorescent type II quantum dots for sentinel lymph node mapping. *Nature Biotechnology*. 2004, Vol. 22, 1, pp. 93-97.
59. **E. G. Soltesz, S. Kim, S. W. Kim, R. G. Laurence, A. M. De Grand, C. P. Parungo, L. H. Cohn, M. G. Bawendi, J. V. Frangioni.** Sentinel lymph node mapping of gastrointestinal tract by using invisible light. *Annals of Surgery and Oncology*. 2006, Vol. 13, pp. 386-396.
60. **M. Hikage, K. Gonda, M. Takeda, T. Kamei, M. Kobayashi, M. Kumasada, M. Watabe, S. SATOMI, N. Ohuchi.** Nano-imaging of the lymph network structure with quantum dots. *Nanotechnology*. 2010, Vol. 21, 185103.
61. **J. O. Winterra, N. Gomeza, S. Gatzert, C. E. Schmidt, B. A. Korgela.** Variation of cadmium sulfide nanoparticle size and photoluminescence intensity with altered aqueous synthesis conditions. *Colloids and Surfaces*. 2004, Vol. 254, pp. 147-157.
62. **U. Mahmood, C. H. Tung, A. Bogdanov, R. Weissleder.** Near-infrared optical imaging of protease activity for tumor detection. *Radiology*. 1999, Vol. 213, pp. 866-870.
63. **P. Wunderbaldinger, K. Turetschek, C. Bremer.** Near-infrared fluorescence imaging of lymph nodes using a new enzyme sensing activatable macromolecular optical probe. *European Radiology*. 2003, Vol. 13, pp. 2206-2211.

64. **C. Hirsch, D. Murawa, Z. Mohr, S. Kneif, M. Hunerbein.** ICG fluorescence-guided sentinel node biopsy for axillary nodal staging in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2010, Vol. 121, 2, pp. 373-378.
65. **C. Hirche, S. Dresel, R. Krempien, M. Hunerbein.** Sentinel node biopsy by ICG retention fluorescence detection for inguinal lymph node staging of anal cancer: preliminary experience. *Annals of Surgical Oncology*. 2010, Vol. 17, 9, pp. 2357-2362.
66. **T. Hojo, T. Nagao, M. Kikuyama, S. Akashi, T. Kinoshita.** Evaluation of sentinel node biopsy by combined fluorescent and dye method lymph flow for breast cancer. *the Breast*. 2010, Vol. 19, 3, pp. 210-213.
67. **T. Sugie, K. A. Kassim, M. Takeuchi, T. Hashimoto, K. Yamagami, Y. Masai, M. Toi.** A novel method for sentinel lymph node biopsy by indocyanine green fluorescence technique in breast cancer. *Cancers*. 2010, Vol. 2, pp. 713-720.
68. **L. M. A. Crane, G. Themelis, H.J. G. Arts, K. T. Buddingh, A. H. brouwers, V. Ntziachristos, G. M. van Dam, A. G. J. van der Zee.** Intraoperative near infrared fluorescence imaging for sentinel lymph node detection in vulvar cancer: first clinical results. *Gynecologic Oncology*. 2011, Vol. 120, 2, pp. 291-295.
69. **R. A. Kruger, K. D. Miller, H. E. Reynolds, W. L. Kiser, D. R. Reinecke, G. A. Kruger.** Breast cancer in vivo: contrast enhancement with Thermoacoustic CT at 434 MHz—Feasibility Study. *Radiology*. 2000, Vol. 216, pp. 279-283.

2 Optique des milieux biologiques: théorie et propriétés

Comme il a été exposé dans le premier chapitre, les techniques d'imageries sont variées, de plus la gamme spectrale correspondante est importante. Des radiofréquences, avec l'imagerie par résonance magnétique (IRM), en passant par les rayons X pour la tomodensitométrie (scanner), jusqu'aux rayons γ pour la tomographie par émission de positons (TEP), l'imagerie médicale in-vivo utilise principalement les ondes du spectre électromagnétique (figure 2.1).

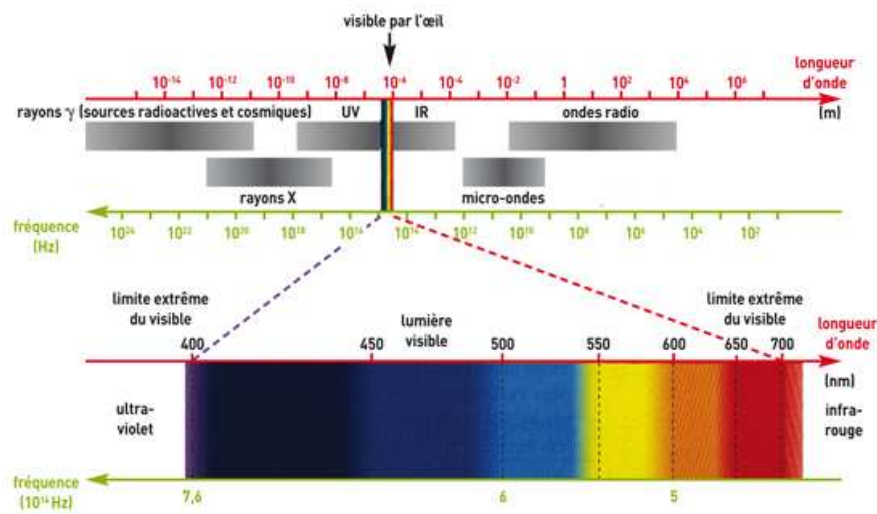


Figure 2.1 : Spectre des ondes électromagnétiques (1)

Les applications cliniques liées aux domaines du visible et infrarouge sont encore limitées. Cependant certaines techniques, comme par exemple la tomographie optique cohérente (OCT), ont trouvé leur place. Cette méthode d'imagerie est maintenant largement acceptée, en particulier dans le domaine ophtalmologique (2) (3) ou encore pour imager des tissus nécessitant une résolution micrométrique et une profondeur de pénétration millimétrique (4) ne pouvant pas être atteints avec l'échographie ou l'IRM. La spectroscopie proche infrarouge (NIRS) est également en plein essor. En effet, le domaine spectral associé correspond aux radiations pouvant pénétrer au plus profond des tissus biologiques en toute innocuité. Ainsi, l'analyse de l'information véhiculée par l'onde au sein des tissus permet d'apporter des renseignements sur leur nature et leur état physiologique. En effet, les propriétés optiques intrinsèques diffèrent fortement d'un milieu à un autre, d'un tissu sain à un tissu lésé. De nombreux facteurs sont à l'origine de ces modifications : différence d'oxygénation entre un tissu sain et un tissu cancéreux, présence d'un agent de contraste absorbant ou fluorescent, variation de la quantité et du type de sang irrigué...

Ce chapitre a pour objectif d'apporter une meilleure compréhension concernant les interactions entre la lumière et les tissus biologiques. Les deux premières parties préciseront les phénomènes physiques en jeu et les paramètres physiques expliquant ces interactions. Dans une troisième partie, nous définirons la fluorescence et expliquerons ses caractéristiques.

2.1 Interaction lumière/tissus biologiques

Lorsqu'une onde électromagnétique interagit avec un milieu, on observe plusieurs phénomènes : la réfraction, la diffraction, l'absorption et la diffusion. Les ondes lumineuses se propagent ainsi dans les milieux matériels selon ces modes d'interaction qui sont fortement dépendants de la longueur d'onde (λ). La description de ces mécanismes d'interaction fait intervenir un certain nombre de caractéristiques : les propriétés tissulaires.

2.1.1 Indice de réfraction

Le principe de réfraction est expliqué par la troisième loi de Snell-Descartes. Cette dernière exprime le changement de direction d'un faisceau lumineux lors de son passage entre deux milieux différents (5).

Chaque milieu est caractérisé par son indice de réfraction n qui dépend de la vitesse de la lumière dans ce milieu v et de la vitesse de la lumière dans le vide c , selon la relation :

$$n = \frac{c}{v} \quad (2.1)$$

De plus, si on note n_1 l'indice de réfraction du premier milieu dans lequel se propage le rayon incident, n_2 celui du second milieu dans lequel se propage le rayon réfracté, θ_1 l'angle d'incidence pris entre la normale au point d'incidence et le rayon réfracté et θ_2 l'angle de réflexion pris entre la normale au point d'incidence et le rayon incident, nous obtenons la loi de Snell-Descartes (figure 2.2) suivante :

$$n_1 \cdot \sin \theta_1 = n_2 \cdot \sin \theta_2 \quad (2.2)$$

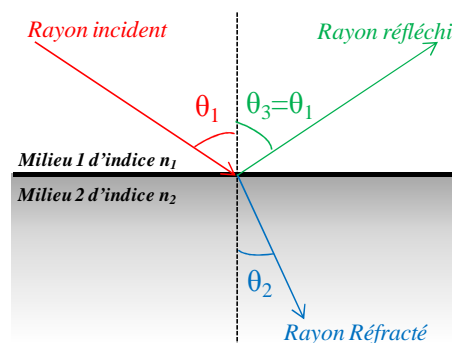


Figure 2.2 : loi de Snell-Descartes

D'un point de vue macroscopique, dans les milieux biologiques, cet indice de réfraction varie très peu et ne dépend principalement que de la teneur en eau d'un tissu à un autre. L'indice de réfraction moyen dans les tissus biologiques est d'environ 1,40 et varie entre 1,33 (indice de réfraction de l'eau) et 1,55 pour un tissu déshydraté (6).

2.1.2 L'absorption.

D'un point de vue microscopique, l'absorption d'un photon proche infrarouge, de fréquence ν , par une molécule, a lieu quand son énergie, $h\nu$, (h étant la constante de Planck, $h = 6,62 \cdot 10^{-34}$ J.s), correspond à celle d'une transition d'énergie, électronique ou vibrationnelle pour le domaine optique, de cette molécule. Cette énergie absorbée par la molécule peut être réémise sous forme d'un photon de fluorescence, ou induire une réaction photochimique après conversion de la molécule dans un état triplet et production de radicaux libres, ou plus couramment être dissipée dans les tissus sous forme de chaleur, comme exposé plus en détail dans le paragraphe II.1 de ce chapitre.

D'un point de vue macroscopique, dans un milieu réel tel que les tissus, l'absorption est due à la présence de chromophores. Ceux-ci atténuent l'onde électromagnétique (ou rayonnement) qui se propage dans le milieu en absorbant une partie de son énergie. Chaque chromophore peut être assimilé à une sphère de taille proportionnelle à son pouvoir d'absorption (figure 2.3).

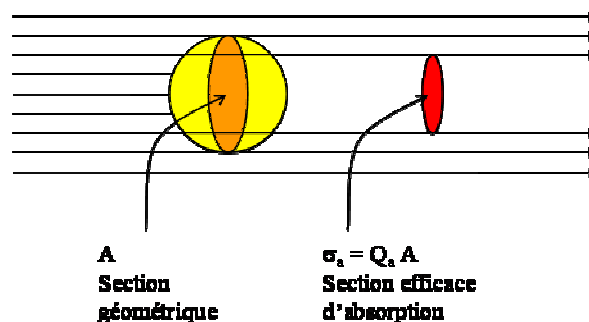


Figure 2.3 : section efficace d'absorption (7)

Dans ce cas, on définit la *section efficace d'absorption* σ_{ai} (m^2) du chromophore i qui est reliée à sa taille géométrique A_i (m^2) par le facteur de proportionnalité appelé *l'efficacité d'absorption* Q_{ai} (sans dimension) tel que :

$$\sigma_{ai} = A_i \cdot Q_{ai} \quad (2.3)$$

Le rayonnement peut donc être absorbé par le chromophore selon son coefficient d'absorption (m^{-1}), qui est le produit de sa section efficace σ_{ai} par sa concentration (m^{-3}) :

$$\mu_{ai} = \rho_i \cdot \sigma_{ai} \quad (2.4)$$

En considérant l'ensemble des chromophores, le *coefficient d'absorption* du milieu s'exprime comme la somme des coefficients de ses différents chromophores:

$$\mu_a = \sum_i \rho_i \cdot \sigma_{ai} \quad (2.5)$$

Lorsqu'une onde plane se propage dans un milieu absorbant, homogène et non diffusant, sa diminution relative en intensité I lors de la traversée d'une tranche d'épaisseur dx s'écrit (8) (9) :

$$\frac{dI}{I} = -\mu_a \cdot dx \quad (2.6)$$

A partir de l'équation (2.6) et en considérant une épaisseur $[x, x+dx]$, nous constatons que l'intensité lumineuse est absorbée dans cette tranche et qu'elle est proportionnelle au produit $\mu_a dx$. Ainsi, l'intégration sur une tranche d'épaisseur x conduit à la loi d'atténuation de Beer-Lambert (10):

$$I(x) = I_0 \cdot \exp(-\mu_a x) \quad (2.7)$$

où I_0 est l'intensité de la lumière incidente (à $x = 0$) (figure 2.4).

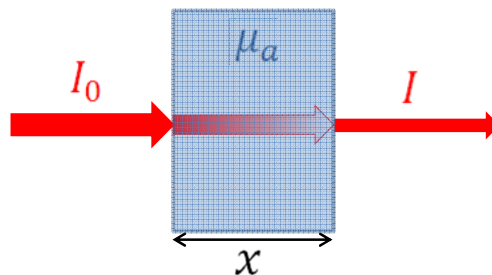


Figure 2.4 : atténuation d'une onde incidente par un milieu absorbant ; loi de Beer-Lambert

L'inverse du coefficient d'absorption est aussi appelé le *libre parcours moyen d'absorption*, il représente le parcours moyen d'un photon avant son absorption :

$$L_a = \frac{1}{\mu_a} \quad (2.8)$$

Comme nous l'avons souligné auparavant, l'absorption d'un milieu dépend des chromophores le constituant : de leur concentration et de leurs sections efficaces. En notant C_i la concentration de ces chromophores [mol/L] et ϵ_i leur coefficients d'extinction molaire [mol⁻¹.mm⁻¹.L], il est possible de réécrire l'équation 2.7 sous sa forme usuelle :

$$I(x) = I_0 10^{-\epsilon_i C_i x} \quad (2.9)$$

Avec :

$$\mu_{ai} = \epsilon_i C_i \cdot \ln(10) = \rho_i \cdot \sigma_{ai} \quad (2.10)$$

Il est alors possible de définir la *transmission* T d'un milieu d'épaisseur L comme le rapport entre l'intensité de la lumière transmise et l'intensité initiale :

$$T(x) = \frac{I(L)}{I_0} \quad (2.10)$$

Enfin, la *densité optique* (DO) d'un milieu d'épaisseur L donnée est définie par :

$$DO = \log_{10} \left(\frac{1}{T} \right) = -\log_{10} \left(\frac{I(L)}{I_0} \right) \quad (2.11)$$

Ainsi, il est possible de relier la DO d'un milieu d'épaisseur L à son coefficient d'absorption et aux coefficients d'extinction molaire des ses composants et d'écrire l'équation :

$$DO = \mu_a \cdot L \cdot \log_{10}(e) = L \sum_i \varepsilon_i \cdot C_i \quad (2.12)$$

2.1.3 Diffusion

2.1.3.1 Le phénomène de diffusion

Afin de comprendre le phénomène de diffusion lumineuse, on peut le rapprocher à un modèle de physique bien connu : la propagation des ondes électromagnétiques dans les milieux diélectriques. Si l'on considère que le champ électrique associé à cette onde modifie les nuages électroniques, via les forces de Coulomb, induisant ainsi des moments dipolaires, ces dipôles créent une polarisation macroscopique du milieu et oscillent à la même fréquence que l'onde électromagnétique incidente. Ainsi chaque dipôle devient une source de champ électromagnétique à la fréquence d'oscillation. Puis l'onde réémise excite de proche en proche les atomes et progresse dans le milieu.

Deux types de milieu peuvent être considérés. Si le milieu est homogène, la proximité des éléments diffusants conduit à des phénomènes d'interférences destructives entre les différentes ondes réémises ayant pour conséquence la propagation unidirectionnelle de la lumière. Le second type de milieu n'est quant à lui pas homogène et s'apparente plus à un milieu réel. Dans ce cas, ces mêmes interférences destructives entre les champs ne sont pas totales et provoquent l'émission de lumière dans d'autres directions que celle de l'onde incidente; on parle alors de *diffusion lumineuse*. Ce type de milieu n'est pas sans rappeler la composition des tissus biologiques qui, avec de nombreuses différences de densité, explique la diffusion que l'on y rencontre. Ces différences entre milieux biologiques menant à une diffusion plus ou moins importante se traduisent par des variations de l'indice de réfraction. Le tableau 2.1 présente des valeurs d'indice de réfraction de quelques composants des tissus.

Composants	Indice de réfraction n
Air	1,00
Eau	1,33
Cytoplasme	1,38
Mitochondries	1,40
Lipides	1,48

Tableau 2.1 : Indice de réfraction de l'air et de différents composants tissulaires

La diffusion est caractérisée par l'intensité lumineuse émise en fonction de l'angle d'observation par rapport à l'onde incidente. On distingue généralement deux types de diffusion variant en fonction de la taille des particules diffusantes :

- Les particules sont très petites devant la longueur d'onde. Ce cas, mis en évidence par Rayleigh en 1871 qui formula la première théorie de la diffusion, entraîne une diffusion isotrope de la lumière (11) (figure 2.5).
- Les particules ayant des tailles voisines de la longueur d'onde ; en 1908, Mie généralise la théorie de la diffusion à ce cas en montrant que la diffusion est dirigée préférentiellement vers l'avant à mesure que la taille des particules augmente (12) (figure 2.5).

Cependant, la théorie de Mie assimile toute irrégularité à une sphère homogène. D'autres modèles plus réalistes ont été développés en modélisant les cellules à l'aide d'un modèle concentrique (13). Malgré les recherches menées sur le sujet, il est bon de rappeler que les tissus biologiques sont d'une complexité bien plus grande que de « simples sphères ». Ainsi, même les derniers modèles développés bien que réalistes ne suffisent pas à expliquer le phénomène.

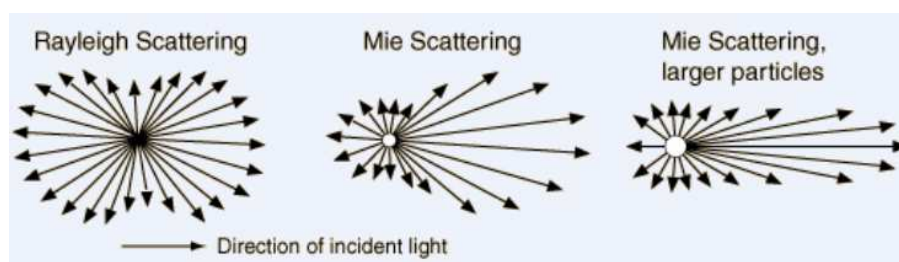


Figure 2.5 : Observation du phénomène de diffusion en fonction de la taille de la particule ; Diffusion de Rayleigh, et diffusions de Mie (14)

2.1.3.2 La diffusion d'un point de vue macroscopique

Il est possible d'écrire le coefficient de diffusion de façon analogue au coefficient d'absorption. Ainsi, chaque centre diffuseur sera assimilé à une sphère de taille proportionnelle à son pouvoir de diffusion (figure 2.4). Dans le cas présent, on définit alors la

section efficace de diffusion σ_s (m^2), qui est reliée à la taille géométrique du centre diffuseur A_s (m^2) par le facteur de proportionnalité appelé l'efficacité de diffusion Q_s (sans dimension) tel que :

$$\sigma_s = A_s Q_s \quad (2.13)$$

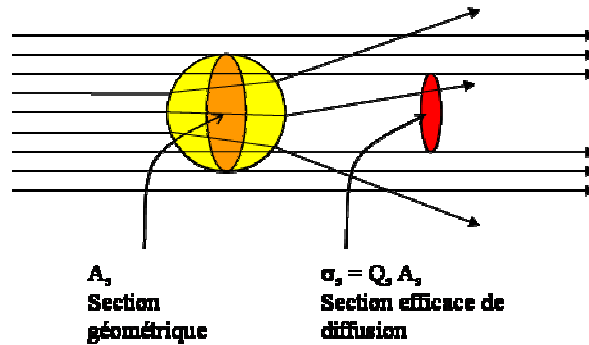


Figure 2.4 : Section efficace de diffusion (7)

Le coefficient de diffusion (m^{-1}) s'exprime dans un milieu contenant plusieurs diffuseurs indépendants, i , et en introduisant la densité de centres diffuseurs ρ_s (m^{-3}) par :

$$\mu_s = \sum_i \rho_s \sigma_{si} \quad (2.14)$$

Dans un milieu non absorbant, l'intensité de lumière diffusée I évolue, en fonction de la profondeur x , selon l'équation suivante:

$$dI/I = -\mu_s dx \quad (2.15)$$

En intégrant sur une tranche d'épaisseur x , d'un milieu absorbant et diffusant, en notant I_0 l'intensité de la lumière incidente (à $x = 0$), on obtient l'atténuation du faisceau diffusé (figure 2.5):

$$I(x) = I_0 \exp(-(\mu_a + \mu_s)x) \quad (2.16)$$

L'équation 3.16 permet de définir le coefficient d'atténuation totale $\mu_t = \mu_a + \mu_s$ qui définit l'atténuation globale de la lumière balistique. L'inverse du coefficient de diffusion est aussi appelé le libre parcours moyen de diffusion (L_D), il représente le parcours moyen d'un photon entre deux événements de diffusion consécutifs :

$$L_D = 1/\mu_s \quad (2.17)$$

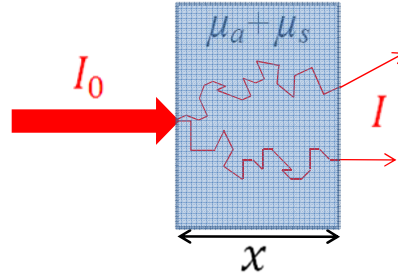


Figure 2.5 : Atténuation d'une onde incidente par un milieu absorbant et diffusant

La distribution de lumière diffusée en fonction de l'angle de diffusion est appelée *fonction de phase* $f(\theta)$ où θ représente la direction de propagation de la lumière diffusée. On peut encore simplifier la description de la distribution angulaire de la diffusion dans les tissus, par le *facteur d'anisotropie* g . Celui-ci est défini comme le cosinus de l'angle moyen de diffusion $\langle \theta \rangle$:

$$g = \langle \cos(\theta) \rangle = \int_{-1}^1 \cos \theta \cdot f(\cos \theta) \cdot d \cos \theta \quad (2.18)$$

Ce facteur varie de 0 pour une diffusion isotrope, à 1 pour une diffusion uniquement vers l'avant, ce qui tend à se rapprocher des tissus biologiques, comme nous l'avons précisé lorsque nous avons introduit la diffusion de Mie. De plus, en 1941, Henyey et Greenstein ont développé une expression de la fonction de phase qui peut être appliquée aux milieux biologiques et ainsi retrouver la fonction de phase à partir du simple coefficient g (15):

$$f(\cos \theta) = \frac{1}{2} \frac{1-g^2}{(1+g^2-2g \cos \theta)^{3/2}} \quad (2.19)$$

A partir de μ_s et g , on définit le *coefficient de diffusion réduit* qui, dans le cas d'un tissu épais et fortement diffusant, décrit l'ensemble des événements de diffusion d'angle θ de la lumière, se propageant de manière équivalente à des diffusions isotropes ($\theta = 90^\circ$) dans un milieu de coefficient μ'_s :

$$\mu'_s = \mu_s(1 - g) \quad (2.20)$$

L'inverse du coefficient de diffusion réduit ($1/\mu'_s$) est le *libre parcours moyen de transport*. Il représente la distance au bout de laquelle un photon a perdu la mémoire de sa direction initiale et est généralement assimilé au parcours moyen d'un photon entre deux événements de diffusion isotrope consécutifs. La figure 2.6 illustre l'équivalence entre une propagation anisotrope de libre parcours moyen de diffusion l et de facteur d'anisotropie $g = 0,9$ et une propagation isotrope de libre parcours moyen de transport $L = 10.l$.

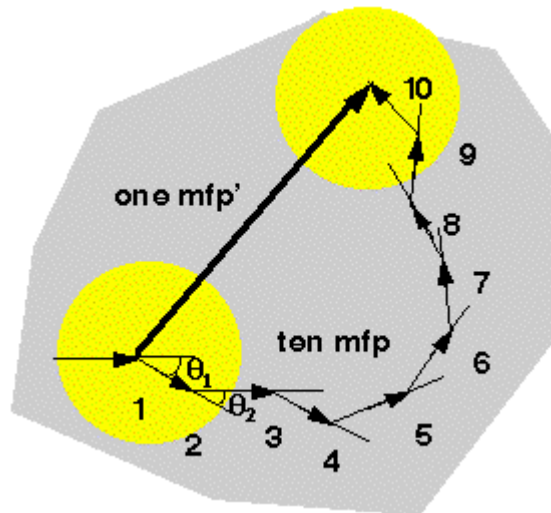


Figure 2.6 : Illustration du libre parcours moyen de diffusion ($l = \text{mfp}$ sur le schéma pour « mean free path ») et du libre parcours moyen de transport ($L = \text{mfp}'$) (7).

2.1.4 Propriétés optiques des tissus

Les tissus sont optiquement inhomogènes et contiennent des chromophores, ils possèdent des indices de réfraction plus grands que l'air. Ceci est responsable de la réflexion partielle des radiations à l'interface air/tissu (figure 2.2). Les phénomènes d'absorption et de diffusions multiples des photons sont responsables de l'atténuation d'un faisceau lumineux lors de sa propagation. Ainsi, la propagation de la lumière au sein des tissus dépend fortement des propriétés optiques des chromophores et des composants cellulaires de différents indices de réfraction les constituants. Les processus d'absorption sont liés à l'énergie du photon, par conséquent l'absorption d'un chromophore varie avec la longueur d'onde. Le spectre d'absorption d'un milieu complexe est la somme des spectres de ces différents constituants. La bande spectrale allant de 600 nm à 1000 nm, qui inclut le rouge et le proche infrarouge, a été nommée « fenêtre thérapeutique » par J. A. Parrish (16). Le diagnostic médical y est possible car ce domaine spectral correspond aux photons pénétrant au plus profond des tissus biologiques. La figure 2.7 présente les spectres d'absorption des principaux absorbeurs rencontrés *in-vivo* que nous allons détailler : l'eau, la mélanine, l'oxy- et la déoxy-hémoglobine.

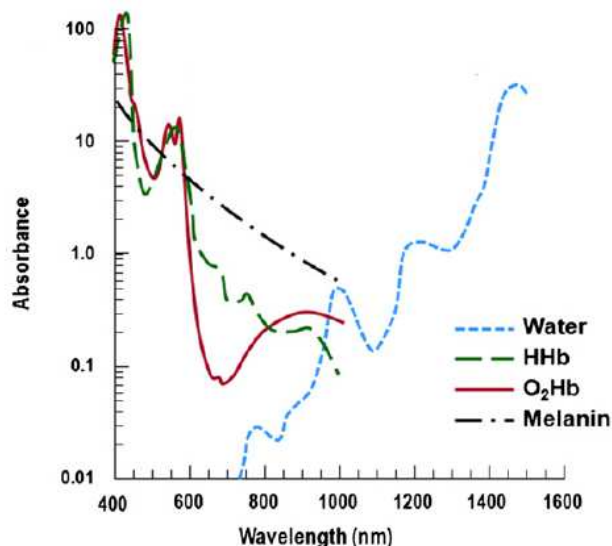


Figure 2.7 : Spectres d'absorption des principaux absorbeurs tissulaires : l'eau (courbe bleue), la déoxy-hémoglobine (courbe verte), l'oxy-hémoglobine (courbe rouge) et la mélanine (courbe noire) (9).

2.1.4.1 L'eau

L'eau est le composant principal des tissus biologiques. Elle peut représenter jusqu'à 80% de la masse de certains organes, comme le cerveau et 70% dans le sein (17). Son absorption devient importante aux longueurs d'onde supérieures à 950 nm et ne peut être négligée dans la partie supérieure de la fenêtre thérapeutique (figure 2.7).

2.1.4.2 L'hémoglobine

Elle est responsable du transport de l'oxygène par les hématies dans le sang. Ces deux formes majoritaires sont l'oxy-hémoglobine et la déoxy-hémoglobine. La concentration en hémoglobine dans les hématies est d'environ 350 g.L⁻¹. En considérant un taux hématocrite moyen de 0,45 ; on obtient une concentration d'hémoglobine dans le sang d'environ 160 g.L⁻¹ et en considérant la masse molaire moyenne de l'hémoglobine ($\approx 65000 \text{ g.mol}^{-1}$), on obtient une concentration de $5,6 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$. La figure 2.8 représente les spectres d'absorption des deux formes d'hémoglobine entre 650 et 1000 nm. On remarque ainsi que l'absorption liée à la déoxy-hémoglobine est très importante, vis-à-vis de l'oxy-hémoglobine, dans la partie inférieure de la fenêtre thérapeutique et que ce phénomène s'inverse au-delà de 800 nm (18).

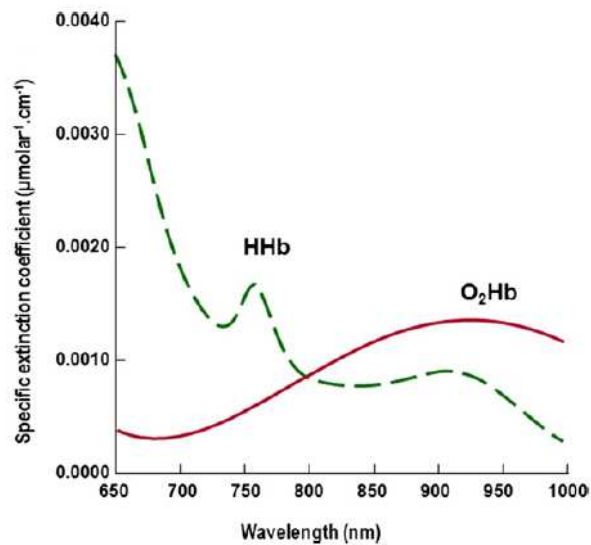


Figure 2.8 : Spectres d'absorption de la déoxy-hémoglobine (courbe verte) et de l'oxy-hémoglobine (courbe rouge) dans le sang (9).

2.1.4.3 La mélanine

La mélanine protège l'épiderme et absorbe principalement dans l'UV et le visible, domaine spectral où son absorption est la plus élevée. Son absorption reste cependant importante dans la fenêtre thérapeutique, mais ne concerne pas les principaux tissus d'intérêt. C'est un pigment de couleur foncée (du noir jusqu'au rouge) que l'on trouve majoritairement dans la peau, les poils, les cheveux et la choroïde (membranes de l'œil). La quantité de mélanine chez un individu dépend de plusieurs facteurs comme l'hérédité ou les hormones. Cependant des facteurs pathologiques peuvent également entrer en jeu tel que l'albinisme provoquant une dénaturation de la mélanine et diminuant par conséquent sa concentration (19).

2.2 Fluorescence

La fluorescence correspond à l'émission spontanée d'un photon par une molécule excitée par un photon incident. Nous présentons ici un résumé des caractéristiques et des différents phénomènes liés à la fluorescence.

2.2.1 Caractéristiques de l'émission

Le diagramme de Perrin-Jablonski permet d'illustrer différents processus physiques tels que l'absorption d'un photon par une molécule, le phénomène de conversion interne, de phosphorescence ou encore de fluorescence (figure 2.9).

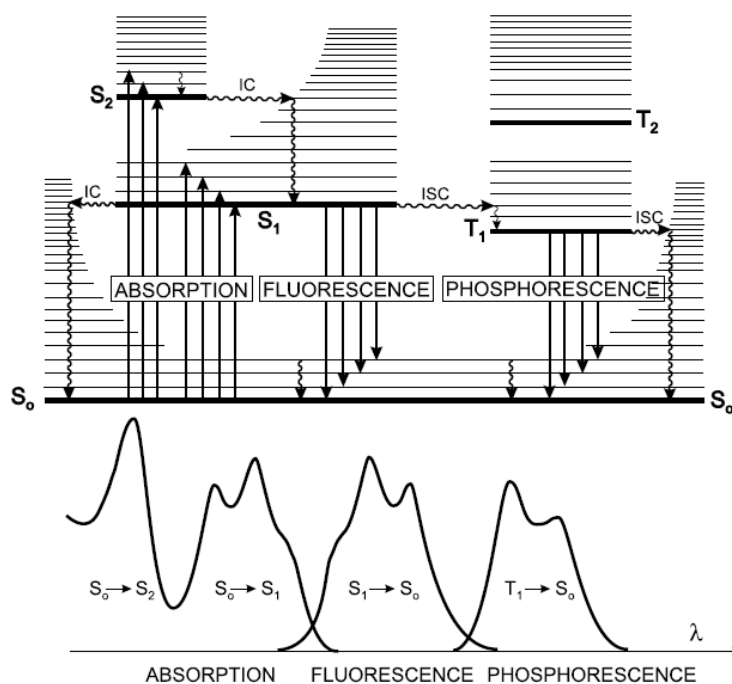


Figure 2.9 : Diagramme de Perrin-Jablonski et position relative des spectres d'absorption, de fluorescence et de phosphorescence (20)

Les états électroniques singulets sont notés S_0 (état fondamental), S_1 , S_2 , ... et les états triplets sont notés T_1 , T_2 , ... De plus, les états vibrationnels associés à chacun de ces états électroniques sont également représentés. Le phénomène d'absorption est très rapide vis-à-vis des autres, environ 10^{-15} s. Ainsi, il n'y a pas de déplacement possible d'atomes constituant la molécule durant cette brève période prise pour la transition électronique ce qui reste à la base du principe de Franck-Condon (21).

Le premier phénomène est l'absorption et les flèches verticales correspondantes débutent à partir d'un niveau d'énergie vibratoire bas, S_0 , ce qui est le cas à température ambiante. L'absorption d'un photon peut donc exciter une molécule vers l'un des niveaux vibrationnels : S_1 , S_2 , ... Suite à cela, plusieurs phénomènes de désexcitation sont possibles et vont maintenant être développés.

2.2.1.1 Conversion Interne

La *conversion interne* (IC sur la figure 2.9) est une transition non radiative entre deux états électroniques de même multiplicité de spins. Ce phénomène est suivi par une relaxation vibrationnelle vers le plus bas niveau d'énergie de l'état électronique final. Si la molécule est en contact avec un solvant, l'excès d'énergie vibratoire peut être transféré à ce dernier par collisions entre la molécule excitée et les molécules du solvant. Si la molécule est excitée à un niveau d'énergie supérieur à celui du premier état électronique S_1 , la relaxation vibrationnelle

amène la molécule vers le niveau vibrationnel 0 de l'état singulet S_1 , en 10^{-13} à 10^{-11} s. De même une conversion interne est possible, si l'état singulet excité est plus élevé que S_1 .

La conversion interne allant de S_2 à S_1 est plus efficace énergétiquement que la conversion entre S_1 et S_0 en raison de l'écart d'énergie beaucoup plus grand entre S_1 et S_0 . Par conséquent, la conversion interne de S_1 à S_0 peut rivaliser avec l'émission de photons de fluorescence et également avec le phénomène de croisement intersystèmes (ISC sur la figure 2.9), qui sera développé plus bas, à partir duquel l'émission de photons de phosphorescence peut être observée.

2.2.1.2 Croisement intersystème et phosphorescence

A température ambiante, la désexcitation non radiative de l'état triplet T_1 , est prédominante sur les désexcitations radiatives, appelées *phosphorescence*, car la transition de T_1 à S_0 est interdite rendant quasi impossible ces désexcitations radiatives. Au contraire, les nombreuses collisions entre les molécules du solvant favorisent les ISC puis les relaxations vibrationnelles vers S_0 .

Au contraire, à basse température ou dans un milieu rigide, la phosphorescence peut être observée. La durée de vie de l'état triplet peut alors être suffisamment longue pour l'observer durant quelques secondes.

Le spectre de phosphorescence est situé à des longueurs d'onde plus élevées que le spectre de fluorescence (figure 2.9), car l'énergie du plus bas niveau de l'état triplet T_1 est inférieure à celle de l'état singulet S_1 .

2.2.1.3 La fluorescence

On appelle *fluorescence* l'émission de photons accompagnant une relaxation de l'état singulet S_1 à l'état fondamental S_0 . La transition entre niveaux d'énergie électronique est généralement la même pour l'absorption (vers S_1) et pour la fluorescence. Cependant, le spectre de fluorescence est situé à des longueurs d'onde supérieures à celles du spectre d'absorption en raison de la perte d'énergie de l'état excité liée aux relaxations vibrationnelles (figure 2.9). En général, les différences entre les niveaux vibratoires sont semblables entre les états fondamentaux et les états excités, de sorte que le spectre de fluorescence ressemble souvent au spectre d'absorption ; on parle alors d'image miroir de l'un par rapport à l'autre. L'écart (exprimé en nombre d'onde) entre le maximum de la bande d'absorption et le maximum du spectre de fluorescence est appelé le déplacement de Stokes ($\Delta\bar{\nu}$ sur la figure

2.10). Cette grandeur est très importante en imagerie de fluorescence. En effet, il est nécessaire de travailler avec des molécules qui ont un $\Delta\bar{\nu}$ assez important afin de pouvoir rejeter les photons liés à l'excitation et de ne collecter que les photons de fluorescence.

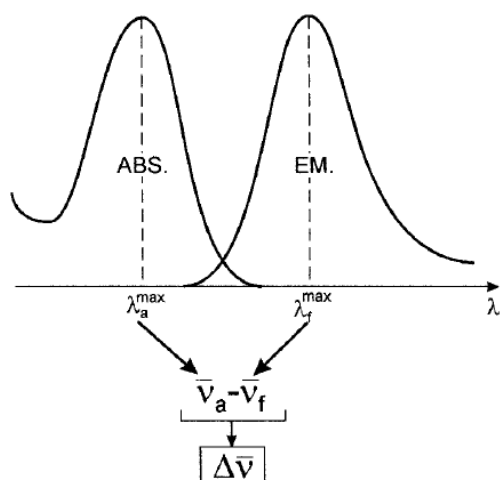


Figure 2.10 : Déplacement de Stokes entre le maximum d'un spectre d'absorption et d'émission de fluorescence (20)

L'émission d'un photon est aussi rapide que l'absorption d'un photon ($\approx 10^{-15}$ s). Cependant, les molécules excitées restent dans l'état S_1 un certain temps (quelques dizaines de picosecondes à plusieurs nanosecondes) avant d'émettre un photon ou de subir un des autres phénomènes de désexcitation cités précédemment (IC, ISC). Ainsi, après excitation d'un milieu contenant des molécules fluorescentes par une impulsion lumineuse, l'intensité de fluorescence va décroître, exponentiellement si toutes les molécules sont dans le même environnement, avec un temps caractéristique représentant le temps de vie moyen des molécules dans l'état excité S_1 .

Une molécule fluorescente est caractérisée par ses spectres d'émission et d'excitation. La figure 2.11 présente à titre d'exemple les profils des spectres d'excitation et d'émission de deux colorants fluorescents : Cy5.5 et IRDye® 800CW. Dans les cas présentés, les maxima des profils d'excitation et d'émission sont à 678 nm et 689 nm pour Cy5.5. Pour IRDye® 800CW, ces maxima sont de 745 nm et 795 nm. Les déplacements de Stokes sont respectivement de 11 nm et 50 nm.

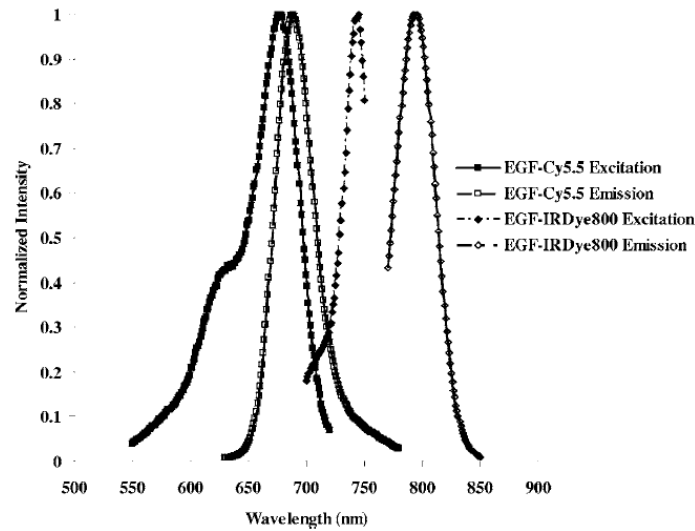


Figure 2.11 : Spectres d'excitation (■) et d'émission (□) de la molécule de cyanine 5.5 (Cy5.5) et spectre d'excitation (◆) et d'émission (◇) de la molécule IRDye® 800CW (22).

Un fluorophore est également caractérisé par trois grandeurs essentielles qui nous renseignent sur les propriétés physico-chimiques de cette molécule : le temps de vie de fluorescence, l'intensité de fluorescence et le rendement quantique de fluorescence (23). La suite de ce chapitre est consacrée à la présentation de ces grandeurs.

2.2.2 Temps de vie de fluorescence

Afin d'expliquer le temps de vie de fluorescence, considérons le schéma 2.12 avec :

- k_r^S : le taux de désactivation radiative $S_1 \rightarrow S_0$ menant à l'émission de fluorescence
- k_{ic}^S : le taux de conversion interne $S_1 \rightarrow S_0$
- k_{isc} : le taux de croisement inter système.

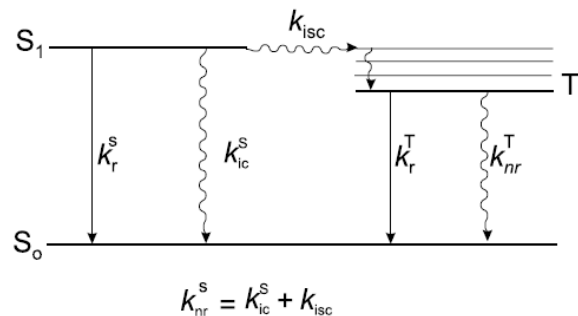


Figure 2.12 : Schéma des constantes de temps des différents procédés

Si nous considérons les désexcitations non radiatives issues de l'état S_1 , il est possible d'introduire le taux global k_{nr}^S défini par :

$$k_{nr}^S = k_{ic}^S + k_{isc} \quad (2.21)$$

Considérons une solution fluorescente de concentration $[C]$. Une impulsion lumineuse au temps $t = 0$ va porter un certain nombre de molécules à l'état singulet excité S_1 par absorption de photons. Le retour à l'état fondamental S_0 se fera ensuite par transfert radiatif ou non ou par croisement inter système. Le taux de dissipation de la molécule excitée peut s'écrire sous la forme de l'équation différentielle suivante :

$$-\frac{d[C^*]}{dt} = (k_r^S + k_{nr}^S)[C^*] \quad (2.22)$$

En notant $[C^*]_0$ la concentration de molécules excitées à $t=0$, l'intégration de cette équation donne l'évolution temporelle de la concentration de la molécule excitée :

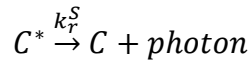
$$[C^*] = [C^*]_0 \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_S}\right) \quad (2.23)$$

Avec τ_S le temps de vie de l'état excité S_1 défini par :

$$\tau_S = \frac{1}{k_r^S + k_{nr}^S} \quad (2.24)$$

2.2.3 L'intensité de fluorescence

L'intensité de fluorescence est définie comme la quantité de photons exprimée en moles émises par unité de temps (s) et par unité de volume (L) d'une solution et qui peut être résumée par :



Après excitation à $t = 0$, l'intensité de fluorescence i_F au temps t est proportionnelle à la concentration de molécules excitées $[C^*]$ et à la constante de désexcitation radiative k_r^S . Il est alors possible d'écrire l'équation suivante :

$$i_F(t) = k_r^S \cdot [C^*] = k_r^S \cdot [C^*]_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau_S}\right) \quad (2.25)$$

Notons ici que si la seule voie de désexcitation à partir du niveau $S_1 \rightarrow S_0$ est l'émission de fluorescence, la durée de vie est alors la durée de vie radiative $\tau_T = 1/k_r^S$.

2.2.4 Rendement quantique de fluorescence

Le rendement quantique de fluorescence Φ_F correspond à la fraction de molécules excitées qui retournent à l'état fondamental S_0 avec émission de photons par fluorescence. Il est donc égal au rapport du taux de relaxation radiative au taux total de relaxation, soit :

$$\Phi_F = \frac{k_r^S}{k_r^S + k_{nr}^S} = k_r^S \tau_S \quad (2.26)$$

Le rendement quantique de fluorescence est aussi le rapport entre le nombre de photons émis et le nombre de photons absorbés. Et selon l'équation (2.25), le rapport entre l'intensité de fluorescence i_F et le nombre de photons absorbés est le suivant :

$$\frac{i_F(t)}{[C^*]_0} = k_r^S \exp\left(-\frac{t}{\tau_S}\right) \quad (2.27)$$

Et en intégrant l'équation 2.27 nous obtenons :

$$\frac{1}{[C^*]_0} \int_0^\infty i_F(t) dt = k_r^S \cdot \tau_S = \Phi_F \quad (2.28)$$

Dans le paragraphe précédent, nous avons établi que si la seule voie de désexcitation est l'émission de fluorescence, la durée de vie est alors la durée de vie radiative $\tau_T = 1/k_r^S$. Finalement le rendement quantique de fluorescence peut s'écrire plus simplement à partir de l'équation 2.28 :

$$\Phi_F = \frac{\tau_S}{\tau_T} \quad (2.29)$$

2.3 Bibliographie

1. <http://www.cea.fr>. [En ligne] 2011.
2. **A. F. Fercher, K. Mengedoht, W. Werver.** Eye-length measurement by interferometry with partially coherent light. *Optics Letters*. 1988, Vol. 13, 3, pp. 186-188.
3. **M. E. J. van Velthoven, D. J. Faber, F. D. Verbraak, T. G. van Leeuwen, M. D. de Smet.** Recent developments in optical coherence tomography for imaging the retina. *Progress in Retina and Eye Research*. 2007, Vol. 26, pp. 57-77.
4. **A. M. Zysk, F. T. Nguyen, A. L. Oldenburg, D. L. Marks, S. A. Boppart.** Optical coherence tomography: a review of clinical development from bench to bedside. *Journal of Biomedical Optics*. 2007, Vol. 12, 5, p. 051403.
5. **A. I. Mahan, C. V. Bitterli.** Total internal reflection: a deeper look. *Applied Optics*. 1978, Vol. 17, 4, pp. 509-519.
6. **F. P. Bolin, L. E. Preuss, R. C. Taylor, R. J. Ference.** Refractive index of some mammalian tissues using a fiber optic cladding method. *Applied Optics*. 1989, Vol. 28, 12, pp. 2297-2303.
7. **J. S. L. Prahl.** <http://omlc.ogi.edu/>. *Oregon Medical Laser Center*. [En ligne]
8. **R. B. Tagirov, L. P. Tagirov.** Lambert formula - Bouguer absorption law? *Russian Physics Journal*. 1997, Vol. 40, 7, pp. 664-669.
9. **A. Pellicier, M. del Carmen Bravo.** Near-infrared spectroscopy: a methodology focused review. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*. 2011, Vol. 16, 1, pp. 42-49.
10. **Y. Tsuchiya.** Photon path distribution and optical responses of turbid media: theoretical analysis based on the microscopic Beer-Lambert law. *Physics in Medicine and Biology*. 2001, Vol. 46, pp. 2067-2084.
11. **J. W. Strutt (Lord Rayleigh).** On the light from the sky, its polarisation and colour I. *The Philosophical Magazine*. 1871, Vol. 41, pp. 107-120.
12. **G. Mie.** Considerations on the optics of turbid media, especially colloidal metal sols. *Annals of Physics*. 1908, Vol. 25, pp. 377-380.
13. **M. Kerker, D. Cooke, H. Chew, P. McNulty.** Light scattering by structured spheres. *Journal of the Optical Society of America*. 1978, Vol. 68, pp. 592-601.
14. <http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbase/atmos/blusky.html>. *Hyperphysics*. [En ligne] 2011.
15. **L. G. Henyey, J. L. Greenstein.** Diffuse radiation in the galaxy. *Astrophysical Journal*. 1941, Vol. 93, pp. 70-83.

16. **J. A. Parrish.** New concept in therapeutic photomedicine: photochemistry, optical targeting and the therapeutic window. *Journal of investigative Dermatology*. 1981, Vol. 77, 1, pp. 45-50.
17. **H. Q. Woodard, D. R. White.** The composition of body tissues. *The british Journal of radiology*. 1986, Vol. 59, pp. 1209-1219.
18. **W. G. Zijlstra, A. Buursma, W. P. Meeuwssen.** Absorption spectra of human fetal and adult oxyhemoglobin, de-oxyhemoglobin, carboxyhemoglobin and methemoglobin. *Clinical Chemistry*. 1991, Vol. 37, 9, pp. 1633-1638.
19. **C. Rooryck, F. Morice, B. Mortemousque, D. Lacombe, A. Taïeb, B. Arveiler.** Albinisme oculo-cutané. *Annals of Dermatology and Venerology*. 2007, Vol. 134, 4, pp. 55-64.
20. **B. Valeur.** *Molecular Fluorescence Principles and Applications*. Paris : Wiley, 2002.
21. **P. W. Atkins.** *Physical Chemistry "fifth edition"*. Oxford : Oxford university Press, 1996.
22. **K. E. Adams, S. Ke, S. Kwon, F. Liang, Z. Fan, Y. Lu, K. Hirschi, M. E. Mawad, M. A. Barry, E. M. Sevick-Muraca.** Comparison of visible and near-infrared wavelength excitable fluorescent dyes for molecular imaging of cancer. *Journal of Biomedical Optics*. 2007, Vol. 12, 2, p. 024017.
23. **R. Philip, A. Penzkofer, W. Bäumlner, R. M. Szeimies, C. Abels.** Absorption and fluorescence spectroscopic investigation of indocyanine green. *Journal of Photochemistry and Photobiology A*. Elsevier, 1996, Vol. 96, pp. 137-148.

3 Caractérisation physicochimique du colorant Bleu Patenté V

3.1 Préambule

Comme nous l'avons mentionné dans le premier chapitre, les colorants bleus sont couramment utilisés afin d'établir la cartographie lymphatique et lors de la biopsie du ganglion sentinelle pour des patients atteints de cancer du sein et autres tumeurs malignes. Parallèlement à l'utilisation croissante de cette technique, des études et rapports sur les effets indésirables liés à l'utilisation de colorants sont de plus en plus fréquents. La réaction mise en avant dans ces publications est le plus souvent le choc anaphylactique lié à leur utilisation (1) (2) (3) (4).

Avant de détailler ces réactions, et à ce moment de l'exposé, il est important de souligner que de nombreuses publications souffrent d'une inexactitude certaine quant à la description du bleu utilisé. En effet, une partie du problème réside dans le fait, que bien souvent, un amalgame entre les différents colorants est fait par les auteurs ; comme par exemple E. Van Zuuren qui, en décrivant le choc anaphylactique d'une patiente lié à l'utilisation du Bleu Patenté V, décrit faussement sa composition chimique comme un regroupement de fonctions anilines, qui en l'occurrence serait une amine primaire aromatique dérivée du benzène et toxique pour l'homme (5)! Cette inexactitude est liée à l'utilisation trompeuse de certaines terminologies chimiques même dans la littérature spécialisée comme le souligne K. Scherer dans une étude comparative des nomenclatures des différents bleus (6). Mais il est vrai qu'il existe de fortes similitudes entre certains colorants. En effet, le Bleu Patenté V (Numéro CAS (*Chemical Abstracts Service*): 3536-49-0) et le Bleu Isosulfan (numéro CAS: 68238-36-8) sont chimiquement assez proches (7). Tous deux sont des triarylméthanés et ont des formules chimiques très proches. Mais le Bleu Patenté V possède un groupe hydroxyle supplémentaire. De plus, le Bleu Isosulfan est l'isomère du Bleu Patenté VF (numéro CAS: 129-17-9).

Le Bleu de Méthylène (numéro CAS: 61-73-4 (Bleu de méthylène anhydre) et 7220-79-3 (trihydrate de Bleu de méthylène)) est parfois également utilisé pour la détection du ganglion sentinelle (8) (9). Mais son utilisation est de plus en plus restreinte. En effet, il doit être injecté profondément, car il peut entraîner des nécroses graves lors de son administration intradermique (10). La figure 3.1 représente les formules chimiques des trois composés cités ci-dessus.

