



IMAGERIE DE FLUORESCENCE EN SÉNOLOGIE

DIU DE SÉNOLOGIE

BADIANE Serigne Moussa

MD, PhD

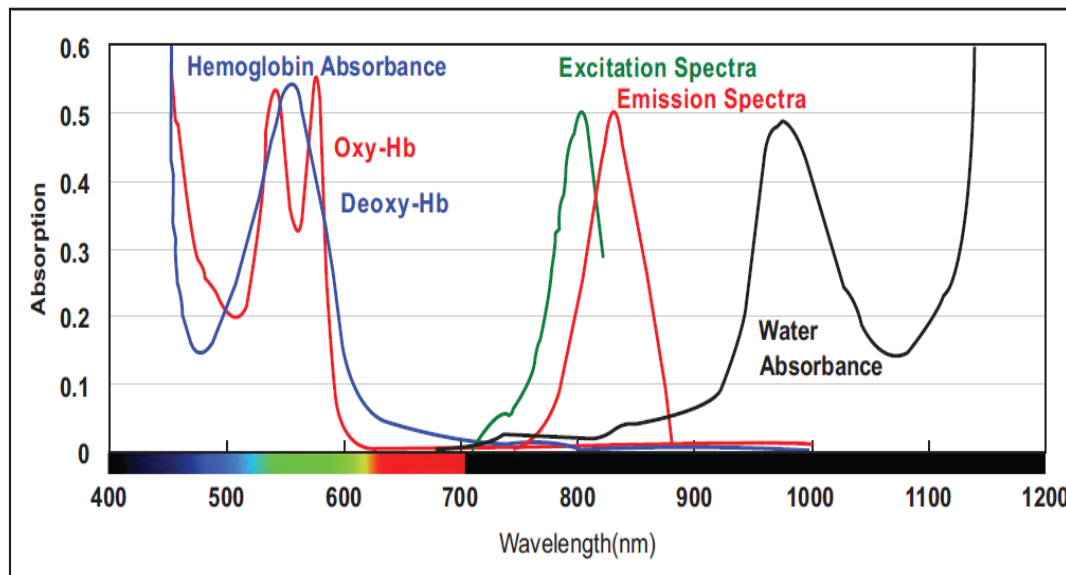
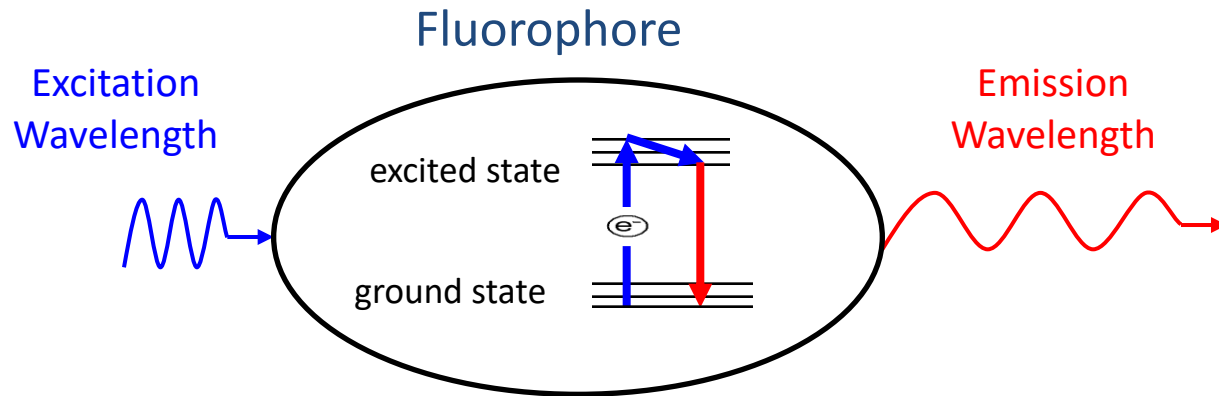
Biophysique – Médecine Nucléaire

INTRODUCTION

- L'imagerie de fluorescence IR: **technique qui va s'imposer** à court terme au niveau international
- Reconnu pour son **potentiel** d'amélioration de la performance des interventions chirurgicales
- **Coûts** d'investissement et d'exploitation modérés et portabilité
- Considérée par l'Institut National du Cancer (INCA) en France comme une stratégie visant à la **réduction des inégalités géographiques** face au cancer