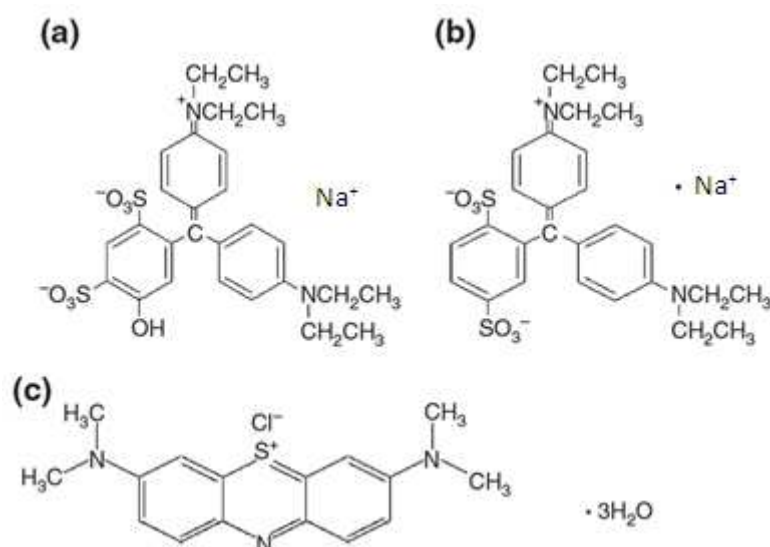


Figure 3.1 : Comparaison des formules chimiques du Bleu Patenté V (a), du Bleu Isosulfan (b) et du Bleu de Méthylène.

Afin d'avoir une vision plus synthétique des différents colorants bleus existants et de leur utilisation, le tableau 3.1 présente les noms, synonymes, CAS Number et applications des principaux bleus rencontrés dans la littérature.

Colorants	Synonymes	# CAS	Nom de vente	Applications
Bleu Patenté V	E131	3536-49-0	Patent Blue V	Détection GS
	Bleu Acide 3		Guerbet	Lymphographie
Bleu Patenté VF	Bleu Acide 1	129-17-9	-	Détection GS
	Bleu de Disulfine		-	Colorant alimentaire
	Bleu alimentaire 3		-	Colorant cosmétique
Bleu Isosulfan	Bleu Patenté Violet	68238-36-8	Lymphazurine	Détection GS
Bleu de Méthylène	Methylthionium	61-73-4	Urolene Blue	Méthémoglobinémie
	Bleu d'aniline		-	Antiseptique
	Bleu Basique 9		Methylene Blue	Marquage tissulaire
			Vitis	

Tableau 3.1 : Résumé des différents colorants bleus et de leurs différentes dénominations

3.2 Propriétés physico chimiques du Bleu Patenté V

3.2.1 Nomenclature du Bleu Patenté

Le Bleu Patenté V Sodique est utilisé pour le repérage vasculaire et lymphatique. Il est conditionné en France par la société Guerbet en ampoules de 2 ml à 2,5 % en solution physiologique NaCl à 0,6 % et phosphate disodique à 0,05 %.

Il s'agit d'un sel sodique du bis-(diéthylamino-4phényl) (hydroxy 5 disulfo-2 4 phényl méthanol) de masse molaire égale à 582,7 g/mol. Sa structure chimique est présentée en Figure 3.1.a et sa formule brute est $C_{27} H_{31} N_2 O_7 S_2 Na$.

3.2.2 Solubilité du Bleu Patenté V

Comme l'a établi D. W. Newton (11), le Bleu Patenté V est peu soluble dans l'alcool (9,8% w/w) par rapport à l'eau distillée (> 42 %). De plus, il est pratiquement insoluble dans des solvants organiques comme l'éther ou le toluène (< 1.10^{-5} %) (11). Ceci s'explique très simplement. En effet, par définition, un soluté polaire est soluble dans un soluté polaire. Dans le cas présent, la solvation est réalisée avec de l'eau (aussi appelée hydratation). La molécule d'eau, H_2O , est très polaire. Le Bleu Patenté V a lui un très fort caractère polaire provenant de son groupe hydroxyle $-OH$ vis-à-vis de son très simple caractère apolaire lié aux quatre groupes éthyle $-C_2H_5$. Il est donc soluble dans l'eau. En revanche, si nous considérons un alcool tel que l'éthanol CH_3-CH_2-OH , ces groupes éthyles lui confèrent un fort caractère apolaire (moment dipolaire globale nul) (12) (13); ce qui explique que le Bleu Patenté V n'est que peu soluble dans les alcools. Le même raisonnement peut être développé avec l'éther ($CH_3-CH_2-O-CH_2-CH_3$).

3.2.3 Spectrométrie du Bleu Patenté V

Le spectre d'absorption et la couleur de solution de Bleu Patenté V dépendent du pH. Cette capacité de changer de couleur en fonction de l'acidité du milieu, appelée halochromisme, a été mise en évidence très tôt par P. C. Henriquez en 1933 (14). C'est la raison pour laquelle il a très vite été utilisé comme un indicateur de pH. En effet, le tableau 3.2 nous montre qu'il est possible d'obtenir des couleurs stables entre différentes valeurs de pH (11). En outre, il a la propriété de jouer le rôle d'indicateur de titration d'oxydoréduction. Il manifeste notamment un brusque changement de couleur au point d'équivalence dans la titration du titane, du chrome ou du cuivre avec des ions ferreux et du sulfate de cérium (15) (16).

Comme nous l'observons dans le tableau 3.2, le Bleu Patenté V est bleu de manière stable lorsque le pH varie entre 4 et 11. Lors de notre étude, le pH des solutions réalisées était toujours proche de 7. Dans ces conditions, après dilution du colorant pur dans du PBS, nous avons obtenu le spectre d'absorption présenté sur la figure 3.2. L'acquisition de ce spectre a été faite grâce un spectrophotomètre UV/Visible à deux faisceaux (UVIKON 943) dans des cuves de 10 mm en utilisant comme référence du PBS.

Gamme de pH	Couleur	λ Maximum [nm]
4 à 11	Bleu	638
2,7 à 3,5	Bleu-Vert	638 - 412
1,5 à 2,5	Vert-Jaune	412
-5,8 à -1	Jaune	418
-10 à -7	Incolore	273

Tableau 3.2 : Variations de couleur du Bleu Patenté V en fonction du pH (11).

Une espèce ne peut être colorée que si la molécule, qui la constitue, absorbe sélectivement certaines longueurs d'onde du spectre visible. Dans le cas du Bleu Patenté V, nous remarquons que le colorant présente plusieurs bandes d'absorption. Les deux premières, situées dans la partie UV du spectre électromagnétique, possèdent un maximum à 207 nm et 310 nm. Les deux autres sont situées dans la partie visible et présentent des absorptions maximales à 411 et 638 nm (figure 3.2).

Par définition, les molécules colorées sont constituées de l'association de deux types de groupement d'atomes :

- Les chromophores sont généralement des groupements aromatiques ou des groupes de liaisons conjuguées qui confèrent la couleur aux solutions. Ils ont pour principale propriété de posséder des électrons dans leurs orbitales liantes (aussi appelées π) et non liantes (n) de telle manière que les états excités possibles correspondent à des énergies d'absorption se situant dans la partie UV et/ou Visible du spectre électromagnétique. Les groupements aromatiques phényles correspondent à la transition électronique $\pi \rightarrow \pi^*$ caractéristique des bandes d'absorption du domaine UV du spectre électromagnétique (17). Le Bleu Patenté V possède trois de ces groupements et cette transition correspond au pic à 207nm.
- Le second type de groupement est constitué des auxochromes tels que -OH, -OCH₃, -NH₂, -Cl, -N(CH₃)₂ ... Ils ont pour point commun de posséder des électrons non liés qui augmentent la délocalisation électronique des électrons des liaisons conjuguées (18). Le Bleu Patenté V possède un groupement -OH. Celui-ci a pour conséquence d'influencer les énergies d'absorption des transitions électroniques du groupe auquel il est fixé, de sorte que le Bleu Patenté V ainsi formé absorbe dans le visible, produisant la couleur de la molécule. De plus, comme l'a décrit C. R. Bury en 1935 (19), deux formes mésomères «quinoïde-benzénoïde» peuvent entrer en résonance, ce qui, dans le cas de la molécule de Bleu Patenté V, correspond au fait que l'azote d'un groupement aminodiéthyl en position para sur un cycle, est en résonance entre les deux groupements aminodiéthyl. Cette résonance est la cause d'un déplacement des pics relatifs aux transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ vers de

plus grandes longueurs d'onde, du domaine visible du spectre, ce qui correspond à la bande d'absorption ayant son maximum à 638 nm.

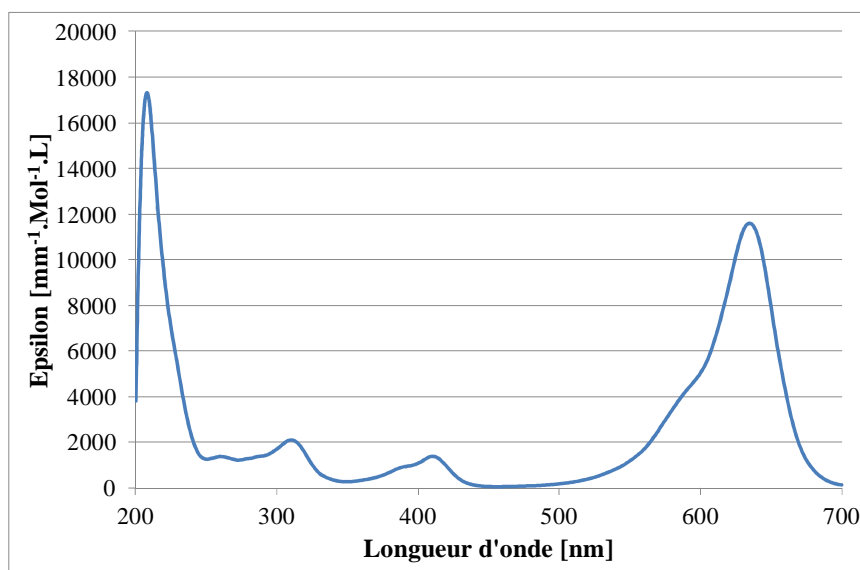


Figure 3.2 : Spectre d'absorption du Bleu Patenté V à 14 µmol/L dans le PBS

De plus, en diminuant le pH, la molécule de colorant est le siège d'une réaction de protonation. La charge portée par le carbone central réduit de 50 % la longueur de la résonance du système quinoïde-benzénoïde. Ce résultat se traduit par une diminution du recouvrement des orbitales électroniques et élève le niveau d'énergie de l'état excité. Il doit s'en suivre un déplacement hypsochromique de la bande d'absorption à l'origine de la couleur. Il y a donc tout lieu de penser que la bande d'absorption de la molécule protonée est représentée dans le spectre par la bande dont l'amplitude maximum est de 418 nm. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé une série de mesure du spectre d'absorption du Bleu Patenté V à 14 µmol/L en diminuant le pH de 7,5 à 0,7 unités (figure 3.3). Nous constatons un effet hypochrome à 638nm accompagné d'un effet hyperchrome à 418nm avec un point isobestique à 505nm lorsque le pH diminue. Ces remaniements électroniques, conséquences de la réaction d'équilibre protonation - déprotonation, expliquent le virage au jaune de la solution à faible pH. De plus, pour des forces d'acidité encore supérieures, la molécule de colorant est le siège d'une double protonation et sa solution devient incolore (20). Il serait donc logique d'assigner la bande d'absorption dont le maximum d'amplitude est à 418 nm aux mêmes types d'états électroniques et aux mêmes causes envisagées pour la bande d'absorption de maximum à 638 nm.

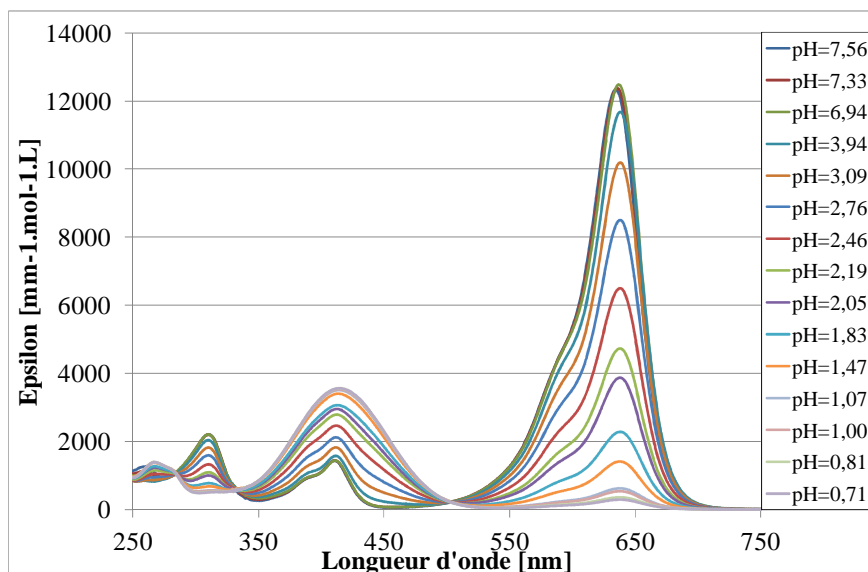


Figure 3.3 : Spectres d'absorption du Bleu Patenté V dans l'eau à différents pH

3.2.4 Interactions Bleu Patenté V / Albumines

3.2.4.1 Le sérum d'albumine humaine

Parmi l'ensemble des protéines contenues dans le plasma, l'albumine représente la proportion la plus importante, que se soit d'un point de vue quantitatif (55 à 60 % des protéines totales) ou qualitatif. C'est une protéine globulaire, de masse molaire égale à 65000 g/mol, composée de 585 acides aminés (21). Sa concentration sanguine chez l'adulte varie entre 38 et 48 g/L selon les individus. Elle est produite par le foie et permet le transport de nombreuses substances (endogènes et exogènes). Elle assure environ 80 % de la pression osmotique du plasma (22) et sa demi-vie varie, selon la littérature, entre 15 et 20 jours (23). De nombreuses recherches ont été menées afin de connaître sa structure tridimensionnelle. Dès 1970, plusieurs formes de la molécule d'albumine sérique humaine (HSA) ont été proposées mais celles-ci ne donnaient pas de réelles informations structurales (24). Le premier modèle tridimensionnel à basse résolution fut décrit par D. C. Carter en 1989 (25) qui affina, en 1992, sa modélisation avec une résolution de 2,8 Å (21). Depuis, la structure de la molécule d'HSA a été encore affinée afin d'obtenir par cristallisation la représentation que nous connaissons aujourd'hui. La figure 3.4 représente le schéma de cette molécule où chaque sous domaine est marqué par une couleur différente (Ia en jaune, Ib en vert, IIa en rouge, IIb en magenta, IIIa en bleu, IIIb en cyan) et où les sites liants sont clairement distincts (Arg₁₁₇, Lys₃₅₁ et Lys₄₇₅ en blanc).

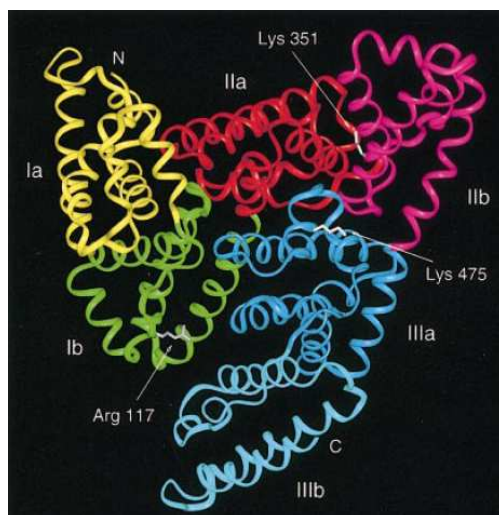


Figure 3.4 : Schéma structurel d'une molécule HSA (26).

3.2.4.2 Choix du Bleu Patenté V pour la détection du Ganglion sentinelle

Dès les années 1950, des études physico-chimiques ont montré que les colorants sulfonés peuvent s'éliminer cinq fois plus lentement que des molécules non sulfonées, avec un taux très proche de celui des protéines plasmatiques (27). Ainsi, très rapidement s'est posée la question de l'existence d'une liaison plus ou moins forte avec les protéines en fonction du nombre de groupes $-SO_3H$ présents sur le colorant. C. Tsopelas a plus récemment étudié ces interactions en comparant de nombreux colorants, incluant le Bleu Patenté V, le Bleu Evans ou encore le Bleu de Méthylène fixés à du plasma de rat (28). Il a ainsi pu constater que le Bleu de Méthylène, qui ne possède pas de groupe sulfoné, ne se lie pas aux protéines plasmatiques et il a montré que la liaison d'une molécule de colorant avec la protéine dépend du nombre de groupes sulfonés et de leur position dans la molécule. Il a mis en évidence que la présence de deux groupements sulfonés séparés par 2-6 atomes dans la structure moléculaire, renforçait la liaison. Ainsi, le Bleu Evans, qui comprend quatre groupes sulfonés, est caractérisé par un pourcentage de liaison de 68,1 % alors que le Bleu Patenté V qui comprend deux groupements sulfonés séparés par 2 liaisons carbonées, est caractérisé par un pourcentage de liaison plus faible de 4,7 % (28). La faible affinité entre le Bleu Patenté V et les protéines, en collaboration avec son rythme lent de l'excrétion rénale (29), explique pourquoi l'urine des patients est de couleur bleue verdâtre plus de 18 h après la chirurgie.

Malgré cela, l'utilisation du Bleu Patenté V s'est petit à petit imposée comme « gold standard » en routine clinique. En effet, il est nécessaire de réaliser un compromis entre ces propriétés physicochimiques et son utilisation afin de choisir le colorant le plus approprié. Ainsi plusieurs propriétés apparaissent comme essentielles : la nécessité d'avoir un colorant

lié avec les protéines pour limiter l'excrétion précoce urinaire, une captation rapide par le ganglion et la quantité injectée qui doit être la plus faible possible afin de minimiser les effets secondaires. Mais la liaison doit être caractérisée par une constante d'association peu élevée car la complexion du colorant avec les protéines ralentit sa diffusion et sa captation au niveau des ganglions.

Le choix du Bleu Patenté V est en accord avec ces contraintes. Après injection intradermique du colorant, la visualisation des vaisseaux lymphatiques est rapide (moins de 15 minutes). Cependant, les vaisseaux lymphatiques sont fins et, peu de temps après, leur visualisation devient plus difficile à cause d'une diffusion des molécules à travers leur paroi en direction du milieu interstitiel. Cette observation est en agrément avec la faible liaison de ce colorant aux protéines et une excrétion urinaire précoce élevée. En revanche, un colorant comme le Bleu Evans, qui se complexe de manière plus importante avec l'HSA mais qui diffuse plus lentement, n'est pas prioritairement le meilleur colorant pour une visualisation des vaisseaux lymphatiques et la recherche de ganglions sentinelles.

3.2.5 Etude spectroscopique

Le sérum d'albumine humaine, utilisé durant notre étude, provient de chez Sigma Aldrich (CAS #70024-90-7) de masse molaire égale à 66335 g/mol. Le Bleu Patenté V est mis en solution dans de l'HSA et dans du PBS afin de réaliser ces spectres d'absorption. La figure 3.5 représente ces spectres correspondant au Bleu Patenté V libre (courbe bleue) et liée à différentes concentrations d'albumine (10 à 40 g.L⁻¹). On observe un effet bathochrome du maximum d'absorption de 638 à 640 nm, un effet hypochrome du maximum du coefficient d'extinction molaire de 17 % et un élargissement spectral.

L'effet bathochrome peut être expliqué par le fait que l'attraction électrostatique des groupements SO₃H⁻ du Bleu Patenté V par les groupements NH₂ de la molécule d'HSA, neutralise les charges négatives et accroît la résonance des doubles liaisons conjuguées des cycles benzoïde-quinoidé (30). Au sujet de l'effet hypochrome, comme l'a évoqué I.M. Klotz, la liaison électrostatique entre les deux molécules doit être renforcée par des interactions de van der Waals qui exercent un couplage entre un résidu voisin aromatique (tyrosine), ou hétérocyclique (tryptophane) de la molécule d'albumine (31).

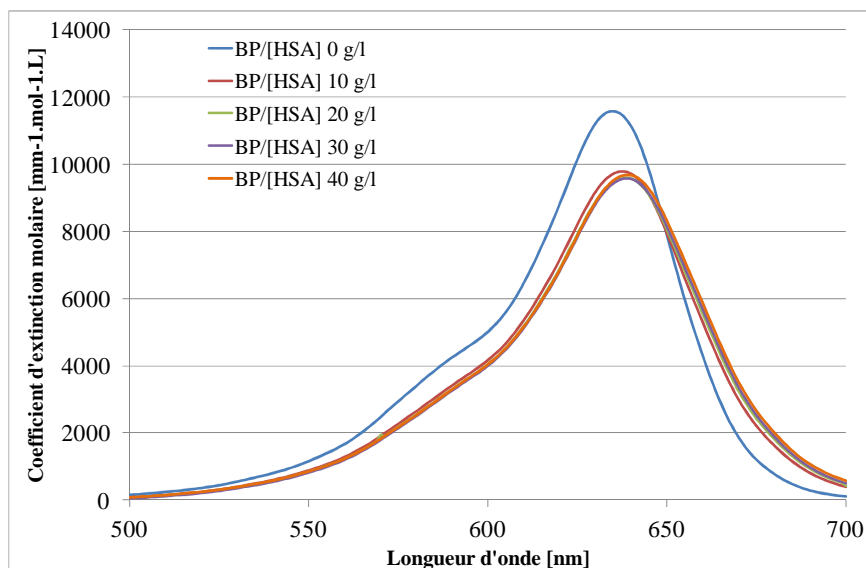


Figure 3.5 : Comparaison entre le spectre d'absorption du Bleu Patenté V libre et le Bleu Patenté V fixé à de l'HSA à différentes concentrations.

3.3 Etude fluorimétrique du Bleu Patenté V

La littérature nous renseigne de façon précise sur la capacité du Bleu Patenté V à être fluorescent. Il apparaît clairement que celui-ci n'est pas fluorescent lorsqu'il est libre et que son rendement quantique est de l'ordre de 10^{-4} . En effet, les molécules de triphénylméthane, tel que le Bleu Patenté V, ont normalement des rendements quantiques de fluorescence extrêmement bas dus à leur rapide et facile désexcitation vibrationnelle. Cependant, cette fluorescence peut être exaltée en limitant de telles vibrations, en plaçant la molécule dans des milieux visqueux ou froids (32). De plus, de nombreuses études ont montré qu'une condition nécessaire pour augmenter le rendement quantique de fluorescence d'une molécule, repose sur le fait que celle-ci doit se trouver dans une configuration rigide en limitant la flexibilité des cycles aromatiques phényle par rapport au carbone central de la molécule (33). Le but de cette étude est de trouver une macro molécule injectable au patient qui permet d'exalter la fluorescence du Bleu Patenté V lorsque les deux sont liés. La molécule d'albumine paraît être un candidat approprié. Nous présenterons dans la suite de ce chapitre les méthodes développées afin d'obtenir le rendement quantique du Bleu Patenté V libre et lié, et les résultats obtenus.

3.3.1 Méthode

La méthode que nous utilisons pour la détermination des rendements quantiques du Bleu Patenté V est une méthode de comparaison, nécessitant la connaissance préalable du rendement quantique de fluorescence d'un corps de référence. Cette méthodologie fut

introduite par H. W. Melhuish en 1954 (34), qui l'appliqua par la suite à de nombreuses molécules (35). Le principe, relativement simple, permet à partir de l'enregistrement du spectre de fluorescence de la solution de référence, de relier l'intensité d'excitation, la fraction d'intensité absorbée et l'intensité de fluorescence au rendement quantique du corps de référence. Il en est de même pour la molécule étudiée. Ainsi, il est possible d'écrire le rendement quantique Φ_x de la solution recherchée (ici le Bleu Patenté V) en fonction de celui de la solution référence (Φ_r), de leurs densités optiques (DO_r et DO_x) à la longueur d'onde d'excitation, des indices des solvants des deux solutions (n_1 pour le solvant de la solution étudiée et n_2 pour la solution référence) et des aires sous les courbes des spectres d'émission (S_x et S_r) sous la forme :

$$\Phi_x = \frac{DO_r}{DO_x} \cdot \frac{S_x}{S_r} \cdot \frac{n_1^2}{n_2^2} \cdot \Phi_r \quad (3.1)$$

Afin de faire ce calcul, il est nécessaire d'avoir un colorant de référence ayant un spectre d'absorption et d'émission proche du Bleu Patenté V. Notre choix s'est porté sur le Nile Blue. En effet, la fluorescence émise par ce colorant est depuis longtemps connue et son rendement quantique est de 0,27 (36).

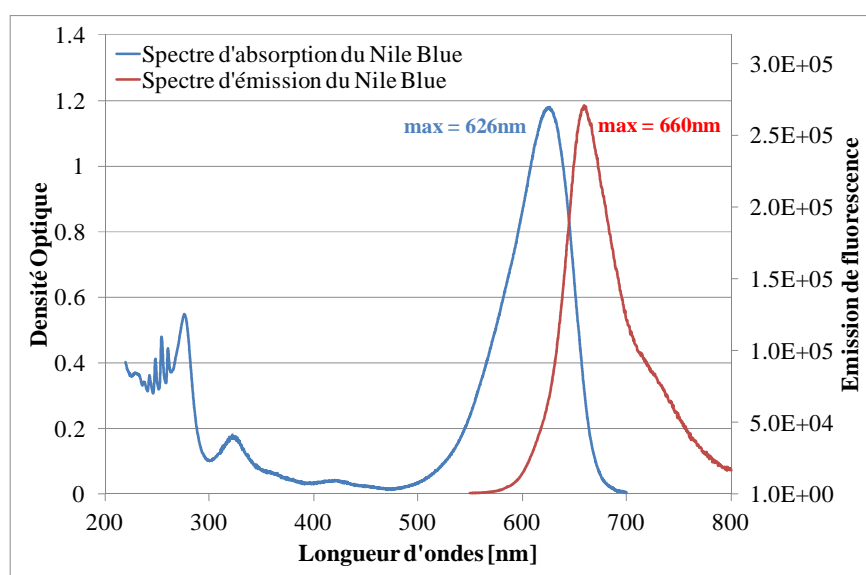


Figure 3.6 : Spectres d'absorption et d'émission du Nile Blue (37)

Le colorant utilisé durant cette étude est le Nile Blue Chloride (Sigma Aldrich, CAS # 2381-85-3) de formule chimique $C_{20}H_{20}ClN_3O$, de masse molaire égale à 353,85 g/mol. La figure 3.6 présente les spectres d'absorption et d'émission du Nile Blue dans le méthanol. Le maximum du spectre d'absorption est de 626nm et le déplacement de Stokes du maximum du spectre d'émission est de 34nm.

3.3.2 Résultats

3.3.2.1 Rendement quantique du Bleu Patenté V libre

La figure 3.7 représente les spectres d'absorption du Bleu Patenté V libre et du Nile Blue libre avec pour solvants respectifs de l'eau pure et du méthanol. Ces deux spectres sont proches, comme requis par la méthode utilisée.

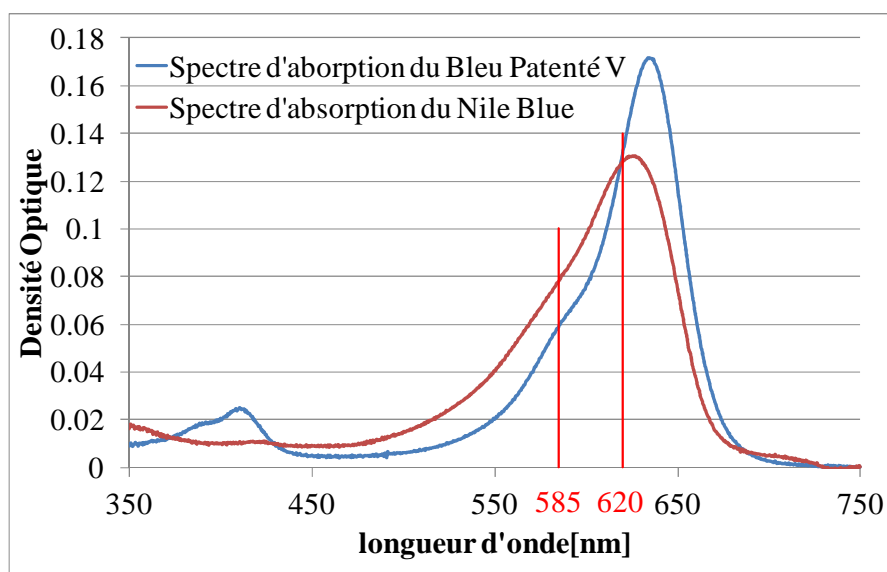


Figure 3.7 : Spectres d'absorption du Bleu Patenté V et du Nile Blue entre 350 et 750 nm. Les traits verticaux rouges représentent les longueurs d'onde choisies (585 nm et 620 nm)

Nous choisissons de mesurer le rendement quantique de fluorescence du Bleu Patenté V en choisissant deux longueurs d'ondes d'excitation afin de confronter ces deux résultats. La première longueur d'onde est choisie proche du croisement des spectres, 620 nm, la seconde est fixée à 585 nm, au niveau de l'épaule du spectre d'absorption du Bleu Patenté V. Les DO, aux longueurs d'onde choisies, sont précisées dans le tableau 3.3.

Colorant	Bleu Patenté V		Nile Blue	
Longueur d'onde	585 nm	620 nm	585 nm	620nm
Densité Optique	0,0587	0,1312	0,0778	0,1279

Tableau 3.3 : Comparaison des DO du Bleu Patenté V et du Nile Blue à 585 nm et 620 nm

Les spectres d'émission des deux colorants libres après excitation à 585 nm et à 620 nm ont été enregistrés sur un spectrofluorimètre FluoroMax-3 (JobinYvon Horiba) à température ambiante. Tous les spectres ont été corrigés pour les variations d'intensité de la source d'excitation.

Ces spectres (figure 3.8) laissent clairement apparaître une intensité de fluorescence plus importante pour le Nile Blue comparativement au Bleu Patented V. A l'aide de l'équation 3.1, nous calculons les rendements quantiques aux deux longueurs d'onde du Bleu Patented V, nous obtenons :

$$\begin{cases} \Phi_{BPV(585nm)} = \frac{DO_{NB(585nm)}}{DO_{BPV(585nm)}} \cdot \frac{S_{BPV}}{S_{NB}} \cdot \frac{n_{PBS}^2}{n_{MEoH}^2} \cdot \Phi_{NB} = 5,29 \cdot 10^{-4} \\ \Phi_{BPV(620nm)} = \frac{DO_{NB(620nm)}}{DO_{BPV(620nm)}} \cdot \frac{S_{BPV}}{S_{NB}} \cdot \frac{n_{PBS}^2}{n_{MEoH}^2} \cdot \Phi_{NB} = 4,68 \cdot 10^{-4} \end{cases}$$

Au vu de ces résultats, nous pouvons conclure que la fluorescence du Bleu Patented V libre est trop faible pour être détectée in vivo. Nous nous sommes ensuite intéressés au rendement quantique du Bleu Patented V lié à l'albumine.

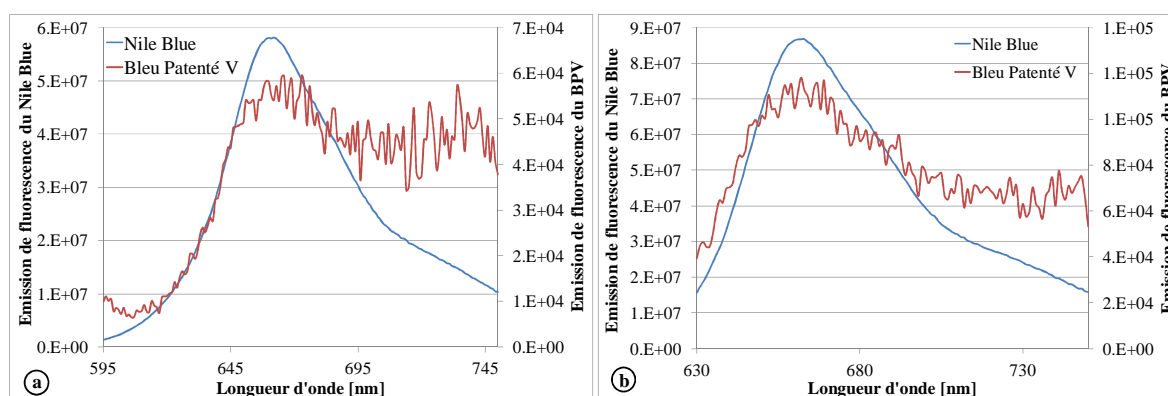


Figure 3.8 : Spectres d'émission du Nile Blue (courbes bleues) et de Bleu Patented V (courbes rouges à 585 nm (a) et 620 nm (b))

3.3.2.2 Rendement quantique du Bleu Patented V lié à l'albumine

Nous choisissons de mesurer les rendements quantiques de fluorescence du Bleu Patented V lié à l'albumine en faisant varier la concentration d'albumine entre $6.25 \cdot 10^{-2}$ et 1 mmol.L^{-1} . Cette dernière valeur s'approche de la concentration moyenne d'albumine présente in-vivo. Le solvant utilisé pour le Nile Blue est toujours le méthanol. Nous répétons le même protocole que celui détaillé dans le paragraphe précédent en mesurant au préalable les DO des solutions aux deux longueurs d'ondes d'excitation. La figure 3.9 représente les spectres d'absorption et les spectres d'émission du Bleu Patented V, de concentration $4 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$, lié à cinq concentrations d'albumine, après excitation à 620 nm. On remarque, une exaltation du signal de fluorescence en comparaison du signal obtenu lors de l'expérience réalisée avec le colorant libre. Il en est de même pour les signaux obtenus après excitation à 585 nm (non représenté). Cette augmentation est visible pour chaque concentration d'HSA. Ceci est confirmé par le calcul des rendements quantiques pour chaque solution et à chaque longueur

d'onde d'excitation. En effet, en appliquant de nouveau l'équation 3.1 nous obtenons les rendements quantiques présentés dans le tableau suivant :

Solution	Rendement Quantique	
	Excitation 585 nm	Excitation 620 nm
BPV [4 μ M]/HSA [0,0625 mM]	$1,54.10^{-2}$	1.10^{-2}
BPV [4 μ M]/HSA [0,125 mM]	$1,74.10^{-2}$	$1,14.10^{-2}$
BPV [4 μ M]/HSA [0,25 mM]	$2,16.10^{-2}$	$1,38.10^{-2}$
BPV [4 μ M]/HSA [0,5 mM]	$1,65.10^{-2}$	$1,35.10^{-2}$
BPV [4 μ M]/HSA [1 mM]	$1,49.10^{-2}$	$1,25.10^{-2}$

Tableau 3.4 : Rendements quantiques des différentes solutions de Bleu Patenté lié à de l'albumine à concentrations variables

Nous observons un rendement quantique moyen de $1,71.10^{-2} \pm 0,26.10^{-2}$ lorsque la solution de Bleu Patenté V lié à HSA est excitée à 585 nm et un rendement quantique moyen de $1,22.10^{-2} \pm 0,16.10^{-2}$ pour les mêmes solutions excitées à 620nm. Finalement, il est possible de fournir un rendement quantique moyen général égal à $1,47.10^{-2} \pm 0,33.10^{-2}$, bien que les rendements mesurés aux deux longueurs d'onde soient significativement différents. Ces résultats démontrent que lorsque que le colorant Bleu Patenté V est lié à une macro molécule comme l'HSA, son intensité de fluorescence est exaltée. Ce rendement quantique, bien que moyennement faible par rapport à d'autres colorants tel que le Vert d'Indocyanine ($\approx 0,15$) (38), est tout à fait détectable en utilisant une instrumentation appropriée.

Le choix d'une longueur d'onde proche du maximum d'absorption pour la source d'excitation peut s'avérer judicieuse, d'une part pour avoir un maximum de photons absorbés, et d'autre part pour bénéficier d'un rendement quantique optimum. L'utilisation de longueur d'onde d'excitation plus basse peut cependant présenter l'avantage d'abaisser la longueur d'onde de coupure du filtre de fluorescence et de collecter ainsi une plus forte proportion des photons de fluorescence.

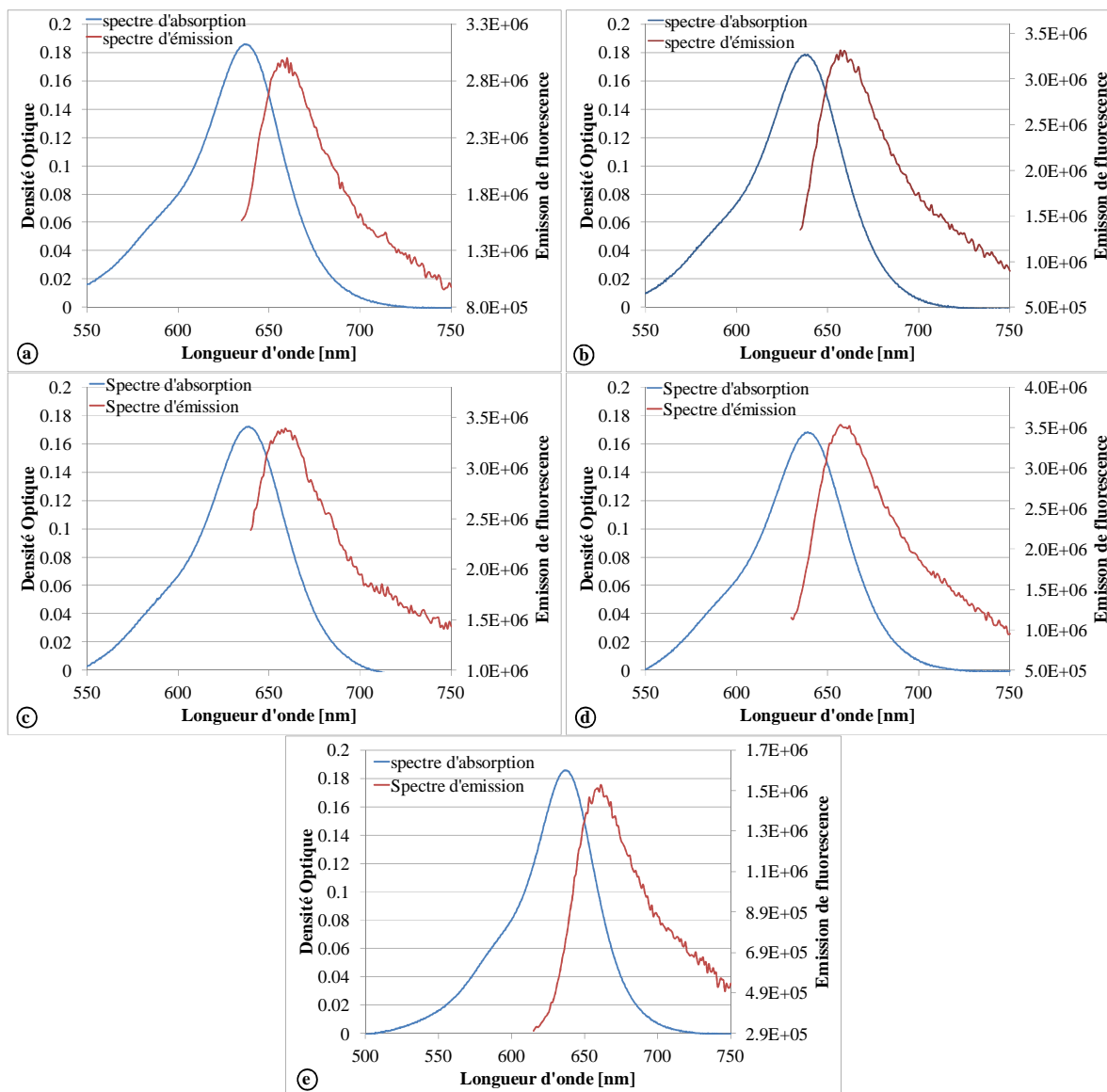


Figure 3.9 : Spectres d'absorption et d'émission du Bleu Patenté V en solution avec HSA : 0,0625 mmol.L⁻¹ (a), 0,125 mmol.L⁻¹ (b), 0,25 mmol.L⁻¹ (c), 0,5 mmol.L⁻¹ (d) et 1 mmol.L⁻¹.

3.4 L'utilisation du Bleu Patenté V en médecine et ses risques

Avant de conclure, il est bon de rappeler une notion introduite dans le préambule de ce chapitre. De nombreuses études et publications tentent de mettre en garde les chirurgiens concernant l'utilisation du Bleu Patenté V (et autres bleus) en médecine. Son utilisation a même été suspendue dans certains pays comme les Etats Unis, le Canada ou encore l'Australie. De plus, en France, l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (AFFSAPS) (39) a placé le Bleu Patenté V sur la liste des médicaments à surveiller. Cependant, il est nécessaire de temporer les perspectives pessimistes créditées à ce colorant. En effet, une très grande majorité des publications parues sur les risques liés à son utilisation ne portent que sur des cas isolés et ne donne souvent que très peu de données ramenées aux

pourcentages de patients (2) (5). Cependant, C. Bézu a effectué une revue de la littérature (40) montrant que depuis le premier cas rapporté en 1966 (41) par W. L. Kopp, un certain nombre d'études à grande échelle a été mené afin d'avoir des données chiffrées plus précises (tableau 3.5). Nous considérerons des cohortes de patients supérieurs à 1000 unités, afin d'avoir des résultats robustes. Ainsi, nous observons une incidence de 2,7 % pour 1001 patientes par Kalimo en 1981 (42) en diminution constante jusqu'à l'ALMANAC paru en 2010 regroupant 5853 patientes et indiquant 0,9 % de cas allergènes (43). Il apparaît très clairement, que les précautions prises au fil des années (tests allergènes préopératoires, surveillance des phénomènes d'hypotension...) ont permis de mieux cibler les patientes à risque. Ainsi ce risque, connu, est de plus en plus maîtrisé par le chirurgien et l'anesthésiste. L'utilisation de façon rigoureuse du Bleu Patented V, pour la détection du ganglion sentinelle, est donc actuellement encore autorisée.

Auteur et année	Nombre de patientes	Réactions allergènes (%)
Kalimo et al, 1981	1001	2,7
Cox et al, 2000	1700	1
Montgomery et al, 2002	2392	1,6
Krag et al, 2007	5588	0,7
Barthelmes et al, 2010	5853	0,9

Tableau 3.5 : Extrait de la revue de littérature de C. Bézu regroupant les pourcentages de risques allergènes liés à l'utilisation du Bleu Patented V (40)

Pour finir, il est établi à l'heure actuelle qu'une double détection, combinant les méthodes isotopique ET colorimétrique, augmente les chances de repérage du ganglion sentinelle (44). De plus, comme l'a montré l'étude, portant sur 496 patientes, de T. Kang, 13,9 % de ganglions détectés par le chirurgien, étaient « chauds » mais n'apparaissaient pas bleu à l'œil et 0,8 % n'étaient ni « chauds » ni bleus (45). Ces derniers ont pu être détectés uniquement grâce à l'expérience du praticien. Fondamentalement, cela ne veut pas forcément dire que le colorant n'avait pas pénétré dans ces ganglions. En effet, si une quantité trop faible de bleu a marqué ces ganglions, il est fort probable que l'œil du chirurgien (bien qu'entraîné) n'ait pu détecter la variation de couleur. Ceci constitue l'une des bases de ce travail qui consiste à mettre au point un instrument optique capable de détecter les ganglions sentinelles marqués par le Bleu Patented V de manière spécifique tout en possédant une sensibilité supérieure à l'œil de l'utilisateur.

3.5 Bibliographie

1. **L. Barthelmes, A. Goyal, P. Sudheer, R. E. Mansel.** Investigation of anaphylactic reaction after patent blue V dye injection. *The Breast*. Elsevier, 2010, Vol. 19, pp. 516-520.
2. **M. P. Lafourcade, M. Martin.** Anaphylactic shock in surgery due to patent blue. *Revue française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique*. Elsevier, 2008, Vol. 48, pp. 459-461.
3. **R. Mansouri, D. W. Chicken, M. R. S. Keshtgar.** Allergic reactions to patent blue dye. *Surgical Oncology*. Elsevier, 2006, Vol. 15, p. 58.
4. **I. Woltsche-Kahr, P. Komericki, B. Kränke, M. Horn, S. Schuller-Petrovic, E. Richtig, W. Aberer.** Anaphylactic shock following peritumoral injection of patent blue in sentinel lymph node biopsy procedure. *European Journal of Surgical Oncology*. 2000, Vol. 26, pp. 313-314.
5. **E. Van Zuuren, M. C. A. Polderman, I. Kuijken.** Anaphylaxis to patent blue during sentinel lymph node identification. *Contact Dermatitis*. 2005, Vol. 53, p. 171.
6. **K. Scherer, W. Studer, V. Figueiredo, A. J. Bircher.** Anaphylaxis to isosulfan blue and cross-reactivity to patent blue V: case report and review of the nomenclature of vital blue dyes. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*. 2006, Vol. 96, pp. 497-500.
7. <http://www.cas.org/>. *Division of the American Chemical Society*. [Online] 2011.
8. **J. M. East, C. S. P. Valentine, E. Kanchev, G. O. Blarke.** sentinel lymph node biopsy for breast cancer using methylene blue dye manifests a short learning curve among experienced surgeons a prospective tabular cumulative sum (CUSUM) analysis. *BMC Surgery*. 2009, Vol. 9, 2, pp. 1-8.
9. **S. Tahmasebi, M. Haghifard, A. Talei.** Combined Methylene Bleu dye and radioactive tracer technique for sentinel lymph node localization in early breast cancer. *Middle East Journal of Cancer*. 2010, Vol. 1, 4, pp. 155-158.
10. **B. Stradling, G. Aranha, S. Gabram.** Adverse skin lesions after methylene blue injections for sentinel lymph node localization. *American Journal of Surgery*. 2002, Vol. 184, pp. 350-352.
11. **D. W. Newton, P. J. Breen, D. E. Brown, J. F. Mackie, R. B. Kluza.** Physicochemical characteristics of patent blue violet dye. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1981, Vol. 70, 2, pp. 122-127.
12. **Y. Chang, J. Lin, C. Lii.** Effect of ethanol concentration on the physicochemical properties of waxy corn starch treated by hydrochloric acid. *Carbohydrate Polymers*. 2004, Vol. 57, pp. 89-96.

13. **C. Zhang, F. Zhao, Y. Wang.** Thermodynamics of the solubility of sulfamethazine in methanol, ethanol, 1-propanol, acetone, and chloroform from 293.15 to 333.15K. *Journal of Molecular Liquids*. 2011, Vol. 159, 2, pp. 170-172.
14. **P. Cohen Henriquez,.** L'influence du pH. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas*. 1933, Vol. 52, 13, pp. 991-1000.
15. **J. H. Yoe, G. R. Boyd.** Patent Bleu V as a pH and redox indicator. *Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition*. 1939, Vol. 11, 9, pp. 492-493.
16. **N. Venkateswara, V. V. S. Eswara Dutt.** Triphenylmethane dyes as a redox indicators in the cerimetric titration of titanium, chromium an copper. *Z Analytical chemistry*. 1971, Vol. 254, 2, pp. 128-129.
17. **R. Mahé, D. Devilliers, E. Mahé.** Expériences portant sur la notion d'indicateur coloré. *Bulletin de l'Union des Physiciens*. 1998, Vol. 92, 801, pp. 299-326.
18. **L. Michaelis, S. Granick.** Metachromasy of basic dyestuffs. *Journal of American Chemical Society*. 1945, Vol. 67, pp. 1212-1219.
19. **C. R. Bury.** Auxochromes and resonance. *Journal of American Chemical Society*. 1935, Vol. 57, pp. 2115-2117.
20. **D. F. Duxbury.** The photochemistry and photophysics of triphenylmethane dyes in solid and liquid media. *Chemical Review*. 1993, Vol. 93, pp. 381-433.
21. **X. Min He, D. C. Carter.** Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature*. 1992, Vol. 358, pp. 209-214.
22. **G. Scatchard, A. C. Batchelder, A. Brown.** Chemical, clinical and immunological studies on the products of human plasma fractionation. The osmotic pressure of plasma and serum albumin. *Journal of Clinical Investigation*. 1944, Vol. 23, pp. 458-464.
23. **K. Sterling.** Serum albumin turnover in laennec's cirrhosis as measured by I131-tagged albumin. *Journal of Clinical Investigation*. 1951, Vol. 30, 11, pp. 1238-1242.
24. **R. J. Mc Clure, B. M. Craven.** X-ray data for four crystalline forms of serum albumin. *Journal of molecular Biology*. 1974, Vol. 83, 4, pp. 551-555.
25. **D. C. carter, X. M. He, S. H. Munson, P. D. Twigg, K. M. Gernert, M. B. Broom, T. Y. Miller.** Three-dimensional structure of human serum albumin. *Science*. 1989, Vol. 244, 4909, pp. 1195-1198.
26. **S. Sugio, A. Kashima, S. Mochizuki, M. Noda, K. Kobayashi.** Crystal structure of human serum albumin at 2.5Å resolution. *Protin Engineering*. 1999, Vol. 12, 6, pp. 439-446.
27. **T. H. Allen, P. D. Orahovats.** Combination of toluidine dye isomers with plasma albumin. *The American Journal of Physiology*. 1950, Vol. 161, 3, pp. 473-482.

28. **C. Tsopelas, R. Sutton.** Why certain dyes are useful for localizing the sentinel lymph node. *Journal of Nuclear Medicine*. 2002, Vol. 43, pp. 1377-1382.
29. **B. Pump, P. Hirnle.** Preoperative lymph-node staining with liposomes containing patent blue violet; A clinical case report. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 1996, Vol. 48, 7, pp. 699-701.
30. **N. Nizomov, E. N. Kurtaliev, S. N. Nizamov, G. Khodjayev.** Spectral luminescent study of the interaction of some styrycyanine dyes with bovine serum albumin and DNA in aqueous solutions. *Journal of Molecular Structure*. 2009, Vol. 936, pp. 199-205.
31. **I. M. Klotz.** Spectrophotometric investigations of the interactions of proteins with organic anions. *Journal of the American Chemical Society*. 1946, Vol. 68, 11, pp. 2299-2304.
32. **J. R. Babendure, S. R. Adams, R. Y. Tsien.** Aptamers switch on fluorescence of triphenylmethane. *Journal of the American Chemical Society*. 2003, Vol. 125, pp. 14716-14717.
33. **G. Oster, Y. Nishijima.** Fluorescence and internal rotation: their dependence on viscosity of medium. *Journal of the American Chemical Society*. 1956, Vol. 78, 8, pp. 1581-1584.
34. **H. W. Melhuish, W. S. Metcalf.** The quenching of the fluorescence of anthracene; The transition from strong to weak quenching. *Journal of Chemical Society*. 1954, pp. 976-979.
35. **W. H. Melhuish.** Measurement of quantum efficiencies of fluorescence and phosphorescence and some suggested luminescence standards. *Journal of the Optical Society of America*. 1964, Vol. 51, 2, pp. 183-186.
36. **H. Du, R. A. Fuh, J. Li, L. A. Corkan, J. S. Lindsey.** PhotochemCAD++: A computer-aided design and research tool in photochemistry. *Photochemistry and photobiology*. 1998, Vol. 68, 2, pp. 141-142.
37. **Prahl, Scott.**
<http://omlc.ogi.edu/spectra/PhotochemCAD/html/nileblue%28MeOH%29.html>. *OMLC Header*. [Online]
38. **S. Reindl, A. Penzkofer, S.H. Gong, M. Landthaler, R. M. Szeimies, C. Abels, W. Bäuml.** Quantum Yield of triplet formation for indocyanine green. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 1997, Vol. 105, 1, pp. 65-68.
39. <http://www.afssaps.fr/Activites/Surveillance-des-medicaments/Medicaments-sous-surveillance-renforcee/%28offset%29/0>. *Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé*. [Online] Mai 2011.
40. **C. Bézu, C. Coutant, A. Salengro, E. Daraï, R. Rouzier, S. Uzan.** Anaphylactic response to blue dye during sentinel lymph node biopsy. *Surgical Oncology*. 2011, Vol. 20, 1, pp. 55-59.

41. **W. L. Kopp.** Anaphylaxis from alphazurine 2 G during lymphography. *Journal of the American Medical Association.* 1966, Vol. 198, 6, pp. 668-669.
42. **K. Kalimo, C. T. Jansen, M. Kormano.** Sensitivity to patent blue dye during skin prick testing and lymphography. *Radiology.* 1981, Vol. 14, pp. 368-7.
43. **L. Barthelmes, A. Goyal, R. G. Newcombe, F. McNeill, R. E. Mansel.** on behalf of the eNEW START and ALMANAC study groups. *European Journal of Surgery and Oncology.* 2010, Vol. 36, pp. 399-403.
44. **P. Varghese, A. Mostafa, A. T. Abdel-Rahman, S. Akberali, J. Gattuso, A. Canizales, C. A. Wells, R. Carpenter.** Methylene blue dye versus combined dye-radioactive tracer technique for sentinel lymph node localisation in early breast cancer. *European Journal of Surgery and Oncology.* 2007, Vol. 33, pp. 147-152.
45. **T. Kang, M. Yi, K. K. Hunt, E. A. Mittendorf, G. V. Babiera, H. Kuerer, I. Bedrosian, R. F. Hwang, A. Lucci, F. Meric-Bernstam.** Does Blue dye contribute to success of sentinel node mapping for breast cancer? *Annals of Surgical Oncology.* 2010, Vol. 17, pp. 280-285

4 Méthodes et instrumentations pour la détection optique du ganglion sentinelle

Après avoir introduit les bases physicochimiques du colorant Bleu Patenté V et étudié les caractéristiques spectroscopiques de la forme libre et liée aux molécules d'albumine, nous avons pu conclure que sa détection peut se faire selon deux modes opératoires. Le premier se rapporte à la détection des photons diffusés après absorption par le milieu, le second consiste, après excitation à une longueur d'onde déterminée, à détecter les photons de fluorescence émis à une longueur d'onde supérieure.

Dans ce chapitre, nous présenterons, dans un premier temps, les différents dispositifs expérimentaux conçus pour réaliser ces deux types de détection ainsi que la méthode d'analyse des signaux développée. Dans un second temps, nous présenterons les modèles utilisés afin de caractériser nos équipements successifs, puis nous introduirons le modèle animal nous ayant servi lors de la validation in-vivo des sondes et finirons par expliquer quel protocole a été mis en place avec le Centre anticancéreux Paul Strauss de Strasbourg afin de réaliser des mesures sur des pièces opératoires.

4.1 Détection des photons diffusés à deux puis quatre longueurs d'onde

Durant cette thèse, deux dispositifs ont été développés afin de détecter le Bleu Patenté V par la méthode des photons diffusés. Nous présenterons ici successivement, le premier prototype puis le second, basé sur le même principe que le premier mais permettant d'améliorer la qualité des données mesurées.

4.1.1 Principe de fonctionnement

Afin de détecter les photons diffusés après absorption par le Bleu Patenté V de la lumière incidente, deux sondes ont été développées. Le premier instrument utilise comme sources d'excitation deux diodes laser (LDM modules, ILEE) générant des faisceaux lumineux à deux longueurs d'onde distinctes. Le premier laser a une longueur d'onde de 657 nm, proche du maximum d'absorption du Bleu Patenté V, pour détecter ce colorant. Le second, à une longueur d'onde non absorbée par le colorant, 785 nm, est utilisé afin de mesurer l'absorption optique des tissus. Chaque diode laser est modulée à une fréquence propre : 15 Hz pour la première et 25 Hz pour la seconde. Chaque faisceau est injecté dans une fibre optique (SEDI Fibres) placée dans une sonde stylo, celles-ci séparées de 2 millimètres en leur extrémité. Une

troisième fibre optique, située à 4 millimètres des deux fibres d'excitations, est incorporée à la sonde et permet de collecter les photons rétrodiffusés et les transporte jusqu'à une photodiode. La séparation des deux composantes spectrales du signal mesuré est réalisée par une transformation de Fourier. Elle permet de discriminer l'absorption du BPV de celle des autres chromophores tissulaires. La loi de Beer-Lambert, modifiée pour prendre en compte la diffusion des tissus, permet de calculer la concentration relative du colorant. Les diodes laser sont pilotées à l'aide d'une carte National Instrument (NI-USB 6008 OEM) et les signaux, collectés par la photodiode (S5106 HAMAMATSU), sont digitalisés par cette même carte. Celle-ci est connectée à un ordinateur portable par un port USB et est pilotée via un programme écrit en langage Labview (figure 4.1) (1).

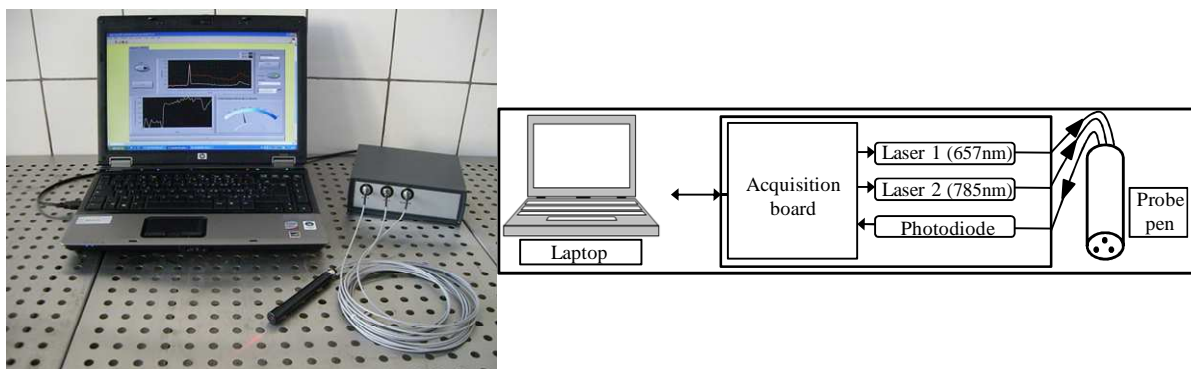


Figure 4.1 : Photographie et schéma de principe de la sonde 2λ

Suite au développement de ce premier prototype, une analyse plus poussée a été menée afin de prendre en compte les variations spectrales d'absorption des tissus. Ainsi, comme nous l'avons vu lors du chapitre 2, l'absorption de la déoxy-hémoglobine est nettement supérieure à celle de l'oxy-hémoglobine à 657 nm (figure 4.2). Une diminution de l'oxygénation du sang se traduit, donc, par une augmentation de l'absorption à cette longueur d'onde et est interprétée par la sonde deux longueurs d'onde comme une augmentation de l'absorption par le colorant.

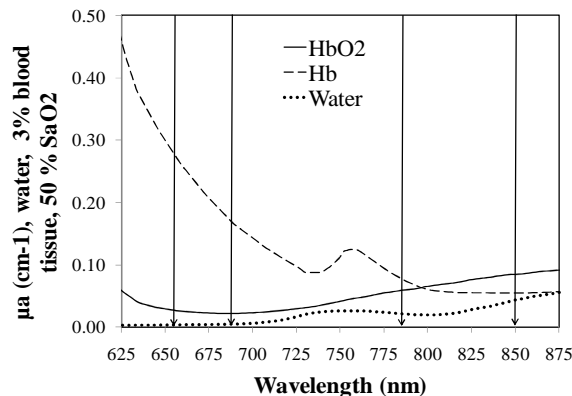


Figure 4.2 : Spectres d'absorption de l'eau, de l'oxy-hémoglobine et de la déoxy-hémoglobine d'un tissu contenant 3 % de sang à un taux de saturation de 50 %. Les 4 flèches verticales représentent les 4 longueurs d'onde des 4 diodes utilisées

Afin de corriger cette erreur d'interprétation potentielle, une seconde sonde a été développée. Cette dernière utilise quatre diodes laser de puissance moyenne égale à $400 \mu\text{W}$ à quatre longueurs d'onde différentes, sur le même principe physique que la sonde deux longueurs d'ondes. L'instrument est toujours équipé d'un laser émettant à 657 nm, à proximité du maximum d'absorption du Bleu Patenté V. Le second laser à 785 nm, longueur d'onde qui n'est pas absorbée par le colorant, a été maintenu. Deux diodes laser supplémentaires, à 689 nm et 850 nm, ont été incorporées dans ce second prototype permettant ainsi de séparer les absorptions liées à l'hémoglobine et à l'oxy-hémoglobine et d'éviter un biais dans la détection du Bleu Patenté V. Chaque diode laser est modulée à une fréquence distincte. Chaque faisceau est injecté dans une fibre optique quatre en un et placé dans une sonde en inox et stérilisable en autoclave. La voie de détection utilise une photodiode (S5106 HAMAMATSU), comme dans le dispositif précédent. Une seconde fibre, séparée de 4 millimètres de la première, est utilisée par la détection de photons diffusés. La séparation des quatre composantes spectrales du signal, mesurées par le détecteur, est réalisée une nouvelle fois grâce à une transformation de Fourier. Elle permettra de discriminer l'absorption du BPV de celle de l'oxy-hémoglobine et de la déoxy-hémoglobine. Le pilotage des diodes laser et le traitement des signaux collectés sont réalisés à l'aide d'une carte National Instrument (NI-USB 6229) connectée à un ordinateur portable par un port USB. La figure 4.3 représente une photographie et le schéma de principe de cette sonde à 4 longueurs d'onde.

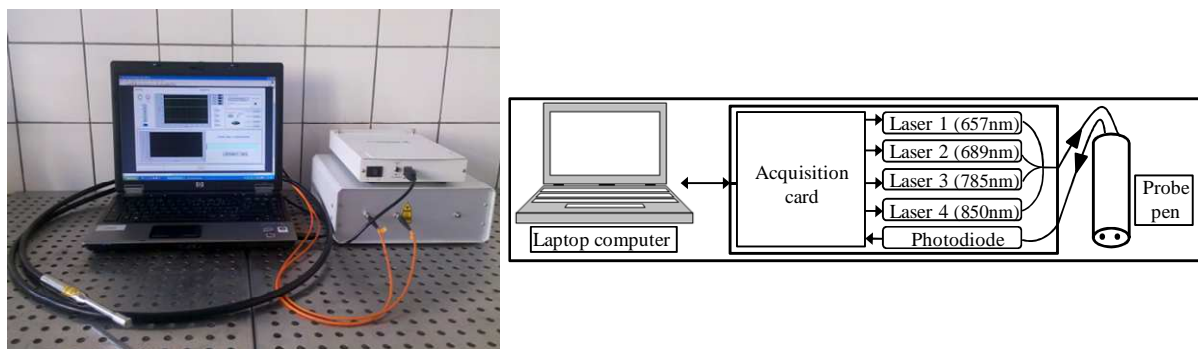


Figure 4.3 : Photographie et schéma de principe de la sonde 4λ (2)

Après avoir présenté rapidement les deux dispositifs développés, nous allons maintenant détailler les différents éléments les constituant avant d'expliquer plus en détail leurs modes de fonctionnement.

4.1.2 Présentation des différents éléments

4.1.2.1 Les diodes lasers

Lors du développement de ces deux prototypes, les mêmes modules de diode laser (LDM, ILEE AG) ont été utilisés. Comme nous l'avons précisé lors du paragraphe précédent, le choix des longueurs d'onde a été dicté par deux critères principaux : le premier étant de choisir des longueurs d'onde situées dans la fenêtre diagnostique afin d'assurer une pénétration optimale dans les tissus des rayonnements proche infrarouge (voir chapitre 2), le second étant de pouvoir séparer l'absorption liée au Bleu Patenté V de celle des tissus environnants.

Nous avons précisé dans le paragraphe précédent le choix des longueurs d'onde d'excitation pour les deux sondes en précisant que l'ajout de deux sources supplémentaires dans le second prototype permettra de dé-corréler de façon plus précise l'absorption du colorant. Dans ce second prototype la fréquence de modulation de la diode à 657 nm est de 850 Hz, 250 Hz pour celle à 689 nm, 650 Hz pour celle à 785 nm et 400 Hz pour celle à 850 nm.

Les modules des diodes laser peuvent être contrôlés par une tension analogique comprise entre 0 et 5 V. Dépendant de la diode laser utilisée, l'électronique est de type P (P = + sur le boîtier) pour les diodes à 657 nm et à 850 nm ou de type M (M = masse sur le boîtier) pour les diodes à 689 nm et à 785 nm. La figure 4.4 représente la puissance relative (%) d'une diode de type P en fonction de la tension appliquée. Nous remarquons ainsi qu'à 1,9 V la diode fournit 50 % de sa puissance maximale, et que celle-ci est obtenue dès 3 V. Les fonctionnements des autres diodes laser sont similaires. Les tensions d'alimentation dépendent du type de diodes lasers utilisées ; les unes de type P (657 nm et 850 nm) sont polarisées entre 0 V et 5 V et délivre une puissance maximum à 5 V, les autres, polarisées en inverse (689 nm et 785 nm), délivrent une puissance max à 0 V.

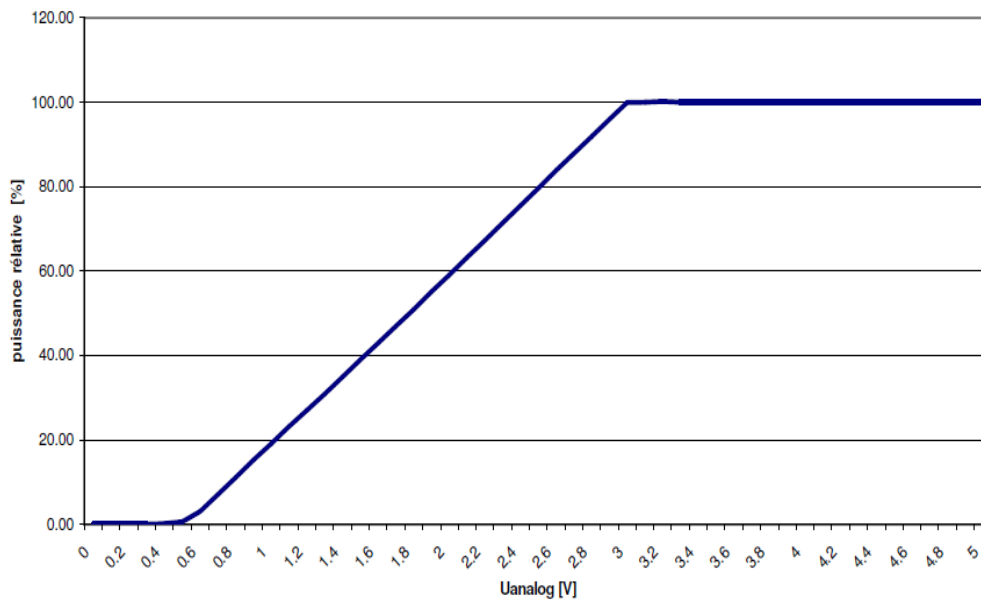


Figure 4.4 : Puissance relative des modules de diode laser à 657 nm et à 850nm en fonction de leur tension d'alimentation (3)

Nous avons mesuré à l'aide d'un spectrophotomètre (USB 2000, Ocean Optics) les longueurs d'onde des 4 diodes utilisées. La figure 4.5 représente les spectres émission de ces 4 lasers. Nous avons ainsi mesuré les caractéristiques suivantes :

- Module laser ILEE/LDM 650 : longueur d'onde maximale 657,8nm (FWHM=2,8 nm)
- Module laser ILEE/LDM 690 : longueur d'onde maximale 688.6nm (FWHM=3,5 nm)
- Module laser ILEE/LDM 785 : longueur d'onde maximale 785,3nm (FWHM=2,4 nm)
- Module laser ILEE/LDM 850 : longueur d'onde maximale 849,5nm (FWHM=3,3 nm)

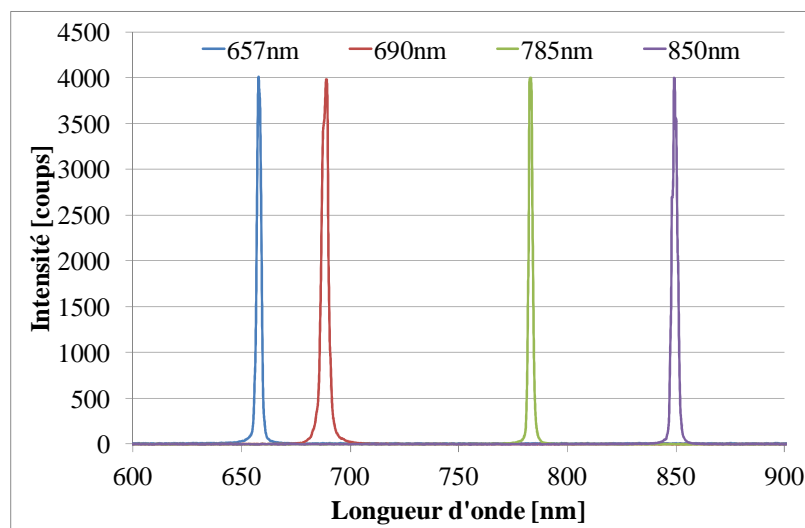


Figure 4.5 : Spectres des 4 diodes laser utilisées

4.1.2.2 Le détecteur

Les deux prototypes sont équipés du même détecteur : une photodiode Silicium (S5106 Hamamatsu) (figure 4.6.a). Les photons rétrodiffusés sont collectés par la fibre optique de réception branchée via un connecteur SMA au boîtier de commande. Dans le but de limiter le flux de lumière détecté, un filtre optique passe bande de 600 à 900 nm est placé devant le détecteur. Il rejette ainsi une grande partie de la lumière ambiante collectée par la fibre de détection et permet d'améliorer la dynamique de la chaîne de détection. La photodiode dispose d'une excellente linéarité à l'égard de l'intensité de la lumière incidente. Elle possède également un faible bruit interne ($1,6 \cdot 10^{-14} \text{ (W/Hz)}^{1/2}$) dut en particulier à la taille de la surface active de détection (5 x 5 mm). Elle est sensible dans un domaine spectral très large allant de 400 nm à 1100 nm. Le maximum de sensibilité se situe à 960 nm (0,72 A/W). Celle-ci est égale, pour les longueurs d'onde utilisées, à 0,45 A/W à 657nm, 0,48 A/W à 689nm, 0,57 A/W à 785nm et 0,65 A/W à 850nm (Figure 4.6.b). La tension de sortie de l'amplificateur connecté à la photodiode est échantillonnée à 500 échantillons par seconde. La carte National Instrument fait l'acquisition de 500 échantillons pour chaque point de mesure. Le choix de cette fréquence d'échantillonnage a été essentiel dicté par la carte d'acquisition utilisée. Le fait de piloter deux lasers, aux mêmes fréquences d'échantillonnages, ajouté à la lecture du signal est très vite limité par la capacité de cette simple carte.

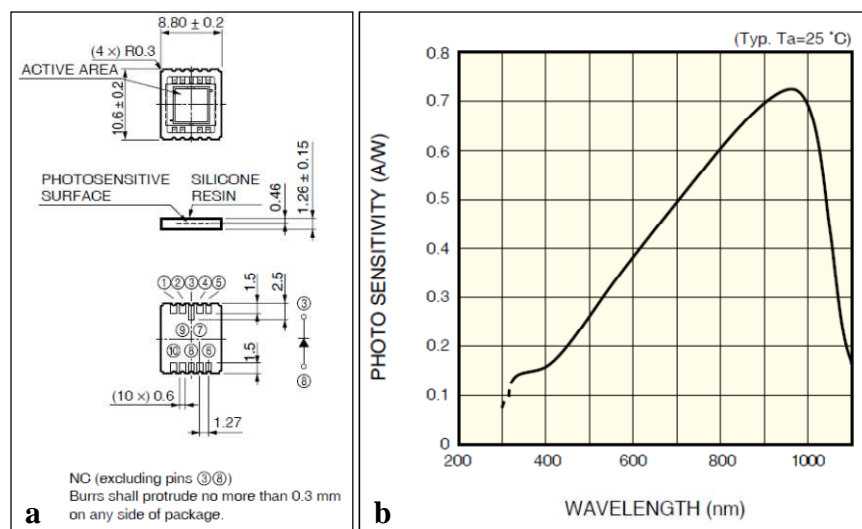


Figure 4.6 : (a) Schéma de la photodiode et courbe de sensibilité en fonction de la longueur d'onde (4)

La sortie de la photodiode est connectée à un amplificateur de courant permettant de délivrer à sa sortie une tension proportionnelle au courant de la photodiode (figure 4.7). Une capacité C_1 a été connectée en parallèle de la résistance de contre réaction R_2 afin de lisser le

signal de sortie. Le gain de l'ensemble a été choisi pour optimiser la dynamique du signal. Les deux capacités C_2 connectées sur les tensions d'alimentation permettent de les filtrer.

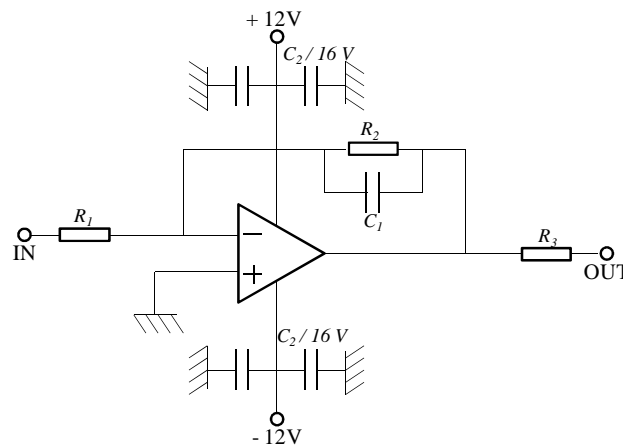


Figure 4.7 : Schéma du circuit électronique en sortie de la photodiode

4.1.2.3 Les sondes de détection

Comme nous l'avons mis en avant précédemment, le prototype à quatre longueurs d'onde est une évolution du dispositif de première génération à deux longueurs d'onde. Chaque prototype possède sa propre sonde de détection, avec une évolution notable de cette dernière. Dans les deux cas, le souci de développer un outil léger, maniable et ergonomique fut le point prépondérant. La première sonde, (Figure 4.8.a) utilisée avec le prototype à 2 longueurs d'ondes, est en plastique. Elle est reliée au boîtier électronique par les deux fibres optiques d'excitation et par la fibre de détection ayant chacune un diamètre de cœur égal à $200\ \mu\text{m}$. Ses dimensions sont de 130 mm de long et 12 mm de diamètre. La distance entre les fibres d'émission et la fibre de détection est de 4 mm. La seconde sonde, utilisée avec le prototype à 4 longueurs d'onde, a été conçue afin de permettre une utilisation en clinique. Elle est en acier inoxydable et peut être stérilisée. Elle est plus longue que la précédente (175 mm) pour un diamètre de 11 mm. La distance entre les fibres d'émission et de réception est toujours de 4 mm. La fibre d'émission a un diamètre de 1 mm. Ce choix résulte de l'injection de chacun des faisceaux des 4 diodes laser dans une fibre de $200\ \mu\text{m}$ de diamètre, puis du regroupement de ces 4 fibres dans un même connecteur SMA relié à la face avant du boîtier. Le diamètre de 1mm de la fibre d'excitation permet un couplage avec de faibles pertes, à cette extrémité commune aux 4 lasers. Les figures 4.8.b et 4.8.c présentent la sonde inox réalisée.

Chacune de ces sondes a servi lors des expérimentations préliminaires de caractérisation des prototypes, mais également lors des expérimentations animales et durant les essais ex-vivo sur des prélèvements opératoires pour la détection des ganglions sentinelles.

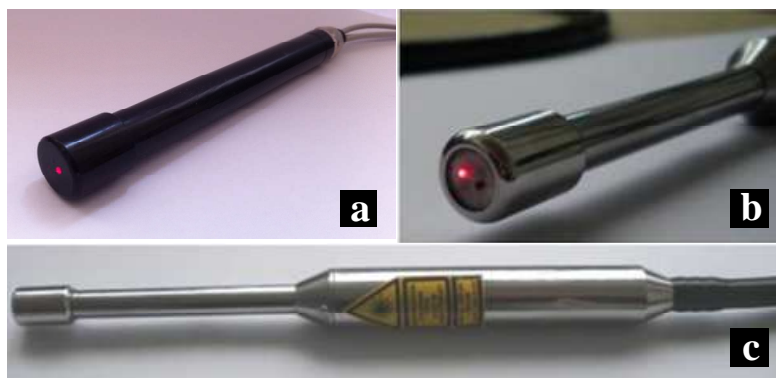


Figure 4.8 : Sonde optique plastique (a) et sonde optique inox (b,c)

4.1.2.4 Les cartes entrée/sortie et leur logiciel de commande

4.1.2.4.1 Présentation

Chaque prototype possède sa propre carte entrée/sortie National Instruments permettant le pilotage des diodes lasers et le traitement des signaux obtenus par la photodiode.

La carte utilisée pour la sonde à deux longueurs d'onde est une carte NI USB 6008 OEM (12 bits, 150 éch./s) possédant 2 sorties et 8 entrées analogiques. L'alimentation électrique et le transfert de données de la carte à l'ordinateur portable sont réalisés par un port USB (5).

Le second prototype possédant 4 diodes lasers, il était nécessaire de choisir une carte ayant plus de sorties analogiques. Notre choix s'est alors arrêté sur une carte NI USB-6229 avec 4 sorties analogiques et 32 entrées analogiques (16 bits) (6).

Ces deux sondes sont pilotées par des programmes écrits dans le langage LabVIEW version 8.6 (National Instruments). Il est ainsi aisé de concevoir un logiciel permettant de contrôler et d'automatiser l'instrumentation développée en utilisant une interface graphique par laquelle le programme interagit avec l'utilisateur. Le but final étant de fournir un appareil facile à exploiter et dont l'utilisation est intuitive, cette interface utilisateur/machine a été conçue de façon épurée et ergonomique pour chaque sonde. Les figures 4.9.a et 4.9.b représentent les faces avant des programmes d'utilisation des deux sondes. On remarque, dans chaque cas, les boutons « start » et « stop » permettant de démarrer les sondes et de les arrêter. Les variations des concentrations de Bleu Patenté V, information la plus importante, sont représentées à chaque fois par un graphique déroulant avec en plus un « vumètre » pour la première sonde, et une jauge pour la seconde. La possibilité d'enregistrer les données collectées est visible dans la partie supérieure droite de ces faces avant. Enfin, lors du développement du programme de pilotage de la sonde à 4 longueurs d'onde, un signal sonore à tonalité réglable en fonction de la concentration de bleu détecté a été ajouté. Il permet à

l'utilisateur de garder les yeux sur le milieu analysé (champ opératoire) tout en percevant une information relative à la détection du colorant (figure 4.9.b).

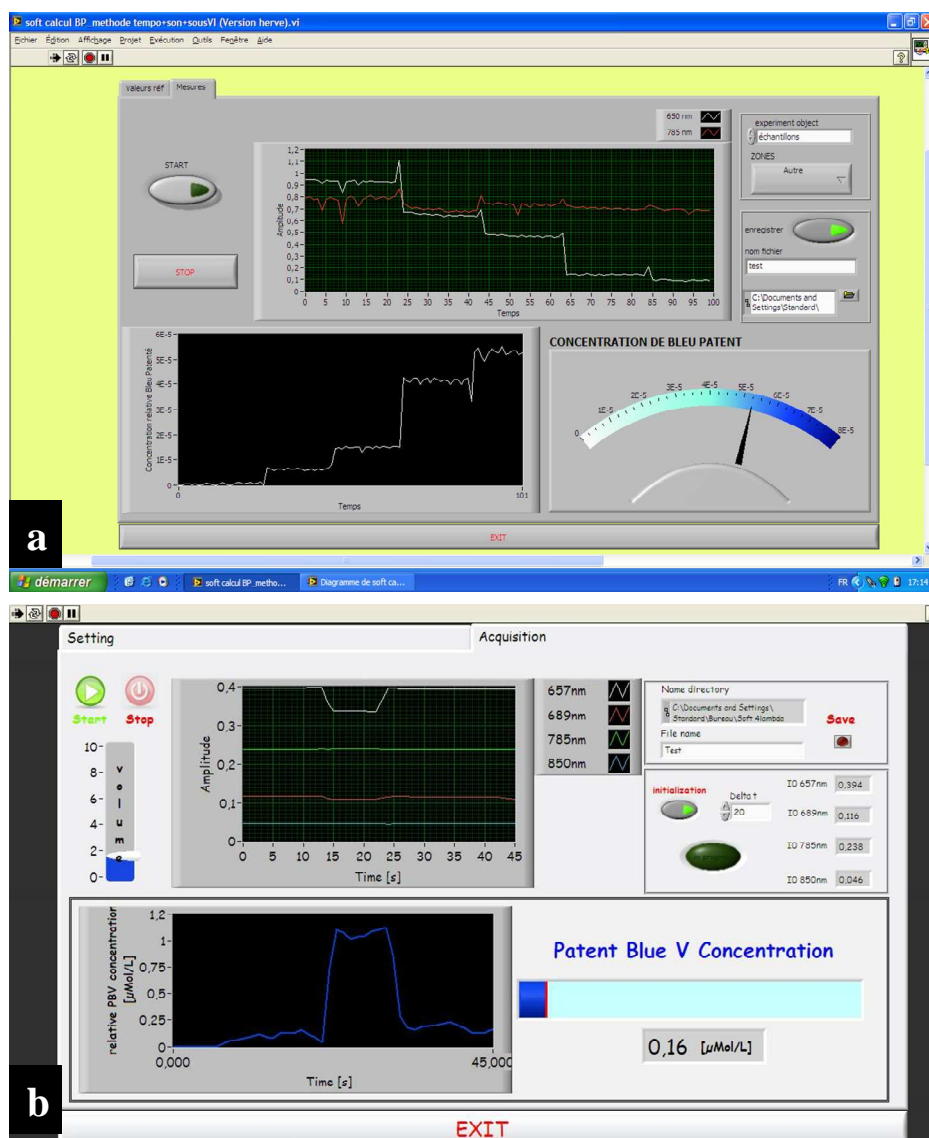


Figure 4.9 : Faces avant du programme d'utilisation de la sonde à deux longueurs d'onde (a) et de la sonde à quatre longueurs d'onde (b)

4.1.2.4.2 Analyse des données

De nombreux paramètres influent sur la mesure des signaux. Nous citerons les puissances émises par les lasers en sortie de la sonde, la distance entre la fibre émettrice et réceptrice, la distance séparant la sonde du milieu d'étude, les propriétés optiques et la géométrie du milieu d'étude. Ainsi pour extraire de ces signaux les paramètres optiques d'intérêt, en particulier les coefficients d'absorption aux différentes longueurs d'onde, il est nécessaire de réaliser un traitement des données qui s'appuie sur un modèle de propagation de la lumière dans le milieu.

Dans le cas présent, et compte tenu de la simplicité du dispositif expérimental, le milieu considéré a été assimilé à un milieu diffusant, homogène et semi infini. La propagation de la lumière s'y rapportant a été modélisée par Patterson et al (7). En 1997, Contini et al (8) ont simplifié ce modèle afin d'exprimer l'intensité lumineuse rétrodiffusée, notée I , par un milieu semi infini, en réalisant l'intégration du profil temporel en fonction du coefficient d'absorption μ_a , du coefficient de diffusion réduit μ'_s , et de la distance source/détecteur ρ pour en déduire l'équation suivante

$$I = I_0 \left(1 + \rho \cdot \sqrt{\frac{\mu_a}{D}} \right) \exp \left(-\rho \cdot \sqrt{\frac{\mu_a}{D}} \right) \quad (4.1)$$

Avec $D = 1/3\mu'_s$. I_0 représente l'intensité diffusée par un objet de coefficient de diffusion identique, mais non absorbant. Les conditions d'application de cette équation, $\frac{1}{\mu'_s} < \frac{1}{\mu_a}$ et $\frac{1}{\mu'_s} < \rho$, sont généralement observées sur les tissus biologiques, pour des distances source/détecteur de quelques millimètres. Cette équation ne permet pas de calculer le coefficient d'absorption, mais seulement le rapport μ_a/D . Pour séparer ces deux termes, d'absorption et de diffusion, il serait par exemple nécessaire d'utiliser des méthodes résolues en temps (9). Ce type de méthodologie étant lourde et coûteuse nous avons choisi une technique plus simple, avec pour hypothèse simplificatrice le fait que le coefficient de diffusion reste constant et que les variations des signaux ne sont liées qu'aux changements d'absorption.

Le modèle de Contini, régi par l'équation 4.1, montre que le signal mesuré varie en fonction de μ_a selon une loi plus complexe que la loi de Beer Lambert (Eq. 2.7). Une approche encore plus simple consiste à considérer que l'intensité mesurée suit la loi de Beer-Lambert modifiée (10) pour tenir compte de la diffusion. Après comparaison avec le modèle de Contini, c'est l'approche qui a finalement été retenue pour mesurer l'absorption du Bleu Patenté V dans le milieu d'étude.

La loi de Beer Lambert modifiée exprime l'intensité d'une onde se propageant dans un milieu absorbant et diffusant. Selon cette loi, l'intensité de la lumière rétrodiffusée mesurée par le détecteur peut être écrite comme suit:

$$I_T = I_0 \cdot e^{-(\mu_a)l \cdot \beta} + I_D \quad (4.2)$$

I_0 est l'intensité de la lumière rétrodiffusée par un échantillon non absorbant, μ_a le coefficient d'absorption optique du milieu, l la distance séparant la source lumineuse du détecteur. β , la constante appelée « differential pathlength factor » dépend des propriétés de diffusion et d'absorption du milieu (10). Il permet d'exprimer la longueur du chemin optique moyen, βl , des photons qui se sont propagés, dans le milieu diffusant, du point source au point détecteur.

Le terme I_D représente la mesure lorsqu'il n'y a pas de signal diffusé. Ce terme représente le signal d'obscurité du détecteur.

Lors du développement de la sonde à deux longueurs d'onde, nous avons établi la faisabilité du calcul de la concentration du Bleu Patenté V en résolvant un système de deux équations à deux inconnues (1). La seconde sonde, utilisant quatre diodes laser, est basée sur le même modèle. La principale différence réside dans le calcul de la concentration de Bleu Patenté V qui se fait en résolvant un système de quatre équations à quatre inconnues.

Pour déterminer la concentration de Bleu Patenté V, nous utilisons l'équation 4.2 où l'absorption d'un milieu représente la somme des contributions des différents absorbeurs. Ainsi, il est possible de discriminer l'absorption du colorant μ_{aPB} de celle des tissus μ_{aT} :

$$I_T = I_0 \cdot e^{-(\mu_{aPB} + \mu_{aT})l\beta} + I_D \quad (4.3)$$

Après une mesure initiale de $I_{T\infty} = I_D$ sans lumière diffusée et de $I_{T0} = I_0 + I_D$ sur un échantillon non absorbant, il est possible d'obtenir le produit de l'absorption totale par la longueur $l\beta$:

$$R = (\mu_{aPB} + \mu_{aT})l\beta = \ln\left(\frac{I_{T0} - I_D}{I_T - I_D}\right) \quad (4.4)$$

En considérant un milieu contenant n chromophores absorbant, le coefficient d'absorption μ_a peut s'écrire:

$$\mu_a = 2,3 \sum_{i=1}^n \varepsilon_n \cdot C_n \quad (4.5)$$

Finalement, en isolant le coefficient d'extinction molaire ($\varepsilon_1 = \varepsilon_{PB}$) et la concentration ($C_1 = C_{PB}$) de Bleu Patenté V des autres absorbeurs (indice 2 à n) la mesure R peut s'écrire:

$$R = (\varepsilon_{PB} \cdot C_{PB} + \varepsilon_2 \cdot C_2 + \dots + \varepsilon_n \cdot C_n)l\beta = \frac{1}{2,3} \ln\left(\frac{I_{T0} - I_D}{I_T - I_D}\right) \quad (4.6)$$

Effectuer la mesure de R à quatre longueurs d'onde permet le calcul de la concentration du Bleu Patenté V en résolvant un système de quatre équations à quatre inconnues. Ce système linéaire peut être écrit comme suit:

$$Y = A \cdot X \quad (4.7)$$

Où $Y = \begin{bmatrix} R_1 \\ R_2 \\ R_3 \\ R_4 \end{bmatrix}$, $A = \begin{bmatrix} \varepsilon_{11} & \varepsilon_{12} & \varepsilon_{13} & \varepsilon_{14} \\ \varepsilon_{21} & \varepsilon_{22} & \varepsilon_{23} & \varepsilon_{24} \\ \varepsilon_{31} & \varepsilon_{32} & \varepsilon_{33} & \varepsilon_{34} \\ \varepsilon_{41} & \varepsilon_{42} & \varepsilon_{43} & \varepsilon_{44} \end{bmatrix}$ est la matrice des coefficients d'extinction molaire avec ε_{ij}

représentant le coefficient d'extinction molaire du chromophore i à la longueur d'onde j et

$X = \begin{bmatrix} C_1 \\ C_2 \\ C_3 \\ C_4 \end{bmatrix} \cdot l\beta$ le vecteur représentant les concentrations des chromophores multipliées par la

longueur du chemin optique $l\beta$. La concentration $C_1 = C_{PB}$ représente la concentration du

colorant. C_2 , C_3 et C_4 les concentrations de trois autres chromophores présents dans les tissus. Deux d'entre eux seront l'oxy-hémoglobine et la déoxy-hémoglobine, qui sont les principaux absorbeurs des tissus aux longueurs d'onde utilisées. Le quatrième peut être l'eau, les graisses, ou une combinaison des deux.

En pratique, la résolution de ce système d'équation fait appel à un programme d'optimisation fourni dans la librairie Labview.

4.1.3 Implémentation logiciel

Les sondes sont pilotées par un programme qui permet également de réaliser les différentes étapes d'analyse et de traitement du signal exposées dans le paragraphe précédent.

Avant toute expérimentation, chaque sonde nécessitera donc deux étapes de calibration. En effet, comme le montre l'équation 4.3, les mesures des paramètres I_D et I_0 à chaque longueur d'onde sont primordiaux. I_D est obtenu en plaçant la sonde en regard d'un milieu noir très absorbant et non diffusant et I_0 en mettant cette sonde sur un objet non absorbant et diffusant ou avant injection du colorant dans le milieu d'étude. Comme il est possible de le voir sur la figure 4.9.b (partie appelée « initialization »), la mesure de ces paramètres peut être réalisée durant une période fixée par l'expérimentateur. Par exemple, si l'utilisateur fixe un temps de 30 secondes, le programme calculera la moyenne des mesures à chaque longueur d'onde durant cette période puis le logiciel les gardera en mémoire. Le calcul des coefficients R (Eq. 4.6), est réalisé après transformée de Fourier du signal, sur chacune des composantes spectrales. Les amplitudes obtenues à chaque longueur d'onde R_1 , R_2 , R_3 et R_4 et la matrice A des coefficients d'extinction molaire (implémentée dans le logiciel) permettent le calcul des concentrations des 4 chromophores (figure 4.10). Seule la concentration de Bleu Patenté V est affichée, mais il serait possible de calculer et d'afficher d'autres paramètres comme par exemple le taux de saturation de l'hémoglobine des tissus observés.

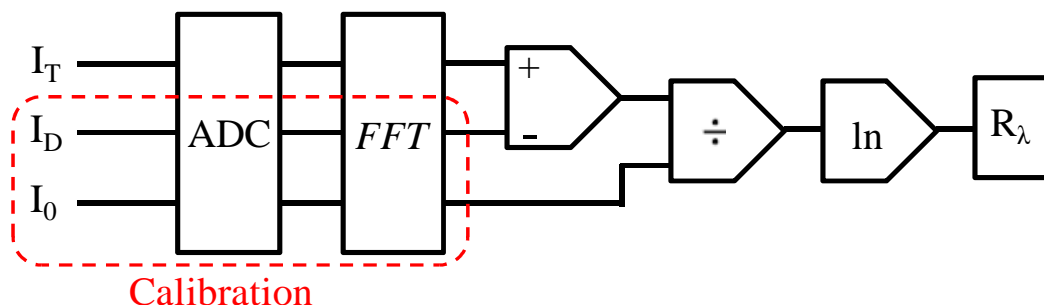


Figure 4.10 : Schéma bloc représentant les étapes de calibration et de calcul de R à une longueur d'onde

Ainsi, l'utilisateur n'a plus qu'à placer la sonde, plastique ou inox selon le prototype, en regard du milieu à analyser et presser sur « Start » pour commencer les mesures et sur « Stop » à la fin de l'expérience. Entre deux mesures successives, soit chaque seconde, l'appareil effectue tous les calculs mentionnés précédemment. Le programme de pilotage est quitté définitivement en cliquant sur « Exit ». Les signaux et les concentrations sont ensuite enregistrés afin de pouvoir être exploités ultérieurement.

Une alternative à la transformée de Fourier serait de réaliser un lock-in qui permet d'extraire efficacement un signal du bruit du détecteur. Cependant au vu des résultats obtenus et des bons rapports signaux sur bruit, cela n'a pas été jugé indispensable afin de progresser dans ce travail. Ceci est aussi la raison pour laquelle un filtrage numérique n'est pas appliqué. En effet, après avoir essayé une implémentation logicielle les résultats obtenus n'ont pas montré de réelle amélioration.

4.2 Détection des photons de fluorescence

4.2.1 Principe de fonctionnement

Il a été établi dans le chapitre précédent que le Bleu Patenté V peut émettre des photons de fluorescence lorsqu'il est fixé sur une macro molécule telle que l'albumine. Dans le but de détecter ces photons, un troisième instrument a été développé. Le schéma de principe de l'appareil que nous allons détailler est présenté sur la figure 4.11.

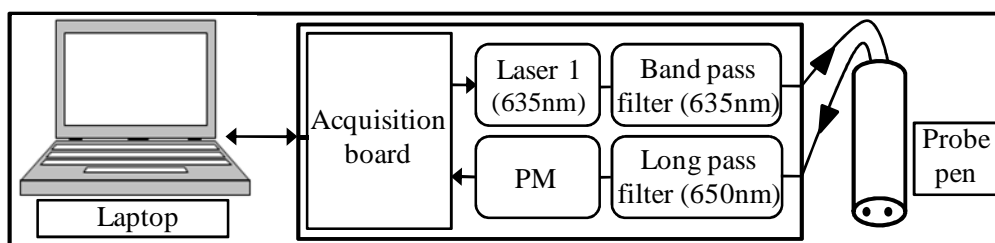


Figure 4.11 : Schéma de principe de la sonde de détection ponctuelle de la fluorescence

Nous avons démontré que le rendement de fluorescence du colorant était élevé lorsque la molécule est excitée près du maximum de son spectre d'absorption, soit 638 nm. Suivant cette observation, un laser d'excitation à 635 nm (ROITHNER Laser Technik ; RLTMRL-III-635 1-500 mW) de puissance variable de 1 à 500 mW a été choisi. Pour la détection des photons de fluorescence, le choix du détecteur s'est porté sur un photomultiplicateur sensible dans le proche infrarouge (HAMAMATSU H10721-20). L'ensemble est incorporé au boîtier du dispositif à 4 longueurs d'onde présenté dans le paragraphe I.1.2.4.1 de manière à n'avoir qu'un seul et même prototype permettant à l'utilisateur de choisir le mode de détection du Bleu Patenté V : par absorption ou par fluorescence. Cette configuration permet également de

piloter la nouvelle source laser ainsi que le second détecteur par la même carte d'acquisition (NI USB 6229). Deux filtres optiques ont été ajoutés. Le premier, en sortie du laser, est un filtre interférentiel passe bande centré à 632 nm (EDMUND ; Techspec Bandpass 632) avec une FWHM de 10 nm, permettant de transmettre de façon sélective la portion du spectre centrée sur la longueur d'excitation, tout en rejetant les composantes de longueurs d'onde élevées du faisceau laser, qui pourraient gêner la détection des photons de fluorescence. Le second filtre est un filtre passe haut haute performance à 650 nm (EDMUND ; Techspec High performance Longpass 650) placé devant la photocathode du photomultiplicateur. Il permet, une nouvelle fois, de s'affranchir des photons d'excitation en ne transmettant que les photons de fluorescence de longueur d'onde supérieure à la longueur d'onde de coupure. Afin d'explorer la zone d'intérêt, la même sonde inox que celle décrite dans le paragraphe I.1.2.3 est utilisée.

En résumé, nous disposons maintenant d'un dispositif présentant trois branchements de type SMA possibles en façade avant. Le premier est utilisé pour injecter le (ou les) faisceau laser dans la fibre optique d'excitation. Les deux autres permettent d'éclairer le détecteur souhaité: la photodiode, pour des mesures en réflexion diffuse ou le photomultiplicateur pour des mesures de fluorescence, via la fibre optique de détection.

4.2.2 Présentation des différents éléments

4.2.2.1 Laser

La source lumineuse d'excitation utilisée est un laser de puissance modulable entre 0 et 500 mW (ROITHNER RLTMRL-III-635) (figure 4.12.a). La puissance générée par celui-ci en fait un laser de classe 4, c'est-à-dire qu'il peut produire des réflexions diffuses dangereuses pouvant provoquer des lésions cutanées. Ainsi, ce laser est alimenté par une alimentation sécurisée par une clé (ROITHNER PSU-FDA power supply) (figure 4.12.b). Il est possible de moduler l'intensité de ce laser, de façon analogique, par un signal électrique compris entre 0 et 5 V. La sortie du laser est équipée d'un couplage SMA permettant de connecter la fibre optique.

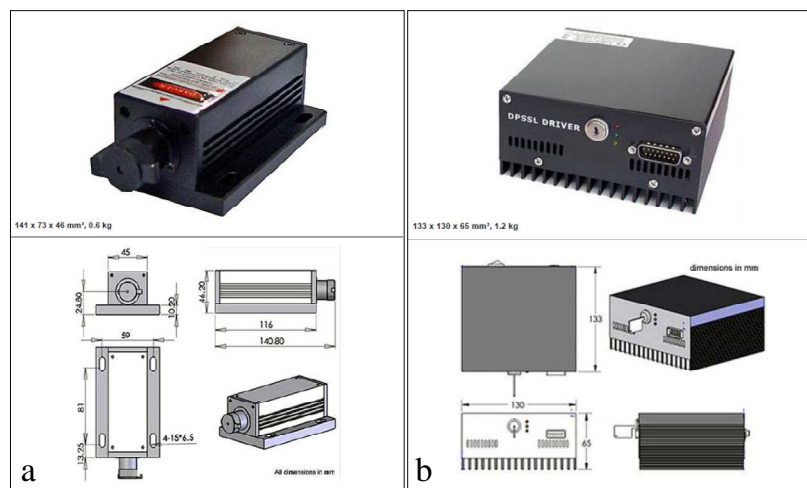


Figure 4.12 : Laser ROITHNER RLTMRL-III-635 (a) et son alimentation sécurisée (b)

Les données fournies par le constructeur nous indiquent que ce laser nécessite un temps de chauffe de 5 minutes environ avant d'être utilisé de façon optimale. Nous avons vérifié cette information en mesurant la puissance, après que le faisceau laser ait traversé le filtre passe bande de 635nm et en sortie de notre sonde inox. La figure 4.13.a compare la puissance du laser en sortie en fonction du temps (0 à 1 heure). Cette mesure est réalisée à l'aide d'un puissance mètre (Thorlabs PM100). On remarque effectivement que la puissance en sortie passe de 23 mW à 40 mW après 5 minutes pour une tension d'alimentation de 5 V mais que celle-ci reste constante même après 1 heure d'utilisation. En plus de la stabilité de l'appareil dans le temps, cette figure montre qu'il y a une atténuation de la puissance du faisceau due aux couplages successifs. La figure 4.13.b résume cette diminution. Ainsi la puissance est divisée deux fois consécutivement par 3,5 : en sortie du filtre passe bande puis en sortie de sonde.

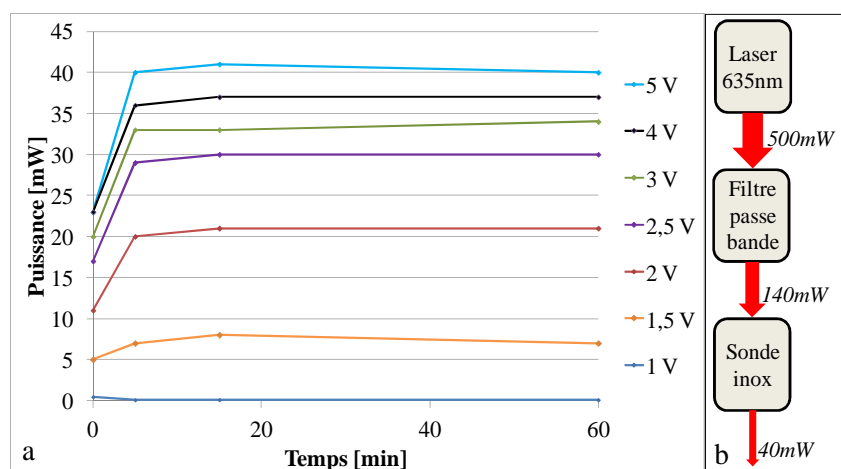


Figure 4.13 : a. Puissance en sortie de notre sonde en fonction du temps pour différentes tensions d'alimentation; b. diminution de la puissance à la sortie des interfaces successives

Pour comprendre l'utilité du filtre passe bande en sortie du laser, une étude plus approfondie doit être menée. Nous observons le spectre du laser avec un spectrophotomètre USB 2000 (Ocean Optics). Pour ne pas éblouir le détecteur et obtenir des informations exploitables, nous utilisons un atténuateur entre le laser et l'appareil de mesure. La figure 4.14.a représente les spectres mesurés à différentes tensions d'alimentation.

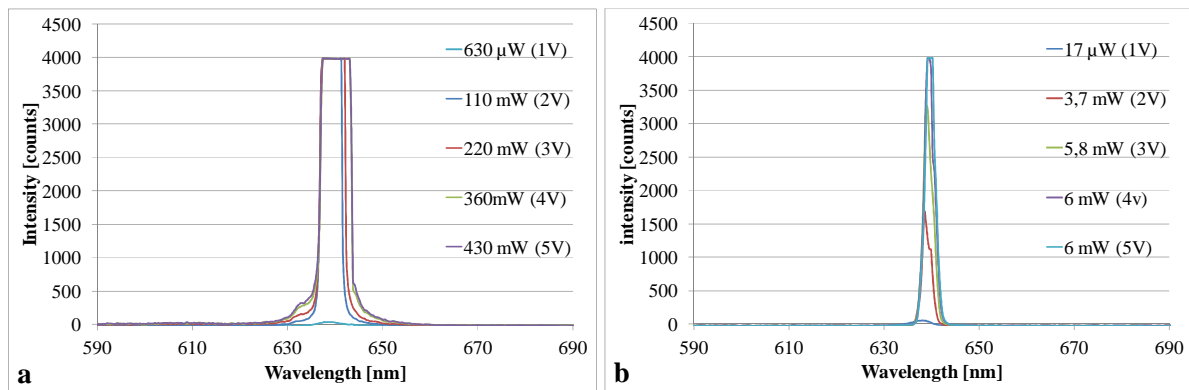


Figure 4.14 : Spectre d'émission du laser Roithner 635nm à différentes puissances sans filtre passe bande en sortie (a) et avec un filtre passe bande 635 ± 5 nm en sortie (b)

Nous observons clairement une saturation, malgré la présence de l'atténuateur, la puissance lumineuse arrivant sur le détecteur est trop importante. Malgré tout, il est possible de tirer des conclusions évidentes, à savoir que : si le laser est utilisé même pour des puissances peu élevées, il est nécessaire de mettre un filtre passe bande en sortie. Cela n'aurait aucun sens de calculer les FWHM (Full Width at Half Maximum), FWTM (Full Width at Tenth Maximum) et FWOM (Full Width at One-tenth Maximum) (figure 4.15) des spectres obtenus puisqu'il est impossible de connaître le maximum à cause de la saturation. Ainsi, la possibilité pour le détecteur de capter des photons issus du laser d'excitation, au-delà du filtre passe haut à 650 nm, est réelle et doit être annihilée afin de ne pas occulter la détection des photons de fluorescence.

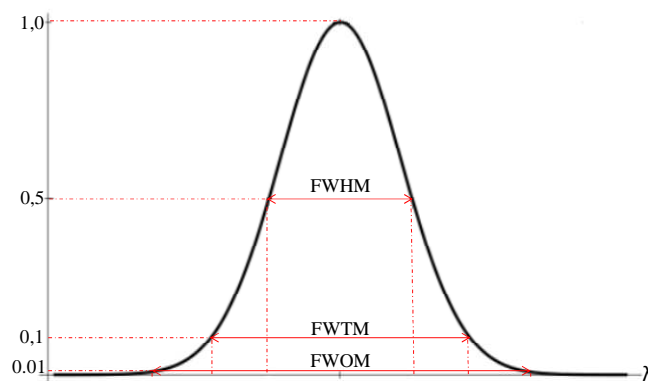


Figure 4.15 : Représentation schématique de la FWHM, FWTM et FWOM

Un filtre passe bande a donc été ajouté sur la voie d'excitation. La figure 4.14.b montre les spectres obtenus pour les mêmes tensions d'alimentation et avec le même atténuateur que précédemment. Dans le cas présent, il apparait clairement que les spectres obtenus sont nettement plus fins ce qui est confirmé par le calcul des FWHM, les FWTM et les FWOM (tableau 4.1).

Tension [V]	FWHM	FWTM	FWOM
1	3,5	5,4	6,1
2	2,2	3,9	5,2
3	2,3	4,3	5,9
4	2,3	4,2	6,1
5	2,3	4,5	6,3

Tableau 4.1 : FWHM, FWTM et FWOM du laser Roithner en fonction de sa tension d'alimentation, avec et sans filtre passe bande en sortie.