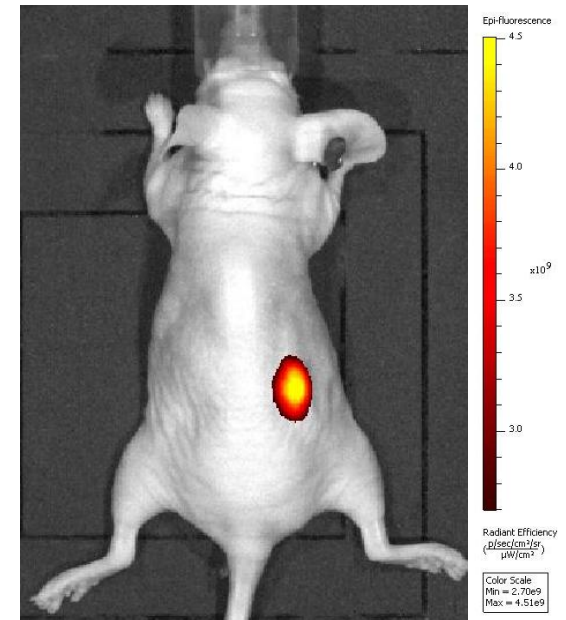
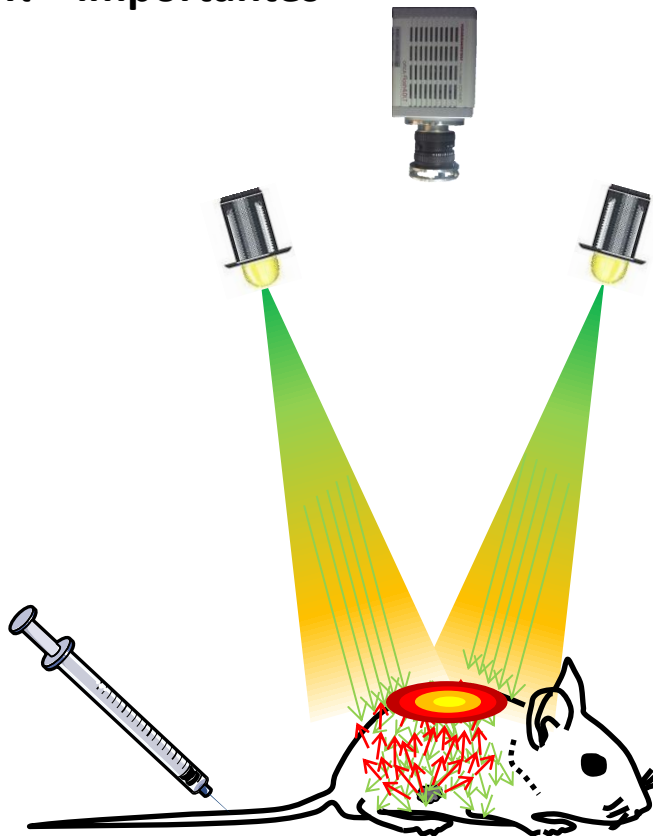
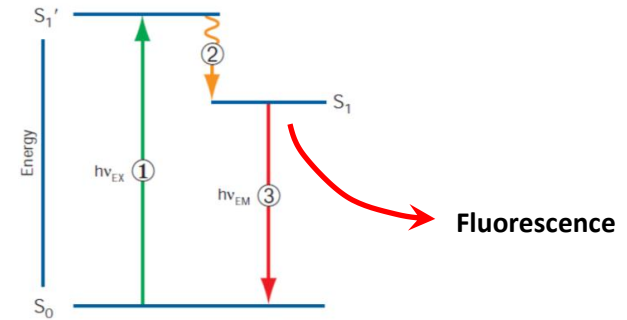
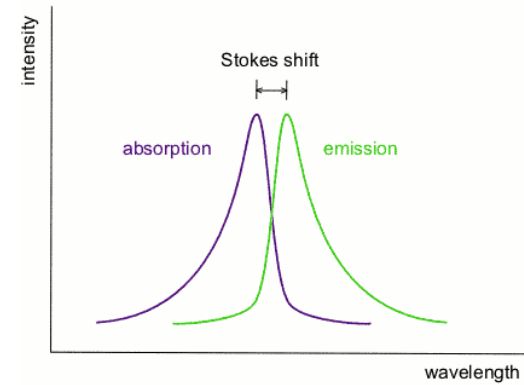
- Technologie désormais **mature**
- Développement actuel **de nombreux agents de contraste en cours**
- **AMM disponible pour l'ICG et le BPV** traceurs utiles pour le repérage lymphatique et vasculaire
- Intérêt particulier d'une imagerie moléculaire spécifique en cancérologie
- De nombreuses études de recherches cliniques multicentriques actuellement en cours en Europe, en Asie et aux USA

PRINCIPE DE LA FLUORESCENCE



Principe de l'imagerie de Fluorescence :

- Illumination par λ_{EX} d'excitation
- Excitation des fluorochromes
- Emission d'une lumière fluorescente λ_{EM} à des λ + importantes

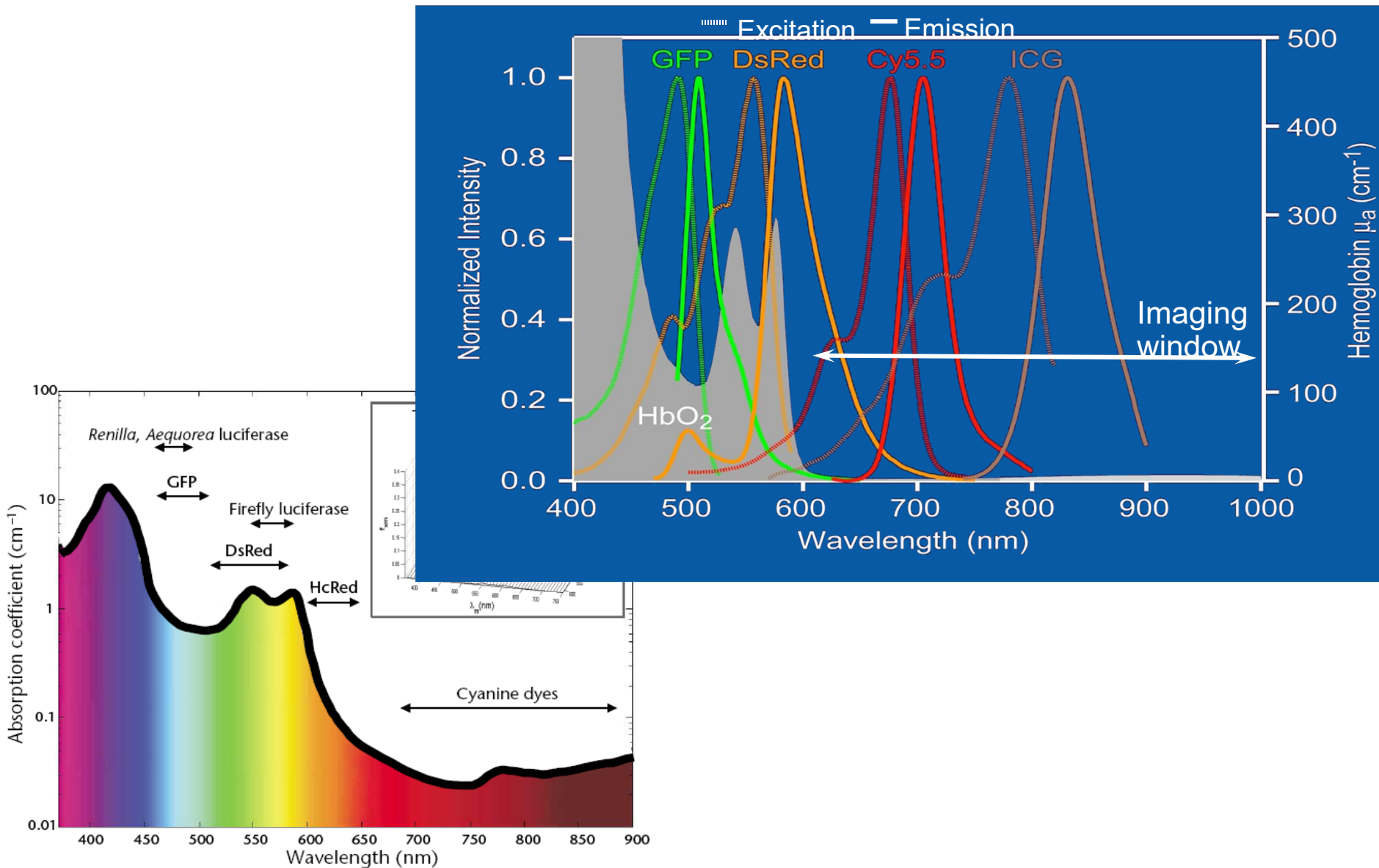


LA FLUORESCENCE IN VIVO DANS LE **PROCHE INFRAROUGE**

- Coefficients d'absorption de l'hémoglobine, de l'eau et des lipides + faibles dans le proche IR (650 – 900 nm)