Bien entendu, il est évident, comme nous l'avons expliqué précédemment, que la puissance du laser est moins importante dans ce second cas, mais l'apport du filtre passe bande permet de conclure qu'aucun photon d'excitation ne parviendra au photomultiplicateur puisque la FWHM moyenne est de $2,5 \pm 0,5$ nm, la FWWTM moyenne est de $4,5 \pm 0,6$ nm et surtout la FWOM moyenne est égale à $5,9 \pm 0,4$ nm. Ainsi, l'utilisation du laser, même à pleine puissance, associée à ce filtre est en accord avec le modèle que nous souhaitons développer.

4.2.2.2 Le détecteur

Le choix du détecteur est certainement l'une des étapes les plus importantes lors du développement d'un appareil de détection de photons de fluorescence. En effet, dans le cas présent, il est nécessaire d'avoir un détecteur sensible dans la gamme de longueur d'onde spécifique à l'application. En excitant le Bleu Patented V à 635 nm, il se produira une émission de photons de fluorescence au-delà de 650 nm. Ainsi, le photomultiplicateur choisi est un HAMAMATSU H10721-20 ayant une sensibilité maximum dans le proche infrarouge (entre 500 et 800 nm) (figure 4.16.a.b).

Un tube photomultiplicateur est un tube à vide constitué d'une fenêtre d'entrée collectrice, d'une photocathode, d'électrodes de focalisation, de dynodes multiplicatrices d'électrons et d'une anode collectrice générant le courant électrique (figure 4.16.c).

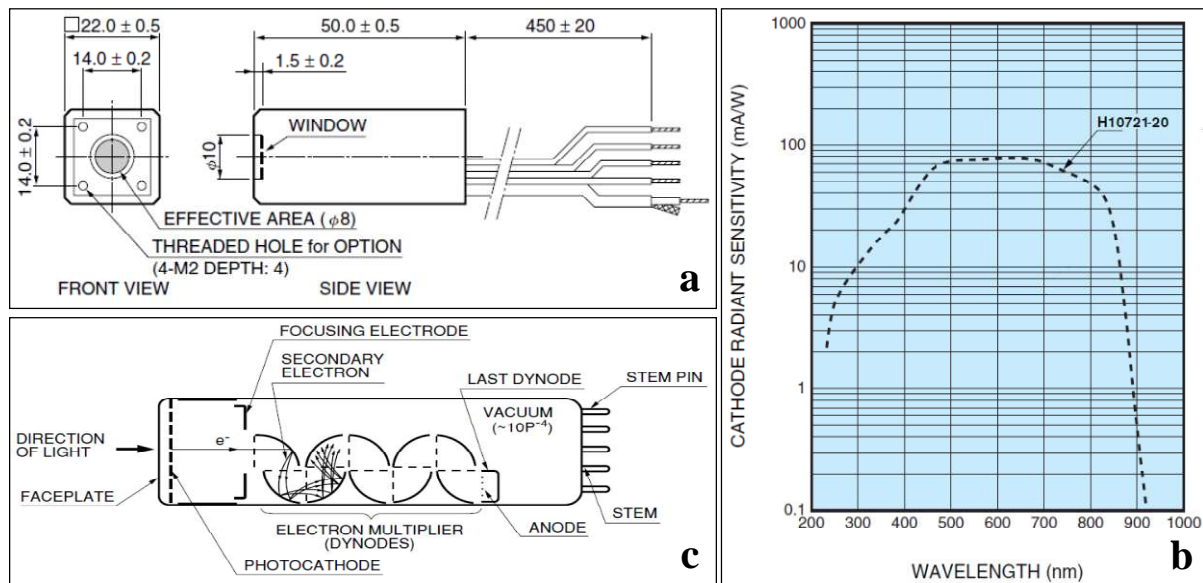


Figure 4.16 : Schéma du photomultiplicateur HAMAMATSU (a), sa courbe de sensibilité en fonction de la longueur d'onde (b) (12) et son schéma du principe de fonctionnement (c) (13)

Le principe général de fonctionnement repose sur le fait que la lumière pénétrant dans le tube photomultiplicateur est détectée et génère un signal de sortie selon les processus suivants:

- Les photons pénètrent à travers la surface de saisie.
- Ces photons excitent par effet photoélectrique les électrons de la bande de valence de la photocathode afin que des photoélectrons soient émis dans le vide.
- Puis ces photoélectrons sont accélérés, et focalisés par l'électrode de focalisation, sur la première dynode où ils sont multipliés par le biais d'émissions d'électrons secondaires. Chacune des dynodes successives possède une valeur de potentiel plus importante que la précédente. Cette différence de potentiel entre dynodes successives permet aux électrons émis d'être accélérés et de générer un certain nombre d'électrons secondaires sur la dynode suivante. Ce phénomène se répétant de dynode en dynode est appelé : effet d'avalanche. De plus, il est important de souligner que la position et la forme des dynodes sont optimisées afin que le temps de vol de ces électrons soit minimisé.
- Finalement, les électrons secondaires émis par la dernière dynode sont recueillis par l'anode permettant de générer un courant électrique en sortie du tube photomultiplicateur.

Le photomultiplicateur que nous utilisons est équipé en entrée d'un filtre passe haut à 650nm introduit dans un porte filtre vissé sur le détecteur et équipé d'un connecteur SMA permettant de coupler la fibre optique de détection.

La tension de sortie de l'amplificateur connecté à la photodiode est échantillonnée à 100000 échantillons par seconde. La carte National Instrument fait l'acquisition de 10000 échantillons pour chaque point de mesure.

La sortie du photomultiplicateur est connectée, comme pour la photodiode, à un amplificateur de courant permettant de délivrer à sa sortie une tension proportionnelle au courant du photomultiplicateur (figure 4.17) et adaptée pour qu'il n'y ait pas de distorsion du signal. Le gain de l'ensemble, réglé afin de ne pas saturer le détecteur, est actuellement de -100, il est déterminé par les résistances : $V_{OUT} = (-R_2/R_1) * V_{IN}$

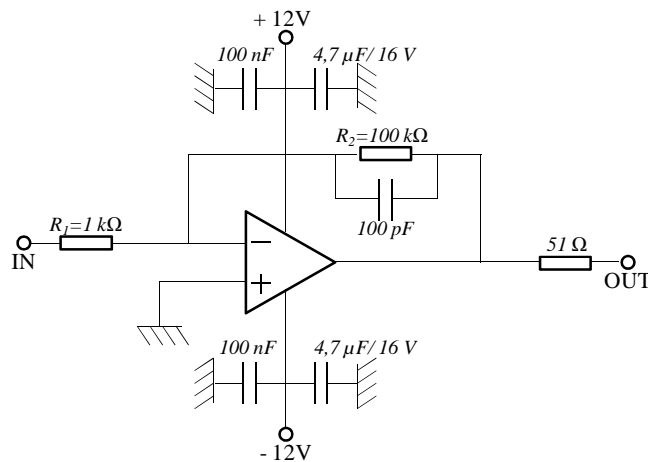


Figure 4.17 : Schéma du circuit électronique en sortie du photomultiplicateur

4.2.2.3 Les filtres

Comme nous venons de le souligner, le dispositif est équipé de deux filtres interférentiels. Ces filtres ont la propriété de sélectionner une partie du spectre de manière sélective. Ils fonctionnent selon le principe de l'interférométrie de Pérot-Fabry. Dans ce cas, si l'on considère le filtre comme deux lames partiellement réfléchissantes, l'onde lumineuse pénétrant entre ces deux lames ne peut être constituée que d'une gamme de longueurs d'onde clairement définies réduisant ainsi la bande passante de l'illumination incidente. Ainsi, un filtre interférentiel est caractérisé par sa bande passante et sa densité optique. Dans notre cas, les deux filtres utilisés sont : un filtre passe bande à 632 nm (EDMUND ; Techspec Bandpass 632) et un filtre passe haut à 650 nm (EDMUND ; Techspec High performance Longpass 650).

Afin de caractériser les filtres utilisés, nous avons étudié leur bande passante. Pour cela, nous avons utilisé une source de lumière blanche à la sortie de laquelle nous avons intercalé nos filtres. La figure 4.18.a représente les résultats obtenus pour chacun d'eux. Le filtre passe

bande est centré sur une longueur d'onde de 634,8nm et possède un plateau compris entre 631 nm et 638,7 nm. La FWHM mesurée est de 11,5 nm et la FWOM est de 17,7 nm. Le filtre passe haut ne laisse passer de la lumière qu'à partir de 650 nm pour un maximum de transmission à partir de 656,4 nm. La longueur d'onde à 50 % de transmission du filtre est de 655 nm.

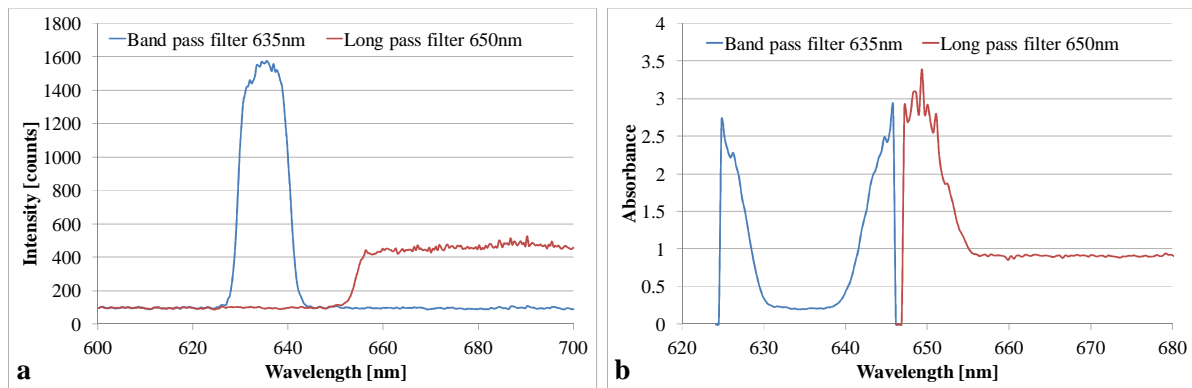


Figure 4.18 : Spectres de transmission (a) et absorbance (b) du filtre passe bande à 635nm (bleu) et du filtre passe haut à 650nm (rouge).

A l'aide d'un spectrophotomètre, il est possible de mesurer la densité optique (ou absorbance A) de chacun d'eux. Le logiciel utilise l'équation suivante pour la déterminer :

$$A_{\lambda} = -\log_{10} \left(\frac{S_{\lambda} - D_{\lambda}}{R_{\lambda} - D_{\lambda}} \right) \quad 4.8$$

Où S_{λ} est l'intensité lumineuse mesurée par le détecteur à la longueur d'onde λ , D_{λ} l'intensité lumineuse mesurée en l'absence de milieu d'étude, R_{λ} l'intensité lumineuse de référence à la longueur d'onde λ et A_{λ} l'absorbance calculée à la longueur d'onde λ .

La figure 4.18.b montre les résultats obtenus pour chaque filtre. Ainsi, nous mesurons une densité optique de 0,25 pour le filtre passe bande a dans sa bande de transmission, rejetant les longueurs d'onde inférieures à 624 nm et supérieures à 646nm. La densité optique du filtre passe haut présente un plateau d'une valeur de $2,77 \pm 0,24$ nm entre 647 nm et 667 nm et est constante à partir de 655 nm avec une densité optique de 0,95 suivant nos conditions expérimentales.

Ces résultats sont plus en deçà des données fournies par le fabricant qui indique des densités optiques supérieures à 4. Cela peut s'expliquer simplement par le fait que les appareils utilisés par celui-ci sont plus performants. Cependant, le filtre passe bande est centré sur la longueur d'onde d'excitation et possède une bande passante suffisamment fine pour ne pas laisser passer de photons au-delà du second filtre passe haut et ce dernier coupe bien la transmission de lumière de longueurs d'onde inférieures à 647 nm permettant ainsi au

détecteur de ne collecter que les photons de fluorescence. Les filtres utilisés sont donc bien adaptés à l'instrumentation développée.

4.2.3 Traitement des données et implémentation logiciel

Dans le cas de ce prototype, nous n'avons donc qu'un laser. Il n'est alors pas nécessaire de réaliser le même traitement du signal que lors du développement des deux prototypes précédents.

Le laser d'excitation est piloté par des signaux carrés à une fréquence de 820 Hz. Une transformée de Fourier du signal mesuré par le photomultiplicateur est réalisée et le maximum de l'amplitude obtenu est enregistré. Tout signal optique capté par le détecteur provenant d'une autre source est ainsi éliminé. Ce traitement permet de s'affranchir des effets de la lumière ambiante, continue ou modulée à 50 et 100 Hz. Les seuls signaux de fréquence égale à 820 Hz sont donc produits par les photons de fluorescence, et éventuellement, des photons d'excitation ayant traversé les filtres optiques décrits ci dessus.

L'implémentation logicielle est très simple. La figure 4.19 représente la face avant du programme, enregistré lors d'une mesure. Le graphique en haut à gauche représente le signal mesuré par le photomultiplicateur et celui du dessous la transformée de Fourier réalisée. On distingue très clairement, dans l'exemple présenté, un pic à la fréquence de 820 Hz signifiant la détection du photons de fluorescence. Les variations du maximum de cette transformée sont représentées en fonction du temps sur le graphique de droite. Sa valeur est indiquée en continu au dessous, tout comme le temps écoulé. L'utilisation de ce programme est intuitive. En effet, comme pour les programmes précédents, l'utilisateur actionne les boutons « Start » et « Stop » lorsqu'il souhaite faire une mesure et presse le bouton « Exit » afin de sortir du programme de pilotage de la sonde. Enfin, les données peuvent être enregistrées dans un fichier afin d'être interprétées à posteriori.

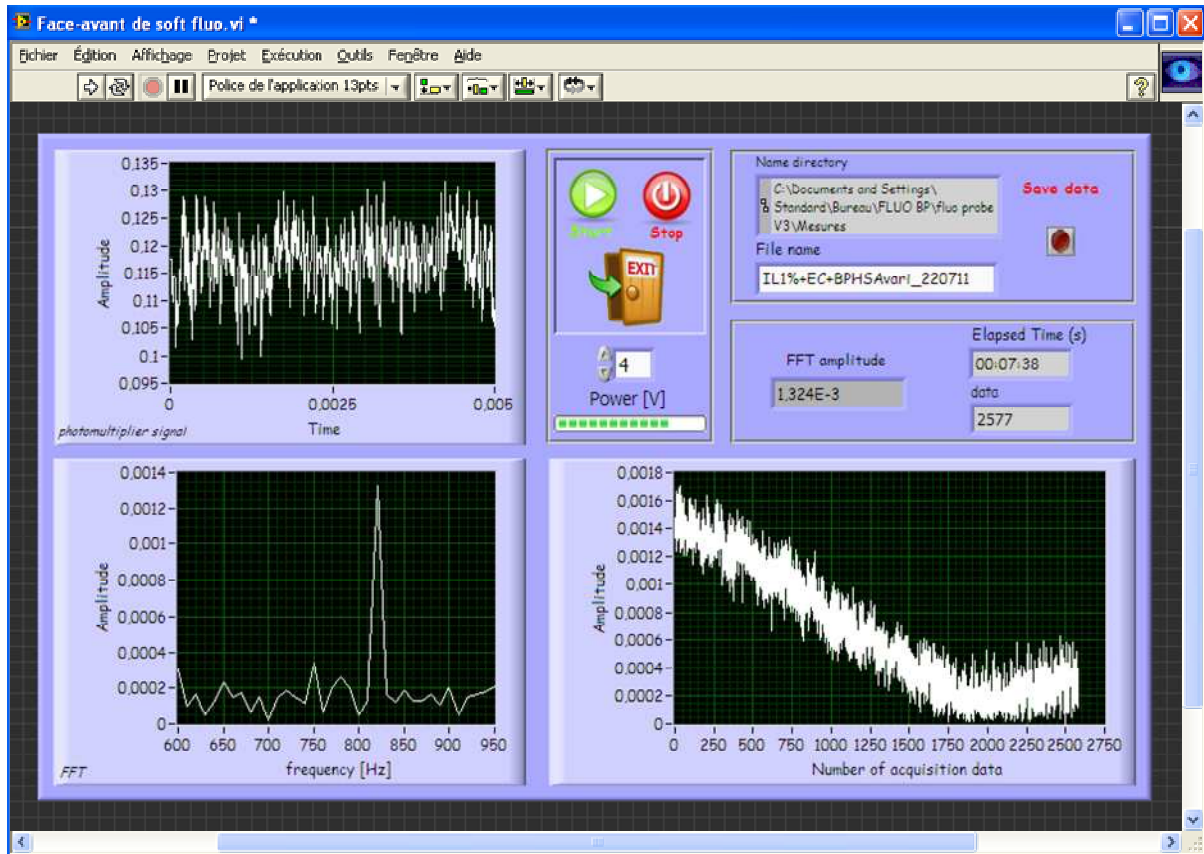


Figure 4.19 : Face avant du programme de détection de fluorescence

4.3 Objets tests

4.3.1 Caractérisation des objets tests

Afin de caractériser les différents instruments développés, des études préliminaires ont été menées sur des milieux artificiels aussi appelés fantômes optiques. La conception de ces fantômes a pour but d'obtenir des propriétés optiques aussi précises que possible, dans la gamme de celles des tissus biologiques, afin d'y simuler la propagation de la lumière. Comme nous l'avons établi lors du chapitre 2, un tissu est un milieu hétérogène complexe. Il serait utopique, voire impossible, d'essayer de réaliser des milieux artificiels reproduisant fidèlement cette complexité. Cependant, nous avons mis en avant dans le chapitre 3 le fait que la propagation de la lumière est régie par deux principaux paramètres optiques : le coefficient d'absorption μ_a et le coefficient de diffusion réduite μ'_s . Ainsi, la validité de nos objets test repose principalement sur des choix judicieux de ces coefficients optiques afin de s'approcher au mieux des tissus biologiques nous intéressant : ceux du sein.

Une revue bibliographique concernant les valeurs des coefficients optiques calculés ou mesurés montre très clairement de grandes différences selon les auteurs. Le tableau 4.2

présente ainsi un panel relativement sommaire des données que l'on peut trouver dans la littérature.

Référence	λ [nm]	μ_a [mm-1]	μ_s' [mm-1]	Type de tissus
v. G. Peters et al, 1990 (14)	540	0,358±0,156	2,24±0,58	Tissus sain
	700	0,047±0,011	1,42±0,3	Tissus sain
	900	0,062±0,005	0,99±0,2	Tissus sain
K. Suzuki et al, 1996 (15)	753	0,0046±0,014	0,89±1,13	Tissus sain
H. Heusmann et al, 1996 (16)	800	0,0017< μ_a <0,0045	0,72< μ_s' <1,355	Tissus sain
B. J. Tromberg et al, 1997 (17)	674	0,004	0,85	Tissus bénin
	674	0,005	0,9	Tissus malin
S. Fantini et al, 1998 (18)	690	0,003	1,2	Tissus sain
S. Fantini et al, 1998 (19)	750	0,002	0,87	Tissus sain
B. J. Tromberg et al, 2000 (20)	670	0,0055	1,12	Pré-ménopause
	810	0,0045	0,96	Pré-ménopause
	670	0,001	0,62	Post-ménopause
	810	0,001	0,6	Post-ménopause
N. Ghosh et al, 2001 (21)	650	0,075	1,5	Tissus bénin
	650	0,15	2,25	Tissus malin
J. C. Hebden et al, 2001 (22)	800	0,007±0,001	0,8±0,1	Fantôme sain
T. Durduran et al, 2002 (23)	750	0,0046±0,0024	0,87±0,22	Tissus sain
D. Grosenick et al, 2003 (24)	670	0,0041±0,013	1,06±0,01	Tissus sain
	785	0,0039±0,0009	1,02±0,16	Tissus sain
T. Vo-Dinh, 2003 (25)	650	0,05	0,89	Tissus sain
T. Svensson et al, 2005 (26)	660	0,005	0,9	Tissus sain
	785	0,0041	0,8	Tissus sain
V.Tuchin, 2007 (27)	674	0,0035	1,11	Tissus sain 27ans
	674	0,004	0,85	Tissus sain 56ans
	674	0,005	0,95	Tissus sain 67ans
Y. Yu, 2009 (28)	690	0,0041±0,013	1,17±0,23	Tissus sain
	830	0,0039±0,0009	1,02±0,16	Tissus sain

Tableau 4.2 : comparaison des coefficients d'absorption et de diffusion des tissus du sein

La première remarque que l'on peut apporter est que plusieurs études ont montré qu'une différenciation entre des tissus bénins et malins macroscopiquement pouvait se traduire également par des différences entre les coefficients optiques (21). La même remarque peut être faite en comparant des tissus du sein pré et post-ménopause (20) (27). Ceci s'explique facilement par le fait qu'après une densification de la structure fibreuse à l'âge adulte jusqu'à la ménopause, une involution graisseuse importante post-ménopause apparaît. Du fait des

grandes différences entre chaque modèle, nous avons choisi de travailler successivement avec deux modèles ayant des coefficients d'absorption différents. Le premier est celui de T. Vo-Dinh avec un coefficient d'absorption $\mu_a = 0.05 \text{ mm}^{-1}$ et un coefficient de diffusion réduite $\mu_s' = 0,89 \text{ mm}^{-1}$ (25). Le second est celui de T. Svensson avec $\mu_a = 0,005 \text{ mm}^{-1}$ et $\mu_s' = 0,9 \text{ mm}^{-1}$ (26).

4.3.2 Conception des fantômes optiques

La littérature comporte énormément de publications concernant la conception de fantômes optiques afin d'évaluer des dispositifs de détection de la lumière diffusée (29) (30) (31). En fonction du but des expériences, deux types de fantômes peuvent être choisis : soit sous forme solide soit sous forme liquide. Nous allons développer chacun de ces modèles.

4.3.2.1 Fantômes optiques solides

4.3.2.1.1 Caractérisation

Ce type de fantôme est utilisé afin de détecter spatialement des zones de propriétés optiques différentes de celles du milieu environnant, comme une inclusion colorée simulant un ganglion marqué par le colorant Bleu Patenté V.

Le matériau transparent choisi est une résine polyester pré accélérée polymérisable (Roth #C647.1). Le chromophore utilisé est de l'encre de Chine (Lefranc Bourgeois/Conté). Les éléments diffusants sont des particules d'oxyde de titane (IV) (TiO_2 , Sigma-Aldrich #T-8141), dont la taille est mal maîtrisée, rendant le calcul de leur propriétés de diffusion impossible. Des expériences de caractérisation ont été réalisées par V. Zint (32). Elles sont basées sur des mesures de la transmission collimatée à l'aide d'un spectrophotomètre et d'une sphère d'intégration, et sur des mesures de réflexion diffuse. Les résultats de ces caractérisations nous fournissent le coefficient de diffusion réduit μ_s' (cm^{-1}) en fonction de la longueur d'onde d'un objet en résine contenant 10 mg/ml de TiO_2 :

$$\mu_s' = 1,211 \cdot 10^7 \cdot \lambda^{-1.668} (1 - g) \quad (4.9)$$

avec λ (nm) la longueur d'onde et g le coefficient d'anisotropie tel que :

$$g = 0,78 - 1,07 \cdot 10^{-4} \cdot \lambda \quad (4.10)$$

Le coefficient d'absorption des fantômes solides est calculé à partir de la concentration en Encre de Chine, après mesure des propriétés optiques de celle-ci sur un spectrophotomètre. Le

coefficient de diffusion relativement faible de ces encres permet en effet ce type de calibration.

Afin de simuler des ganglions lymphatiques marqués, des inclusions de Bleu Patenté V peuvent être insérées dans le fantôme. Deux fantômes ont été réalisés. Pour chacun d'eux, le même protocole de préparation fut appliqué. L'unique changement entre les deux réside dans la différenciation de leurs inclusions. Dans un premier temps, un fantôme possédant 8 inclusions de diamètres différents (de 2 à 10 mm par pas de 1 mm) avec des concentrations de Bleu Patenté V identiques et placées à 4 mm de la surface de l'objet fut conçu. Un second fantôme plus complexe a ensuite été développé. Celui-ci possède 12 inclusions de 4 diamètres différents (4 mm, 6 mm, 8 mm et 10 mm) et à 3 concentrations de colorant différentes (10^{-4} mol.L⁻¹, 5.10^{-5} mol.L⁻¹ et 10^{-5} mol.L⁻¹).

Afin de vérifier si le colorant n'est pas détérioré par les interactions chimiques se produisant entre la résine, le fixateur et le Bleu Patenté V, une étude spectroscopique a été menée en parallèle de la préparation de chacun des fantômes. La figure 4.20 représente les spectres d'absorption normalisés des 2 échantillons en fonction du temps. Nous constatons ainsi une légère dégradation de la qualité des fantômes un mois après leurs conceptions. En effet, les maxima d'absorption ont diminué d'environ 30% dans les deux cas (tableau 4.3).

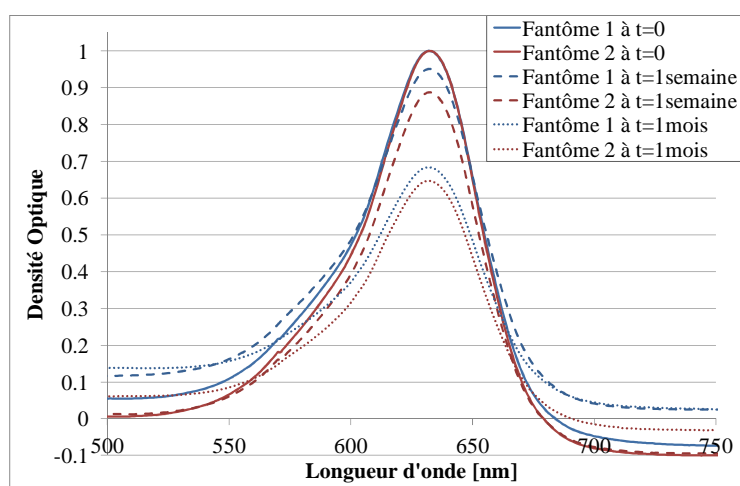


Figure 4.20 : Comparaison des spectres d'absorption normalisés du Bleu Patenté V dans la résine solide à t = 0, t = 1 semaine et t = 1 mois sur deux fantômes

temps	Echantillon fantôme 1		Echantillon fantôme 2	
	DO max	Diminution (%)	DO max	Diminution (%)
t0	1	-	1	-
t+1 semaine	0,95	4,86	0,89	11,18
t+1 mois	0,68	31,66	0,65	35,28

Tableau 4.3 : Comparaison des maximums d'absorption et diminution relative de la densité optique en fonction du temps.

Ces résultats indiquent clairement qu'il est important de les conserver à l'abri de la lumière pour que leurs qualités ne soient pas altérées et notamment que leurs coefficients d'absorption et de diffusion restent stables.

4.3.2.1.2 Conception

Le protocole de fabrication des objets peut être subdivisé en 3 étapes principales :

- Le choix du moule permet de définir la forme finale recherchée pour l'objet test. La matière de celui-ci doit être choisie avec précaution pour que ce matériau ne réagisse pas avec la résine lors de la réaction de polymérisation. Le polypropylène permet un démoulage facile des pièces qui n'adhèrent pas.
- Le dosage des produits est l'étape la plus importante afin d'obtenir un objet aux propriétés optiques (absorption et diffusion) voulues. Le protocole du mélange est clairement défini. Le TiO_2 et l'encre de Chine sont mélangés dans 2% du volume total de résine dans de l'éthanol absolu. Le TiO_2 ayant une grande affinité pour l'eau (non miscible avec la résine), il se dissoudrait dans la partie aqueuse. Le mélange (TiO_2 +encre de Chine) est homogénéisé aux ultrasons (15 minutes environ), avant d'être ajouté à la résine, un passage de 15 minutes aux ultrasons est à nouveau nécessaire pour mélanger et dégazer. Enfin, le catalyseur est ajouté (2% du volume total) (33). L'échantillon doit rester au minimum 24 heures sous une hotte ventilée avant le démoulage.
- La préparation des inclusions constitue l'étape suivante. Lorsque l'objet est polymérisé, il est usiné afin d'obtenir la géométrie voulue et poncé pour éliminer les irrégularités de surface. Puis des inclusions de différents diamètres sont percées (figure 4.21.a). La résine avec le colorant est préparée suivant le même protocole et introduite dans les inclusions (figure 4.21.b) avant d'être recouverte par une épaisseur de 4 mm de résine aux propriétés optiques identiques (figure 4.21.c).

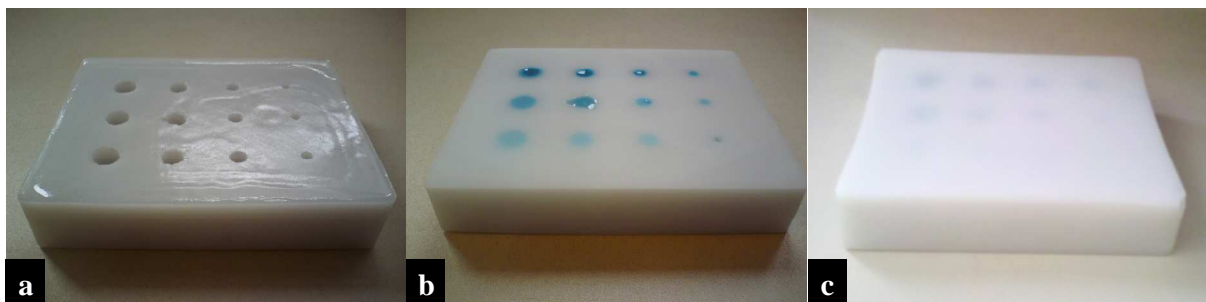


Figure 4.21 : Photos du fantôme optique en résine après séchage et perçage des trous pour les inclusions avant (a), après ajout du colorant (b) et l'ajout de la dernière épaisseur (c)

Deux objets ont été conçus à partir du même moule (125x100x30 mm). Le premier a pour coefficients optiques : $\mu_a = 0,05 \text{ mm}^{-1}$ et $\mu'_s = 8.9 \text{ mm}^{-1}$ (25) et possède 8 inclusions de diamètre allant de 10 mm à 7 mm et de 5 mm à 2 mm et ayant une concentration de Bleu Patenté V fixe de $9.10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$. Le second fantôme a pour propriétés optiques $\mu_a = 0,005 \text{ mm}^{-1}$ et $\mu'_s = 9 \text{ mm}^{-1}$ (26) et possède 12 inclusions (figure 4.21) divisées en 4 diamètres différents (12 mm, 10 mm, 8 mm et 6 mm) et possédant 3 concentrations différentes de colorant : $10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, $5.10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ et $10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$.

4.3.2.2 Fantômes optiques liquides

4.3.2.2.1 Caractérisation

Les fantômes solides sont en général utilisés pour leur stabilité temporelle ou pour modéliser des tissus de géométries ou de structures complexes. Le problème de ce type de fantômes réside dans le fait qu'ils sont figés, ainsi, nous avons choisi de travailler également sur des échantillons liquides faciles à préparer et de propriétés optiques facilement modifiables. Nous avons donc préparé des objets simulant le tissu mammaire constitués par une solution d'intralipides 1 % et d'encre de Chine, dans des proportions permettant d'obtenir les paramètres optiques indiqués au paragraphe III.1 . Nous avons ajouté ensuite des micro-concentrations de Bleu Patenté V afin de caractériser nos prototypes.

Le choix de l'utilisation des intralipides comme milieu diffusant s'explique par le fait que de nombreuses études ont été menées afin des les caractériser (34). De plus, le temps de conservation du produit est relativement long permettant d'éviter les problèmes liés à une éventuelle sédimentation.

Les intralipides sont couramment utilisés en milieu hospitalier comme apport nutritif et sont composés d'huile de soja purifiée, de lécithine d'œuf purifiée, de glycérine et d'eau pour solution injectable. L'indication de pourcentage représente la masse d'huile de soja rapportée à la masse de la suspension (35). Il est à noter que les propriétés de diffusion de la solution ne sont pas modifiées par la glycérine ni par la lécithine. En effet, les particules diffusantes sont les vésicules contenant l'huile de soja de diamètre moyen 97 nm (36). Le phénomène d'absorption est, quant à lui, dû à la présence en grande quantité d'eau (90 %). V. Zint, lors de son travail de thèse, a réalisé une étude bibliographique sur les valeurs des coefficients de diffusion réduite, d'anisotropie et d'atténuation mesurés à 633 nm par différents auteurs (32). Elle a ainsi montré qu'il existait une grande disparité entre ces valeurs, provenant des techniques de mesures et des solutions utilisées. Le tableau 4.4 présente les valeurs mesurées

selon 3 modèles : (32), (36) et (37). La figure 4.22 présente la comparaison des coefficients de diffusion réduit mesurés par ces groupes sur des intralipides 10%.

μ_t [cm ⁻¹]	μ'_s [cm ⁻¹]	g	Auteur
344 ± 28	60 ± 8	0,826 ± 0,177	S. T. Flock
441 ± 8	89 ± 9	0,8 ± 0,08	V. Zint
476 ± 9	-	0,768 ± 0,006	H. J. van Staveren

Tableau 4.4 : Comparaison des valeurs de μ_t , μ'_s et g mesurées à 633nm dans une solution d'intralipides 10% selon trois études.

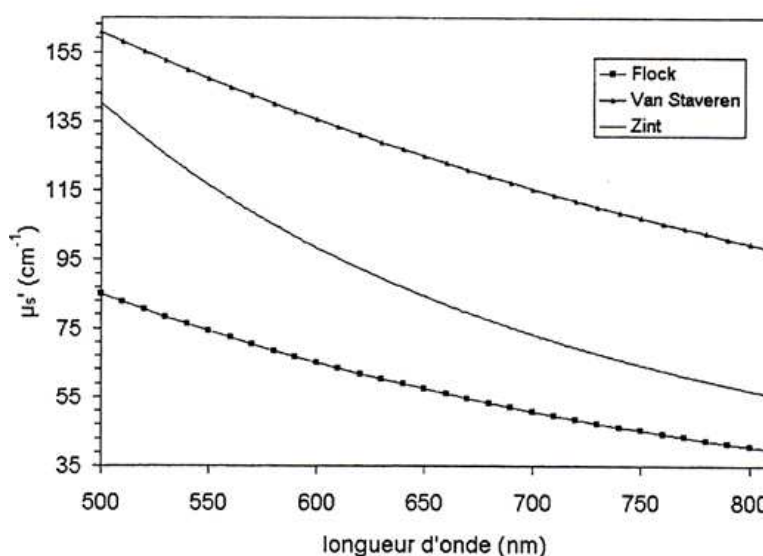


Figure 4.22 : Spectres des coefficients de diffusion réduit des trois études sélectionnées

L'encre de Chine simule les molécules absorbantes des tissus. La figure 4.23 présente la comparaison entre les spectres d'absorption de l'encre de Chine et le Bleu Patenté V mesurés avec le spectrophotomètre UVIKON 943. Nous remarquons que l'absorption de l'encre décroît lorsque la longueur d'onde augmente.

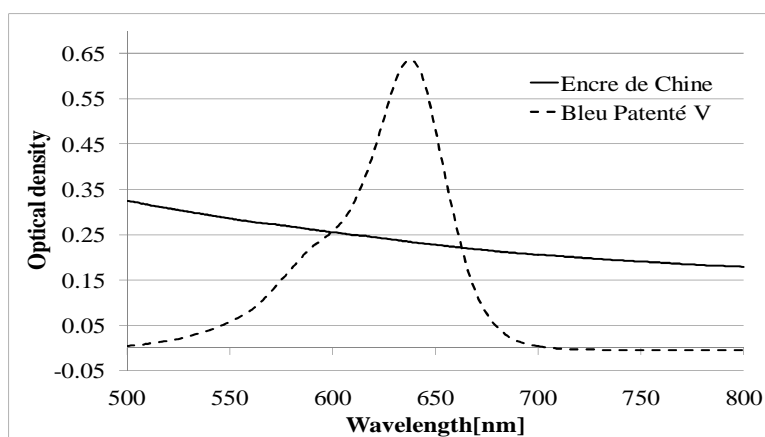


Figure 4.23: Comparaison entre les spectres d'absorption, mesurés dans le PBS, de l'encre de Chine ($\mu_a = 0,005 \text{ mm}^{-1}$) et du Bleu Patenté V de concentration $32,6 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

4.3.2.2.2 Conception

Les objets tests liquides sont réalisés par mélange des différentes solutions les constituant dans un récipient en verre, type bécher. Afin de comprendre les mélanges réalisés, définissons les termes suivants : V_X le volume final et μ'_s le coefficient de diffusion réduit de la solution désiré, V_{IL} et $\mu'_{s\ IL}$ ceux des intralipides. Ainsi, il est possible d'écrire, à une longueur d'onde choisie, la relation :

$$\mu'_s = \mu'_{s\ IL} \cdot \frac{V_{IL}}{V_X} \Leftrightarrow V_{IL} = V_T \cdot \frac{\mu'_s}{\mu'_{s\ IL}} \quad 4.11$$

L'eau, les intralipides et l'encre étant tous les trois absorbant, le coefficient d'absorption de la solution finale μ_{ax} peut s'écrire comme la somme des coefficients d'absorption sous la forme:

$$\mu_{ax} = \mu_{a\ IL} \cdot \frac{V_{IL}}{V_X} + \mu_{a\ EC} \cdot \frac{V_{EC}}{V_X} + \mu_{a\ eau} \cdot \frac{V_{eau}}{V_X} \quad 4.12$$

L'absorption de la solution d'intralipides provient principalement de l'eau, qui est le composant essentiel (90%). Ainsi nous pouvons poser $\mu_{a\ IL} = 0,9 \cdot \mu_{a\ eau}$, ainsi :

$$\mu_{ax} = 0,9 \mu_{a\ eau} \cdot \frac{V_{IL}}{V_X} + \mu_{a\ EC} \cdot \frac{V_{EC}}{V_X} + \mu_{a\ eau} \cdot \frac{V_{eau}}{V_X} = \mu_{a\ eau} \cdot \frac{V_X - V_{EC} - 0,1 V_{IL}}{V_X} + \mu_{a\ EC} \cdot \frac{V_{EC}}{V_X} \quad 4.13$$

Finalement, il est aisé de déterminer les volumes d'encre et d'eau à ajouter dans la solution d'intralipides à partir de l'équation 4.12 pour obtenir une solution de volume final V_X :

$$\begin{cases} V_{EC} = \frac{\mu_{ax} + \mu_{a\ eau} \cdot \left(0,1 \cdot \frac{\mu'_s}{\mu'_{s\ IL}} - 1\right)}{\mu_{a\ EC} - \mu_{a\ eau}} \cdot V_X \\ V_{eau} = V_X - (V_{IL} + V_{EC}) \end{cases} \quad 4.14$$

Considérons la conception d'un objet simulant la diffusion et l'absorption des tissus du sein à 660 nm dont on souhaite les coefficients suivants : $\mu'_s = 0,9 \text{ mm}^{-1}$ et $\mu_a = 0,005 \text{ mm}^{-1}$. A cette longueur d'onde, les coefficients d'absorption et de diffusion réduits des composants nécessaires sont les suivants : $\mu'_{s\ IL} = 6 \text{ mm}^{-1}$, $\mu_{a\ eau} = 0,041 \text{ mm}^{-1}$ et $\mu_{a\ EC} = 0,005 \text{ mm}^{-1}$. Afin de réaliser un objet de 200 mL, les quantités d'intralipides, d'encre (dilué 1000 fois dans l'eau) et d'eau nécessaires sont obtenues à partir des équations 4.10 et 4.13 et sont de :

$$\left\{ \begin{array}{l} V_{IL} = V_T \cdot \frac{\mu'_S}{\mu'_{S IL}} = \mathbf{30 mL} \\ V_{EC} = \frac{\mu_{ax} + \mu_{a eau} \cdot \left(0,1 \cdot \frac{\mu'_S}{\mu'_{S IL}} - 1\right)}{\mu_{a EC} - \mu_{a eau}} \cdot V_X = \mathbf{196 \mu L} \\ V_{eau} = V_X - (V_{IL} + V_{EC}) = \mathbf{169,8 mL} \end{array} \right.$$

4.4 Modèle animal

Dans le but de détecter des ganglions lymphatiques in-vivo, un modèle animal de rat Lewis ayant une inflammation des ganglions a été utilisé : l'Encéphalomyélite Allergique Expérimentale (EAE) (38).

4.4.1 Préparation de l'émulsion

L'émulsion nécessaire à l'immunisation des rats Lewis est composée d'un mélange à volumes égaux de deux solutions préparées préalablement séparément: l'Adjuvant de Freud Complet (AFC) et la solution d'antigène (AG).

- L'AFC est dosé à partir de 4mg de mycobactérium Tuberculosis (Difco H37 RA) par millilitre d'adjuvant de Freud incomplet (Sigma F5506). Cet adjuvant est composé à 85 % d'huile de paraffine et à 15 % d'oléate de mannose. La solution de mycobactérium ayant une anatomie spécifique (multicouche), afin d'en extraire les antigènes, on met le mélange sur un banc rotatif durant au minimum 1h afin d'obtenir l'adjuvant de Freund complet.
- La solution d'antigène est préparée à partir de la protéine basique de la myéline (PBM) à 2 mg/ml dans du sérum physiologique.

L'émulsion AFC/AG est réalisée à l'aide d'un robinet à trois voies en chassant environ 50 fois 500 μ L de la solution d'antigène contenue dans une seringue de 1 mL dans une autre seringue de volume équivalent contenant 500 μ L d'AFC. On vérifie la qualité de l'émulsion en déposant une goutte à la surface d'un récipient d'eau froide. Si la goutte ne se disperse pas, l'émulsion est de bonne qualité.

4.4.2 Immunisation des animaux

Les animaux utilisés sont des rats Lewis femelle (*Elevage Janvier Le Genest-St-Isle France*; référence : RC_LEW_5S_F) pesant entre 140 et 160 g (figure 4.24.a). Afin de réaliser l'immunisation, les rats sont anesthésiés par injection intra-péritonéale d'un mélange kétamine/xylazine (100 et 10 mg/kg respectivement). L'émulsion AFC/AG est ensuite

injectée en sous cutanée au niveau des membres postérieurs de l'animal (100 μ L par patte arrière).

Les signes cliniques des animaux sont suivis et évalués selon une échelle allant de 0 à 6 suivant la sévérité: 0 = aucune signe clinique notable, 0,5 = paralysie partielle de la queue (partie distale), 1 = paralysie totale de la queue, 2 = paralysie légère d'une ou des deux pattes arrières, 3 = paralysie modérée ou ataxie sévère, 4 = paraplégie sévère, 5 = paraplégie totale avec incontinence, 6 = état moribond (39). Ainsi, le modèle prévoit une perte de poids des animaux à J+1 due à la réaction de la solution d'antigène avec le système immunitaire puis à une évolution positive du poids de l'animal. A partir de J+9 une diminution du poids accompagnée de l'apparition des signes cliniques se produit. Le maximum de sévérité clinique se produit environ 4 à 5 jours plus tard, se traduisant par une paraplégie totale et une incontinence importante de l'animal (figure 4.24.b). Finalement, un retour à l'état normal du rat se produit entre 6 et 7 jours après l'apparition des premiers signes cliniques. Le graphique 4.23.c montre un exemple de variation de la courbe de poids et des signes cliniques d'un animal étudié, en fonction du temps. Ces résultats en accord avec le modèle ont permis d'obtenir des ganglions inflammatoires, entre J9 et J13, d'un diamètre approximatif d'environ 5 mm.

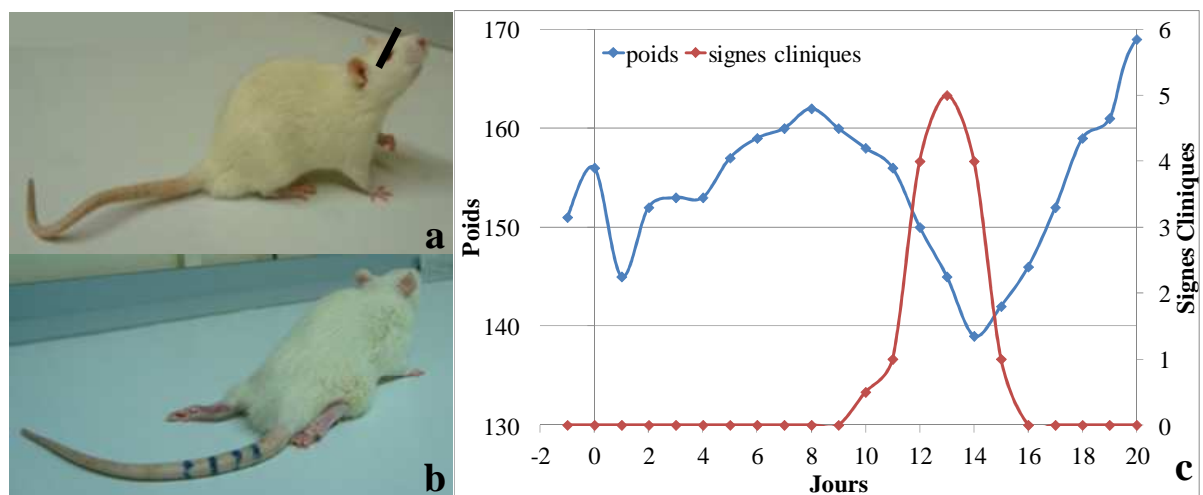


Figure 4.24 : Comparaison entre un rat sain (a) et un rat atteint d'EAE (b) et courbes d'évolution du poids et des signes cliniques d'un rat Lewis immunisé (c).

4.4.3 Protocole expérimental

La détection des ganglions lymphatiques a été réalisée après l'anesthésie gazeuse du rat par l'isoflurane. Le suivi des paramètres vitaux est fait, lors de l'expérience, avec un système d'anesthésie et de contrôle de la température (MINERVE). Le Bleu Patenté V a été ensuite

injecté par voie intradermique dans les membres postérieurs. Lors de ce type d'injection, le colorant est drainé préférentiellement vers les ganglions inguinal, poplité et iliaque (40) (41). Deux types d'expériences ont été menés. Dans les deux cas, différents volumes de Bleu Patenté V ont été injectés à plusieurs animaux. La première expérience consiste à placer la sonde à la surface de l'animal en position fixe et à détecter le passage et la fixation du colorant à travers la peau et les poils dans un ganglion préalablement palpé. Une seconde manipulation consiste à rechercher les différents ganglions marqués en déplaçant la sonde à la surface de l'animal. La figure 4.25 représente les différentes étapes de détection du colorant lorsque la sonde est positionnée en regard d'un ganglion choisi.

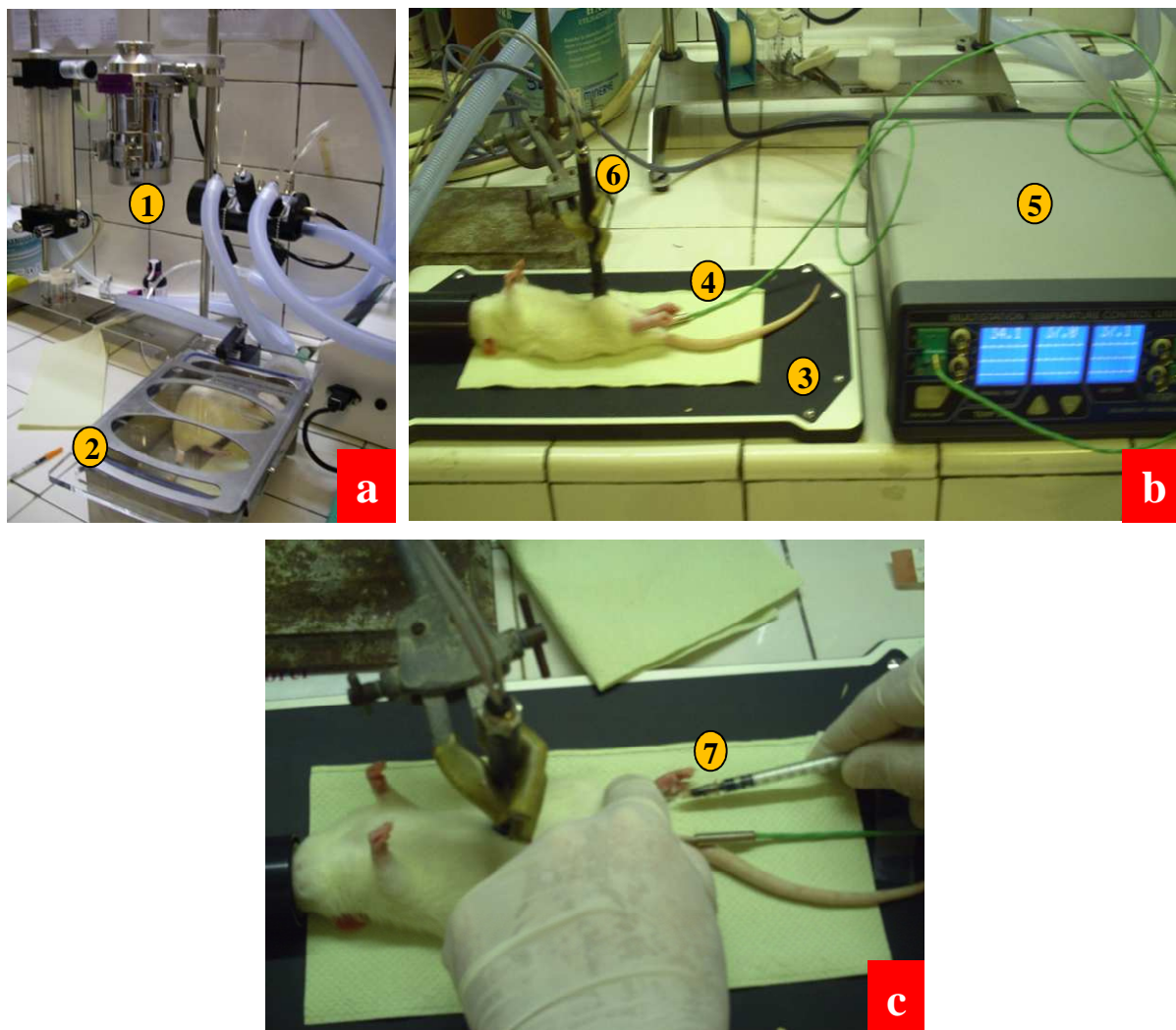


Figure 4.25 : Différentes étapes de détection du colorant, (a) commençant par l'anesthésie gazeuse (1) de l'animal placé dans une boîte hermétique (2). (b) Positionnement de l'animal sur le plaque chauffante (3). Il est équipé d'un thermomètre (4) permettant de réguler sa température interne via le système de contrôle (5). La sonde est placée en regard du ganglion inguinal. (c) Injection du Bleu Patenté dans le coussinet plantaire (7) et détection par la sonde.

4.5 Expérimentation clinique

Nos sondes ont été testées sur des fantômes optiques afin de les caractériser, puis lors d'expérimentations animales, des recherches in-vivo de ganglions marqués par différents volumes de colorant ont été menées. L'étape suivante fût donc de valider ces prototypes sur des pièces opératoires.

Ces études ont été menées au centre anticancéreux Paul Strauss de Strasbourg. N'ayant pas les certifications permettant d'utiliser ces appareils au bloc opératoire, le protocole mis en place est le suivant : le chirurgien détecte les ganglions marqués par le radio-isotope (injecté la veille de l'opération) à l'aide d'une sonde isotopique (EUROPROBE (42)) et visuellement, après injection du Bleu Patenté V. Les pièces opératoires sont ensuite emmenées au service d'anatomopathologie afin de réaliser l'étude microscopique. C'est entre ces deux étapes que nous testons l'efficacité de détection de nos sondes : après l'exérèse du chirurgien et avant l'analyse de l'anatomopathologiste. En accord avec le praticien le volume de colorant injecté a été diminué progressivement de 2 mL (volume usuel), à 1 mL, puis 0,5 mL et enfin 0,25 mL. Le but recherché étant de se placer dans une situation telle que le chirurgien ne parvienne pas à détecter visuellement la coloration mais uniquement le marquage isotopique du ganglion sentinelle grâce à la sonde isotopique. Ainsi nous confronterons la sensibilité de détection de nos prototypes à celui de la sonde isotopique et à l'œil du chirurgien.