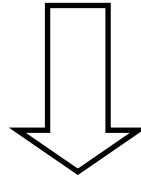
⇒ Proche IR peu absorbé par les tissus

Spectres d'émission des fluorochromes les plus courants



Intérêts

Absorption moins importante



Possibilité pour les photons de traverser
plusieurs cm d'épaisseur

- Minimise l'autofluorescence des organes \Rightarrow \nearrow RSB

INJECTER

ÉCLAIRER

VISUALISER



POUR LE
CHIRURGIEN

POUR LE PATIENT

POUR L'HÔPITAL

La visualisation de phénomènes biologiques invisibles à l'œil nu. Une aide à la prise de décision clinique en temps réel. Un geste chirurgical plus précis.

Une meilleure préservation des tissus sains. Un risque réduit de complications postopératoires. Une durée d'hospitalisation diminuée.

Une technologie utilisable sur un large spectre d'indications chirurgicales. Une réduction des coûts liés aux complications des procédures chirurgicales. Une technologie accessible au plus grand nombre.

IMAGERIE DE FLUORESCENCE DU GANGLION SENTINELLE

(Repérage du ganglion sentinelle)

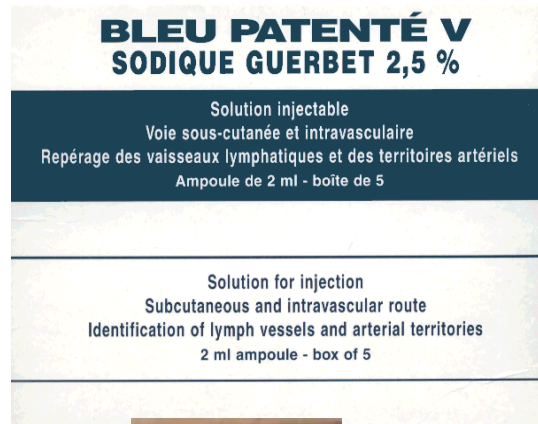
CONTEXTE

- Statut du GS, principal **facteur pronostique**
- Survie à 5 ans > 82 % en cas de GS négatif
- Procédure de **référence**, en l'absence d'atteinte clinique ou radiologique axillaire (T0, T1 et T2 jusqu'à 5 cm)

TECHNIQUE CONSENSUELLE

Colorimétrique + Isotopique

- Colorant lymphotrope (BPV)
- Traceur radio-isotopique (colloïdes marqué au 99mTc)



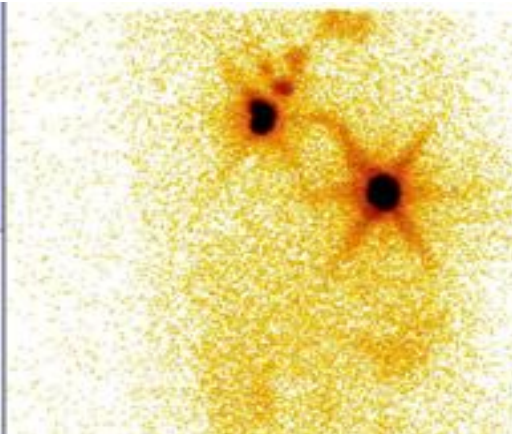
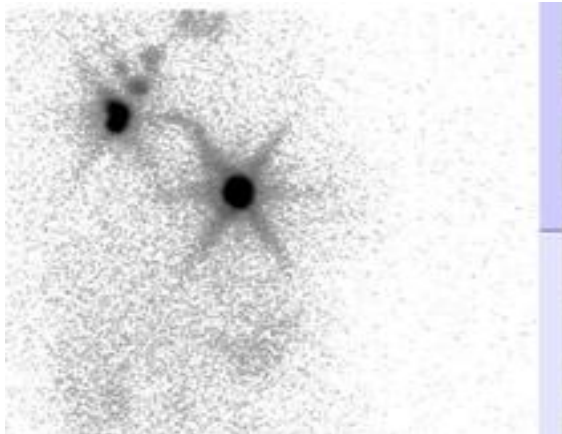
TECHNIQUE CONSENSUELLE