4.6 Bibliographie

1. **F. Tellier, R. Ravelo, H. Simon, R. Chabrier, J. Steibel, P. Poulet.** Sentinel lymph node detection by an optical method using scattered photons. *Biomedical optics Express*. 2010, Vol. 1, 3, pp. 902-910.
2. **F. Tellier, H. Simon, F.X. Blé, R. Ravelo, R. Chabrier, J. Steibel, J.F. Rodier, P. Poulet.** Comparison of 2- and 4-wavelength methods for the optical detection of sentinel lymph node. *Proceedings Paper SPIE Munich*. 2011, Vol. 8092, DOI: 10.1117/12.889631.
3. **ILEE.** http://www.ilee.ch/FR_Uebersicht_Lasermodule_modulierbar.htm. *ILEE Laser Innovation*. [En ligne] 2011.
4. **Hamamatsu.** http://jp.hamamatsu.com/products/sensor-ssd/pd041/pd069/S5106/index_en.html. *Hamamatsu*. [En ligne] 2011.
5. **NI.** <http://sine.ni.com/nips/cds/view/p/lang/fr/nid/202751>. *National Instruments*. [En ligne] 2011.
6. <http://sine.ni.com/nips/cds/view/p/lang/fr/nid/203482>. *National Instruments*. [En ligne] 2011.
7. **M. S. Patterson, B. Chance, B. C. Wilson.** Time resolved reflectance and transmittance for the non-invasive measurement of tissue optical properties. *applied Optics*. 1989, Vol. 28, 12, pp. 2331-2336.
8. **D. Contini, F. Maretli, G. Zaccanti.** Photon migration through a turbid slab described by a model based on diffusion approximation. *Applied Optics*. 1997, Vol. 36, 19, pp. 4587-4599.
9. **N. Nouizi.** tomographie optique diffuse et de fluorescence préclinique: instrumentation sans contact, modélisation et reconstruction 3D résolue en temps. *Thèse de l'Université de Strasbourg*. 2011.
10. **D. T. Delpy, M. Cope, P. van der Zee, S. Arridge, S. Wray, J. Wyatt.** Estimation of optical pathlength through tissue from direct time of flight measurement. *Physical Medicine in Biology*. 1988, Vol. 33, 12, pp. 1433-1442.
11. **A. Pellicier, M. C. Bravo.** Near infrared spectroscopy: A methodology-focused review. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*. 2011, Vol. 16, 1, pp. 42-49.
12. **Hamamatsu.** http://sales.hamamatsu.com/assets/pdf/parts_H/m-h10720_h10721e.pdf. www.hamamatsu.com/. [En ligne] 2011.
13. **Photonics, Hamamatsu.** *Photomultiplier Tubes Basics and Applications*. Third edition. Hamamatsu : s.n., 2006. p. 30.
14. **V. G. Peters, D. R. Wyman, M. S. Patterson, G. L. Frank.** Optical properties of normal and diseased human breast tissues in the visible and near infrared. *Physics in Medicine and Biology*. 1990, Vol. 35, 9, pp. 1317-1334.

15. **K. Suzuki, Y. Yamashita, K. Ohta, M. Kaneko, M. Yoshida, B. Chance.** Quantitative measurement of optical parameters in normal breasts using time resolved spectroscopy: in vivo results of 30 Japanese women. *Journal of Biomedical Optics*. 1996, Vol. 1, 3, pp. 330-334.
16. **H. Heusmann, J. Kolzer, G. Mitic.** Characterisation of female breasts in vivo by time resolved and spectroscopy measurements in near infrared spectroscopy. *Journal of Biomedical Optics*. 1996, Vol. 1, 4, pp. 425-434.
17. **B. J. Tromberg, O. Coquoz, J. B. Fishkin, T. Pham, E. R. Anderson, J. Butler, M. Cahn, J. D. Gross, V. Venugopalan, D. Pham.** Non-invasive measurements of breast tissue optical properties using frequency-domain photon migration. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. 1997, Vol. 352, 1354, pp. 661-668.
18. **S. Fantini, S. A. Walker, M. A. Franceschini, M. Kaschke, P. M. Schlag, K. T. Moesta.** Assessment of the size, position, and optical properties of breast tumors in vivo by noninvasive optical methods. *Applied Optics*. 1998, Vol. 37, 1, pp. 1982-1989.
19. **S. Fantini, S. A. Walker, M. A. Franceschini, A. E. Cerussi, J. Edler, K. T. Moesta, P. M. Schlag, M. Kaschke, E. Gratton.** *Optical Characterization of breast tumors by frequency domain optical mammography*. 1998.
20. **B. J. Tromberg, N. Shah, R. Lanning, A. Cerussi, J. Espinoza, T. Pham, L. Svaasand, J. Butler.** Non-invasive in vivo characterisation of breast tumors using photon migration spectroscopy. *Neoplasia*. 2000, Vol. 2, 1, pp. 26-40.
21. **N. Ghosh, S. K. Mohanty, S. K. Majumder, P. K. Gupta.** Measurement of optical transport properties of normal and malignant human breast tissue. *Applied Optics*. 2001, Vol. 40, 1, pp. 176-184.
22. **J. C. Hebden, H. Veenstra, H. Dehghani, E. M. C. Hillman, M. Schweiger, S. R. Arridge, D. T. Delpy.** Three-dimensional time- resolved optical tomography of a conical breast phantom. *Applied Optics*. 2001, Vol. 40, 19, pp. 3278-3287.
23. **T. Durduran, R. Choe, J. P. Culver, L. Zubkov, M. J. Holboke, J. Giammarco, B. chance, A. G. Yodh.** Bulk optical properties of healthy female breast tissue. *Physics in Medicine and Biology*. 2002, Vol. 47, pp. 2847-2861.
24. **D. Grosenick, K. T. Moesta, H. Wabnitz, J. Mucke, C. Stroszczyński, R. Macdonald, P. M. Schlag, H. Rinneberg.** Time domain optical mammography: initial clinical results on detection and characterization of breast tumors. *Applied Optics*. 2003, Vol. 42, 16, pp. 3170-3186.
25. **T. Vo-Dinh.** *Biomedical Photonics Handbook*. s.l. : CRC Press, 2003.
26. **T. Svensson, J. Swartling, P. Taroni, A. Torricelli, P. Lindblom, C. Ingvar, S. Andersson-Engels.** Characterization of normal breast tissue heterogeneity using time-

resolved near-infrared spectroscopy. *Physics in medicine and Biology*. 2005, Vol. 50, pp. 2559-2571.

27. **V. Tuchin**. *Tissue optics: Light Scattering Methods and Instruments for Medical Diagnosis*. Seconde. Washington : SPIE PRESS, 2007. pp. 186-187.

28. **Y. Yu, N. Liu, A. Sassaroli, S. Fantini**. Near-infrared spectral imaging of the female breast for quantitative oximetry in optical mammography. *Applied Optics*. 2009, Vol. 48, 10, pp. 225-235.

29. **M. Canpolat**. Variation of photon density distribution with system component within Intralipid emulsion. *Optik*. 2011, Vol. 122, pp. 887-890.

30. **J. Pekar, M. S. Patterson**. Fabrication and Characterization of phantoms with tissue-like optical properties from 500 to 700nm. *Medical Laser Application*. 2010, Vol. 25, pp. 147-153.

31. **L. S. Zhang, L. Zhang, C. P. Zhang, S. W. Qi, T. Xu, J. G. Tian**. Measurements of absorption and anisotropy coefficients of the fat emulsion intralipid 10%. *Chinese Physical Letters*. 2004, Vol. 21, 12, pp. 2517-2520.

32. **V. Zint**. Tomographie Optique proche infrarouge, résolue en temps, des milieux diffusants. *Thèse de l'Université Louis Pasteur de Strasbourg*. 2002.

33. **B. W. Pogue, M. S. Patterson**. Review of tissue simulating phantoms for optical spectroscopy, imaging and dosimetry. *journal of biomedical optics*. 2006, Vol. 11, 4, pp. 041102-1-16.

34. **E. Drakaki, S. Psycharakis, M. Makropoulou, A. A. Serafetinides**. Optical properties and chromophore concentration measurements in tissue-like phantoms. *Optics Communications*. 2005, Vol. 254, pp. 40-51.

35. **J. Férézou, A. Gulik, N. Dorningo, F. Milliat, J. C. Dedieu, S. Dunel-Erb, C. Chevalier, A. C. Bach**. Intralipid 10%: physicochemical characterization. *Nutrition*. 2001, Vol. 17, 11/12, pp. 930-933.

36. **H. J. van Staveren, C. J. M. Moes, J. van Marie, S. A. Prahl, M. J. C. van Gemert**. Light scattering in intralipid-10% in the wavelength range of 400-1100nm. *Applied Optics*. 1991, Vol. 30, 31, pp. 4507-4514.

37. **S. T. Flock, S. L. Jacques, B. C. Wilson, W. M. Star, M. J. C. van Gemert**. Optical properties of intralipid: a phantom medium for light propagation studies. *Laser Surgical Medicine*. 1992, Vol. 12, 5, pp. 510-519.

38. **I. L. Namer, J. Steibel, P. Poulet, J. P. Armspach, Y. Mauss, J. Chambron**. In-vivo dynamic MR imaging of MBP-induced acute experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rat. *Magnetic Resonance in Medicine*. 1992, Vol. 24, pp. 325-334.

39. **D. E. McFarlin, S. E. Blank, R. F. Kiber.** Recurrent experimental allergic encephalomyelitis in the Lewis rat. *The Journal of Immunology*. 1974, Vol. 113, 2, pp. 712-715.
40. **M. I. Harrel, B. M. Iritani, A. Ruddell.** Lymph node mapping in the mouse. *Journal of Immunological Methods*. 2008, Vol. 332, pp. 170-174.
41. **N. L. Tilney.** Patterns of lymphatic drainage in the adult laboratory rat. *Journal of Anatomy*. 1971, Vol. 109, 3, pp. 369-383.
42. **EuroRad.** http://www.euroRad.com/PDF/BR_Europrobe3.pdf. <http://www.euroRad.com>. [En ligne] 2011.

5 Détection du ganglion sentinelle : utilisation des photons diffusés

5.1 Introduction

Après avoir présenté, dans le chapitre précédent, les différents dispositifs mis en œuvre, nous allons, durant ce chapitre, exposer les résultats de caractérisation et de mesure des deux sondes permettant la détection du ganglion sentinelle en utilisant les photons diffusés. Après un rapide rappel sur la méthodologie utilisée, seront présentés successivement, les résultats obtenus à l'aide de la sonde à deux longueurs d'onde, et une discussion issue de ces résultats ayant conduit au développement du prototype à quatre longueurs d'onde. La seconde partie de ce chapitre sera consacrée aux résultats obtenus avec le second prototype : des mesures de caractérisation aux essais sur pièces opératoires au Centre Régional de Lutte Contre le Cancer Paul Strauss. Finalement ce chapitre sera conclu par une discussion générale portant sur l'efficacité et la sensibilité de cette modalité de détection et son application clinique potentielle.

5.2 Détection à deux longueurs d'onde

5.2.1 Rappel rapide sur la méthode

Afin de détecter les photons diffusés pour mesurer l'absorption par le Bleu Patenté V, deux appareils ont été développés. Le premier instrument utilise deux diodes laser. Le premier laser a une longueur d'onde de 657 nm, proche du maximum d'absorption du Bleu Patenté V et le second une longueur d'onde non absorbée par le colorant, 785 nm. Chaque faisceau est injecté dans une fibre optique placée dans une sonde stylo. Une troisième fibre optique, située à 4 millimètres des deux fibres d'excitation, est utilisée afin de collecter les photons rétrodiffusés. La séparation des deux composantes spectrales du signal est réalisée par une transformation de Fourier et permet de discriminer l'absorption du BPV de celle des autres chromophores. La concentration relative du colorant est calculée en utilisant la loi de Beer-Lambert modifiée.

Afin d'apporter une certaine cohérence aux résultats présentés par la suite un code couleur à été choisi pour les graphiques suivants. Ainsi, les courbes représentant les variations de signaux à 657 nm sont représentées en vert, les variations des signaux rétrodiffusés à 785 nm en rouge et la concentration relative de Bleu Patenté V en bleu.

5.2.2 Analyse sur fantômes solides

Afin de déterminer la possibilité de détection d'une inclusion colorée en profondeur, par l'instrument à deux longueurs d'onde une expérience simple a été mise en œuvre en utilisant l'un des objets en résine décrit dans le chapitre 4. Le fantôme utilisé dans le cas présent est l'objet en résine ayant comme propriétés optiques : $\mu_a = 0,05 \text{ mm}^{-1}$ et $\mu'_s = 0,89 \text{ mm}^{-1}$ (1). Celui-ci comporte 8 inclusions cylindriques de Bleu Patenté V de concentration initiale $9.10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, de hauteur 10 mm et de face supérieure située à 4 mm sous la surface de l'objet. Les inclusions sont réparties sur deux lignes. La première ligne est constituée d'inclusions de diamètre 10 mm, 8 mm, 7 mm et 6 mm. La seconde possède des inclusions de diamètre 5 mm, 4 mm, 3 mm et 2 mm (figure 5.1).

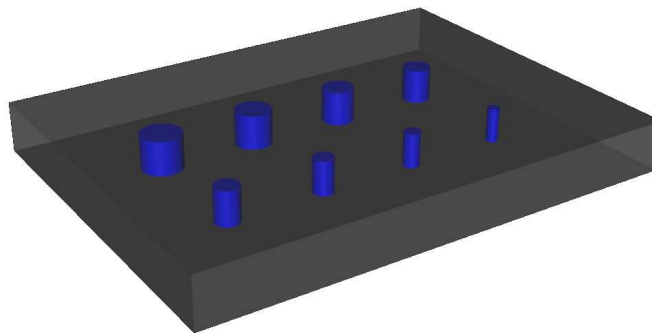


Figure 5.1 : schéma 3D de l'objet en résine et de ces inclusions de Bleu Patenté V se trouvant à 4 mm sous la surface de l'objet.

Afin de collecter ces informations de manière précise, la sonde a été fixée à un cavalier adapté à un rail optique gradué permettant une translation précise de celle-ci. La sonde est déplacée à la surface de l'objet par pas de 2 mm en regard des 2 lignes contenant les inclusions (figure 5.2.a). Afin d'avoir une mesure significative, la sonde est maintenue 30 secondes pour chaque position. Ainsi les résultats illustrés par la suite représentent les moyennes et leurs écarts types de ces mesures durant cette période.

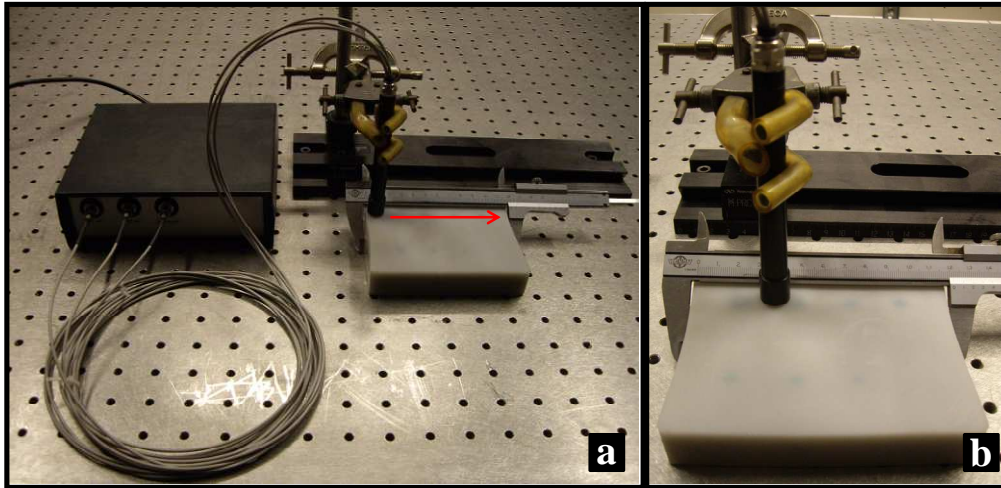


Figure 5.2 : photo du dispositif de recherche d'inclusions, la flèche rouge représentant le sens de balayage (a) ; exemple après déplacement de la sonde de 30 mm (b).

Les figures 5.3.a et b représentent les valeurs moyennes des concentrations relatives de Bleu Patenté V mesurées pour chaque emplacement. Les barres d'erreur représentent ± 2 écarts types des mesures. Les 8 inclusions ont été détectées par la sonde et la concentration moyenne obtenue pour celles-ci est de $5,1 \mu\text{mol.L}^{-1} \pm 1,6 \mu\text{mol.L}^{-1}$. La série de mesure sur les 4 premières inclusions donne une valeur moyenne de $6,0 \mu\text{mol.L}^{-1} \pm 1,2 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Les résultats sont de $4,3 \mu\text{mol.L}^{-1} \pm 1,7 \mu\text{mol.L}^{-1}$ pour la seconde série. Ces résultats démontrent qu'une inclusion, même de petite taille, peut être détectée. Les concentrations relatives de colorant affichées par l'appareil sont des valeurs moyennes entre les points d'entrée et de sortie. Il est donc normal que les valeurs mesurées sont nettement inférieures aux valeurs vraies et que cette valeur diminue avec la taille de l'inclusion. L'instrument ne comportant qu'un seul couple source/détecteur ne peut fournir des valeurs absolues des concentrations. Les valeurs relatives mesurées restent cependant stables tant que le diamètre de l'inclusion est supérieur ou égal à sa distance à la surface.

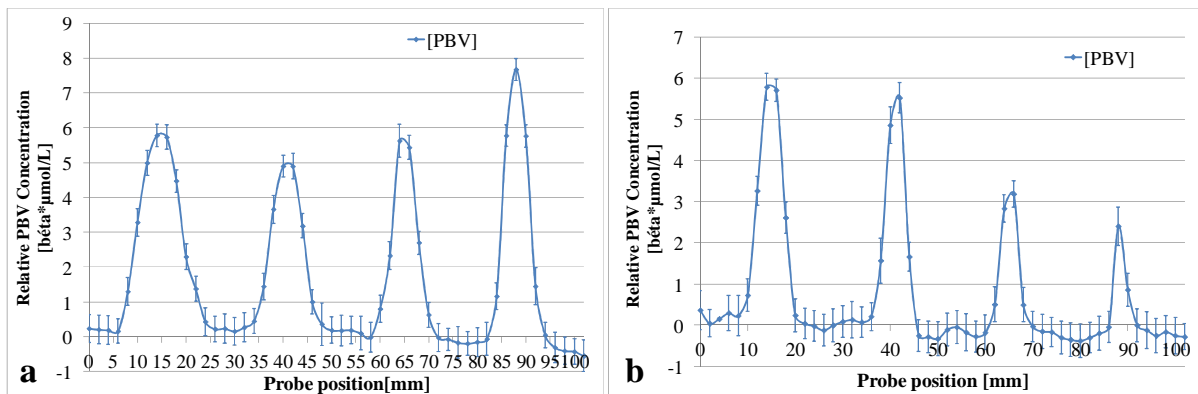


Figure 5.3 : Profils des concentrations relatives de Bleu Patenté V mesurées en fonction de la position de la sonde lors de son déplacement sur l'objet en regard des inclusions de 10 mm, 8 mm, 7 mm, 6 mm (a) et 5 mm, 4 mm, 3 mm et 2 mm (b)

Les courbes de la figure 5.3 permettent de calculer la largeur à mi hauteur (FWHM) des profils de concentration. Le tableau 5.1 présente ces FWHM ainsi que l'écart avec la taille réelle de l'inclusion correspondante. Ainsi nous observons pour les 8 inclusions que les tailles mesurées évoluent comme les tailles réelles, et que les écarts restent inférieurs à 1 mm, sauf pour l'inclusion de 7 mm pour lequel l'écart est de -2,8 mm.

Finalement nous pouvons conclure que malgré ces écarts la sonde est capable de détecter toutes ces inclusions situées à 4 mm de la surface. Les concentrations relatives affichées sont peu dépendantes des concentrations réelles pour des inclusions de taille supérieure à leur profondeur. Ces résultats ont été obtenus avec une profondeur égale à la distance entre fibres source et détecteur, profondeur de pénétration des photons rétrodiffusés communément admise.

La situation lors de mesures in-vivo sera sans doute similaire. On peut considérer que l'appareil sera en mesure de détecter des ganglions dont la taille est supérieure à leur profondeur, et que cette dernière ne peut excéder la distance entre les fibres émettrices et réceptrices (4 mm).

Inclusion [mm]	FWHM [mm]	Ecart [mm]	[BPV] _{max} [$\mu\text{mol.L}^{-1}$]
2	2,6	+0,6	2,42
3	2	-1	3,23
4	4	0	5,59
5	6,1	+1,1	5,79
6	6	0	7,65
7	4,2	-2,8	5,65
8	7,6	-0,4	4,9
10	10	0	5,8

Tableau 5.1 : Tailles réelles, FWHM mesurées, écarts de mesure et concentrations relatives maximales de Bleu Patenté V des inclusions de l'objet solide.

5.2.3 Analyse des performances sur modèle liquide

Cette étape consiste à déterminer le seuil de détection de l'appareil et vérifier si les résultats de mesures sont en accord avec les modèles théoriques présentés dans le chapitre 4. Pour cela nous avons réalisé plusieurs expériences dans des solutions d'Intralipides 1 % auxquelles nous avons ajouté des concentrations croissantes de colorant (encre de Chine et Bleu Patenté V).

5.2.3.1 Validation du modèle théorique : comparaison entre les modèles de Beer-Lambert et de Patterson

Afin de comparer les modèles de Beer-Lambert et de Patterson l'expérience développée a consisté à étudier les variations des signaux à 657 nm et 785 nm en fonction de la concentration d'Encre de Chine dans une solution d'Intralipides 1 % ayant une concentration fixe de Bleu Patenté V ($5 \mu\text{mol.L}^{-1}$).

Les figures 5.4.a et b représentent les résultats expérimentaux et les courbes d'ajustement par la loi de Beer-Lambert modifiée et par l'équation de Patterson. Les résultats des mesures à 657 nm et 785 nm sont présentés séparément. Chaque point correspond à la moyenne des mesures sur 1 minute, à une concentration d'encre de Chine donnée. Nous constatons que les valeurs ajustées sont proches des données expérimentales. Cependant, nous observons que l'ajustement avec le modèle de Patterson est meilleur que celui obtenu avec le modèle de Beer-Lambert modifié. En effet, la somme des carrés des écarts entre les valeurs expérimentales et celles des ajustements est environ 4 fois plus faible selon ce modèle que selon la loi de Beer-Lambert. Le modèle de Patterson prend en compte la diffusion de la solution et conduit à la loi d'évolution de l'intensité diffusée en fonction du coefficient d'absorption, et donc de la concentration qui n'est pas une simple loi exponentielle. La loi de Beer Lambert rend compte de la diffusion par le Differential Pathlength Factor β , mais exprime l'intensité diffusée selon une fonction exponentielle de la concentration. L'ajustement ne peut donc être que plus approximatif. En réalité, β décroît lorsque le coefficient d'absorption optique augmente. Ce fait s'explique par le fait que les trajets courts des photons sont de plus en plus probables, au fur et à mesure que l'absorption augmente.

Cependant si le coefficient d'absorption μ_a varie dans des proportions restreintes, le modèle de Beer-Lambert s'écarte peu du modèle de Patterson et peut donc être utilisé en première approche. Cette situation devrait être rencontrée en pratique clinique, avec des colorations peu marquées de zones limitées, les ganglions. Cette situation sera également obtenue dans les expériences sur objets test suivantes, pour lesquelles une faible quantité de colorant sera ajoutée à un milieu déjà absorbant.

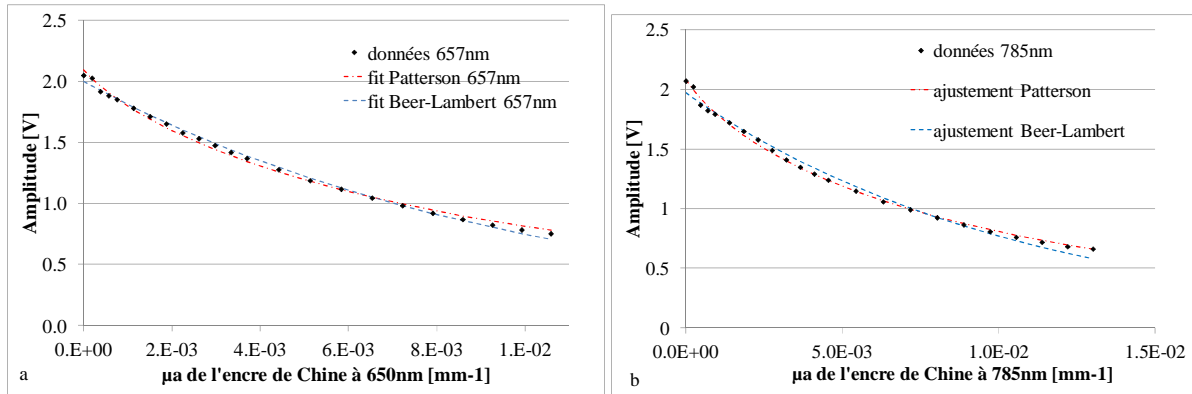


Figure 5.4 : Variations des signaux à 657 nm et 785 nm lors de l'injection d'encre de Chine dans une solution d'Intralipides 1% contenant une concentration fixe de Bleu Patenté V.

Les mesures suivantes ont été effectuées dans une solution d'Intralipides et d'encre de Chine dont les propriétés optiques initiales étaient égales à : $\mu_a = 0,05 \text{ mm}^{-1}$, $\mu'_s = 0,89 \text{ mm}^{-1}$. De faibles concentrations de Bleu Patenté V sont ensuite progressivement ajoutées. Une décroissance de l'intensité du signal rétrodiffusé à 657 nm est observée, au fur et à mesure que la concentration du colorant augmente (figure 5.5). La loi de Beer-Lambert modifiée n'est pas significativement différente du modèle de Patterson. Dans la suite de notre étude, seul le modèle de Beer-Lambert modifié sera utilisé. L'intensité du signal rétrodiffusé à 785 nm subit une légère augmentation. Ce fait peut être expliqué par la dilution progressive de l'encre de Chine, seul absorbeur à cette longueur d'onde. La barre verticale située à $1 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ correspond au seuil à partir duquel l'œil de l'utilisateur peut détecter le colorant.

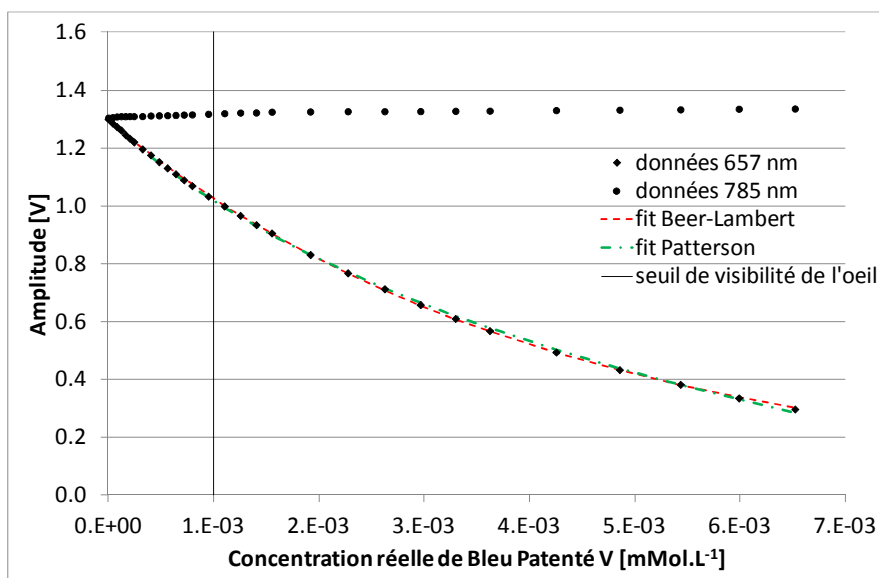


Figure 5.5 : Amplitudes des signaux rétrodiffusés à 657 nm (♦) et à 785 nm (●) en fonction de la concentration de Bleu Patenté V.

5.2.3.2 Détermination du seuil de détection de l'instrumentation

Afin de déterminer le seuil de détection deux méthodes ont été utilisées. La première consiste à déterminer graphiquement la première valeur en dehors du bruit de la mesure initiale (figure 5.6.a). Selon cette méthode, le seuil de détection est de $3,0 \cdot 10^{-2} \mu\text{mol.L}^{-1}$. La seconde méthode est celle des courbes ROC (Receiver Operating Characteristic) (2) permettant de définir une valeur seuil en représentant la sensibilité (Se) en ordonnée et 1 moins la spécificité ($1-Sp$) en abscisse. Afin de comprendre ces deux notions, il est nécessaire d'introduire les termes statistiques qui suivent. On parle de vrais positifs (VP) les cas positifs et identifiés comme tels. Les cas négatifs sont les vrais négatifs (VN). Les cas positifs classés comme négatifs sont les faux négatifs (FN). Enfin, les cas négatifs classés comme positifs sont les faux positifs (FP). Ainsi, la sensibilité se définit comme le pourcentage de cas positifs correctement identifiés:

$$Se = \frac{VP}{VP + FN}$$

La spécificité est définie comme le pourcentage de cas négatifs correctement identifiés:

$$Sp = \frac{VN}{VN + FP}$$

Chaque groupe correspond à la moyenne des mesures, à une concentration donnée, sur une période d'acquisition d'une minute. La solution d'Intralipides sans Bleu Patenté V est utilisée comme groupe de référence. Ce groupe est comparé aux autres groupes, obtenus après injection de colorant.

La figure 5.6.b, montre les courbes ROC des groupes G1 à G3, pour les trois concentrations de colorant utilisées afin de définir la sensibilité de détection de notre sonde : $1,0 \cdot 10^{-2}$; $2,0 \cdot 10^{-2}$ et $3,0 \cdot 10^{-2} \mu\text{mol.L}^{-1}$. Les courbes Gref vs G3, Gref vs G2 et G1 représentent l'analyse ROC du groupe de référence, de concentration nulle, par rapport au groupe dont la concentration de Bleu Patenté V est respectivement égale à 1,0 ; 2,0 et $3,0 \cdot 10^{-2} \mu\text{mol.L}^{-1}$. Les analyses des courbes Gref vs G2 et G1 indiquent déjà une bonne sensibilité/spécificité de détection du colorant. Par définition l'aire sous la courbe ROC représente la probabilité d'identifier correctement le cas avec anomalie quand un cas avec et un cas sans anomalie sont présentés simultanément à un observateur. Ainsi plus cette aire est proche de 1 plus l'ensemble des données analysées sera discriminant par rapport à l'ensemble de référence. Dans notre cas l'aire sous la courbe ROC Gref v G3 est supérieure à 0,90. Par conséquent,

notre seuil de détection peut être fixé à $3,0 \cdot 10^{-2} \mu\text{mol.L}^{-1}$ par cette analyse ROC. Ce résultat est conforme à celui obtenu par analyse des erreurs de mesure, mais apporte en plus une information sur sa spécificité de la détection. Le seuil de détection ainsi estimé est nettement inférieur au seuil de détectivité de l'œil établi avec ce modèle à $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

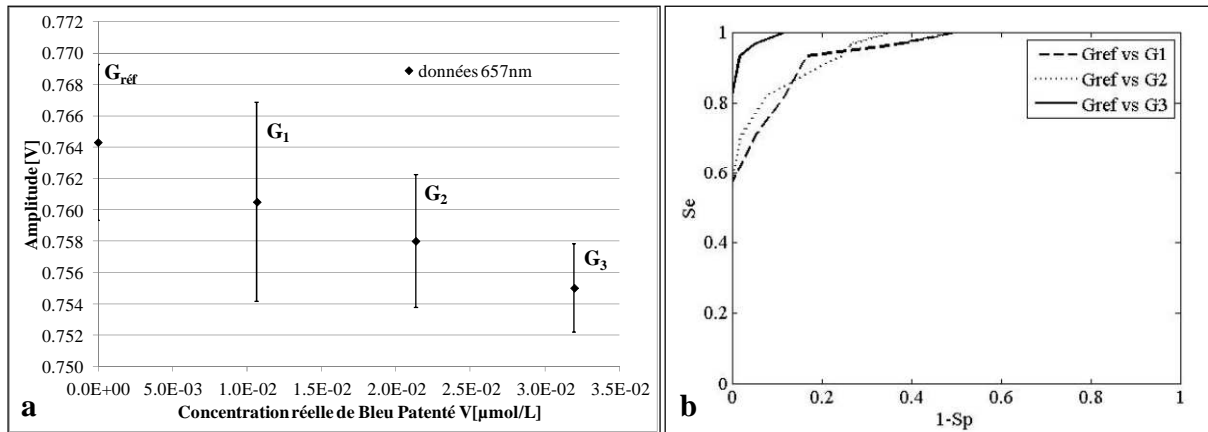


Figure 5.6 : Recherche du seuil de détection de la sonde à longueurs d'onde par deux méthodes : graphique (a) et statistique par la méthode des courbes ROC (b).

Les mesures optiques ont été réalisées sur des fantômes dans le but de tester les performances de notre instrument en utilisant des objets de propriétés optiques (coefficients d'absorption et diffusion réduite). Elles ont également permis de vérifier que le modèle de Berr-Lambert modifié peut être utilisé pour des concentrations inférieures à $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Le seuil de détection avec l'instrumentation développée est très nettement inférieur à celui de l'œil. Si ce seuil est facile à déterminer sur des objets simples homogènes, il apparaît plus complexe à évaluer sur des mesures in-vivo. Nous allons toutefois démontrer les performances de notre appareil sur un modèle animal, et sa capacité à détecter des faibles quantités de colorant, invisible à l'œil, à travers la peau et les poils de l'animal.

5.2.4 Expérimentation animale

Afin de réaliser la validation de l'appareil dans des conditions expérimentales in-vivo, nous nous sommes proposé de détecter des ganglions lymphatiques sur un modèle d'inflammation, après marquage par le colorant Bleu Patenté V. La méthode utilisée est résumée dans le paragraphe IV.3 du chapitre 4.

La localisation anatomique des ganglions lymphatiques chez le rat est représentée sur la figure 5.7. Les injections du colorant sont réalisées dans le coussinet plantaire arrière gauche de l'animal à J10 post immunisation. L'étude de son système lymphatique nous permet de savoir quels ganglions seront sollicités prioritairement. En effet, M. I. Harrel nous indique

que, lors de ce type d'injection, les ganglions poplité, inguinal et illiaque seront drainés en priorité (2).

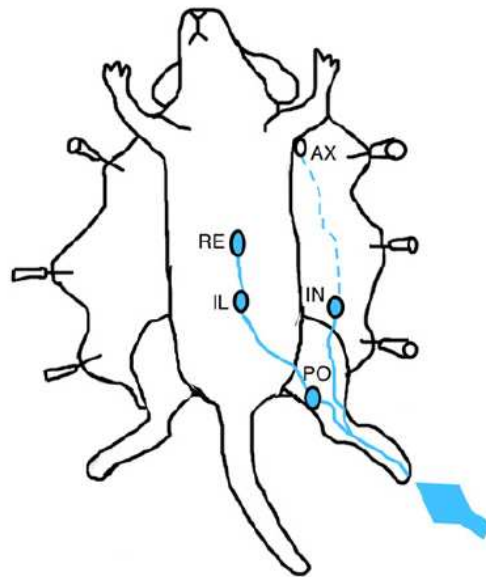


Figure 5.7 : Schéma représentant la distribution du colorant (lors d'une injection au niveau de la patte) dans les ganglions lymphatiques poplité (PO), inguinal (IN), illiaque (IL) et rénal (RE) chez un rat adulte disséqué (3)

Ainsi, dans les résultats présentés ci-dessous, les études de cinétique du colorant ont été faites sur plusieurs animaux mais toujours en regard du ganglion inguinal. La seconde partie consacrée à la recherche de ganglions se limitera à la recherche des ganglions indiqués par Harrel.

Lors de chaque expérience la détection est réalisée à travers la peau et les poils du rat. Il est à noter que les ganglions marqués ne sont pas visibles à travers la peau de l'animal. La figure 5.8 est une photo, prise après détection du ganglion inguinal et épilation de l'animal, montrant clairement que la détection visuelle de ce ganglion n'est pas possible. Dans l'exemple présenté le volume de Bleu Patenté V injecté est de 35 μL . Des résultats similaires ont été observés après injection de 15 μl et 50 μL .



Figure 5.8 : Photographie d'un rat après épilation de la région inguinale. Le ganglion indiqué par le rond bleu n'est pas visible à travers la peau après son marquage par le Bleu Patenté V.

5.2.4.1 Détection de la cinétique du colorant au sein d'un ganglion

Afin de réaliser l'étude cinétique du colorant plusieurs volumes de colorant ont été utilisés allant de 15 μL à 50 μL d'une ampoule de Bleu Patenté V Guerbet à 2,5 %. L'enregistrement des signaux a débuté lors de l'injection du colorant. Il est stoppé lorsque la variation des signaux est considérée comme nulle. Ce temps est variable selon le volume injecté et l'animal mais n'a jamais excédé 35 minutes. Les figures 5.9, 5.10 et 5.11 représentent les variations de signaux à 657 nm, 785 nm et de la concentration relative de Bleu Patenté V après injection de 15 μL , 35 μL et 50 μL à trois animaux différents.

Dans chaque cas, nous remarquons que le signal à 657 nm diminue avant de se stabiliser à une valeur limite liée à l'absorption par le colorant. Ceci permet de mettre en évidence le passage et l'accumulation du colorant dans le ganglion palpé. Les signaux à 785 nm restent stables durant l'expérimentation, la sonde étant statique et le colorant n'absorbant pas à cette longueur d'onde. Les deux signaux sont bruités. On observe d'une part des variations aléatoires autour de la valeur moyenne instantanée, on observe également des pics très brefs et de grande amplitude, essentiellement liés aux mouvements respiratoires de l'animal.

Les courbes représentant les variations de concentrations relatives de Bleu Patenté V augmentent en fonction du temps avant de se stabiliser. Les quantités de colorant sont exprimées comme le produit coefficient β (differential pathlength factor, défini au chapitre 4) par la concentration en $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

Il est possible de séparer les enregistrements obtenus en trois parties. La première, relativement brève (environ 1 minute), représente le temps séparant l'injection du début de l'assimilation du colorant par le ganglion. La seconde partie correspond à l'accumulation du

marqueur dans le ganglion. La durée de cette étape est variable, entre 5 et 25 minutes suivant le volume injecté. Enfin la dernière étape correspond à la période durant laquelle la concentration de colorant ne change plus et correspond à une stabilisation des mesures. La dynamique de variation des signaux augmente avec le volume injecté. En effet cette variation, pour le signal à 657 nm, est de 0,1 V pour une injection de 15 μL , 0,2 V à 35 μL et 0,25 V à 50 μL . Les valeurs limites des concentrations relatives de Bleu Patenté V sont de 2,5 $\mu\text{mol/L}$ après injection de 35 μL et de 6,8 $\mu\text{mol/L}$ après injection de 50 μL . Le plateau n'a pas été atteint lors de l'enregistrement des signaux après injection de 15 μL .

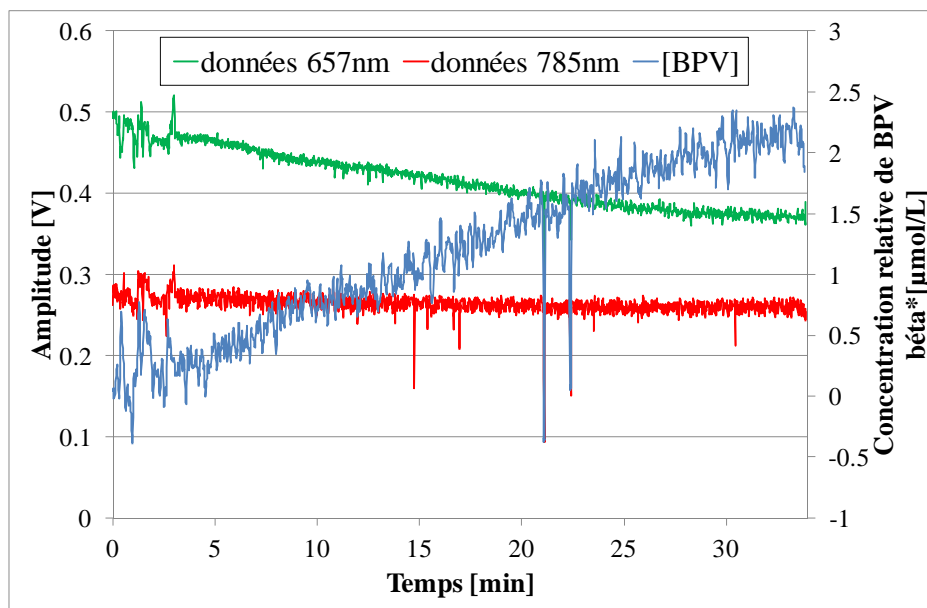


Figure 5.9 : Variations des signaux à 657 nm et 785 nm et de la concentration relative de Bleu Patenté V en regard du ganglion inguinal. Volume injecté : 15 μL

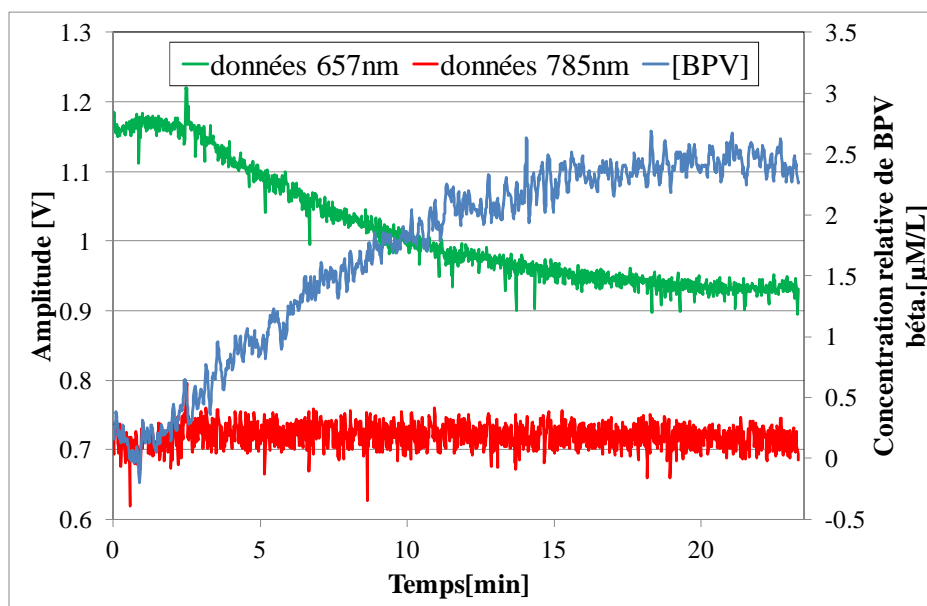


Figure 5.10 : Variations des signaux à 657 nm et 785 nm et de la concentration relative de Bleu Patenté V en regard du ganglion inguinal. Volume injecté : 35 μL .

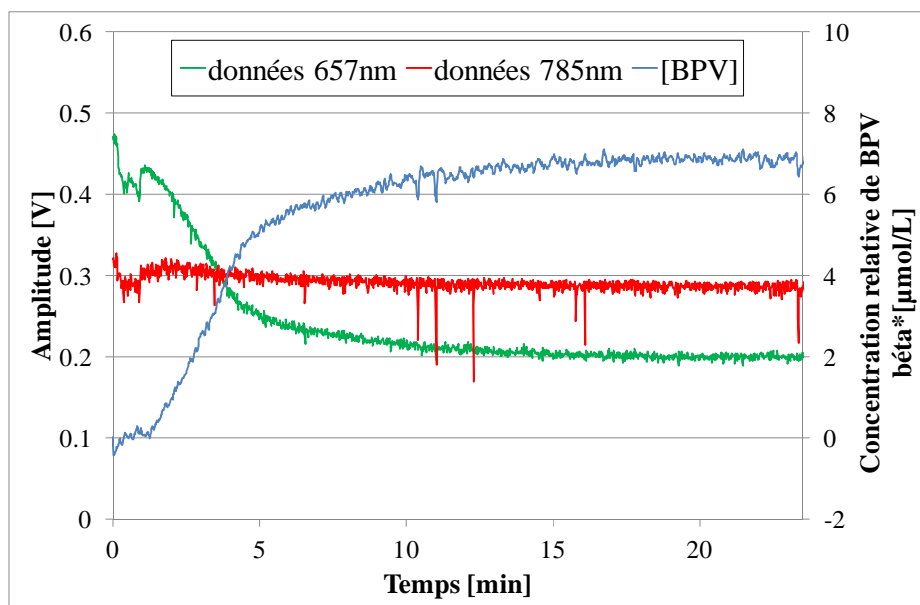


Figure 5.11 : Variations des signaux à 657 nm et 785 nm et de la concentration relative de Bleu Patenté V en regard du ganglion inguinal. Volume injecté : 50 µL

Cette première série de mesures confirme le fait qu'il est possible de détecter le passage et l'accumulation du colorant in-vivo lorsque la sonde est placée en regard d'un ganglion choisi, préalablement détecté par palpation. L'étape suivante consiste à savoir s'il est possible de détecter un ou plusieurs ganglions par déplacement de la sonde sur la peau de l'animal.

5.2.4.2 Recherche de ganglions marqués par le colorant

Afin de réaliser de la localisation spatiale des ganglions inguinal, poplité et iliaque nous avons injecté à un rat un volume de 50 µL de Bleu Patenté V. Le résultat de mesure est représenté sur la figure 5.12 et peut être divisé en 4 parties distinctes, notées de 1 à 4 sur le graphique :

- La première partie, entre 0 et 1 minute, correspond à une période durant laquelle la sonde est placée sur l'animal dans une zone où il n'y a pas de ganglion. Les signaux à 657 nm et 785 nm sont constants et la concentration relative de colorant calculée et proche de 0.
- La seconde partie, entre 1 et 2 minutes, correspond à la période durant laquelle l'utilisateur a déplacé la sonde en regard du ganglion inguinal. On observe une légère diminution du signal à 785 nm (de 0,19 V à 0,16 V) et une diminution beaucoup plus significative de la lumière rétrodiffusée à 657 nm (0,25 V à 0,07 V). Ce phénomène est lié à l'absorption du colorant à 657 nm et traduit la détection du ganglion inguinal

marqué. Cette accumulation du colorant est objectivée par le calcul de la concentration relative du Bleu Patenté V qui indique une valeur moyenne de $11 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

- La troisième partie, entre 2 et 3 minutes, correspond au moment où la sonde est placée dans la zone correspondant au ganglion iliaque. L'amplitude moyenne des deux signaux rétrodiffusés est du même ordre. Celle à 785 nm est proche de la valeur de départ (environ 0,21 V) alors que celle à 657 nm est significativement inférieure à la valeur initiale. Cette diminution, bien qu'inférieure, se traduit aussi par la détection de l'accumulation du colorant au sein du ganglion iliaque et est représentée par le plateau de la courbe de concentration relative de Bleu Patenté V située environ à $4 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Cette concentration, plus faible que la précédente, s'explique simplement par le fait que le ganglion détecté se situe à une distance plus éloignée du point d'injection que le précédent.
- La quatrième partie, entre 3 minutes 30 et 4 minutes 30, correspond à la période durant laquelle la sonde est placée en regardant du ganglion poplité. L'amplitude du signal mesurée à 785 nm est équivalente à celle de la première étape. En revanche le signal à 657 nm à un plateau autour d'une valeur moyenne de 0,18 V inférieure à l'initiale et entre les valeurs mesurées lors de la détection du ganglion iliaque et inguinal. Une nouvelle fois, cette diminution est représentative de la détection d'un absorbeur spécifique à 657 nm : le Bleu Patenté V présent dans le ganglion poplité. La valeur moyenne de concentration mesurée est de $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

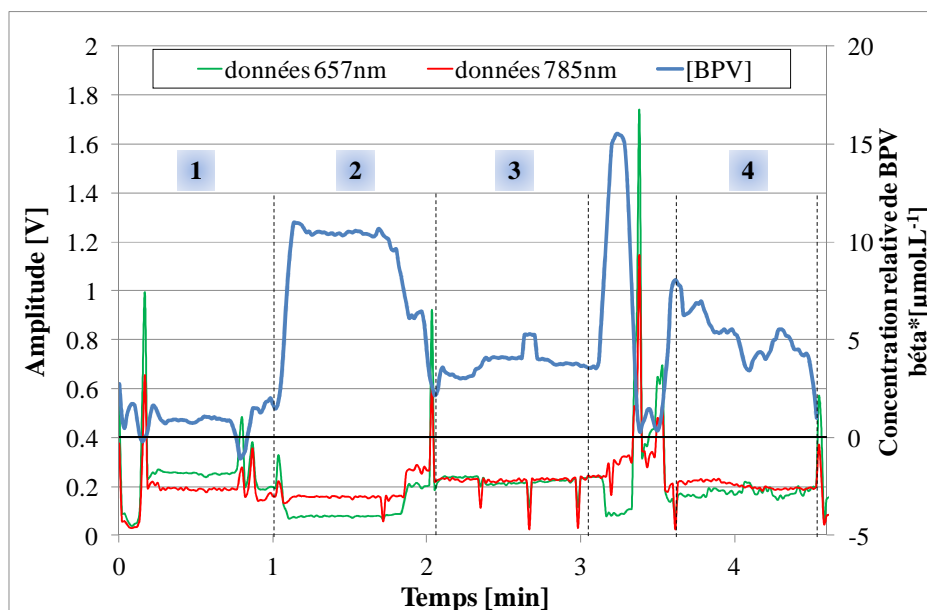


Figure 5.12 : Variation des signaux rétro diffusés à 657 nm et 785 nm de la concentration relative de Bleu Patenté V en fonction du temps lors de la recherche de ganglions

5.2.4.3 Discussion

L'analyse de ces résultats de mesures in-vivo montre que la sonde développée a permis de détecter le passage et l'accumulation du colorant Bleu Patenté V dans plusieurs ganglions. Ceci a été réalisé dans deux situations : d'une part en ayant la sonde en position fixe permettant ainsi d'enregistrer la cinétique du colorant après injection et d'autre part en déplaçant la sonde. Il a ainsi été possible de constater sa distribution spatiale et de localiser différents ganglions (4).

La méthode utilisée a permis la détection de colorant à de très faible concentration. Les variations relatives de concentrations mesurées sont de l'ordre du $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Ces concentrations sont exprimées avec un facteur multiplicatif β . Celui-ci étant de l'ordre de 5 à 10 selon les tissus (5) (6), ce dispositif permet de détecter des concentrations inférieures à 0,1 $\mu\text{mol/L}$.

5.2.5 Détection ex-vivo sur pièces d'exérèse

S'inscrivant dans le développement d'un prototype et au vu des résultats précédents encourageants, une étude préalable a été menée sur différents types de pièces opératoires dès leur arrivée dans le service d'anatomo-pathologie (voir chapitre 4 pour le protocole). Le colorant Bleu Patenté V a ainsi été recherché sur 17 ganglions sentinelles, 3 mastectomies et 1 zonectomie après injection de différents volumes, égaux ou inférieurs à la pratique de l'équipe (tableau 5.2). En effet, pour la recherche du ganglion sentinelle du cancer du sein, le chirurgien injecte usuellement en deux points et en péri-aréolaire une ampoule de 2 mL de Bleu Patenté V sodique à 2,5 % (Guerbet) (7). Dans le cas présent des mesures avec 1mL et 0,5mL ont également été menées.

Pièce opératoire	Nombre	Volume de Bleu Patenté V injecté [mL]		
		2	1	0,5
Ganglion sentinelle	17	5	3	6
Mastectomie	3	1	0	0
Zonectomie	1	1	0	0
TOTAUX	21	7	3	6

Tableau 5.2 : récapitulatif des pièces opératoires analysées

Les figures 5.13, 5.14 et 5.15 représentent les profils des concentrations mesurées sur trois ganglions après injection de 2 mL, 1 mL et 0,5 mL. Sur chaque photo est représentée une flèche noire symbolisant la direction de déplacement de la sonde sur la pièce opératoire.

La première constatation que l'on peut établir concerne l'aspect visuel du ganglion. En effet, le ganglion marqué après injection de 2 mL de Bleu Patenté V apparaît plus bleuté que ceux marqués par 1 mL et 0,5 mL. Pour chaque mesure le protocole est le même. La sonde est placée sur un emplacement de la pièce opératoire autre que celle où se trouve le ganglion ; puis la sonde est déplacée afin de localiser la zone marquée par le colorant. Lorsque le ganglion sentinelle est détecté la sonde est laissée en regard durant un certain laps de temps (entre 15 et 20 secondes suivant l'expérience) puis l'utilisateur se déplace hors de la zone d'intérêt. La durée totale de la manipulation n'a jamais excédé la minute (40 secondes dans les trois exemples sélectionnés). Pour chaque mesure réalisée la sonde a détecté de manière significative les ganglions. La valeur moyenne de la concentration mesurée après injection de 2 mL est de $74,23 \mu\text{mol.L}^{-1} \pm 3,26 \mu\text{mol.L}^{-1}$, Les valeurs sont de $66,84 \mu\text{mol.L}^{-1} \pm 3,02 \mu\text{mol.L}^{-1}$ pour 1 mL et de $60,35 \mu\text{mol.L}^{-1} \pm 2,07 \mu\text{mol.L}^{-1}$ pour 0,5 mL.