Colorimétrique + Isotopique

Lymphoscintigraphie préalable

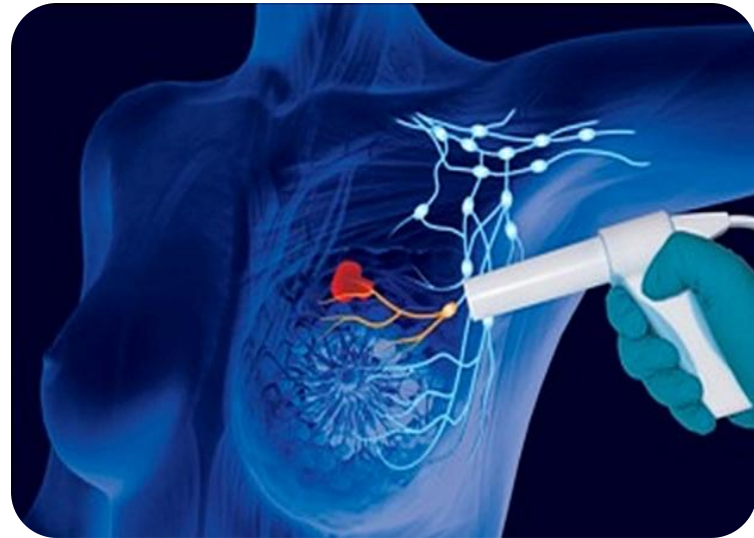
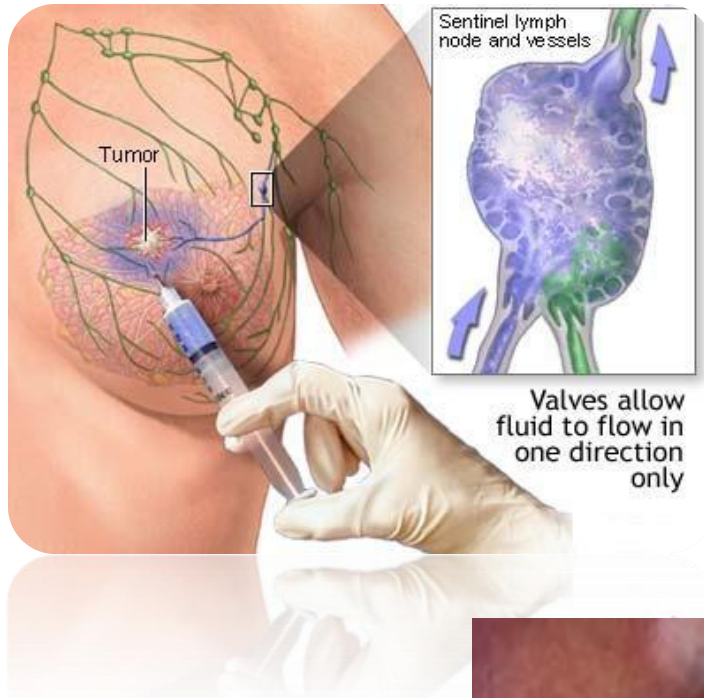
Planning

injection	scinti	bloc
8H	11H	14H
13H	16H	8H



TECHNIQUE CONSENSUELLE

Colorimétrique + Isotopique



TECHNIQUE CONSENSUELLE

Colorimétrique + Isotopique

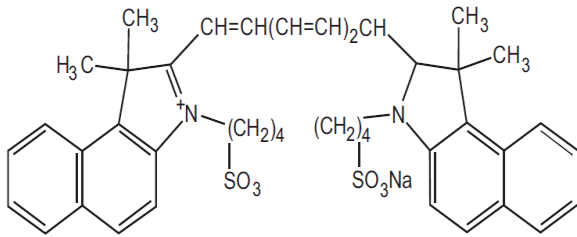
- Bonne performance
- Taux d'identification : 98 %

Cependant

- Cout d'**investissement et d'exploitation**
(582 Euros/Malade en moyenne en France)
- Contraintes de **radioprotection**
- Contraintes structurelles **organisationnelles** et temporelles