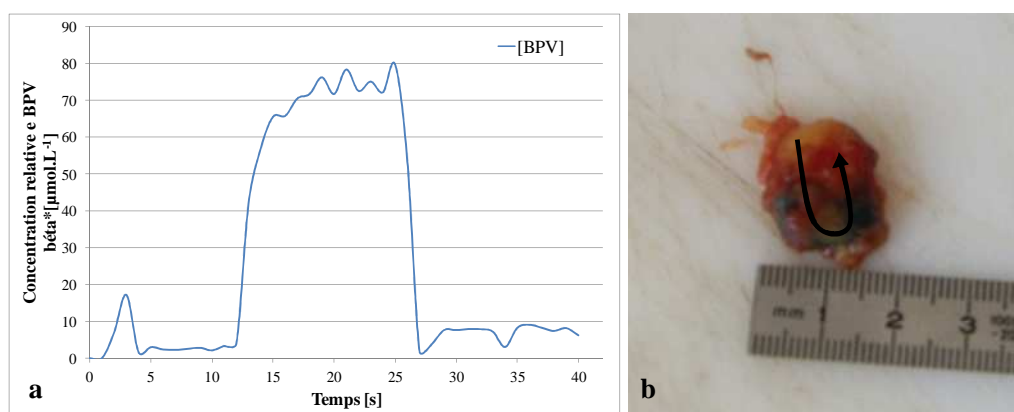


Figure 5.13 : profil de la concentration de Bleu Patenté V mesurée (a) sur un ganglion sentinelle (b) ; volume injecté : 2 mL

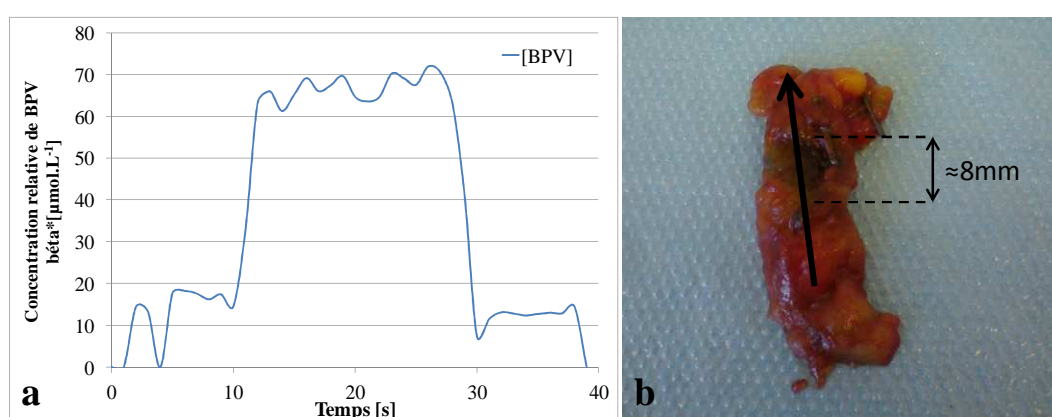


Figure 5.14 : profil de la concentration de Bleu Patenté V mesurée (a) sur un ganglion sentinelle (b) ; volume injecté : 1 mL

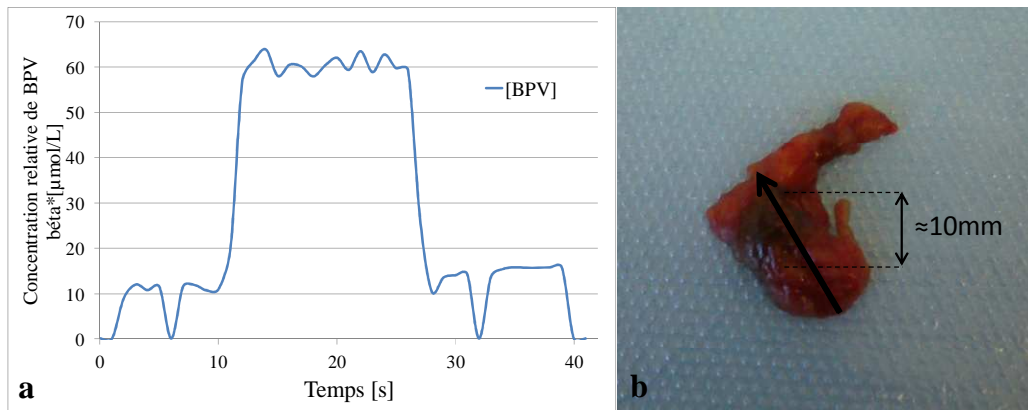


Figure 5.15 : profil de la concentration de Bleu Patenté V mesurée (a) sur un ganglion sentinelle (b) ; volume injecté : 0,5 mL

Parallèlement à ces mesures un essai à pu être mené lors d'une zonectomie. Cette opération consiste en l'exérèse d'une lésion non palpable (de type microcalcification) se trouvant dans le sein (8). La figure 5.16.a représente le profil de la concentration de Bleu Patenté V mesurée lors de l'expérimentation. La manipulation à durée 1 minute environ. Dans le cas présent lorsque la pièce opératoire est arrivée au service d'anatomopathologie la zone marquée par le colorant n'était pas visible (figure 5.16.b (1)). Ainsi les 20 premières secondes de mesures correspondent à la recherche de la zone marquée. Après 20 secondes une augmentation significative de la concentration relative de Bleu Patenté V mesurée est constatée (environ $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$). La sonde est laissée en place durant une trentaine de seconde afin de signaler l'emplacement supposé d'une zone marquée par le colorant au pathologiste (figure 5.16.b (2)). Puis la sonde est retirée afin de réaliser une incision dans la graisse laissant ainsi apparaître la lésion (figure 5.16.b (3)). Cette expérience a permis de détecter avec précision une tumeur marquée par colorimétrie à travers 5 mm de graisse.

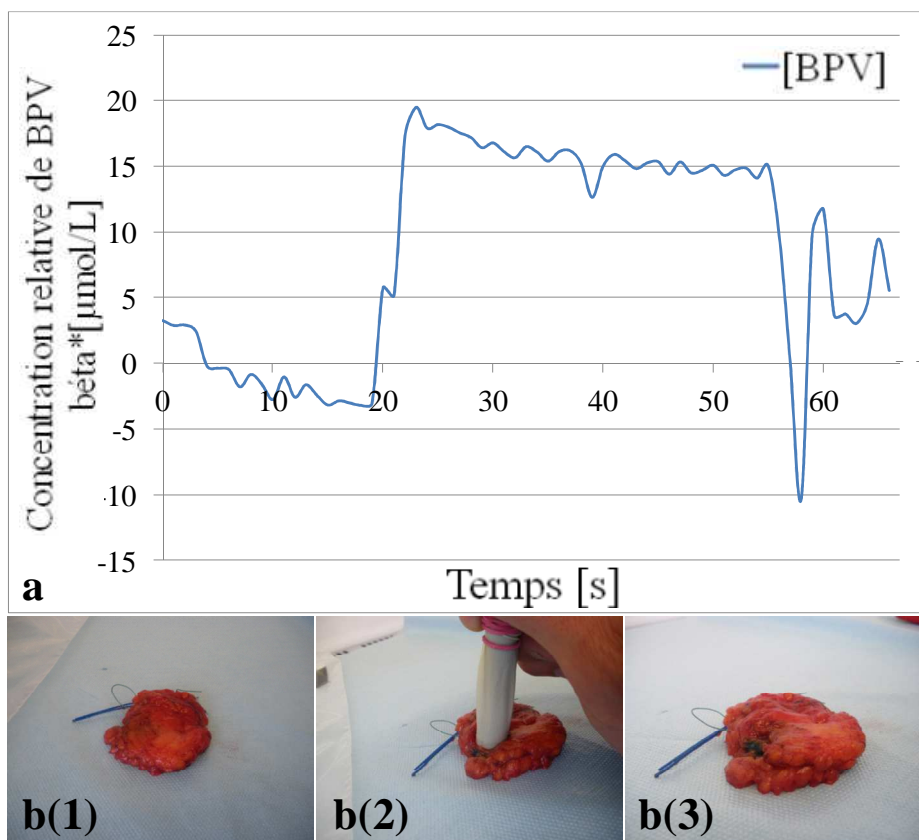


Figure 5.16 : profil de la concentration de Bleu Patenté V mesurée (a) sur une zonectomie (b1, b2 et b3)

5.2.6 Conclusion et discussion concernant le prototype à deux longueurs d'onde

Un instrument pour la détection optique du ganglion sentinelle marqué par un colorant utilisé en pratique clinique a été développé. Il a permis de détecter le colorant Bleu Patenté V dans différents modèles expérimentaux: objets test, animaux et biopsies.

Les expériences réalisées sur objets tests ont permis de détecter des inclusions de Bleu Patenté V de différents diamètres sous une épaisseur de 4 mm de résine simulant l'absorption et la diffusion optique des tissus du sein. Des mesures sur des objets tests liquides ont permis d'établir que le seuil de détection de cet instrument était environ 30 fois inférieur à celui de l'œil. Suite à ces résultats de caractérisation une expérimentation animale a été développée. Celle-ci a permis, lors de deux types d'expérimentations, de mesurer la cinétique du colorant au sein d'un ganglion choisi mais également de réaliser la localisation spatiale de différents ganglions (4). Enfin, des mesures réalisées sur des pièces opératoires ont montré que le prototype développé pouvait détecter des ganglions sentinelles marqués par des volumes de colorant 4 fois inférieurs à ceux habituellement injectés par le praticien (9). Cet instrument a démontré qu'il pouvait apporter à l'équipe médicale une information objective et quantifiée.

Cependant, l'utilisation de deux longueurs d'onde pour la détection par absorption du ganglion sentinelle marqué par le Bleu Patenté V présente certaines limites. En effet, comme évoqué dans le chapitre précédent, l'utilisation de deux longueurs d'onde ne permet pas de séparer les différents chromophores absorbant dans les tissus biologiques. L'absorption des tissus étant principalement due à l'hémoglobine sous ces deux formes oxy- et déoxy-hémoglobine il paraît essentiel d'améliorer ce dispositif pour palier à ce biais. Si ces deux formes de l'hémoglobine ont des coefficients d'extinction molaire proches à 785 nm, il n'en est pas de même à 657 nm. A cette longueur d'onde, l'absorption de la déoxy-hémoglobine est significativement supérieure à celle de l'oxy-hémoglobine. Ainsi, une désaturation du sang se traduira par une augmentation de l'absorption à 657 nm et sera interprétée comme une augmentation de la concentration en colorant.

Afin de résoudre ce problème un second instrument a été développé. La partie suivante est consacrée à la description des résultats obtenus avec celui-ci.

5.3 Détection à quatre longueurs d'onde

5.3.1 Rappel rapide sur la méthode

Un second prototype utilisant 4 longueurs d'onde, et fonctionnant sur le même principe physique que le premier, a été développé. Pour mémoire, les deux lasers émettant à 657 nm et 785 nm ont été maintenus et deux diodes laser supplémentaires, à 689 nm et 850 nm, ont été ajoutées afin d'éviter un biais dans la détection du Bleu Patenté V. Le traitement du signal réalisé est également basé sur le même principe.

La suite de cet exposé sera consacrée à la présentation des résultats de caractérisation de l'instrumentation à 4 longueurs d'onde. Après validation sur objets tests, des expérimentations animales et des mesures sur des pièces opératoires ont été réalisées.

Le code couleur utilisé dans ce paragraphe est le suivant : en vert les données mesurées à 657 nm, en orange à 689 nm, en rouge à 785 nm, en violet à 850 nm et en bleue celles représentant la concentration relative de Bleu Patenté V.

5.3.2 Détection d'inclusions sur fantômes solides

Comme nous l'avons réalisé avec la sonde à 2 longueurs d'onde, une étude sur la possibilité de détecter des inclusions colorées a été réalisée sur un milieu diffusant. Le second objet test en résine décrit dans le chapitre 4 a été utilisé à cette fin. Ce fantôme a pour propriétés optiques : $\mu_a = 0,005 \text{ mm}^{-1}$ et $\mu'_s = 0,9 \text{ mm}^{-1}$ (10). Il contient 12 inclusions

contenant du Bleu Patenté V réparties sur 3 lignes d'égalles concentrations : $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (ligne 1), $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (ligne 2) et $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (ligne 3). Chaque ligne est constituée de 4 inclusions de hauteur égale à 10 mm, dont la face supérieure est située à 4 mm sous la surface de l'objet, et de diamètres variables : 12 mm, 10 mm, 8 mm et 6 mm (figure 5.17).

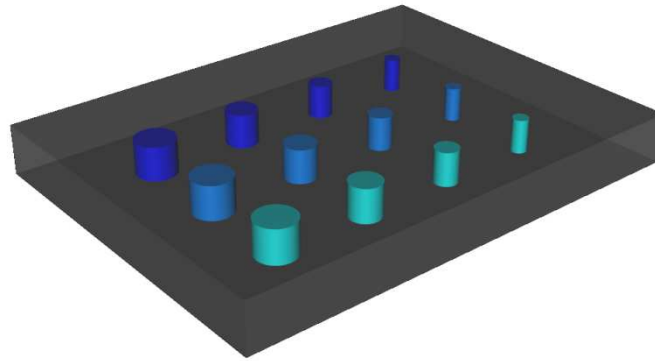


Figure 5.17 : schéma 3D de l'objet en résine avec des inclusions de Bleu Patenté V à trois concentrations et quatre diamètres différents.

Afin de détecter ces inclusions nous utilisons le même protocole que celui utilisé pour la caractérisation de l'appareil à 2 longueurs d'onde. La sonde inox est fixée sur le montage décrit dans le paragraphe I.2. Elle est déplacée à la surface de l'objet par pas de 2 mm en regard des 3 lignes contenant les inclusions. Ainsi les résultats illustrés Les figures 5.18.a, b et c correspondent aux données mesurées sur chaque ligne. Chaque point représente la moyenne, et la barre d'incertitude l'écart type, de la mesure effectuée durant 30 secondes.

Les 12 inclusions ont été détectées. Les concentrations moyennes obtenues sont de : $4,2 \mu\text{mol.L}^{-1} \pm 0,4 \mu\text{mol.L}^{-1}$ pour la première ligne, $3,7 \mu\text{mol.L}^{-1} \pm 0,3 \mu\text{mol.L}^{-1}$ pour la seconde et $1,2 \mu\text{mol.L}^{-1} \pm 0,3 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Ces résultats indiquent bien une diminution de la concentration relative moyenne entre chaque ligne même si les proportions entre chacune ne sont pas conservées. Une seconde remarque peut être apportée concernant la détection des inclusions : leur détection devient plus délicate lorsque la taille diminue. Ceci s'observe essentiellement sur les inclusions de 6 mm.

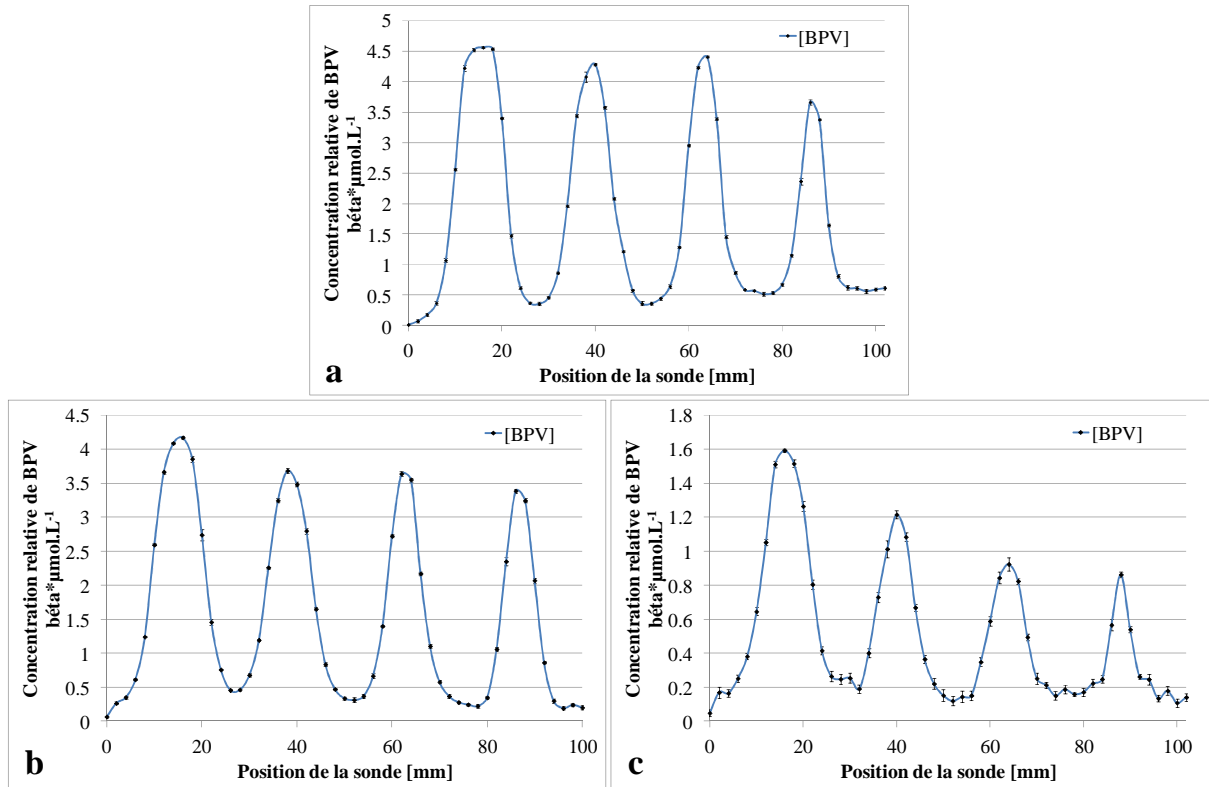


Figure 5.18 : Profils des concentrations relatives de Bleu Patenté V mesurées en fonction de la position de la sonde lors de son déplacement sur l'objet en regard des inclusions de la première ligne (a) de la seconde (b) et de la troisième (c)

Il est possible de calculer la largeur à mi-hauteur, FWHM, de chacun des profils obtenus. Le tableau 5.3 présente ces FWHM ainsi que l'écart à la taille réelle de l'inclusion correspondante. Ainsi nous observons pour les 4 inclusions de la première ligne, où la concentration est la plus élevée, que l'écart entre la taille réelle et la mesure est faible. Les écarts plus importants, obtenus lors des mesures réalisées sur la troisième ligne de faible concentration, s'expliquent également par le fait que la résine s'est fissurée lors du perçage de l'objet, modifiant ainsi très certainement les dimensions du volume occupé par le colorant.

Taille réelle inclusions	Ligne 1		Ligne 2		Ligne 3	
	FWHM [mm]	Ecart [mm]	FWHM [mm]	Ecart [mm]	FWHM [mm]	Ecart [mm]
12	11,5	-0,5	12	0	11	-1
10	9,5	-0,5	10,4	+0,4	8,9	-1,1
8	8	0	7,75	-0,25	9,2	+1,2
6	6,5	+0,5	7,45	+1,45	5,45	-0,55

Tableau 5.3 : Taille réelle, FWHM et écart mesurés en fonction de la taille et de la concentration des inclusions.

Finalement nous pouvons conclure que malgré ces écarts l'appareil est capable, au même titre que le premier prototype, de détecter ces inclusions situées à 4mm de la surface, pour des

concentrations aussi faibles que 10 $\mu\text{mol/L}$. Les concentrations relatives de colorant affichées par l'appareil sont nettement inférieures aux valeurs vraies et correspondent à des valeurs moyennes sur le volume total exploré par les photons, nettement supérieur à celui des inclusions dans les trajectoires des photons détectés. On note également que les concentrations maximales mesurées diminuent avec le volume des inclusions. Cette diminution est particulièrement marquée pour les inclusions les moins concentrées.

5.3.3 Caractérisation sur objets tests liquides

Dans le but de caractériser cet instrument et de la comparer au premier prototype, des expériences ont été menées sur des objets tests liquides. Ces fantômes sont constitués d'une solution de base d'Intralipides 1% à laquelle nous ajoutons de l'encre de Chine afin de simuler l'absorption et la diffusion des tissus du sein. Les coefficients d'absorption et de diffusion choisis sont les mêmes que pour l'objet en résine précédant à savoir : $\mu_a = 0,005 \text{ mm}^{-1}$ et $\mu'_s = 0,89 \text{ mm}^{-1}$.

La figure 5.19 représente les données enregistrées à 657 nm, 680 nm, 785 nm, 850 nm et la concentration relative de Bleu Patenté V calculée lors d'injections successives de colorant dans la solution d'étude. La concentration réelle de colorant a ainsi augmenté de 0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ à 0,3 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Chaque point représente la moyenne des mesures effectuées sur 1 minute. Les écarts types sur les mesures ne sont pas représentés sur cette figure car trop faibles pour être visualisés.

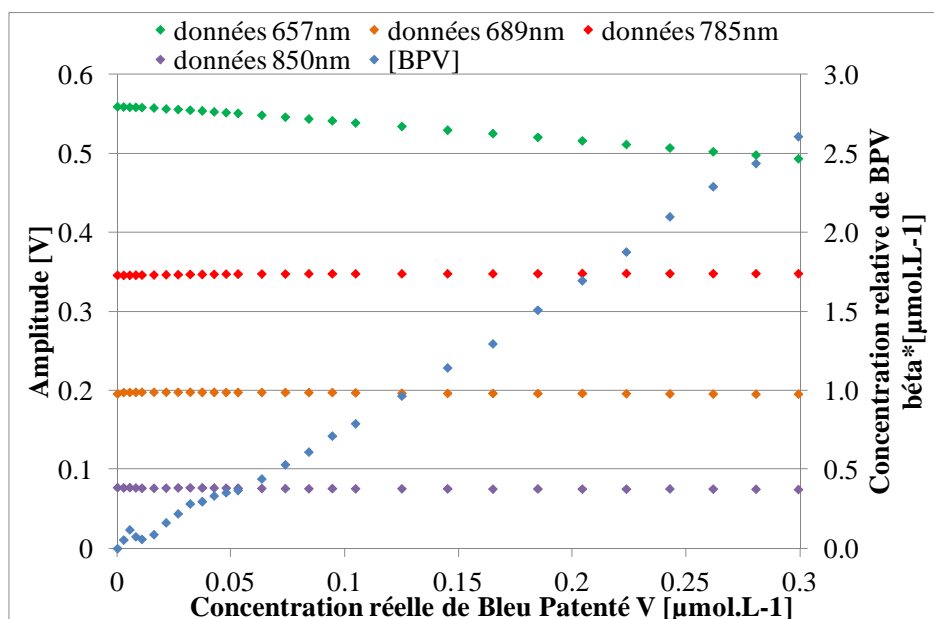


Figure 5.19 : Signaux rétrodiffusés aux 4 longueurs d'onde et concentration relative de Bleu Patenté V en fonction de la concentration réelle de colorant.

L'analyse statistique de la distribution des écarts types, par longueur d'onde, des mesures à concentration de colorant croissante donne les résultats suivants : $3,4 \cdot 10^{-4} \text{ V} \pm 1,9 \cdot 10^{-4} \text{ V}$ à 657 nm, $3,8 \cdot 10^{-4} \text{ V} \pm 4,7 \cdot 10^{-4} \text{ V}$ à 689 nm, $1,6 \cdot 10^{-4} \text{ V} \pm 4,2 \cdot 10^{-5} \text{ V}$ à 785 nm et à 850 nm $5,2 \cdot 10^{-4} \text{ V} \pm 4,5 \cdot 10^{-4} \text{ V}$.

L'expérience a été arrêtée lorsque la coloration de la solution était visible. Nous observons une diminution progressive du signal rétrodiffusé à 657nm lorsque la concentration de Bleu Patenté V augmente alors que les intensités des 3 autres signaux peuvent être considérées comme constantes. Les variations des données à 657 nm peuvent être modélisées selon le modèle de Beer-Lambert modifié (figure 5.21), avec une bonne qualité d'ajustement. La concentration relative de colorant (concentration vraie multipliée par le differential pathlength factor β) calculée augmente linéairement. En effet une régression linéaire de ces données conduit à l'expression d'une droite d'équation $y = 8,6x - 5 \cdot 10^{-4}$ avec un coefficient de corrélation $R^2 = 0,99$. La valeur de 8,6 correspond à un coefficient β dans le domaine communément admis.

A partir des résultats enregistrés pour le signal à 657 nm il est possible, comme cela a déjà été réalisé pour l'appareil à 2 longueurs d'onde, de déterminer le seuil de détection du prototype à 4 longueurs d'onde. Les deux méthodes décrites auparavant ont été reprises. La première consiste à déterminer graphiquement la première valeur en dehors du bruit de la mesure de référence. La seconde méthode utilise les courbes ROC. Les résultats des 2 méthodes d'analyse sont représentés sur les figures 5.20.a et 5.20.b. Dans les deux cas, le groupe de données de référence correspond à la mesure du signal avant injection de Bleu Patenté V. Selon la méthode graphique, nous observons que dès la troisième mesure, la valeur moyenne calculée (plus ou moins deux fois son écart type) paraît significativement différente de la mesure initiale. Ceci est confirmé par la méthode des courbes ROC. En effet, la courbe du groupe de mesure 3, comparé au groupe de référence, n'est pas visible car il permet de faire une discrimination parfaite (aire sous la courbe ROC égale à 1). Ainsi, avec les deux méthodes le seuil de détection a été estimé à $8 \cdot 10^{-3} \mu\text{mol.L}^{-1}$ pour une puissance de 1 mW environ. Ce seuil résulte principalement du rapport signal à bruit des mesures. Ce rapport peut être amélioré, si nécessaire, de plusieurs manières. La première consiste à augmenter la puissance lumineuse utilisée, tout en respectant les normes de sécurité laser ou la durée d'une mesure. Il est également possible de réduire le bruit, en améliorant la chaîne de détection : détecteur et électronique associée ou en réalisant un filtrage numérique du signal. Une troisième méthode consisterait à utiliser des voies de détection synchrone sur chacun des signaux, plutôt qu'une analyse de Fourier.

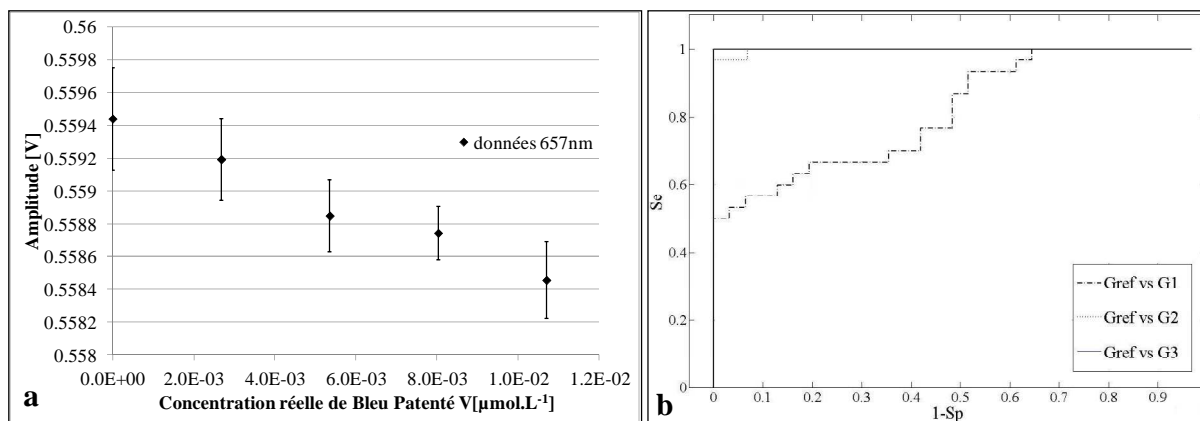


Figure 5.20 : Détermination du seuil de détection : comparaison des amplitudes successives (a) et courbes ROC (b).

Avec l'instrumentation détaillée au chapitre 4, les seuils de visibilité obtenus sont inférieurs à 10 nmol.L^{-1} . Par comparaison, le seuil de visibilité de l'œil est estimé à $0,3 \text{ µmol.L}^{-1}$. Il est intéressant de comparer ces résultats à ceux obtenus par une méthode similaire, avec l'appareil à 2 longueurs d'onde, mais sur des solutions contenant dix fois plus d'encre de Chine. Les seuils de détection, avec l'instrumentation et visuellement, étaient respectivement de 30 nmol.L^{-1} et de 1 µmol.L^{-1} . Dans les deux cas, on retrouve un gain de sensibilité voisin de 30, en utilisant une instrumentation optique, plutôt que la seule inspection visuelle. Mais la valeur absolue du seuil de détection du Bleu Patenté V dépend également des propriétés optiques du milieu dans lequel il est recherché.

Nous allons maintenant tenter de démontrer l'apport de l'approche à 4 longueurs d'onde, en comparant des résultats obtenus avec cet instrument, mais en exploitant soit toutes les données, soit seulement celles à 657 et 785 nm, les 2 longueurs d'onde de l'appareil de première génération.

La figure 5.21 représente une comparaison entre les concentrations relatives de Bleu Patenté V calculées à partir des données à 2 et 4 longueurs d'onde. Les pentes, correspondant aux coefficients β , des deux droites obtenues sont proches. Comme il n'est guère possible de connaître la valeur vraie de β d'une part, et qu'il est impossible de réaliser des mesures absolues sur des objets inhomogènes, aucune amélioration de la qualité des résultats, associée au passage de 2 à 4 longueurs d'onde ne peut être observée avec cette expérience. Ceci s'explique simplement par le fait qu'il n'y a que deux espèces absorbantes dans la solution d'Intralipides (Bleu Patenté V et encre de Chine), et qu'une analyse à deux longueurs d'onde est suffisante.

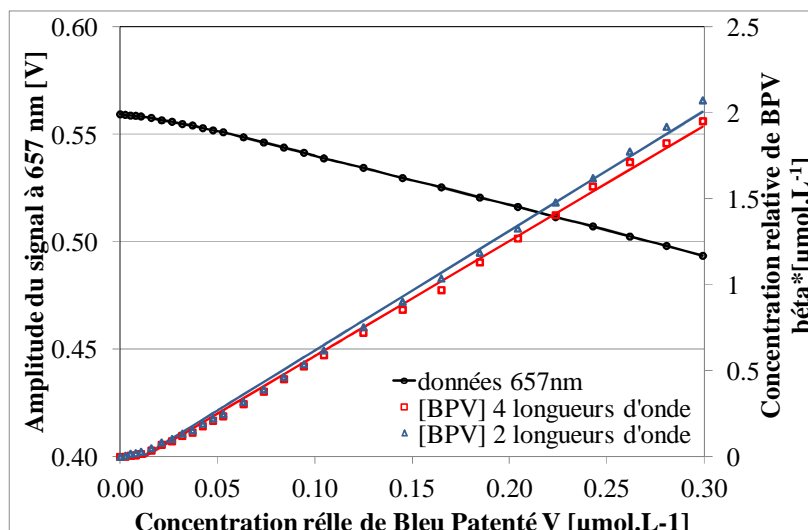


Figure 5.21 : Signaux rétrodiffusés à 657nm : résultats expérimentaux et données ajustées à l'aide du modèle de Beer-Lambert modifié, après des injections successives de Bleu Patented V. Concentrations de Bleu Patented V calculées à partir des données 2 (■) et 4 (Δ) longueurs d'onde.

Afin de démontrer que l'utilisation d'un appareil à quatre longueurs d'onde peut corriger des erreurs de mesure de la concentration de Bleu Patented V dues à des variations de concentrations d'autres chromophores, il est nécessaire d'utiliser plus de 2 espèces absorbantes. L'expérience suivante a ainsi été réalisée. Nous avons successivement ajouté dans les suspensions d'Intralipides décrites précédemment, du Bleu Patented V et du vert d'indocyanine (ICG). Les spectres d'absorption des deux colorants sont comparés en figure 5.22.

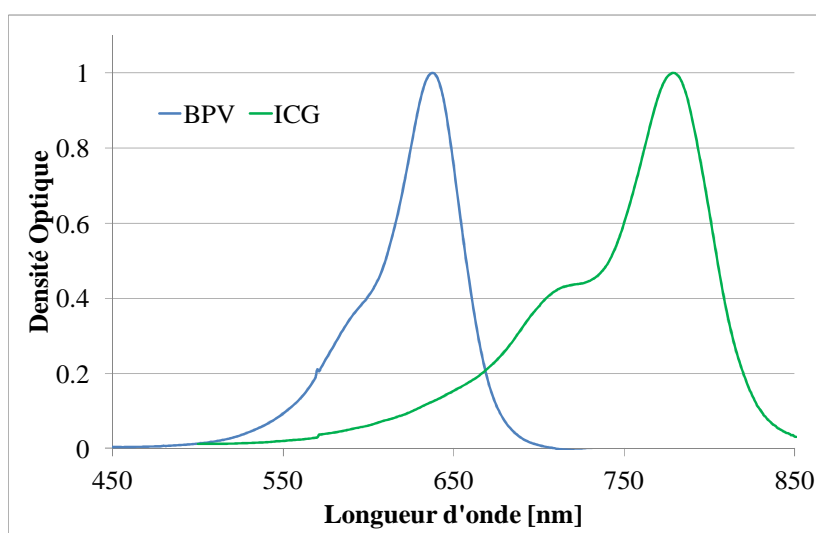


Figure 5.22 : Spectres d'absorption normalisés du Bleu Patented V (bleu) et du Vert d'Indocyanine (Vert).

Les résultats obtenus après injections de colorant sont présentés sur la figure 5.23. Chaque point est la valeur moyenne obtenue lors d'une minute d'acquisition. Nous comparons le calcul

des concentrations de Bleu Patenté V obtenues en utilisant deux longueurs d'onde (657 nm et 785 nm) (Fig.5.23.a) avec celles en utilisant quatre longueurs d'onde (Fig.5.23.b). Dans le premier cas, le calcul est faussé par la différence d'absorption entre l'ICG et l'encre de Chine. Mathématiquement, ce cas correspond à la résolution d'un ensemble de deux équations, alors que le problème possède en fait trois inconnues. Lorsque le calcul des concentrations est réalisé à partir des données à quatre longueurs d'onde, les absorptions des colorants sont bien séparées. Ceci s'observe par le fait que lorsque l'on injecte de l'ICG, la concentration de Bleu Patenté V calculée à partir des données à deux longueurs d'onde diminue au lieu de rester constante. Ceci n'est pas le cas lorsque l'on utilise les 4 longueurs d'onde.

Dans ce cas, les concentrations de Bleu Patenté V et d'ICG calculées varient linéairement en fonction des concentrations réelles des colorants. Les valeurs mesurées sont égales aux valeurs vraies multipliées par des coefficients β égaux à 6,7 et 3,8, pour le BPV et l'ICG respectivement. La différence entre les deux valeurs de β peut être attribuée à la dépendance du coefficient de diffusion vis-à-vis de la longueur d'onde. Une seconde explication réside dans les modifications des coefficients d'extinction molaires des deux colorants dues à leur liaison possible avec les intralipides en suspension.

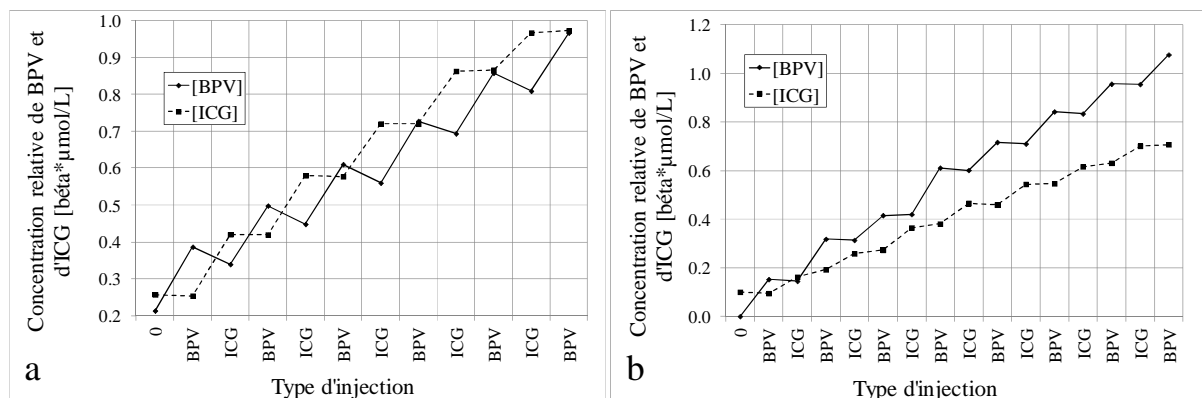


Figure 5.23 : concentrations relatives de Bleu Patenté V et d'ICG calculées en utilisant 2 longueurs d'onde (a) et 4 longueurs d'onde (b).

5.3.4 Expérimentation animale

Afin de valider in-vivo le fonctionnement de cette sonde un protocole expérimental basé sur la détection d'un ganglion dans le modèle inflammatoire d'EAE a de nouveau été mené. Les résultats d'une expérience type sont visibles sur la figure 5.24.a. Celle ci représente les profils aux 4 longueurs d'onde des signaux rétrodiffusés ainsi que la concentration relative de Bleu Patenté V. Dans le cas présent l'animal s'est vu injecté 50 µL de Bleu Patenté V (2,5 %

Guerbet) dans le coussinet plantaire arrière droit. Préalablement la sonde avait été placée en regard d'un ganglion sélectionné par palpation : le ganglion inguinal (figure 5.24.b).

La position de l'animal est instable durant la première minute, à cause de l'injection qui a lieu de 0 à 30 secondes. Les signaux sont exploitables à compter de $t = 1$ minute. Environ 20 secondes après, la sonde détecte le passage du colorant. Le signal à 657 nm, spécifique de l'absorption du Bleu Patenté V diminue alors que les 3 autres restent constants durant les 15 minutes de l'expérience. Ceci se traduit par le résultat observé sur la courbe bleue : une augmentation de la concentration relative de Bleu Patenté V permettant de visualiser le passage et la fixation du marqueur dans le ganglion.

La cinétique d'évolution et la concentration limite de Bleu Patenté V dans le ganglion inguinal dépend de l'animal étudié. Les figures 5.11 (à 2 longueurs d'onde) et 5.24 (à 4 longueurs d'onde) montrent que les constantes de temps d'accumulation sont de l'ordre de quelques dizaines de minutes et que les concentrations relatives limites sont de l'ordre de $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ après injection de $50 \mu\text{L}$ de Bleu Patenté V Guerbet. Les signaux aux trois longueurs d'onde non absorbées par le colorant restent stables dans les expériences où la sonde reste fixe. La sonde à 4 longueurs d'onde n'apporte donc aucune amélioration en ce cas.

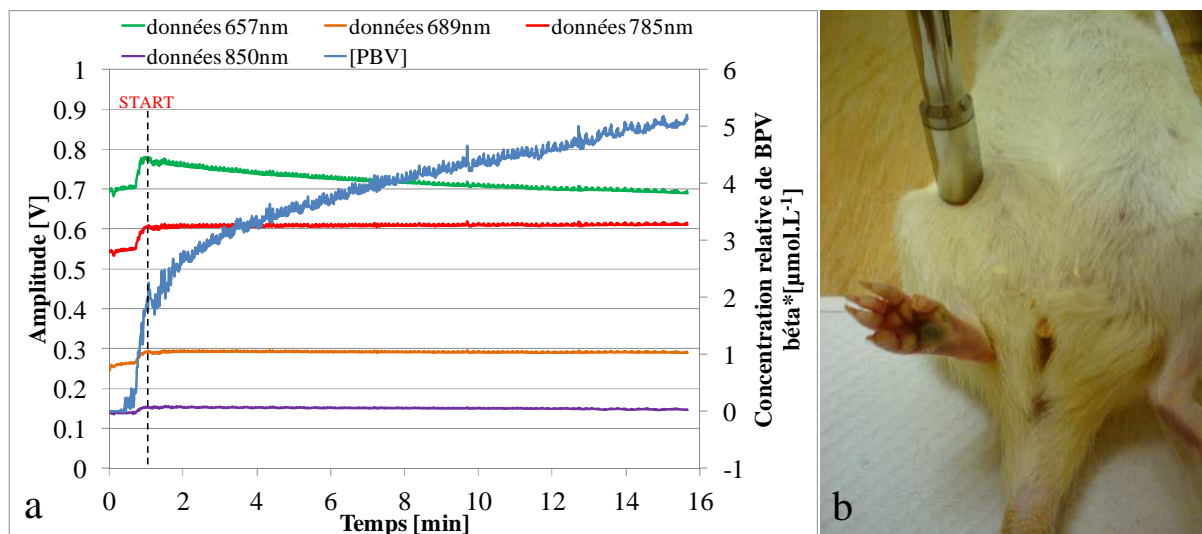


Figure 5.24 : Recherche du ganglion inguinal : variation des signaux rétrodiffusés aux 4 longueurs d'onde et de la concentration relative de Bleu Patenté V en fonction du temps (a) après injection de $50 \mu\text{L}$ de colorant dans la patte du rat.

5.3.5 Validation clinique

5.3.5.1 Méthode et patients

Cette étude prospective a été réalisée entre Novembre 2010 et Mars 2011 dans le département d'anatomo-pathologie du Centre anticancéreux Paul Strauss à Strasbourg. La

raison de cette étude sur des pièces d'exérèse est que le prototype utilisé n'a pas encore été autorisé par les autorités pour une utilisation en salle d'opération.

Cette étude préliminaire a été menée auprès de 24 patients. Tous les patients étaient des femmes ayant un cancer du sein invasif. Ce diagnostic a été réalisé par une biopsie préopératoire. L'âge moyen des patientes était de 57 ans (extrêmes: 41-79). Les critères d'exclusion étaient : les patientes étant en cours de grossesse, ayant un carcinome canalaire in situ, des tumeurs multicentriques, des tumeurs inflammatoires et un cancer du sein hyper métastatique.

Le protocole d'injection des deux marqueurs (isotopique et colorimétrique) est expliqué dans le chapitre 4. Afin d'obtenir des pièces chirurgicale marqués par le Bleu Patenté V visibles et invisibles à l'œil, le volume d'injection a été diminué progressivement de 2 ml (1 patiente), à 1 ml (3 patientes), à 0,5 mL (2 patientes) et enfin 0,25 ml (16 patientes). En outre, 2 patientes, n'ayant subi aucune injection de colorant ont été incluses dans le protocole comme témoins. La peau a été incisée au niveau du creux axillaire et une dissection minutieuse a été réalisée pour rechercher les ganglions lymphatiques. Une sonde peropératoire isotopique (Europrobe, EURORAD SA, France) a été utilisé pour aider et guider la dissection. Les ganglions sentinelles ont été identifiés in vivo suivant une des trois caractéristique suivantes : ils étaient bleus, avaient un comptage isotopique positif ou présentaient les deux caractéristiques. Ainsi l'analyse des données accumulées se base sur une comparaison des taux de détection des deux sondes : la sonde isotopique au bloc opératoire et la sonde optique en post-opératoire. Une fois les ganglions excisés, les pièces anatomiques arrivées au département de pathologie ont été analysées dans un délai moyen de 2 minutes. Le prototype optique a été utilisé sur chaque pièce pour détecter et localiser le ganglion sentinelle par l'accumulation de colorant. Cette mesure a été effectuée avant l'examen pathologique extemporané. Les pathologistes ont été consultés pour savoir s'ils pouvaient détecter visuellement les ganglions lymphatiques colorés en bleu. Ces évaluations visuelles ont été comparées avec l'information objective fournie par l'instrumentation optique.

5.3.5.2 Résultats de détection

En considérant les 24 patientes, les résultats accumulés ont porté sur un total de 78 ganglions sentinelles tous détectés par la sonde isotopique. Huit de ces ganglions obtenus par détection isotopique exclusive, car les patientes n'avaient pas reçu de colorant, ont été utilisés pour valider la spécificité de la méthode optique. Il n'a pas été possible de détecter la présence de colorant sur ces 8 pièces opératoires.

Pour la suite de cet exposé, seuls les résultats obtenus sur les 70 pièces excisées après marquage par le Bleu Patenté V, seront considérés. Tous ces ganglions ont été détectés par la sonde optique, indépendamment du fait que la coloration de la pièce opératoire était visible par l'œil du chirurgien ou non. 3 ganglions sentinelles ont été détectés après l'injection d'une ampoule de 2 ml de colorant (2,5 % Guerbet), 7 après 1 ml, 6 après 0,5 ml et 54 après 0,25 mL (tableau 5.4).

	N	Volume de Bleu Patenté V injecté [mL]				
		V = 0	V = 0,25	V = 0,5	V = 1	V = 2
Patientes	24	2	16	2	3	1
Ganglions sentinelles	78	8	54	6	7	3
Chauds et non visibles	17	0	16	1	0	0

Tableau 5.4 : répartition des nombre de patientes, de ganglions sentinelles et de ganglions chauds et non bleus en fonction du volume de colorant injecté

La première conclusion à propos de ces essais est que pour chaque pièce chirurgicale et chaque volume d'injection de Bleu Patenté V l'appareil optique a été capable de détecter la présence du colorant dans les échantillons de tissus ; alors que 53 ganglions (68 %) seulement ont été détectés comme visuellement colorés par le chirurgien. En effet, 1 ganglion excisé après injection de 500 µL et 16 pour des injections de 250 µL n'ont été détecté au bloc opératoire qu'avec l'aide de la sonde isotopique.

La figure 5.25 permet de visualiser les variations de coloration d'une pièce opératoire en fonction du volume de colorant injecté, sur 4 exemples de pièces opératoires, pour chacun des 4 volumes concernés. Nous constatons que lorsque le volume diminue il parait effectivement difficile de distinguer le ganglion sentinelle de la graisse qui l'entoure.

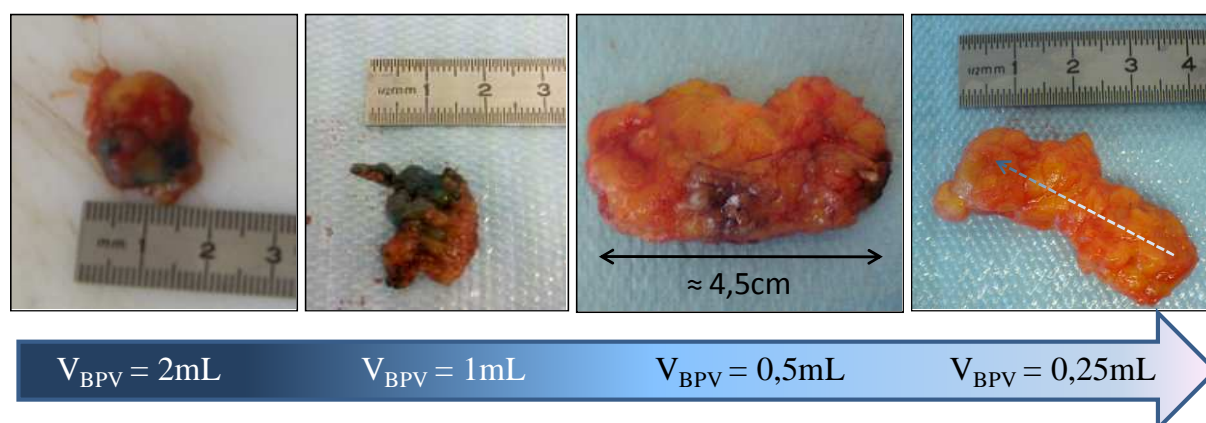


Figure 5.25 : variation de coloration du ganglion sentinelle en fonction de volume de Bleu Patenté V injecté

Il faut également noter que des différences significatives peuvent être constatées entre des biopsies marquées par le même volume de colorant. Par exemple, si l'on compare les deux

pièces opératoires obtenues après injection de 500 μL de colorant, présentées sur la figure 5.25 ci-dessus et celle présentée dans le paragraphe I.5, nous pouvons constater qu'il est plus difficile de situer le ganglion sentinelle de la figure 5.25.

La figure 5.26.a présente un exemple de détection de 3 ganglions sentinelles à l'aide de la sonde optique après injection de 250 μL de colorant. La première partie du graphique, entre 0 et 25 secondes, correspond à la mesure d'initialisation sur une partie grasseuse de la biopsie, non marquée par le colorant. La sonde est ensuite placée en regard de la première pièce opératoire (figure 5.26.b) durant 10 secondes. Nous constatons une augmentation de la concentration relative de colorant mesurée par la sonde à une valeur de 25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ environ. Puis la sonde est déplacée successivement sur le second ganglion (entre 35 et 42 s) et le troisième (de 43 à 49 s). Les concentrations relatives de Bleu Patenté V mesurées sont respectivement d'environ 16 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ et 8 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Cette diminution est également observable visuellement. Mais s'il apparait évident de détecter le marquage à l'œil, il est plus difficile de comparer les quantités de colorant fixé. Une nouvelle fois cela illustre bien la difficulté que peut rencontrer le chirurgien lors de la recherche du ganglion sentinelle.

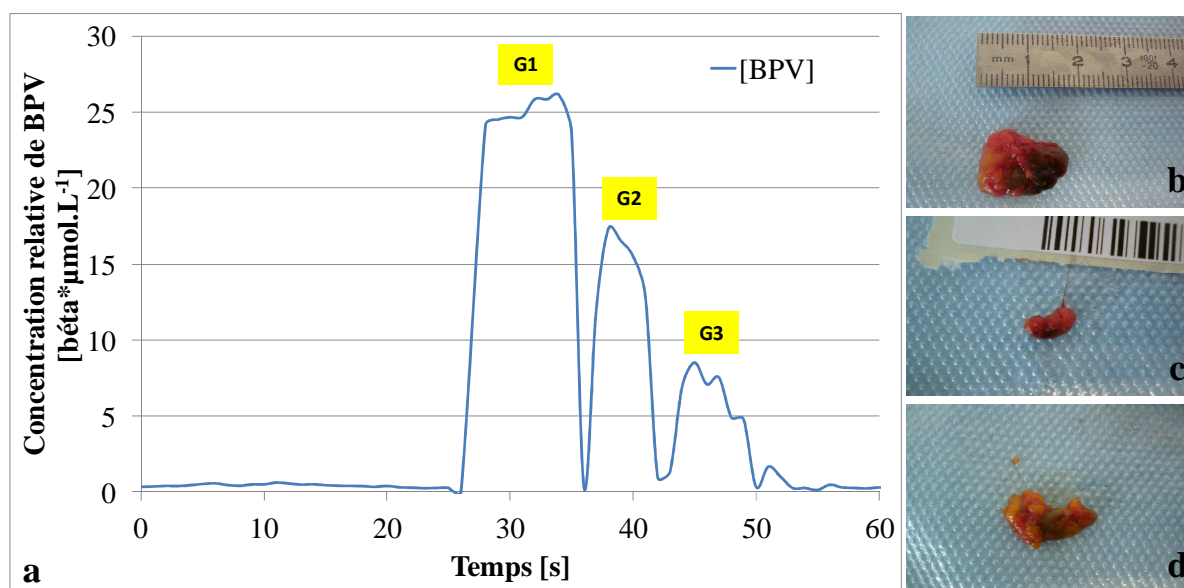
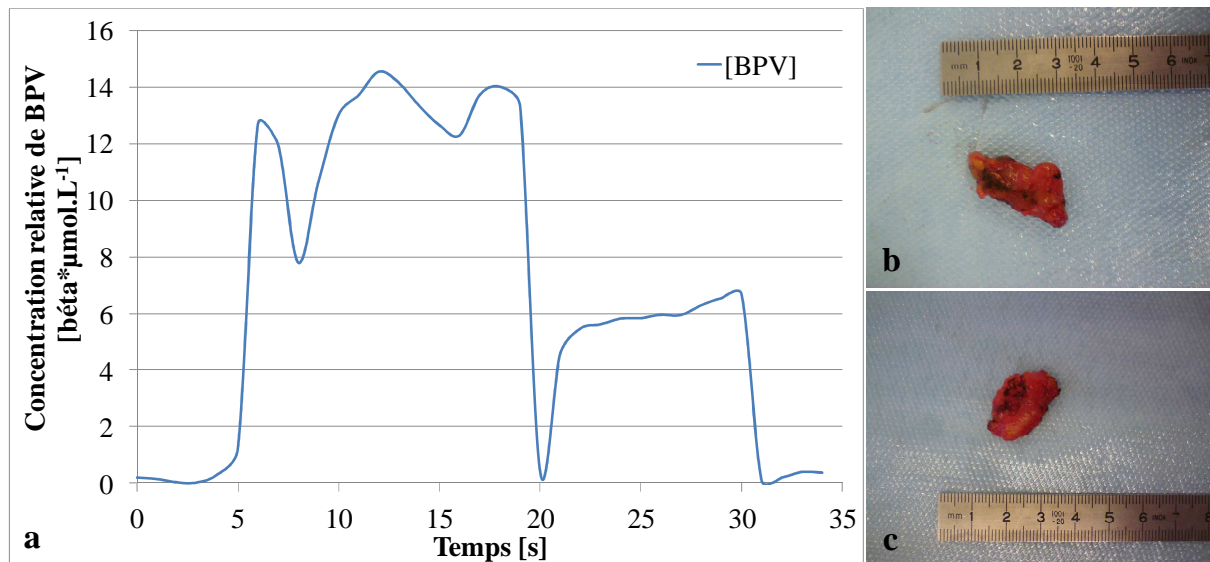


Figure 5.26 : détection de 3 ganglions sentinelles marqués par 250 μL de colorant

Si toutes ces pièces opératoires ont pu être détectées visuellement, la sonde optique s'est montrée indispensable pour la recherche de ganglions uniquement détectés par la sonde isotopique en per-opératoire.

La figure 5.27 illustre ce cas. Les deux ganglions (figure 5.27.b et c) ont été détectés par le chirurgien en utilisant la sonde isotopique. Cependant une détection visuelle n'a été possible que sur le premier (5.27.b). Nous avons cependant pu détecter ces deux ganglions à l'aide de

la sonde optique, comme le montre la figure 5.27. L'augmentation de la concentration relative, entre les secondes 5 et 20, correspond au temps durant lequel la sonde est placée en regard du premier ganglion ; la valeur moyenne mesurée est de $12,7 \mu\text{mol.L}^{-1} \pm 1,7 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Puis entre les secondes 21 et 30, lors de la recherche du second ganglion, cette valeur est de $5,9 \mu\text{mol.L}^{-1} \pm 0,6 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Les incertitudes liées à ces mesures sont essentiellement liés aux mouvements de la sonde par l'utilisateur durant son placement.



Considérant les 17 ganglions détectés grâce à la sonde isotopique mais non détectés visuellement, nous nous sommes posé la question de savoir s'il était possible de les classer selon leur état histologique. Treize se sont révélés négatifs à l'examen, 3 étaient micrométastasés et 1 macrométastasé. Nous avons seulement considéré, pour la suite de cet exposé, les 16 ganglions marqués avec le même volume de Bleu Patenté V: 250 µL.

La concentration PBV relative moyenne globale dans ces 16 cas est égale à $5,5 \mu\text{mol.L}^{-1} \pm 1,4 \mu\text{mol.L}^{-1}$. En fonction de la phase d'invasion métastatique, les concentrations moyennes mesurées sont les suivantes : $5,8 \mu\text{mol.L}^{-1} \pm 1,8 \mu\text{mol.L}^{-1}$ pour les 12 ganglions négatifs ; $4,9 \mu\text{mol.L}^{-1} \pm 3,3 \mu\text{mol.L}^{-1}$ dans les 3 micrométastatiques ; $4,3 \mu\text{mol.L}^{-1} \pm 0,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ dans le seul ganglion macrométastatique. Pour ce dernier, l'incertitude correspond aux variations temporelles du signal. Ces résultats montrent une dispersion des valeurs pour chaque catégorie d'échantillon trop importante pour une classification à partir de la mesure optique. La diminution de la valeur moyenne de la concentration relative observée lorsque l'état métastatique devient plus prononcé pourrait être en accord avec le fait que plus le ganglion est dans un état métastatique avancé et plus il y est difficile pour le marqueur (isotopique et

colorimétrique) d'y pénétrer. Les informations récoltées sont insuffisantes pour établir une relation significative entre le statut histologique et la concentration relative de colorant dans le ganglion sentinelle. Le nombre de pièces chirurgicales disponibles pour deux des statuts histologiques (micro-et macrométastatique) ne permet pas d'effectuer une analyse statistique.

5.3.6 Conclusion et discussion concernant le prototype à quatre longueurs d'onde

La première sonde optique ne tient pas complètement compte de l'évolution de l'absorption des tissus biologiques que peut rencontrer le chirurgien in-vivo. Une seconde sonde utilisant 4 longueurs d'onde a été développée pour corriger ce problème. Nous avons démontré, sur des objets tests, que l'apport de 2 longueurs d'onde supplémentaires permet une discrimination de l'absorption de différents colorants et réduit les erreurs de mesure de la concentration relative de Bleu Patenté V (11). Suite à cela, différentes mesures effectuées sur des pièces chirurgicales ont permis de démontrer que la détection optique de ganglions sentinelles marqués par le colorant est efficace. En effet, pour chaque pièce opératoire excisée, l'instrumentation développée a permis de détecter les ganglions sentinelles, quel que soit le volume de colorant injecté, même lorsque celui-ci n'était pas visuellement détectable. Dans cette étude, seulement 53 ganglions sentinelles ont été détectés visuellement par le chirurgien alors que les 70 ganglions marqués ont été localisés grâce à l'appareil optique. En ne considérant que les ganglions marqués par le même volume d'injection (250 μL), la concentration relative moyenne de Bleu Patenté V mesurée est de $5,5 \mu\text{mol.L}^{-1} \pm 1,4 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Le faible taux de dispersion (25 %) des mesures sur ces pièces opératoires indique que la sonde a été efficace pour différents patients, avec une reproductibilité satisfaisante (12).

5.4 Conclusion sur la méthodologie de détection des photons diffusés

Les instruments développés présentent l'avantage de travailler avec le colorant Bleu Patenté V qui est déjà utilisé en routine clinique. En outre, l'instrumentation et le colorant sont disponibles à un coût raisonnable. Les résultats obtenus avec les deux appareils optiques ont permis de démontrer que l'utilisation de la méthode d'enregistrement des photons diffusés appliquée à la détection du ganglion sentinelle pour le cancer du sein est possible.

Les études sur des modèles fantôme ont permis de déterminer que les seuils de détection des deux appareils, à 2 et 4 longueurs d'onde, sont identiques. Ils sont significativement plus bas, environ 30 fois, que celui de l'analyse visuelle en utilisant des puissances lumineuses de l'ordre du milliwatt. L'ajout de 2 longueurs d'ondes supplémentaires, permet de discriminer

l'absorption du Bleu Patenté V de celles des autres colorants et de réduire les erreurs de calcul de sa concentration relative. Les expérimentations sur petit animal, menées à 2 et 4 longueurs d'onde ont permis de détecter in-vivo le passage et la fixation du colorant sur différents ganglions en utilisant un modèle inflammatoire chez le rat. Finalement, différentes mesures effectuées sur des pièces chirurgicales ont permis de détecter des ganglions sentinelles après différents volumes d'injection. Un protocole, incluant une diminution de la dose injectée, de 2 mL à 0,25 mL, a été mené en accord avec les praticiens hospitaliers. Il a permis de comparer la sensibilité de détection de la sonde à 4 longueurs d'onde à une sonde isotopique et à celle de l'œil du chirurgien. Ainsi l'ensemble des ganglions sentinelles ont été détecté par les deux sondes alors que 17 ganglions n'ont pu être détectés par inspection visuelle.

Cette nouvelle technique semble donc adaptée pour une utilisation durant l'excision de ganglions sentinelles. Elle peut permettre au chirurgien d'avoir un outil de diagnostic simple, sans changer de façon significative son geste opératoire. De plus, environ 1 % des ganglions échappe actuellement à la détection car ne fixant que très peu le radiotraceur et/ou le colorant (13). Une augmentation de la sensibilité de détection optique devrait permettre de réduire ce chiffre. Un dispositif bimodal opto-nucléaire apparaît ainsi comme une approche très intéressante pour réduire ce taux de faux négatifs.

Enfin, les risques de tatouage de la peau associés à l'injection de colorant sont connus (14). L'appareil développé ayant permis de détecter des pièces de biopsies marquées par des volumes 8 fois plus faibles que celui usuellement employés, il est raisonnable d'envisager qu'une diminution de la dose injectée pourrait réduire cet effet secondaire indésirable.

5.5 Bibliographie

1. **T. Vo-Dinh.** *Biomedical Photonics Handbook*. s.l. : CRC Press, 2003.
2. **M. I. Marrel, B. M. Iritani, A. Riddell.** Lymph node mapping in the mouse. *Journal of Immunological Methods*. 2008, Vol. 332, pp. 170-174.
3. **N. L. Tilney.** Patterns of lymphatic drainage in the adult laboratory rat. *Journal of Anatomy*. 1971, Vol. 109, 3, pp. 369-383.
4. **F. Tellier, R. Ravelo, H. Simon, R. Chabrier, J. Steibel, P. Poulet.** Sentinel lymph node detection by an optical method using scattered photons. *Biomedical Optics Express*. 2010, Vol. 1, 3, pp. 902-910.
5. **A. Duncan, T.L. Whitlock, M. Cope, D. T. Cope.** Measurement of changes in optical pathlength through human muscle during cuff occlusion on the arm. *Optics & Laser technology*. 1995, Vol. 27, 4, pp. 269-274.
6. **P. van der Zee, M. Cope, S. R. Arridge, M. Essenpreis, L. A. Potter, A. D. Edwards, J. S. Wyatt, D. C. McCormick, S. C. Roth, E. O. R. Reynolds, D. T. Delpy.** Experimentally measured optical pathlengths for the adult head, calf and forearm and the head of the newborn infant as a function of inter optode spacing. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 1992, Vol. 3116, pp. 143-153.
7. **J. F. Rodier, T. Routinot, H. Mignotte, J. C. Janser, A. Bremond, E. David, C. Barlier, J. P. Ghnassia, I. Treilleux, C. Chassagne, M. Velten.** Lymphatic mapping and sentinel node biopsy of operable breast cancer. *World Journal of Surgery*. 2000, Vol. 24, 10, pp. 1220-1225.
8. **P. L. Giacalone, P. Roger, O. Dubon, N. El Gareh, J. P. Daurés, F. Laffargue.** Traitement conservateur des cancers du sein: zonectomie vs oncoplastie. Etude prospective à propos de 99 patients. *Annales de chirurgie*. 2006, Vol. 131, pp. 256-261.
9. **F. Tellier, R. Rasata, H. Simon, M. Wilt, J. F. Rodier, P. Poulet.** Une sonde optique au service du chirurgien pour la détection du ganglion sentinelle dans le cancer du sein : "le troisième oeil". *La lettre du sénologue*. 2011, Vol. 51, pp. 35-37.
10. **T. Svensson, J. Swartling, P. Taroni, A. Torricelli, P. Lindblom, C. Ingvar, S. Anderson-Engels.** Characterization of normal breast tissue heterogeneity using time-resolved near-infrared spectroscopy. *Physics in Medicine and Biology*. 2005, Vol. 50, pp. 2559-2571.
11. **F. Tellier, H. Simon, F. X. Blé, R. Ravelo, R. Chabrier, J. Steibel, J. F. Rodier, P. Poulet.** Comparison of 2- and 4-wavelength methods for the optical detection of sentinel lymph node. *Proceedings paper SPIE Munich*. 2011, Vol. 8092, DOI: 10.1117/12.889631.
12. **F. Tellier, P. Poulet, J. P. Ghnassia, M. Wilt, D. Weitbruch, J. F. Rodier.** A new optical probe for the detection of the sentinel lymph node using Patent Blue V dye in breast cancer: a preliminary study. *European Journal of Surgical Oncology*. 2011, Vol. Submitted.

6 Détection du ganglion sentinelle : utilisation des photons de fluorescence

6.1 Introduction

Comme nous l'avons mis en évidence dans le chapitre 3, le Bleu Patenté V libre possède un rendement quantique de fluorescence trop faible ($\approx 10^{-4}$) pour permettre sa détection in vivo par des méthodes de fluorescence. Cependant, lorsque ce colorant est lié à une macromolécule telle que l'albumine, une exaltation de son rendement quantique a été constatée ($\approx 1,5 \cdot 10^{-2}$). Ce rendement quantique, bien que plus faible que celui d'autres colorants, tel que le Vert d'Indocyanine ($\approx 0,15$) (1), permet cependant d'envisager la détection du Bleu Patenté V in vivo, au moyen d'une instrumentation appropriée. Un avantage prépondérant de cette approche est bien entendu l'utilisation de produits possédant déjà une autorisation de mise sur le marché et permettant un passage rapide à la clinique.

Dans ce chapitre, nous allons décrire deux méthodes permettant de réaliser la détection par fluorescence, pré-opératoire et/ou per-opératoire, du ganglion sentinelle dans le cas du cancer du sein. La première méthode repose sur l'utilisation de la sonde présentée dans le chapitre 4 pour une détection ponctuelle de la fluorescence. La seconde méthode a pour objet d'apporter au chirurgien une information visuelle, par l'acquisition d'une image de fluorescence superposée à l'image de la patiente. Cette image apporte une information sur la localisation des ganglions sentinelles. Cette imagerie de fluorescence a été réalisée en utilisant un dispositif existant, adapté à notre application.

6.2 Détection à l'aide d'une sonde

La sonde optique développée pour la détection des photons diffusés a été utilisée afin de détecter la fluorescence du Bleu Patenté V, dans les tissus en regard du capteur. Le dispositif expérimental utilise un laser d'excitation à 635 nm et un photomultiplicateur. Le matériel employé, ses caractéristiques et la méthodologie d'acquisition ont été présentés dans le chapitre 4.

Afin de comparer les performances des méthodes par fluorescence et par photons diffusés, nous avons réalisé une série d'expériences sur des objets tests liquides identiques à ceux présentés au chapitre 5. Une suspension d'Intralipides 1 % et d'encre de Chine, de coefficients $\mu_a = 0,005 \text{ mm}^{-1}$ et $\mu'_s = 0,89 \text{ mm}^{-1}$ simule les tissus du sein (2). De faibles

volumes d'une solution de Bleu Patenté V mélangée à de l'albumine humaine (SIGMA-ALDRICH) sont progressivement ajoutés.

La figure 6.1 représente les variations de la moyenne des données mesurées à une concentration donnée durant 1 minute avec une puissance lumineuse d'excitation en sortie de sonde égale à 20 mW. Nous remarquons que malgré les faibles concentrations de colorant dans la solution étudiée, la sonde parvient à détecter un signal dès la première injection.

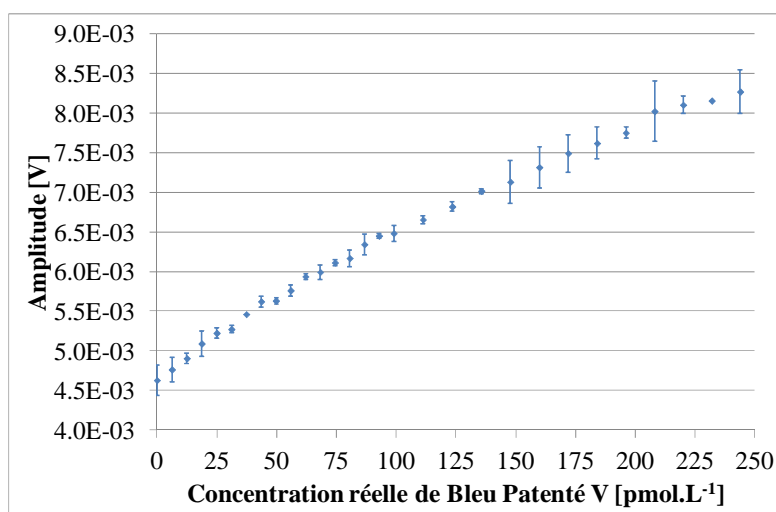


Figure 6.1 : Variations du signal mesuré en fonction de la concentration réelle de Bleu Patenté V (puissance du laser 20 mW)

Le seuil de détection du colorant a été déterminé selon les deux méthodes déjà présentées au chapitre 5. La première est une analyse graphique consistant à rechercher la première mesure qui est statistiquement différente de la référence, avec un écart supérieur à 2 écarts types. La seconde méthode utilise les courbes ROC. Le groupe de référence ($G_{\text{réf}}$) correspond à l'ensemble des données mesurées en absence de Bleu Patenté V. Nous définissons les autres groupes successifs comme les données mesurées après chaque injection de colorant (G_1 , G_2 , ...).

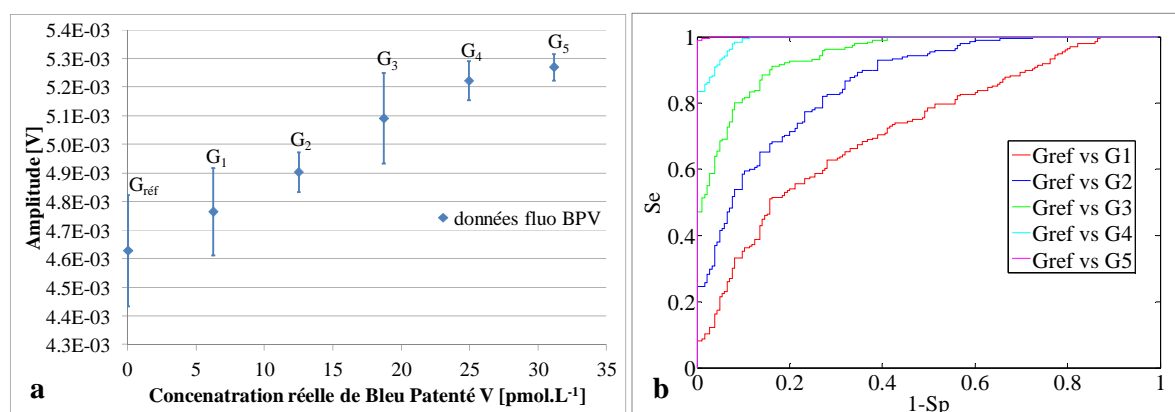


Figure 6.2 : Détermination du seuil de détection : comparaison des amplitudes successives (a) et courbes ROC (b)

La figure 6.2.a représente les premiers groupes. G_3 (20 pmol.L^{-1}) apparait comme le premier groupe indépendant du groupe de référence. L'analyse par les courbes ROC montre que le groupe G_4 (25 pmol.L^{-1}) semble un choix plus approprié afin de limiter la détection de faux positifs (figure 6.2.b). Nous pouvons ainsi fixer le seuil de détection à 25 pmol.L^{-1} . Pour mémoire, le seuil de visibilité du Bleu Patenté V avec ce modèle, rapporté au chapitre 5, est de $0,3 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$.

Cette étude a été répétée à puissance lumineuse plus faible. La limite de puissance des lasers de classe 3R, utilisables en cliniques sans justifier de précautions opératoires lourdes à mettre en œuvre, étant fixée à 5 mW pour les lasers continus dans le spectre visible, le seuil de détection du Bleu Patenté V a été déterminé à 5 mW . La figure 6.3 représente les moyennes de signaux enregistrés après chaque ajout de Bleu Patenté V fixé à de l'albumine humaine. Bien entendu, une concentration supérieure de colorant est nécessaire afin d'obtenir des valeurs significativement différentes de la mesure d'origine. Une rupture dans la pente des données peut être observée et peut être attribué au fait que pour les très faibles concentrations de colorant, en utilisant cette puissance lumineuse, il est très difficile de discriminer le signal du bruit. Ceci est moins le cas à partir du moment où l'on se rapproche du seuil de détection.

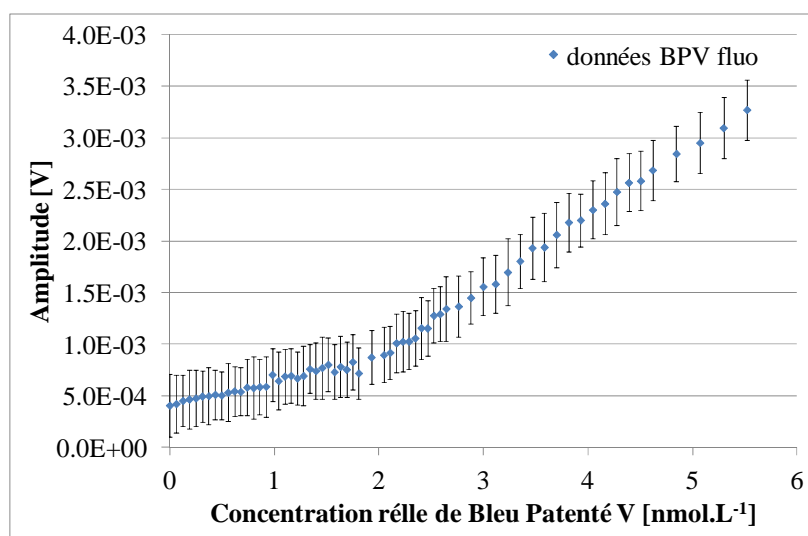


Figure 6.3 : Variations du signal mesuré en fonction de la concentration réelle de Bleu Patenté V (puissance du laser 5 mW)

Le seuil de détection de la sonde a été déterminé avec les deux méthodes précédemment employées. Afin de simplifier les représentations graphiques, le premier groupe représenté, noté $G1$, correspond à la $36^{\text{ième}}$ injection, correspondant à une concentration de colorant égale à $2,29 \text{ nmol.L}^{-1}$.

La figure 6.4.a représente le groupe de référence et 6 différents groupes ainsi que leurs écarts types. L'analyse statistique par la méthode des courbes ROC permet de déterminer le

groupe 5 comme indépendant du groupe de référence. Ce groupe représente l'ensemble des données mesurées à $2,52 \text{ nmol.L}^{-1}$.

Le seuil de détection obtenu à 5 mW ($2,5 \text{ nmol.L}^{-1}$) est nettement plus élevé comme celui obtenu à 20 mW (25 pmol.L^{-1}). Ce résultat est en désaccord avec le fait que les signaux de fluorescence sont proportionnels à l'intensité d'excitation. Il est possible qu'un filtrage imparfait de la lumière ambiante et du laser d'excitation rétro-diffusé soit responsable de cette observation. On notera que ce seuil de détection reste nettement inférieur à celui de l'œil de l'expérimentateur (300 nmol.L^{-1}) et légèrement inférieur à celui mesuré par détection des photons diffusés qui était de 10 nmol.L^{-1} pour une puissance lumineuse de l'ordre du milliwatt

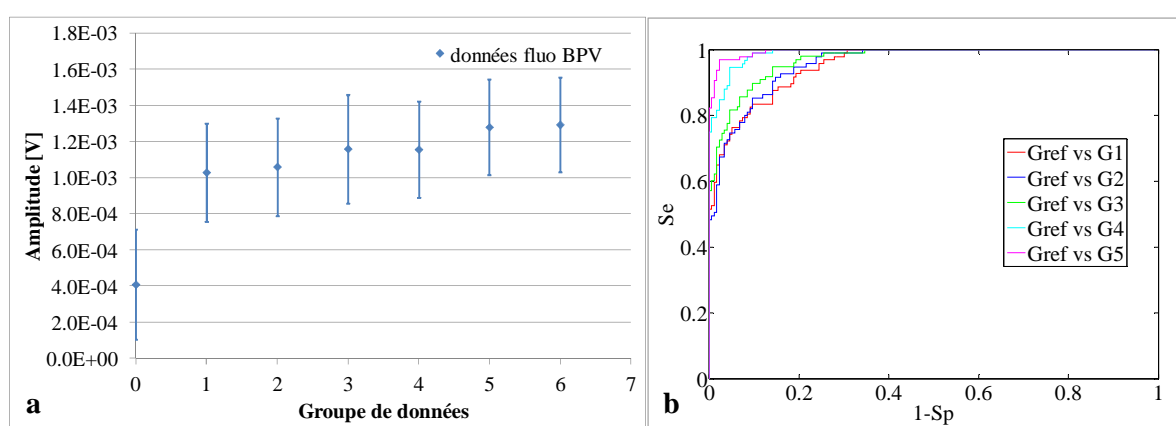


Figure 6.4 : Détermination du seuil de détection : comparaison des amplitudes successives (a) et courbes ROC (b)

Nous pouvons conclure de ces résultats que la sonde mise en œuvre permet de détecter de faibles concentrations du colorant rendu fluorescent par sa liaison à l'albumine humaine, avec une puissance lumineuse inférieure à 5 mW, limite supérieure des lasers de classe 3R.

Les seuils de détection, par fluorescence et diffusion, sont du même ordre de grandeur. Plusieurs pistes pour abaisser ce seuil ont été évoquées au chapitre 5. Elles peuvent être reprises pour la détection par fluorescence. Il conviendrait en particulier d'améliorer le filtrage optique, mais également le traitement du signal par un filtrage numérique ou par utilisation d'une détection synchrone.

L'étape suivante de ce travail à porter sur la détection de la fluorescence à l'aide d'un système d'imagerie adapté. L'objectif est de fournir au chirurgien un appareil capable de localiser précisément, sur le champ opératoire, un ganglion marqué par le colorant fluorescent.

6.3 Imagerie de fluorescence du Bleu Patented V

6.3.1 Instrumentation

Afin de réaliser l'imagerie de fluorescence du Bleu Patented V couplé à l'albumine nous avons utilisé un dispositif expérimental existant développé pour l'imagerie préclinique et mis à disposition du laboratoire par la société Eurorad. Celui-ci est équipé d'une couronne de diodes électroluminescentes (LED) pour l'éclairage de l'animal et d'un laser fibré à 690 nm pour l'excitation de marqueurs fluorescents. Il comporte un objectif unique et un prisme diviseur de faisceau pour former les images, après filtrage optique, de l'objet sur les capteurs de deux cameras (figure 6.5.a). La première est une caméra CMOS standard servant à l'acquisition de l'image couleur (640x480) de la scène a une résolution de 0,11 x 0,11 mm. La seconde est une caméra CCD utilisée pour les images de fluorescence (692x518) de résolution 0,12 x 0,12 mm. Les dispositifs d'éclairage et de détection sont regroupés dans un boîtier unique dont l'extrémité (figure 6.5.b) est fixée à l'intérieur d'une enceinte d'analyse pouvant contenir l'animal étudié placé sur un lit chauffant régulé en température et sous anesthésie gazeuse. La fibre optique transportant la lumière d'excitation est équipée, à sa sortie, d'un filtre passe bande étroit centré sur 690 nm. La caméra de fluorescence est équipée d'un filtre passe haut à 700 nm permettant d'éliminer les photons d'excitation et une grande partie de la lumière des LED. Les deux images sont transmises à un ordinateur afin d'être traitées, superposées et enregistrées. Toutes les figures présentées par la suite sont des images acquises avec un temps d'exposition de 80 ms.

Afin d'exciter le colorant Bleu Patented V à une longueur d'onde optimale, nous avons utilisé le laser à 635 nm, présenté avec la sonde pour la détection ponctuelle de fluorescence, comme source d'excitation. Pour éviter le filtre passe bande de l'instrument, une fibre optique d'excitation a été fixée à côté du dispositif afin de réaliser l'illumination de la zone d'intérêt.

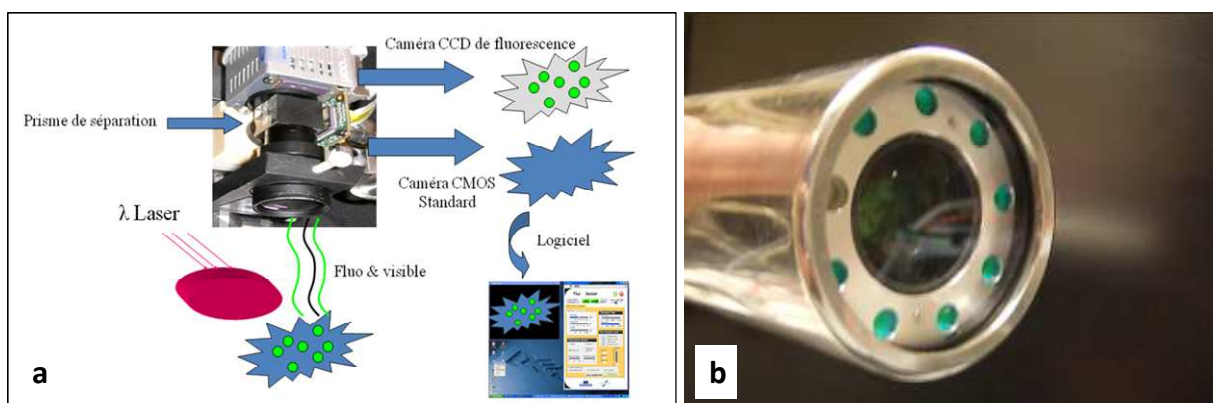


Figure 6.5 : Schéma de montage (a) (3) et photographie du prototype (b) montrant la couronne de LED et l'objectif commun.

Toutes les expérimentations présentées par la suite ont été réalisées avec une puissance lumineuse d'excitation de 200 mW environ. La sortie de la fibre d'illumination se situe à 15 cm environ de la zone d'intérêt. Le diamètre de tache lumineuse est de 40mm. La puissance surfacique mesurée en son centre est de 16 mW /cm² environ.

Afin de mesurer un signal de fluorescence du Bleu Patenté V, nous avons mélangé ce colorant dans des solutions d'albumine. Nous allons présenter par la suite les résultats obtenus avec trois formes commerciales d'albumine humaine :

- « Albumin from human serum » en poudre à diluer (SIGMA-ALDRICH, #CAS : 70024-90-7) (4).
- « Nanocoll » poudre pour solution injectable (GE Healthcare SA, P4832) (5).
- « Vialebex » solution d'albumine humaine pour perfusion (LFB Biomedicaments, code CIP : 570105-5) (6).

Des expériences ont également été menées avec le colorant Bleu Patenté V après mélange à l'albumine extraite de sérum de rat Lewis.

6.3.2 Détection du colorant Bleu Patenté V fixé à l'albumine humaine

6.3.2.1 Bleu Patenté V Fixé à l'albumine humaine Sigma-Aldrich

Une première expérience a été réalisée afin de mettre en évidence l'effet de la concentration de colorant sur l'intensité du signal de fluorescence. Différents microtubes de 250 µL ont été préparés. Des concentrations variables de colorant ont été mélangés à de l'albumine humaine SIGMA-ALDRICH diluée à la concentration de 1 mmol.L⁻¹. Cette valeur est proche de la concentration plasmatique humaine. Ces microtubes seront repérés sur l'image par une lettre, de a à g. Le premier (a) contient une solution tampon de phosphate salin (PBS). Le second (b) contient du Bleu Patenté V libre, dissous dans la solution de PBS à une concentration de 5 µmol.L⁻¹. Les suivants contiennent la solution d'albumine humaine à 1mmol.L⁻¹, avec des concentrations croissantes de Bleu Patenté V : 1 µmol.L⁻¹ (c), 2,5 µmol.L⁻¹ (d), 5 µmol.L⁻¹ (e), 7,5 µmol.L⁻¹ (f) et 10 µmol.L⁻¹ (g).

La figure 6.6.a est l'image couleur des 7 microtubes obtenue avec la caméra CMOS. Cette image est obtenue sans illumination de la zone d'intérêt par le laser d'excitation et présente peu de contraste entre les différents tubes. La figure 6.6.b présente l'image obtenue par la caméra de fluorescence lors de l'illumination des mêmes microtubes. Nous pouvons remarquer un signal de fluorescence en regard des objets c, d, e, f et g, c'est-à-dire ceux contenant du Bleu Patenté V et de l'albumine. Cette image de fluorescence, en fausse couleur, est superposée à l'image couleur (figure 6.6.c).

Cette expérience simple a permis d'observer une image de fluorescence du Bleu Patenté V lié à l'albumine, pour des concentrations de colorant supérieures à $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$. En effet il apparaît clairement que l'intensité de fluorescence mesurée est croissante du premier microtube (c) contenant le colorant lié à l'albumine jusqu'au microtube contenant $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de Bleu Patenté V avant de se stabiliser pour les concentrations suivantes.

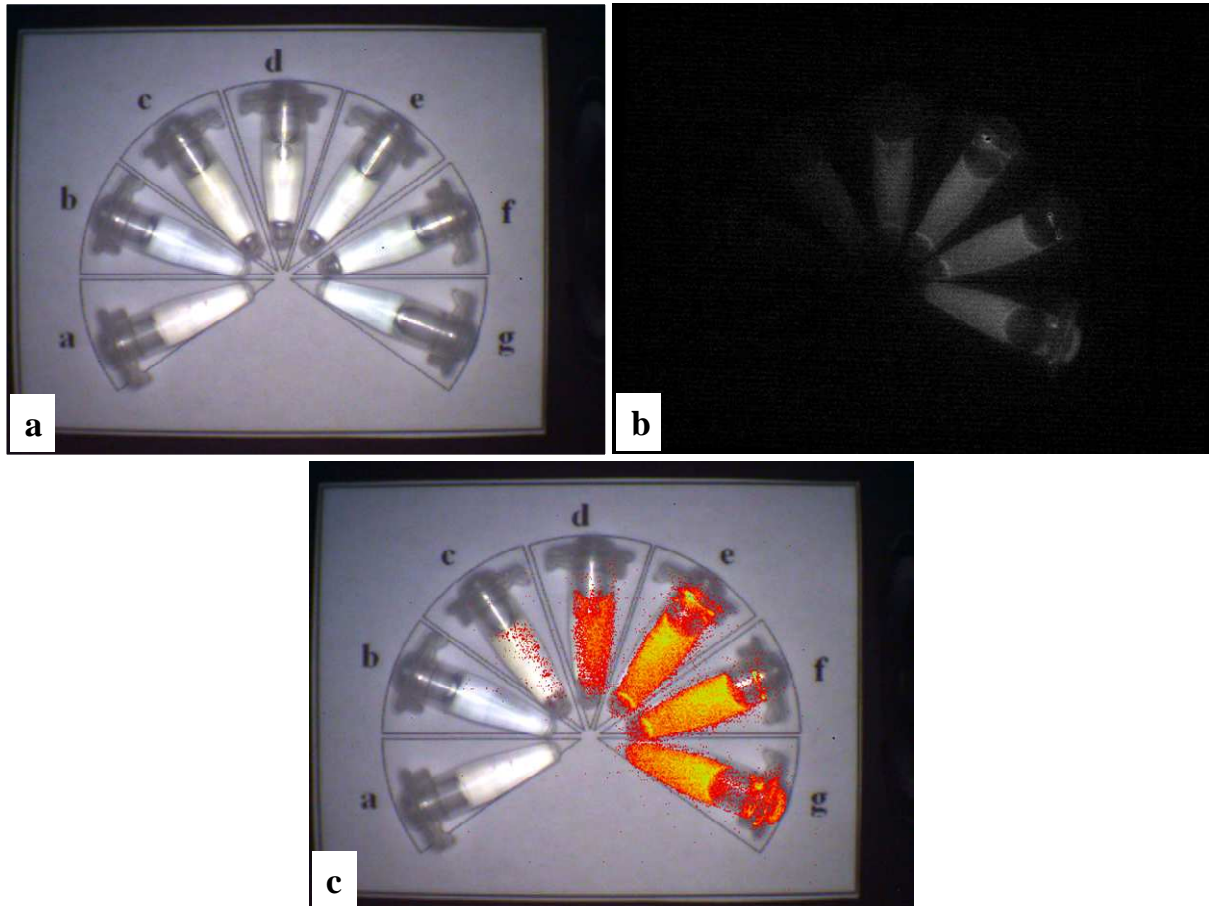


Figure 6.6 : Images d'inclusions contenant du Bleu Patenté V et de l'albumine humaine SIGMA-ALDRICH.

Une seconde expérience a eu pour objet de montrer qu'il était possible de détecter une inclusion fluorescente au sein d'un milieu diffusant, de propriétés optiques proche de celles des tissus du sein. Un microtube de $250 \mu\text{L}$ contenant du Bleu Patenté V à $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ mélangé à de l'albumine à 1mmol.L^{-1} a été plongée dans une solution d'Intralipides et d'encre de Chine aux propriétés optiques suivantes : $\mu_a = 0,005 \text{mm}^{-1}$ et $\mu'_s = 0,89 \text{mm}^{-1}$ (2). La figure 6.7.a représente l'image obtenue par la caméra CCD permettant de visualiser les photons de fluorescence issus de l'inclusion placée à 5mm de la surface des Intralipides. La figure 6.7.b montre l'image de fluorescence obtenue après ajout d'une fausse couleur. Enfin, la figure 6.7.c montre la superposition de l'image couleur de la suspension d'intralipides, blanche, avec l'image de fluorescence en fausse couleur.

Cette expérience démontre qu'il est possible de détecter une inclusion fluorescente, contenant $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de Bleu Patenté V, non visible à l'œil car immergée à 5 mm de profondeur dans un milieu diffusant simulant les tissus du sein.

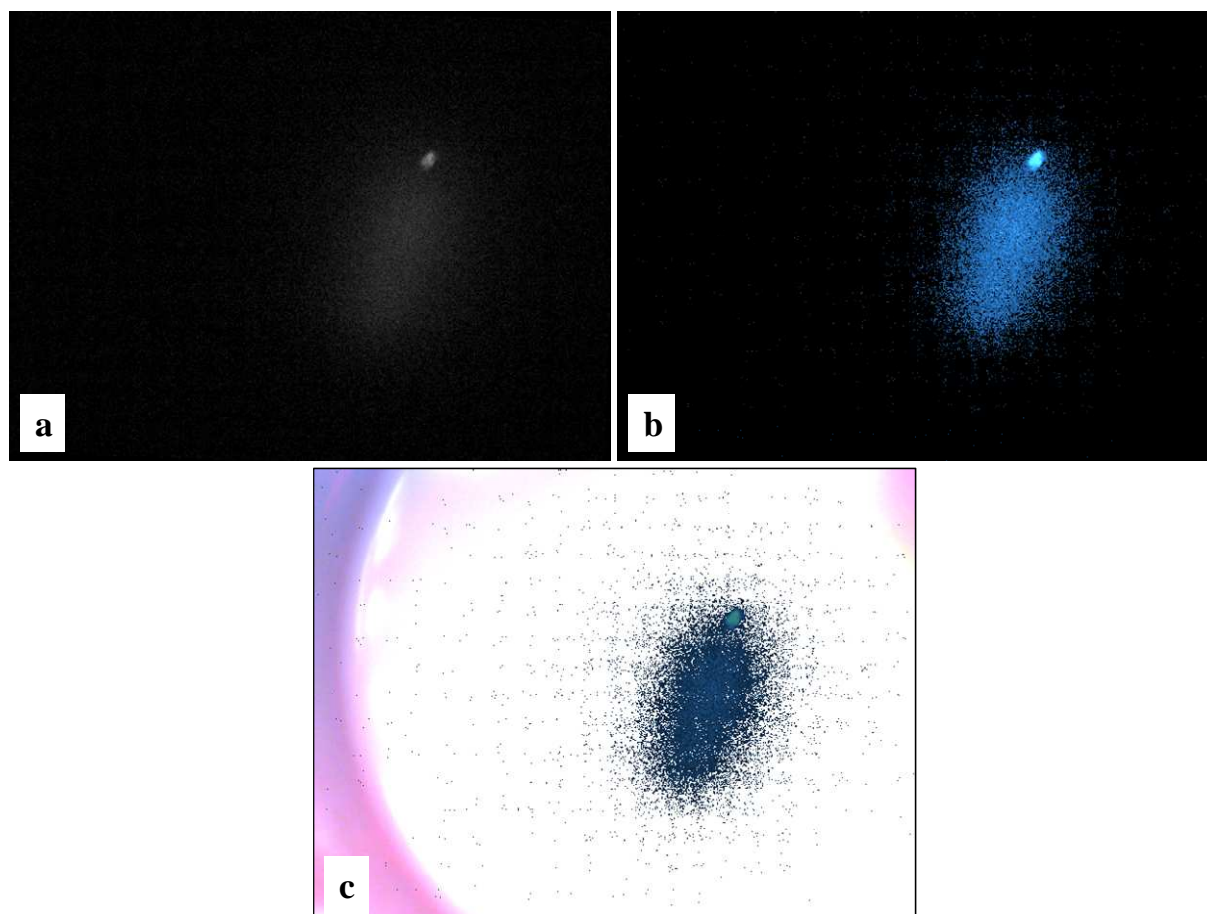


Figure 6.7 : Visualisation d'un microtube fluorescent plongé dans une solution d'Intralipides 1% et d'encre de Chine

6.3.2.2 Bleu Patenté V fixé à l'albumine humaine Vialebex

Une forme d'albumine humaine injectable, par voie intraveineuse, a été testée, dans le but de pouvoir injecter le mélange Bleu Patenté V – Albumine chez des patientes pour la détection par fluorescence du ganglion sentinelle. Le Centre Anti-Cancéreux nous a fourni un flacon de Vialebex, une solution pour perfusion d'albumine humaine. Cette albumine est généralement utilisée afin de restaurer et maintenir le volume sanguin chez les patients qui souffrent d'une quantité de sang circulant réduite (7).

La figure 6.8. a représente l'image couleur de 7 microtubes disposés dans le champ de vue des caméras. Le premier (a) est constitué d'une solution de Vialebex seul à la concentration de 3 mmol.L^{-1} , comme recommandé sur la notice d'utilisation. Le microtube b est rempli de Bleu Patent V libre à $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Les suivants (c, d, e, f et g) contiennent un mélange de

Vialebex (3 mmol.L^{-1}) avec des concentrations croissantes de colorant, respectivement égales à $1 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$, $2,5 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$, $5 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$, $7,5 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$ et $10 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$. L'image de fluorescence 6.8. b montre que le Bleu Patenté V, mélangée à ce produit, possède un rendement de fluorescence élevé. La figure 6.8. c présente l'image de fluorescence, en fausses couleurs, superposée à l'image couleur classique.

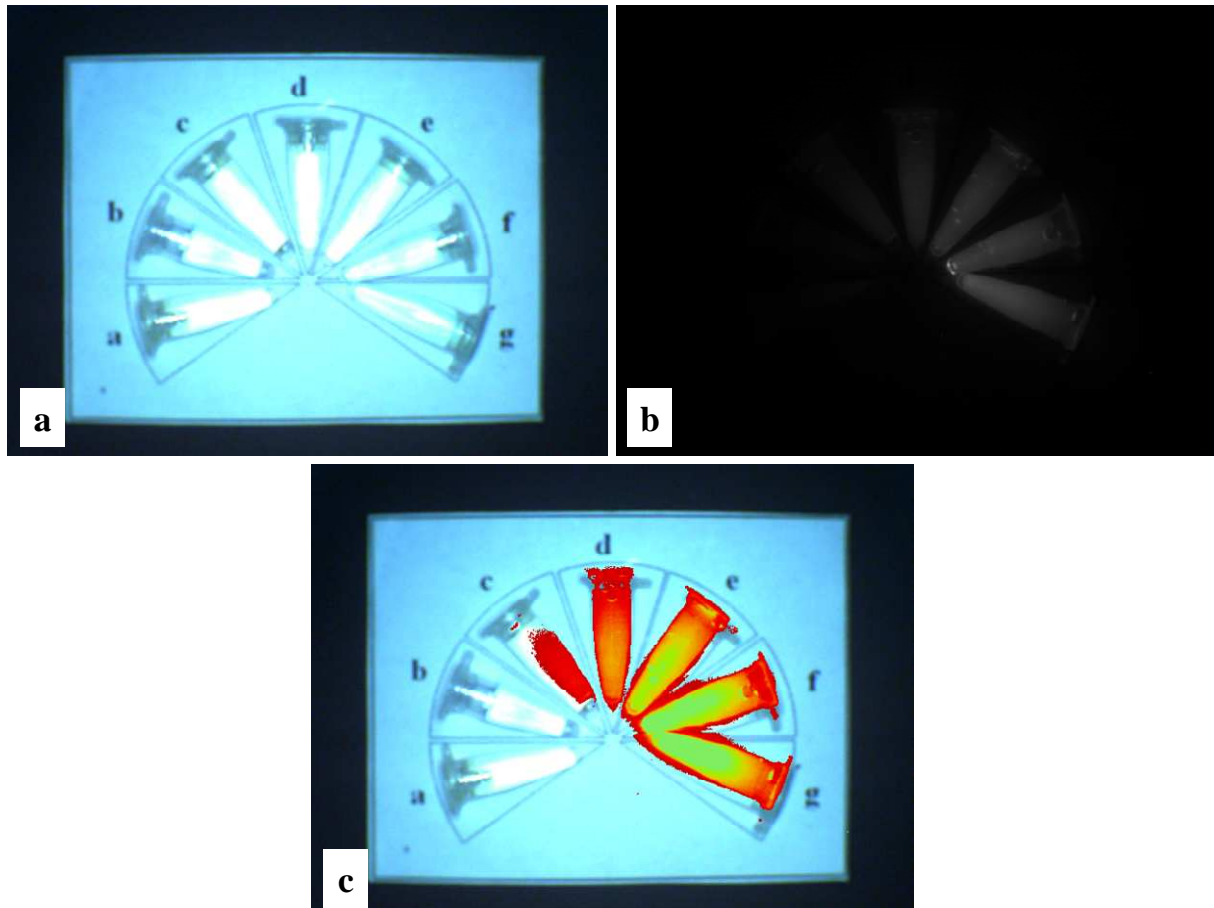


Figure 6.8 : Image couleur (a), image de fluorescence (b) et image superposée (c) de microtubes contenant un mélange de Bleu Patenté V et de Vialebex ainsi que 2 témoins contenant du Vialebex libre et du Bleu Patenté V libre.

Après avoir constaté que le mélange des deux solutions Bleu Patenté V – Vialebex, qui disposent de l'autorisation de mise sur le marché, permet d'obtenir un signal de fluorescence de ce colorant, une nouvelle expérimentation animale sur des rats a été menée. Le protocole expérimental est toujours le même mis à part que l'injection dans le coussinet de la patte arrière gauche est de $100 \text{ }\mu\text{L}$ du mélange Vialebex (3 mmol.L^{-1}) - Bleu Patenté V ($200 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$).

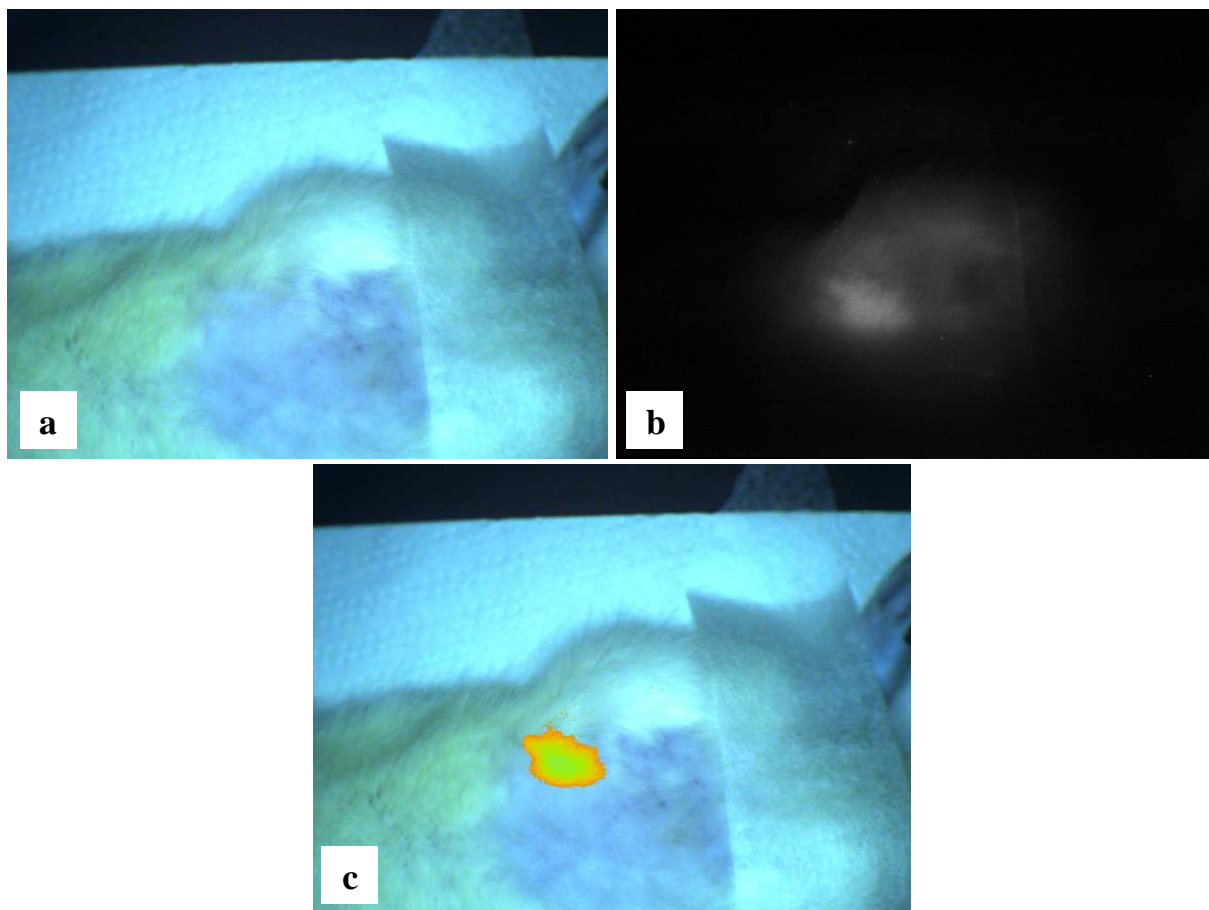


Figure 6.9 : Image couleur (a), image de fluorescence (b) et image superposée (c) lors de la détection du ganglion inguinal chez le rat par une solution fluorescente de Bleu Patenté V et de Vialebex.

Les figures 6.9.a, b et c représentent les images couleur, de fluorescence et la superposition des deux lors de la détection du ganglion inguinal chez un rat épilé. La même expérience a été réalisée également avec succès sur un second animal. Les images obtenues pour ce rat sont représentées par les figures 6.10.a, b et c. On note cependant une différence concernant la détection du colorant chez le second animal puisqu'il est possible d'observer également le point d'injection de la solution au niveau de la patte qui a été placée dans la zone d'illumination.

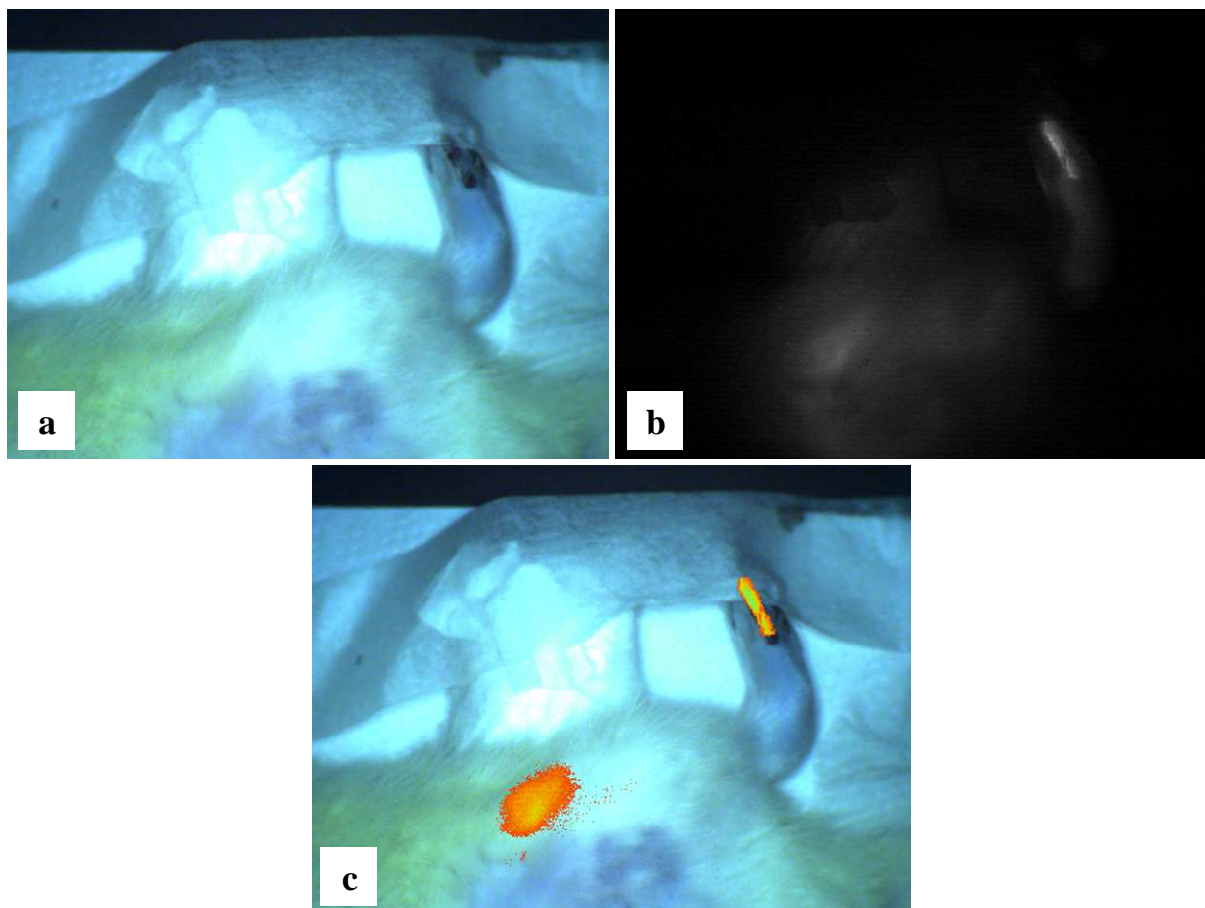


Figure 6.10 : Image couleur (a), image de fluorescence (b) et image superposée (c) lors de la détection du ganglion inguinal chez un second rat par une solution fluorescente de Bleu Patenté V et de Vialebex.