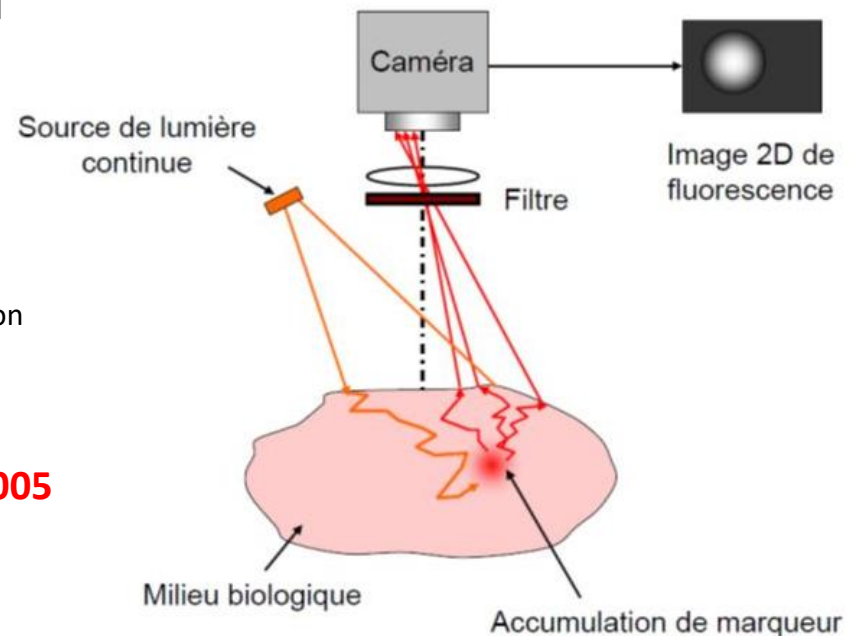
FLUORESCENCE : ALTERNATIVE?

- **ICG (Indocyanine green)** $C_{43}H_{47}N_2NaO_6S_2$



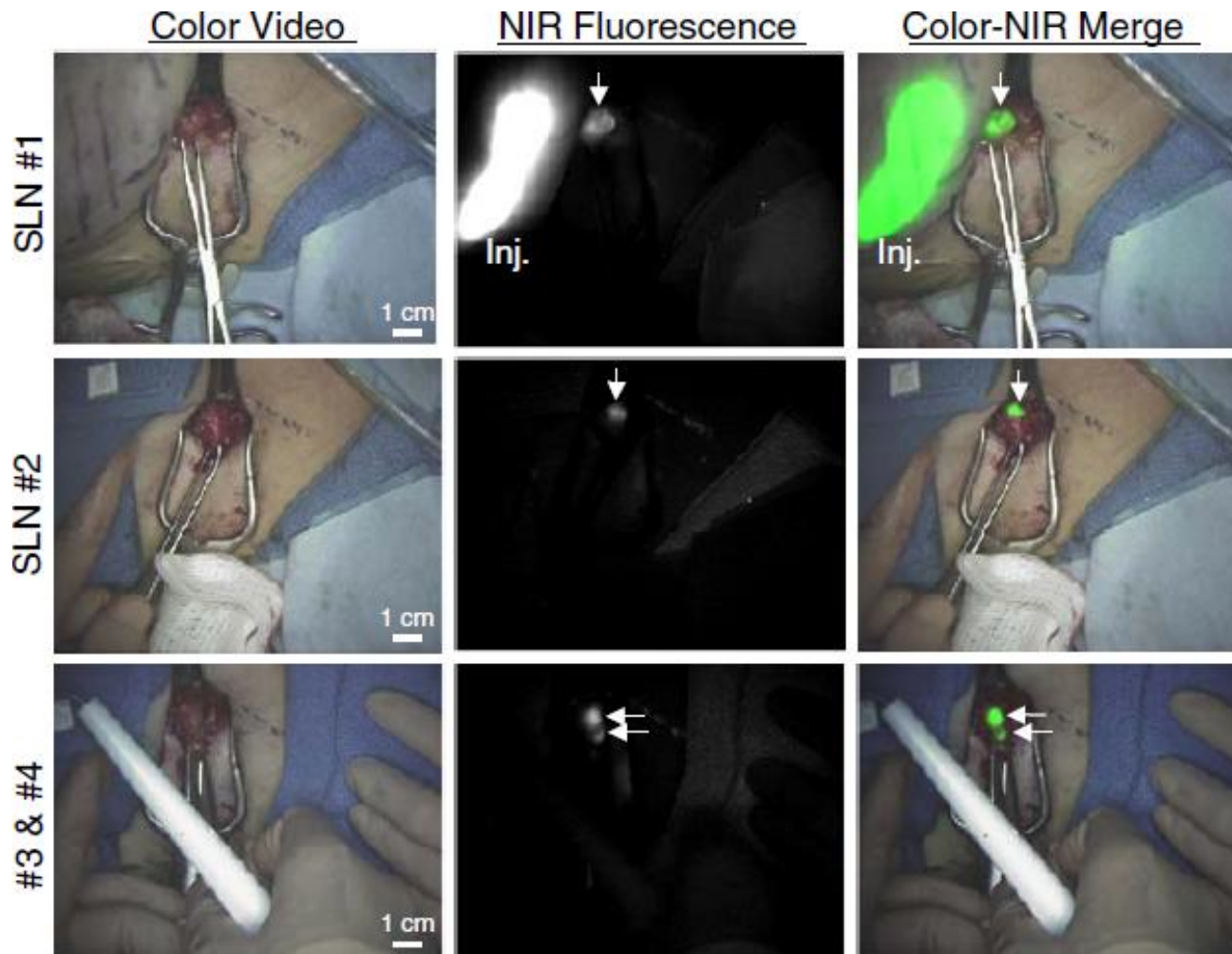
- **Mise en œuvre**

- **Caméra multi spectrale** , source **d'excitation**
 - Injection péri-aréolaire de l'ICG au bloc en début d'intervention
 - Source de lumière blanche sur champ opératoire
 - Diode laser d'excitation de l'ICG
 - Ray de fluorescence détectés par caméras CCD ...
- **Première description** dans la détection du GS en **2005**





NIRF Caméra
Fluobeam® by FLUOPTICS



NIRF by ICG

S. L. **Troyan et al.** The FLARE Intraoperative Near-Infrared Fluorescence Imaging System: A First-in-Human Clinical Trial in Breast Cancer Sentinel Lymph Node Mapping. *Ann Surg Oncol* , jul 2009.

HOPITAL ST LOUIS

FLUORESCENCE : ALTERNATIVE?

- **Intérêts**

- **Coûts** moindres (45euros le flacon d'ICG)
- Réactions allergiques dans moins de 1/10000cas,
- Visualisation des **vaisseaux lymphatiques**
- **Circuit** patient simplifié

- **Limites**

- Contamination du champ opératoire
- Doses non consensuelles
- Tissus profonds
- Nombre de ganglion détecté plus élevé

- **Différentes stratégies d'utilisation proposées**

	Kitai et al., 2005 [39]	Murawa et al., 2009 [40]	Hirche et al., 2010 [18]	Hojo et al., 2010 [26]	Abe et al., 2011 [21]	Wishart et al., 2012 [27]	Sugie et al., 2013 [41]	Verbeek et al., 2014 [16]	Takeuchi et al., 2014 [24]
Type étude	Étude de faisabilité	Tech + ICG	ICG seule	ICG + Bleu vs ICG + Tech	Bleu + ICG	ICG + bleu + Tech	ICG + bleu	ICG + Tech ± bleu	ICG + bleu
Remarques	1 ^{re} utilisant une caméra CDD	Étude dose-dépendante	Médiane de suivi = 4,7 ans						
Nombre de patientes	18	20	43	141	128	100	99	95	145
Dose ICG		1 mL (=5 mg), 2 mL, 3 mL	11 mg	2 mL	0,15 mL à 0,5 %			0,62 mg	2 mL à 0,5 %
Nombre de ganglions détectés ICG	2,8 (1-6)	1,75	2	3,8	NC	1,9	3,4 (1-8)	1,9 (1-5)	3,6
Taux de détection ICG (en %)	94	97	98	99	100	100	99	100	99
Nombres de ganglions détectés bleu				1,9	NC	1,5	NC	NC	
Taux de détection bleu (en %)				93	63	94	78	78	
Nombre de ganglions détectés Tech				2				NC	
Taux détection Tech (en %)				100				88	

N patientes : nombre patientes ; Tech : technétium.

AU DE LÀ DU REPÉRAGE: LE CIBLAGE TUMORALE !