6.3.3 Bleu Patenté V fixé à l'albumine de sérum de rat

6.3.3.1 Imagerie de fluorescence

Cette étude a été menée dans un double objectif. Le premier était de s'assurer qu'une solution de Bleu Patenté V mélangé à l'albumine du sérum de rat avant son injection dans un animal était fluorescente. En effet le colorant injecté seul, qui doit à priori se lier in vivo à l'albumine de l'animal, n'est pas détectable par fluorescence. La deuxième motivation était de mettre en évidence une relation entre l'intensité de fluorescence et la concentration d'albumine.

Nous avons dans un premier temps comparé la fluorescence du Bleu Patenté V mis en solution avec du sérum de rat obtenu après sacrifice d'un animal et la fluorescence du Bleu Patenté V mélangé avec l'albumine SIGMA-ALDRICH. Les figures 6.11 représentent les résultats obtenus. Les microtubes a, b et c contiennent du sérum de rat mélangé à du Bleu Patenté V à des concentrations de colorant respectivement égales à $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$, $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ et $500 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Les microtubes d, e et f contiennent l'albumine SIGMA-ALDRICH avec du

Bleu Patented V aux concentrations respectives de $500 \mu\text{mol/L}^{-1}$, $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ et $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Les 6 microtubes sont fluorescents. Il semble que l'intensité de fluorescence est maximale dans les tubes aux concentrations de $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$, suggérant une auto-absorption dans les solutions à $500 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

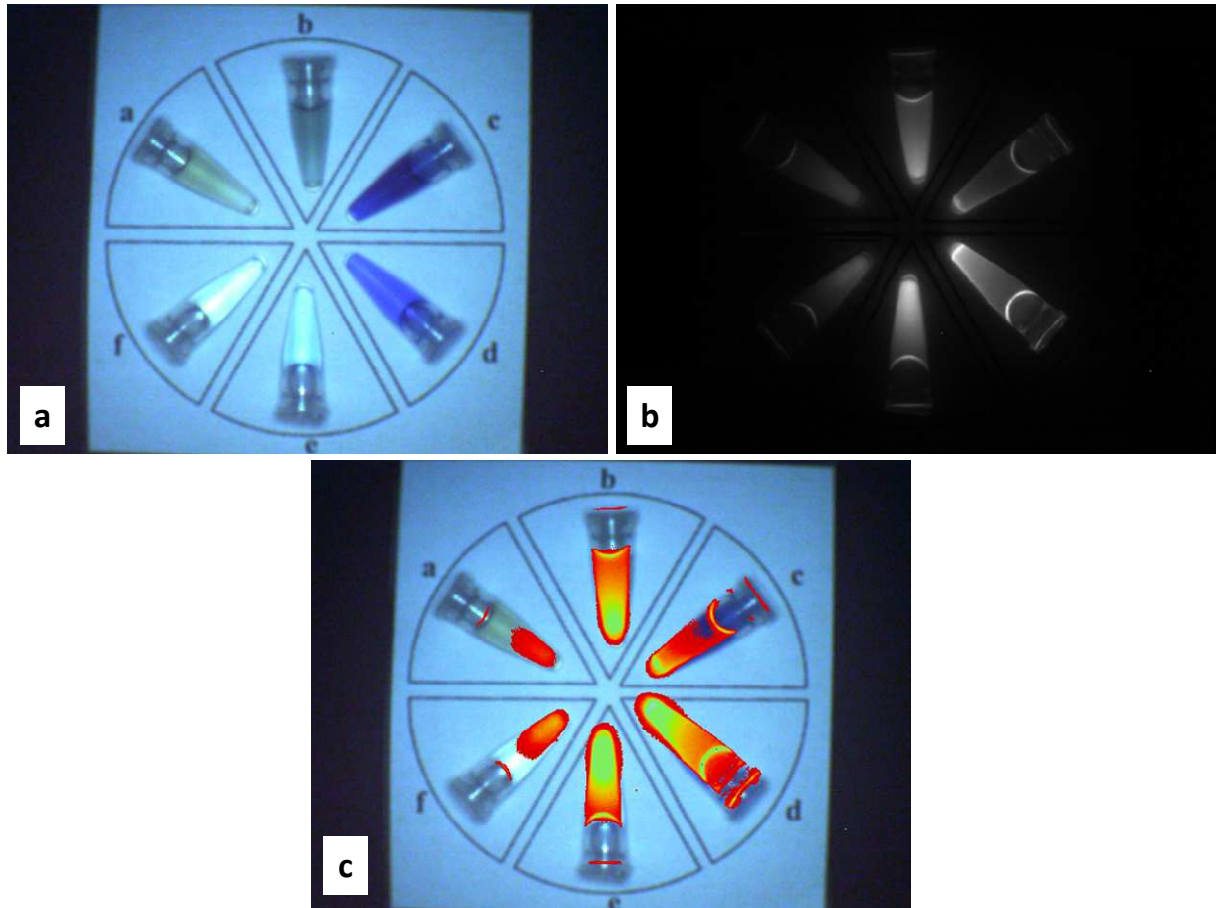


Figure 6.11 : images de microtubes contenant du Bleu Patented V fixé sur du sérum de rat et de l'albumine humaine SIGMA-ALDRICH

Après avoir vérifié que le colorant est bien fluorescent lorsqu'il est mélangé à l'albumine du sérum de l'animal, une seconde expérience a été menée consistant à réaliser la dialyse de sérums de rat et d'homme préalablement mis en solution avec le Bleu Patented V.

Cette dialyse est réalisée dans des boyaux appropriés préalablement lavés à l'eau. Deux boyaux sont remplis des deux mélanges ayant la même concentration en colorant ($200 \mu\text{mol.L}^{-1}$). Puis ils sont plongés séparément dans une solution de PBS durant 24h afin d'atteindre l'équilibre de dialyse. Finalement le boyau contiendra l'albumine liée au colorant alors que le dialysat, à l'extérieur, ne contiendra que la partie libre du colorant. Malgré tout il convient de réaliser qu'une partie de la fraction libre reste à l'intérieur du boyau. Nous en tiendrons compte par la suite.

Les photos de la figure 6.12 représente 6 microtubes disposés en regard du dispositif afin de détecter la fluorescence dans chacune d'elles. Le premier (a) contient du PBS. Les microtubes b et d contiennent les fractions liées du Bleu Patenté V obtenues après dialyse des sérums d'homme et de rat respectivement et c et e contiennent les fractions libres des sérums d'homme et de rat respectivement. Enfin le microtube f contient une solution de Bleu Patenté V de concentration $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$ dans une solution d'albumine SIGMA-ALDRICH diluée à 1 mmol.L^{-1} . La figure 6.12.a représente l'image couleur des 6 objets. La figure 6.12.b représente l'image obtenue de fluorescence. Enfin, la figure 6.12.c représente la superposition de l'image couleur et de l'image de fluorescence en fausse couleur. Ainsi il apparait clairement, qu'en plus de la solution de Bleu Patenté V lié à l'albumine humaine, que seuls les microtubes contenant les fractions de sérum liées au colorant sont fluorescentes. Ceci permet d'avancer l'hypothèse que si le Bleu Patenté V injecté libre se fixe à l'albumine présente dans le plasma ou dans la lymphe, un signal de fluorescence peut alors être mesuré. Nous avons cherché à vérifier cette hypothèse en effectuant une expérimentation animale dont les résultats seront exposés dans le paragraphe III.3.3.

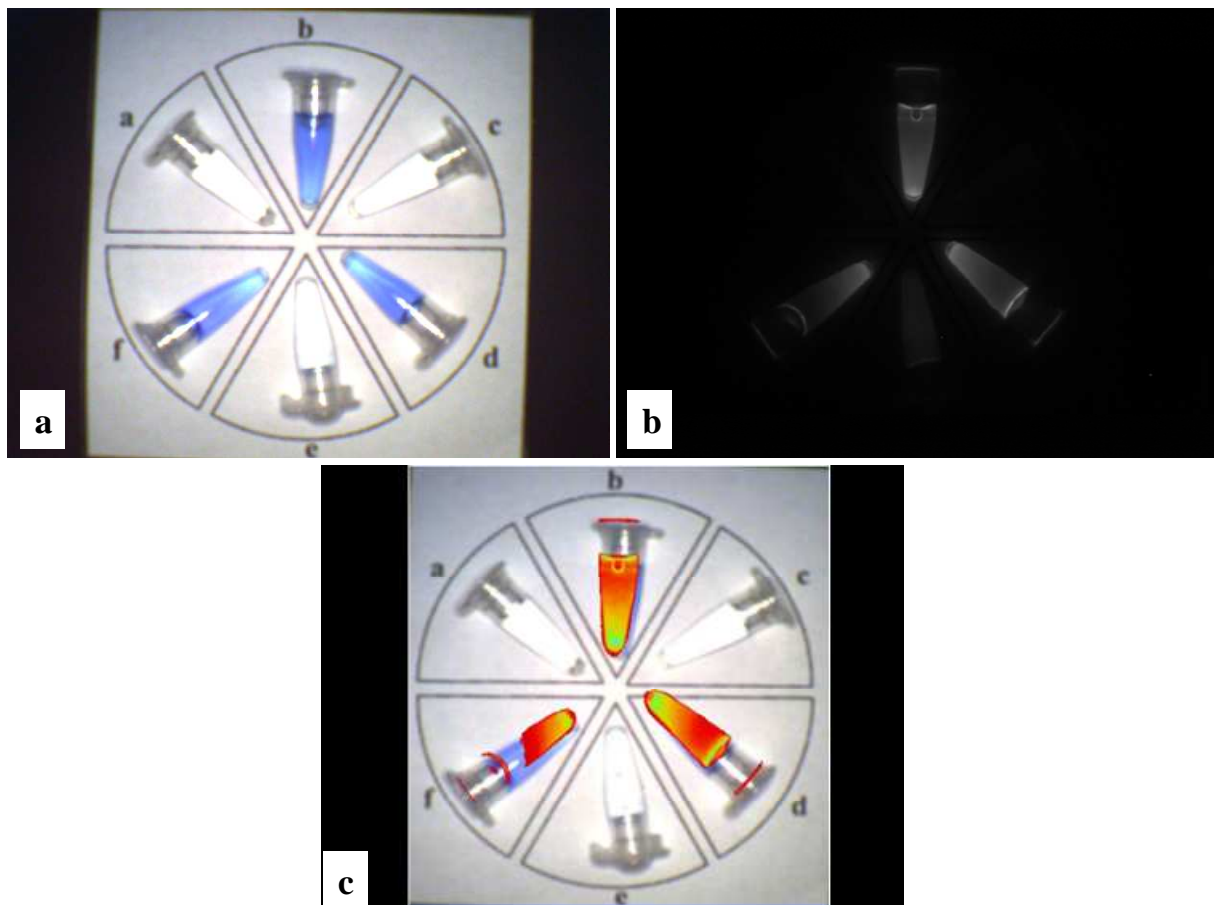


Figure 6.12 : Visualisation des inclusions après dialyse de solution de Bleu Patenté V et de sérums de rat et humain

6.3.3.2 Analyse spectroscopique

Avant de réaliser cette expérimentation animale, afin de vérifier si la fluorescence du Bleu Patenté V est détectable in-vivo, une analyse spectroscopique des fractions libres et liées de l'expérimentation précédente a été menée. Cette étude a pour but de vérifier que les rapports entre les fractions liées et libres du colorant sont identiques, dans le cas du sérum humain et de rat. En effet Dale a montré que ce rapport est environ 3 fois plus grand que l'homme que chez le rat. L'étude portait sur une autre molécule (8).

La figure 6.13.a représente les spectres d'absorption des fractions de colorant liées à l'albumine de l'homme et du rat après équilibre de dialyse. La figure 6.13.b représente les spectres des fractions libres.

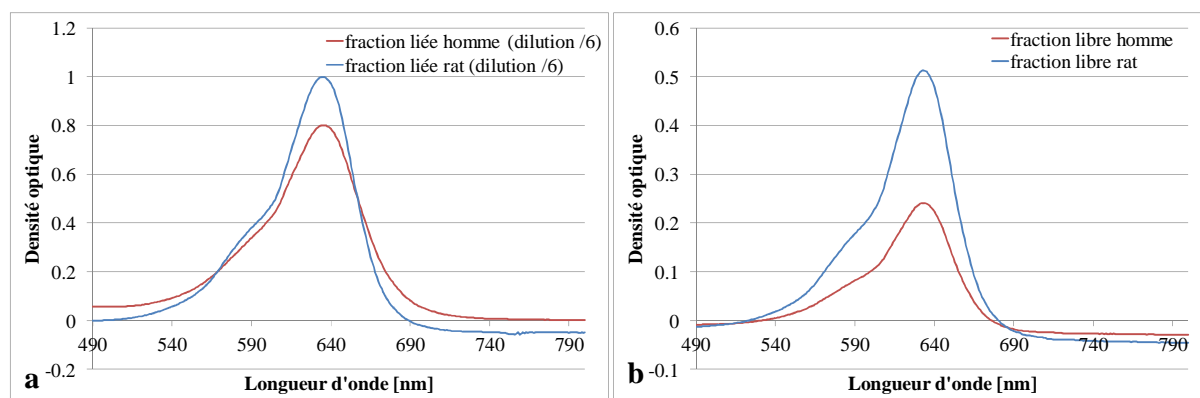


Figure 6.13 : Spectres d'absorption du Bleu Patenté V lié à l'albumine (a) et libre (b), enregistrés sur des sérums d'homme (rouge) et de rat (bleu)

Il apparaît clairement que les densités optiques des fractions liées sont plus importantes que celles des fractions libres (environ 12 fois), les deux fractions de colorant lié ont du être diluées 6 fois afin de pouvoir réaliser les spectres. Ainsi les densités optiques maximales sont de 0,24 pour la fraction libre du sérum humain, 0,51 pour la fraction libre du sérum du rat. Ces densités optiques avant dilution étaient de 4,8 pour la fraction liée du sérum humain et de 6,0 pour la fraction liée du sérum de rat. Le calcul des rapports liés/libres a été effectué en tenant compte de l'absorption de la fraction libre. Les résultats sont présentés dans le tableau 6.14. Finalement nous obtenons des rapports entre les deux fractions de 19 pour le sérum humain et de 11 pour le sérum de rat. Ce résultat est en accord avec celui obtenu par O. Dale qui tend à dire qu'une molécule (colorant ou autre) sera plus liée à l'albumine humaine qu'à celle du rat. Ce résultat est encourageant pour les applications cliniques de ce travail. Cela semble être confirmé également par les observations faites sur la figure 6.11. En effet, en

comparant deux à deux les microtubes de $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ et de $500 \mu\text{mol.L}^{-1}$, il est possible d'observer un signal de fluorescence plus important lorsque le colorant est fixé à de l'albumine humaine plutôt qu'à l'albumine de rat.

	B+F	F	B	B/F
Homme	4,8	0,24	4,56	19
Rat	6,0	0,51	5,48	11

Tableau 6.14: Récapitulatif des mesures des fractions liées mesurée dans le boyau (B+F), des fractions libres (F) et du rapport entre les fractions liées et libres

6.3.3.3 Expérimentation animale

Afin de détecter in-vivo la fluorescence de ganglions marqués par le Bleu Patenté V une expérimentation animale a été menée. Celle-ci est semblable à celle développée lors de la caractérisation des appareils de détection des photons diffusés à 2 et 4 longueurs d'onde. Nous avons dans un premier temps injecté $500 \mu\text{L}$ d'une solution de Bleu Patenté V libre concentré à $500 \mu\text{mol.L}^{-1}$ dans le coussinet plantaire de l'animal. Après avoir attendu près de 45 minutes, aucun signal de fluorescence n'a été détecté par la caméra. Les images de cette expérience n'ayant que peu d'information ne sont pas présentées ici. Cette expérience semble cependant indiquer que le colorant libre ne se fixe pas, après injection transcutanée, à l'albumine contenue dans le système lymphatique.

Une des solutions envisagée est donc d'injecter le colorant préalablement lié à l'albumine. La figure 6.15 est représentée l'image couleur (figure 6.15.a), l'image de fluorescence (figure 6.15.b) et l'image de fluorescence en fausse couleur superposée à l'image normale (figure 6.15.c) de la partie postérieure d'un rat après injection de $500 \mu\text{L}$ d'une solution de Bleu Patenté V à $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$ initialement mélangée à une solution d'albumine de sérum de rat à 1mmol.L^{-1} . Un signal de fluorescence est mesuré par la caméra CCD. L'image de fluorescence, superposée à celle de l'animal, correspond clairement au ganglion inguinal.

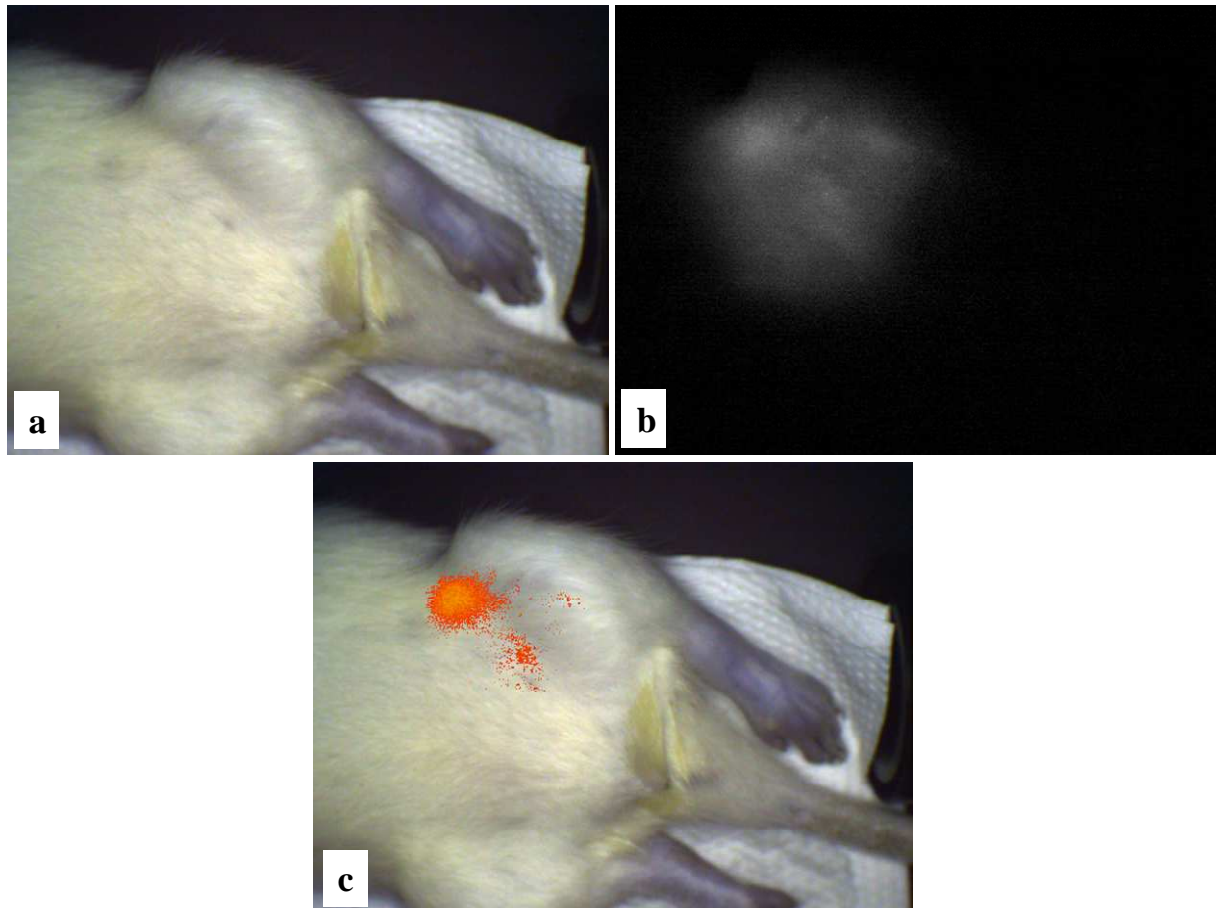


Figure 6.15 : Observation du ganglion inguinal chez un rat par imagerie de fluorescence.

La figure 6.16 représente les images, couleur, fluorescence et superposition, acquises sur un animal préalablement épilé au niveau de la zone d'intérêt. Après anesthésie, une injection de 500 μL de Bleu Patenté V à $500 \mu\text{mol.L}^{-1}$ lié à l'albumine de sérum de rat a été effectuée dans le coussinet de la patte arrière gauche de l'animal. Deux zones distinctes apparaissent sur l'image de fluorescence. La première zone correspond au site d'injection, l'ensemble de la patte apparaît fluorescente. De plus le ganglion inguinal apparaît lui aussi fluorescent (figure 6.16.b.c). L'image anatomique fournie par la caméra CMOS montre que ni le colorant, ni le ganglion ne sont visibles sans le recours à l'imagerie de fluorescence.

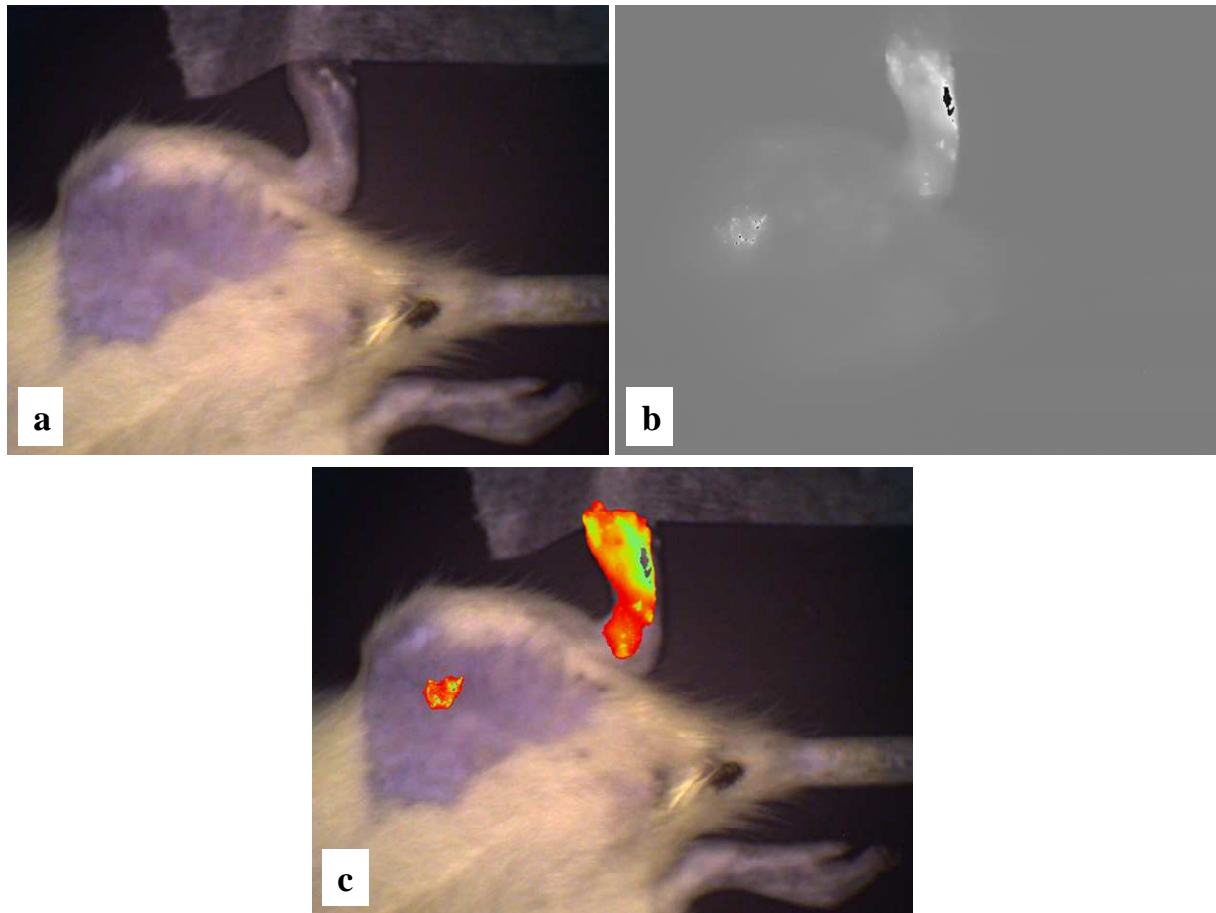


Figure 6.16 : Observation du ganglion inguinal et du site d'injection par fluorescence chez un rat épilé

Enfin l'exemple présenté sur la figure 6.17 montre les résultats d'observation sur un troisième animal. L'injection est en tout point identique au cas précédent. La figure 6.17.a montre l'image anatomique de la zone d'intérêt de l'animal épilé, l'image a été acquise après injection. La figure 6.17.b est l'image de fluorescence, indiquant le site d'injection au niveau de la patte, un premier site fluorescent au niveau du ganglion poplité et un signal plus faible au niveau du ganglion inguinal. Ceci apparaît plus nettement sur l'image de fluorescence superposée à l'image anatomique, figure 6.17.c. Afin de vérifier que le signal de fluorescence correspond bien au ganglion inguinal et non à un faux positif l'expérimentateur prend le dit ganglion entre ces doigts. Après avoir déplacé l'animal pour avoir le maximum de l'intensité lumineuse d'excitation sur ce ganglion une nouvelle série d'images est acquise. La figure 6.17.d est l'image de l'animal avec le ganglion inguinal entre les doigts de l'expérimentateur. Le signal de fluorescence est visualisé sur la figure 6.17.e. La figure 6.17.f représente l'image de fluorescence superposée à l'image anatomique. Nous remarquons que le ganglion poplité est encore visualisé.

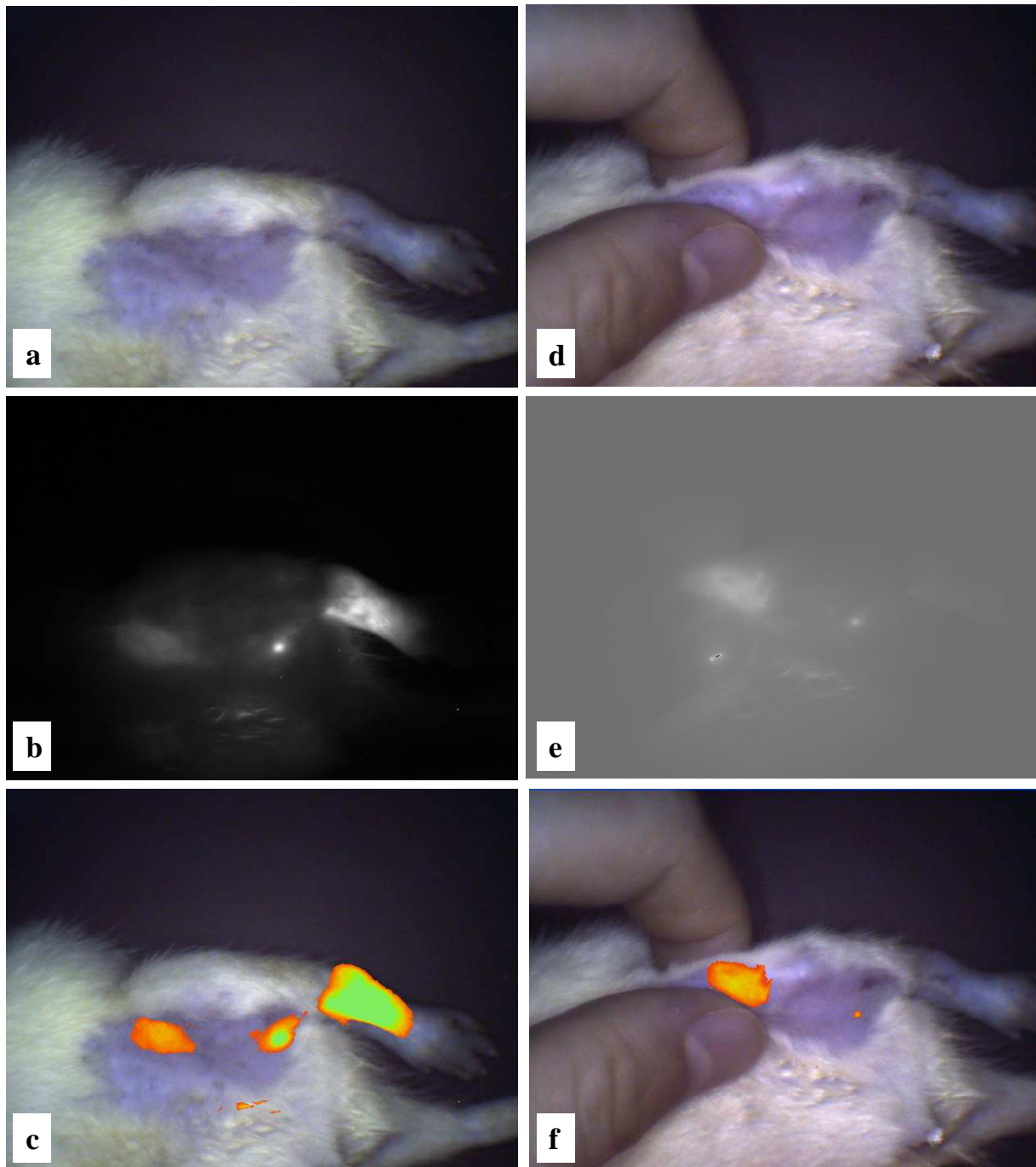


Figure 6.17 : Observation du ganglion inguinal, du ganglion poplité et du site d'injection par imagerie de fluorescence du Bleu Patenté V chez un rat épilé

6.3.4 Bleu Patenté V fixé à l'albumine colloïdale

Afin de pouvoir réaliser le plus rapidement possible des injections de Bleu Patenté V fluorescent à des patientes, nous avons cherché une forme d'albumine injectable par voie transcutanée. L'albumine colloïdale, commercialisée par GE Healthcare sous le nom Nanocoll, est le premier candidat. En effet, ce traceur est depuis longtemps associé au technétium pour la détection du ganglion sentinelle par méthode isotopique (9) (10). L'idée de

cette expérience est donc la suivante : au lieu de marquer le Nanocoll par un radiosotope, celui-ci est marqué par le colorant Bleu Patenté V. Consultée par les cliniciens du Centre Anticancéreux, l'AFSSAPS a donné à ces derniers l'autorisation de mélanger ces deux produits avant de les injecter par voie transcutanée.

6.3.4.1 Inclusions à différentes concentrations

La figure 6.18.a représente l'image couleur de 7 microtubes de 250 μL . Le microtube a contient du Nanocoll seul, à la concentration de 1 mmol.L^{-1} , b contient du PBS et c contient du Bleu Patenté V libre ($5 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$). Les microtubes d, e, f contiennent du Nanocoll à 1 mmol.L^{-1} avec des concentrations croissantes de Bleu Patenté V respectivement de $2,5 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$, $5 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ et $7,5 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$. Enfin la dernière inclusion, g, contient du Bleu Patenté V ($5 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$) dans de l'albumine SIGMA-ALDRICH (1 mmol.L^{-1}).

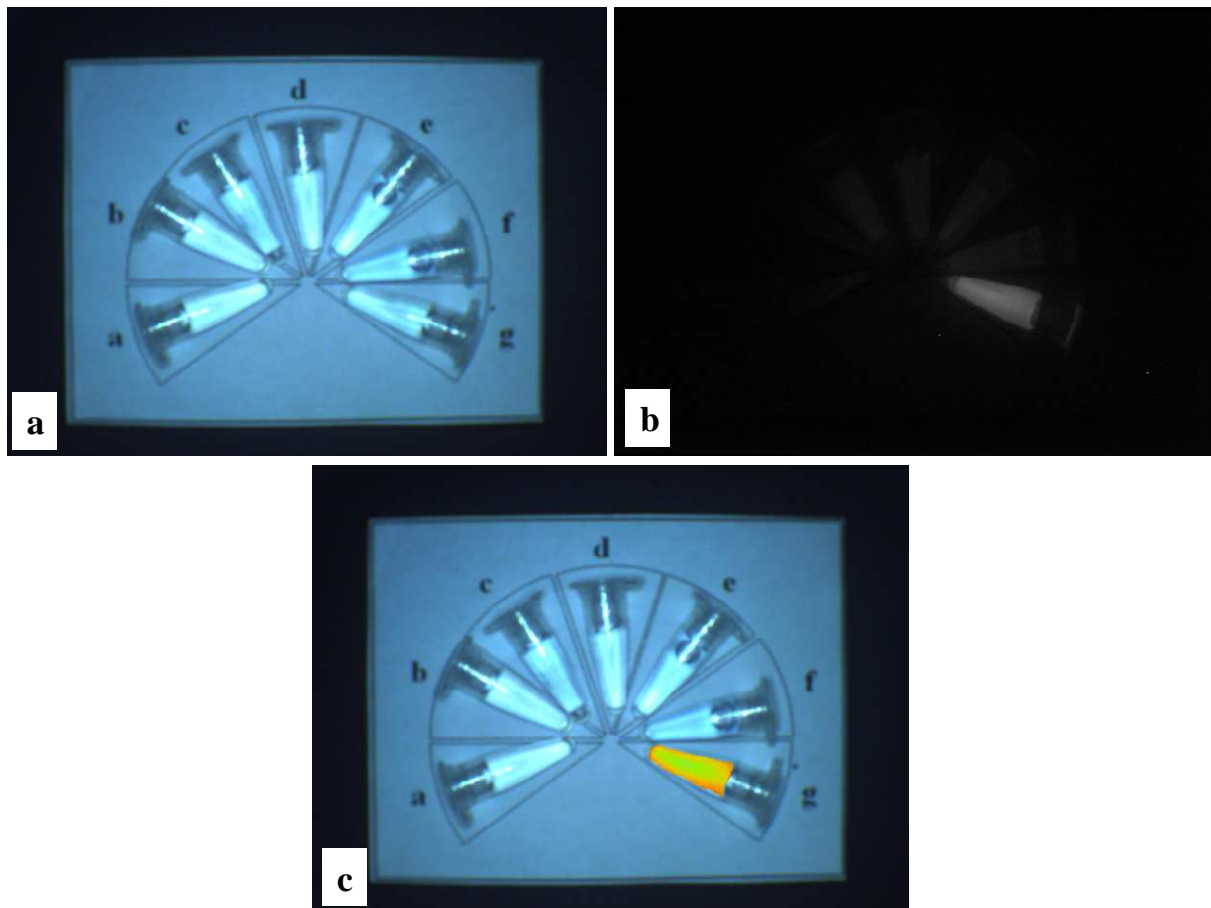


Figure 6.18 : Image couleur (a), image de fluorescence (b) et image superposée (c) de microtubes contenant un mélange de Bleu Patenté V et de Nanocoll ainsi qu'un microtube de Bleu Patenté V fluorescent et 2 témoins de Nanocoll libre et de Bleu Patenté V libre.

La figure 6.18.b représente l'image de fluorescence enregistrée par la caméra CCD. Il apparaît clairement que lorsque le colorant est mélangé à l'albumine colloïdale Nanocoll, celui-ci n'est pas fluorescent. L'image superposée de fluorescence en fausse couleur de la figure 6.18.c confirme cette affirmation. Cette expérience a été répétée avec des concentrations de colorant plus importantes sans apporter de résultat différent.

6.3.4.2 Discussion

Les raisons expliquant que le Bleu Patenté V n'est pas fluorescent au contact de cette albumine peuvent être multiples.

La première peut être liée au processus de fabrication des nanoparticules. En effet, les microsphères contenant l'albumine sont fabriquées par dénaturation thermique. Le mode de fabrication consistant en une dispersion dans de l'huile chaude d'une solution aqueuse d'albumine provoque sa dénaturation thermique. Ainsi le nombre de sites accessibles par le colorant peut être fortement réduit. Une autre raison possible au fait qu'aucune émission de fluorescence n'a pu être observée peut être liée au fait que la Nanocoll contient du chlorure stanneux dihydraté, plus communément appelé étain stanneux (Sn^{2+}), qui est un métal lourd et par conséquent inhibiteur de fluorescence.

6.4 Conclusion sur la détection de fluorescence

Pour conclure sur ce chapitre, nous venons de démontrer que la détection du ganglion sentinelle par fluorescence du Bleu Patenté V est une méthode applicable et réalisable si ce colorant est lié à l'albumine. L'utilisation de nanocolloïde d'albumine Nanocoll n'est pas une solution directement envisageable. L'utilisation de l'albumine humaine, par exemple sous la forme commerciale Vialebex, peut en revanche être une solution à explorer. Il convient néanmoins de prendre en compte les risques encourus par une injection sous cutanée de cette solution. La détection de fluorescence peut être réalisée selon deux procédés. Le premier consiste en une détection ponctuelle de pièces opératoires à l'aide d'une sonde. Cette méthode peut être couplée à la détection isotopique dans un dispositif bimodal. Le second procédé est plus ambitieux. Il repose sur une imagerie pré- ou per-opératoire du ganglion sentinelle par un système relativement simple de conception et de mise en œuvre. Ce dispositif pourrait être rapidement mis à disposition des cliniciens et bénéficier d'autorisation dans le cadre d'essais thérapeutiques.

6.5 Bibliographie

1. **S. Reindl, A. Penzkofer, S.H. Gong, M. Landthaler, R. M. Szeimies, C. Abels, W. Bäumlner.** Quantum Yield of triplet formation for indocyanine green. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 1997, Vol. 105, 1, pp. 65-68.
2. **T. Svensson, J. Swartling, P. Taroni, A. Torricelli, P. Lindblom, C. Ingvar, S. Andersson-Engels.** Characterization of normal breast tissue heterogeneity using time-resolved near-infrared spectroscopy. *Physics in medicine and Biology*. 2005, Vol. 50, pp. 2559-2571.
3. **H. Tubaldo.** Etude et développement d'un logiciel de pilotage d'un prototype d'imagerie de fluorescence préclinique. *rapport de Stage*. Strasbourg : s.n., 2011.
4. **Aldrich, Sigma.**
http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?N4=A1887|SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC. [En ligne] 2011.
5. **Vidal.** <http://www.vidal.fr/Medicament/nanocoll-20331.htm>. *www.vidal.fr*. [En ligne] 2011.
6. **Haute Autorité de Santé.** http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/ct-4072_vialebex_.pdf. *www.has-sante.fr*. [En ligne] 14 02 2007.
7. **I. Durant-Zaleski, C. Alberti, E. Guemas, D. Golly, B. Padrazzi, T. Waegemans.** Etude comparative des coûts hospitaliers liés à une stratégie de remplissage vasculaire par albumine humaine 20% (Vialebex) ou par polygéline dans le traitement des ascites cirrhotiques. *La Presse Médicale*. 2007, Vol. 36, 6, pp. 867-873.
8. **O. Dale, O. G. nilsen.** Differences in the serum protein binding of prazosin in man and rat. *Biochemical Pharmacology*. 1984, Vol. 33, 11, pp. 1719-1724.
9. **J. F. Rodier, T. Routiot, H. Mignotte, J. C. Janser, A. Bremond, E. David, C. barlier, J. P. Ghnassia, I. Treilleux, C. Chassagne, M. Velten.** Lymphatic mapping and sentinel node biopsy of operable breast cancer. *World Journal of Surgery*. 2000, Vol. 24, 10, pp. 1220-1225.
10. **S. D. Nathanson, L. Nelson, K. C. Karvelis.** Rates of flow of technetium 99m-labeled Human Serum Albumin from peripheral injection sites to sentinel lymph nodes. *Annals of Surgical Oncology*. 1995, Vol. 3, 4, pp. 329-335.

Les recherches menées durant ce doctorat et présentées dans ce manuscrit s'inscrivent dans un objectif bien précis, qui a permis d'améliorer le taux de détection du ganglion sentinelle dans le cas du cancer du sein. L'instrumentation développée a permis d'évaluer, la quantité de Bleu Patenté V contenue dans le ganglion. La détection de ce colorant, très utilisé en routine clinique, permettrait de ne pas modifier le geste opératoire du chirurgien. Ce travail a été réalisé, dans le cadre d'une convention CIFRE, au sein de l'entreprise Eurorad et du laboratoire LINC de l'Université de Strasbourg. Il a également bénéficié d'une collaboration étroite du Centre Régional de Lutte Contre le Cancer Paul Strauss.

Préalablement la société Eurorad avait développé une première sonde pour la détection du colorant par absorption. Ce dispositif optique utilisant une seule source lumineuse monochromatique, avait été couplé à une sonde de détection isotopique. Les résultats obtenus n'avaient pas satisfaits les chirurgiens qui avaient évalué ce dispositif. La société avait demandé conseil au LINC, et un premier appareil basé sur deux sources monochromatiques avait été réalisé. Des premières évaluations concluantes, effectuées sur des objets tests, ont amené la société à initier le projet de collaboration débouchant sur cette thèse.

Les travaux de ces trois années ont permis de surmonter les obstacles rencontrés et de corriger les défauts du premier équipement à une longueur d'onde, puis du prototype à deux longueurs d'onde réalisé en début de thèse. Ce travail a permis, en plus la détection des ganglions sentinelles en mesurant les photons diffusés, de réaliser cette détection à partir des photons de fluorescence émis par le colorant Bleu Patenté V lié à l'albumine sérique.

Dans un premier temps des méthodes optiques utilisant les photons diffusés ont été mises en œuvre pour la détection du ganglion sentinelle. Un premier prototype a été réalisé. Il utilise deux lasers de puissance moyenne de l'ordre du milliwatt. La première longueur d'onde a été choisie au voisinage du maximum d'absorption du Bleu Patenté V, la seconde en dehors de son spectre d'absorption. Des études préliminaires sur des objets tests ont démontré que ce prototype est beaucoup plus sensible que l'œil du chirurgien. Cet appareil a également permis de suivre, lors d'expérimentations animales, le passage et la fixation du colorant dans différents ganglions. Deux types de mesures ont été effectués : Dans un premier temps, la cinétique de marquage d'un ganglion, préalablement palpé, par différentes concentrations de Bleu Patenté V à travers la peau et les poils de l'animal a été suivie. Puis une seconde expérience a permis, en déplaçant la sonde à la surface de l'animal, de détecter la distribution

du colorant dans différents ganglions (1). Enfin, des mesures préliminaires sur quelques pièces opératoires ont permis de démontrer la possibilité d'une détection du ganglion sentinelle par la méthode des photons diffusés, avec des volumes de colorant injectés quatre fois inférieurs à la dose usuelle (2).

Cet instrument peut cependant engendrer des erreurs de spécificité de diagnostic, une désaturation du sang en oxygène étant interprétée par le dispositif comme une augmentation de la concentration de colorant. Une amélioration de la méthodologie de mesure a été mise en œuvre afin de corriger ce problème.

Le second prototype développé possède 4 diodes laser émettant à 4 longueurs d'onde. Des études sur objets tests ont montré que le seuil de détection de cet appareil était similaire à celui du dispositif à 2 longueurs d'onde. En fait, la sensibilité de détection est déterminée par la puissance de la diode laser émettant dans la bande d'absorption du colorant. Des mesures sur des milieux plus complexes, contenant plusieurs absorbeurs différents, ont démontré que l'utilisation de 4 longueurs d'onde permettait de corriger les erreurs de spécificité liées au calcul de la concentration de colorant (3). Une expérimentation animale réalisée avec ce dispositif a mis en évidence le passage et la fixation du colorant dans un ganglion préalablement sélectionné.

Un protocole de recherche clinique plus ambitieux a été réalisé avec ce nouveau dispositif. Il a porté sur la recherche de ganglions sentinelles sur 78 pièces opératoires. L'appareil permet de détecter des ganglions marqués, mais non visibles par le chirurgien, par des volumes de Bleu Patenté V injectés divisés par 8. La faible dispersion des résultats de mesures de la concentration relative de colorant dans le ganglion, pour un volume d'injection donné, montre que cet appareil peut apporter des informations pertinentes au chirurgien et diminuer le nombre de faux négatifs (4).

Le second axe de travail, développé durant la dernière année de cette thèse, a porté sur la détection du ganglion sentinelle en utilisant les photons de fluorescence émis par le Bleu Patenté V lié à l'albumine.

Le Bleu Patenté V libre ne possède pas un rendement quantique de fluorescence suffisant pour être détecté par une telle méthode. Notre travail a montré que ce rendement de fluorescence peut être amplifié par un facteur voisin de 100, lorsque ce colorant est fixé à une molécule d'albumine. Le second appareil avait été conçu pour intégrer la détection des photons de fluorescence. On y a intégré une diode laser de forte puissance, pour exciter le Bleu Patenté V, et un photomultiplicateur pour détecter les photons de fluorescence. Des expériences sur objets tests ont permis de déterminer que le seuil de détection par

fluorescence est de $2,5 \text{ nmol.L}^{-1}$ à 5 mW . Cette sensibilité de détection est à comparer au seuil de détection par la méthode des photons diffusés, égale à 10 nmol.L^{-1} à 1 mW . Ces deux valeurs sont nettement inférieures au seuil de détection de l'œil, proche de $300 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$. Cependant, ces deux seuils de détections sont relativement proches si l'on remet chacun d'eux à une même valeur de puissance lumineuse.

Ce travail s'est achevé par des essais d'imagerie de fluorescence, avec un prototype d'imagerie préclinique existant au laboratoire et adapté à la détection du Bleu Patenté V.

Plusieurs types d'albumine sérique, humaine et de rat, ont été testées, ainsi que l'albumine colloïdale utilisée comme vecteur de l'isotope radioactif pour la recherche du ganglion sentinelle. Le Bleu Patenté V ne se liant pas à cette albumine colloïdale, l'alternative proposée aux cliniciens est de réaliser un mélange Bleu Patenté V Guerbet – Albumine Sérique Humaine Viabelex. Ces deux produits pourraient être injectés ensemble, dans le cadre d'un projet de recherche clinique, pour la recherche du ganglion sentinelle par imagerie de fluorescence. Une lettre d'intention de Projet Hospitalier de Recherche Clinique portant sur l'évaluation de cette méthode a été déposée par le Centre Régional de Lutte Contre le Cancer Paul Strauss.

Ce travail de thèse a validé deux nouvelles méthodologies de détection du ganglion sentinelle. Celles-ci ont l'avantage d'utiliser le colorant Bleu Patenté V. Que ce soit en utilisant la détection des photons diffusés ou des photons de fluorescence, les instruments conçus ont des seuils de détectivité nettement meilleurs que l'œil du chirurgien et peuvent diminuer significativement les taux de faux négatifs et ses conséquences lors de l'intervention chirurgicale. Ces travaux peuvent constituer une étape vers le développement d'un nouvel équipement de diagnostic opto-nucléaire. La partie optique de cet appareil peut être basée sur la détection des photons diffusés ou de fluorescence. Cependant la méthode de fluorescence est plus simple à mettre en œuvre. En effet, l'information est fournie directement par l'image de fluorescence dans un cas alors qu'un calcul de la concentration à partir de l'information collectée est nécessaire pour la méthode utilisant les photons diffusés.

Les travaux de fluorescence peuvent conduire à l'introduction d'une nouvelle modalité d'imagerie per-opératoire : l'imagerie de fluorescence du Bleu Patenté V lié à l'albumine sérique humaine. Cette imagerie peut être appliquée à la détection du ganglion sentinelle, mais également à d'autres domaines tels que la chirurgie des cancers, la chirurgie hépatique et les imageries vasculaire et lymphatique.

Bibliographie

1. **F. Tellier, R. Ravelo, H. Simon, R. Chabrier, J. Steibel, P. Poulet.** Sentinel lymph node detection by an optical method using scattered photons. *Biomedical Optics Express*. 2010, Vol. 1, 3, pp. 902-910.
2. **F. Tellier, R. Rasata, H. Simon, M. Wilt, J. F. Rodier, P. poulet.** Une sonde optique au service du chirurgien pour la détection du ganglion sentinelle dans le cancer du sein: "le troisième oeil". *La Lettre du sénologue*. 2011, Vol. 51, 1, pp. 35-37.
3. **F. Tellier, H. Simon, F. X. Blé, R. Ravelo, R. Chabrier, J. Steibel, J. F. Rodier, P. Poulet.** Comparison of 2- and 4-wavelength methods for the optical detection of sentinel lymph node. *Proceedings paper-SPIE Munich*. 2011, Vol. 8092, DOI: 10.1117/12.889631.
4. **F. Tellier, P. Poulet, J. P. Ghnassia, M. Wilt, D. Weitbruch, J. F. Rodier.** A new optical probe for the detection of the sentinel lymph node using Patent Blue V dye in breast cancer: a preliminary study. *European Journal of Surgical Oncology*. 2011, Vol. Submitted.

RESUME

La méthode du ganglion sentinelle (GS) s'est imposée comme la technique de référence afin de détecter un envahissement métastatique dans le cas du cancer du sein. Deux méthodes optiques de détection et de localisation du GS ont été mises en œuvre. La première consiste à enregistrer les photons diffusés par les tissus afin de détecter l'accumulation d'un colorant dans le GS. La seconde méthode consiste à détecter l'émission de photons de fluorescence. Pour les deux applications le colorant choisi est celui le plus utilisé en routine clinique : le Bleu Patenté V (BPV).

Un premier instrument optique, utilisant 4 diodes lasers d'excitation, afin de discriminer l'absorption du BPV des autres chromophores tissulaires, et une photodiode de détection des photons diffusés a été développé. Des expériences réalisées sur des solutions absorbantes et diffusantes, simulant les propriétés optiques des tissus du sein, ont permis de déterminer que la sonde est environ 30 fois plus sensible que l'œil de l'expérimentateur, pour une puissance lumineuse d'excitation de 1 mW. Une expérimentation animale a permis de vérifier, *in-vivo*, la faisabilité de la méthode. Puis, une collaboration avec un centre régional anticancéreux a permis la caractérisation *ex-vivo* du prototype sur 78 pièces opératoires. Celui-ci a détecté des GS marqués par des volumes de BPV 8 fois plus faibles que le volume utilisé usuellement par le chirurgien et visuellement non colorés. Cette nouvelle technique devrait permettre au chirurgien de disposer d'un outil diagnostique pouvant réduire le nombre de faux négatifs durant le geste opératoire et se poser comme une alternative à la détection isotopique.

Parallèlement nos études ont permis de mettre en évidence une exaltation du rendement quantique de fluorescence du BPV, d'un facteur 30, lorsqu'il est lié à de l'albumine humaine sérique. Ainsi, un prototype de détection des photons de fluorescence a été développé. Il possède un seuil de détection environ 100 fois inférieur à l'œil, pour une puissance lumineuse d'excitation de 5 mW. Des ganglions marqués par le fluorophore ont été détectés sur un modèle animal d'inflammation, avec ce dispositif et à l'aide d'un système d'imagerie adapté. Ce travail devrait apporter aux chirurgiens un appareil capable de localiser précisément un GS marqué par un colorant fluorescent injectable chez l'homme par voie percutanée.

ABSTRACT

The sentinel lymph node (SLN) method has become the gold standard to detect breast cancer metastasis. Two optical methods of detection and localization of SLN have been implemented. The first is based on the recording of scattered photons in the tissue to detect dye accumulated in the node. The second consists in detecting the emission of fluorescence photons. For both applications the dye selected is the most frequently used in clinical routine: Patent Blue V (PBV).

A first optical instrument has been developed, using 4 excitation laser diodes, to discriminate absorption of PBV from that of other tissue chromophores, and one photodiode to detect scattered photons. Experiments on absorbing and scattering solutions simulating the optical properties of breast tissue determined that the probe was about 30 times more sensitive than the eye of an experimenter, for a 1 mW excitation power light. Animal experimentation allowed to verify, *in-vivo*, the feasibility of the method. Subsequent collaboration with a regional cancer centre has permitted *ex-vivo* characterization of the prototype using 78 surgical pieces. SLN marked with PBV volumes 8 times as low as that usually used by the surgeon, and not visually blue. This new technique should allow the surgeon to have a diagnostic tool that can reduce false negatives during the surgical procedure and can be an alternative to isotopic detection.

Our parallel studies highlighted an enhancement of the PBV fluorescence quantum yield by a factor of 30 when it was bounded to human serum albumin. Thus, a prototype to detect fluorescence photons has been developed. Its detection threshold is about 100 times as low as that of the human eye, for a 5 mW excitation power light. Fluorophore-marked nodes were detected in an animal model of inflammation, with this device and using an appropriate imaging system. This work should provide surgeons with a device that can localize precisely a marked SLN after percutaneous injection of a fluorescent dye.