- Potentiel de l'imagerie moléculaire en cancérologie
- Problématique du GS micro envahi
- Bases théoriques et expérimentales du ciblage des intégrines pour l'imagerie multimodale
- Démarche de recherche transrationnelle

Les Intégrines

- Récepteurs transmembranaires hétérodimériques
- Composé d'une sous unité alpha (α) et d'une sous unité bêta (β)

Les Intégrines $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_v\beta_5$

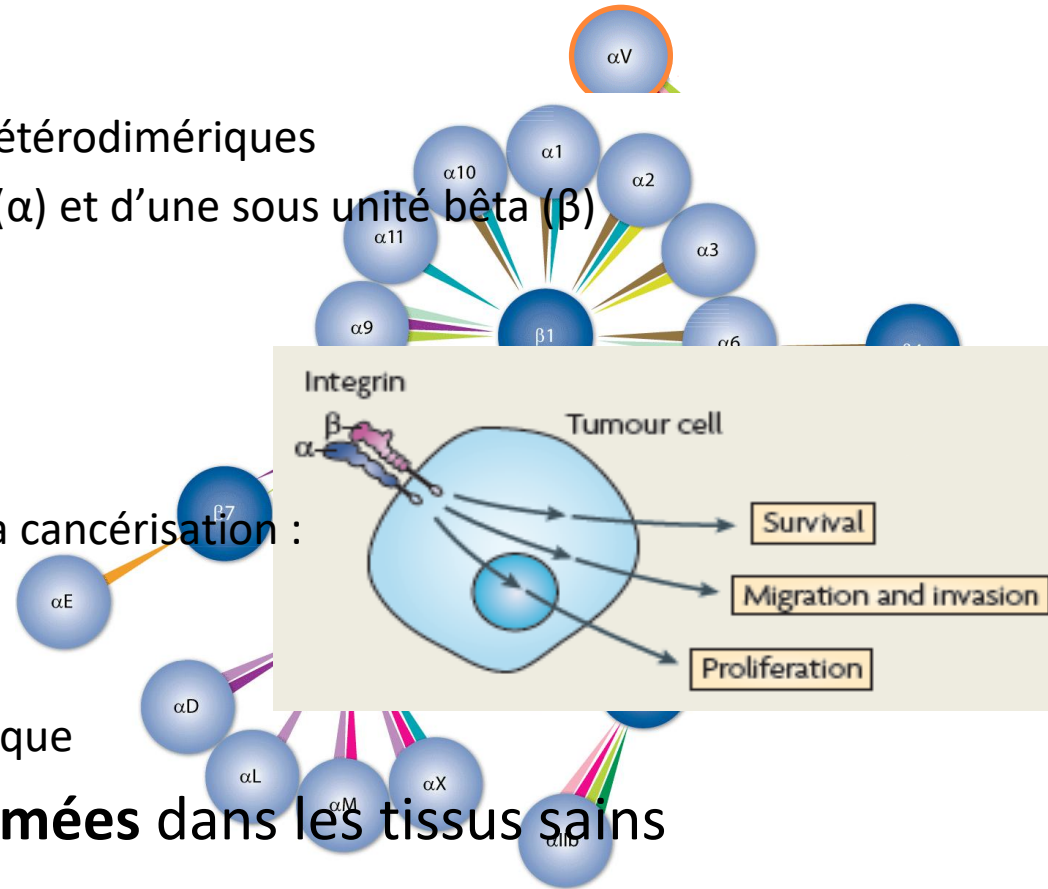
- Implication de $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_v\beta_5$ dans la cancérisation :

- Néoangiogenèse
- Prolifération
- Migration, Invasion métastatique

Très faiblement exprimées dans les tissus sains

Fortement surexprimées dans :

- l'endothélium activé (switch angiogénique)
- de nombreuses tumeurs solides



Le RGD

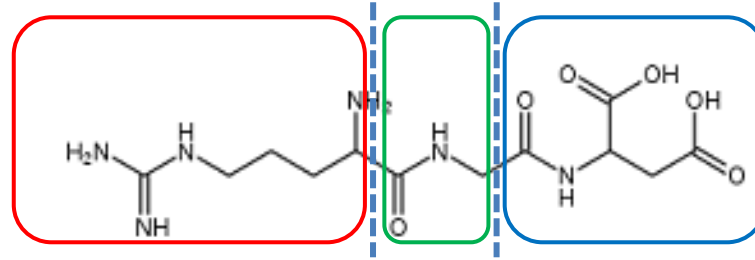
Ligand endogène des intégrines

➤ Tripeptide :

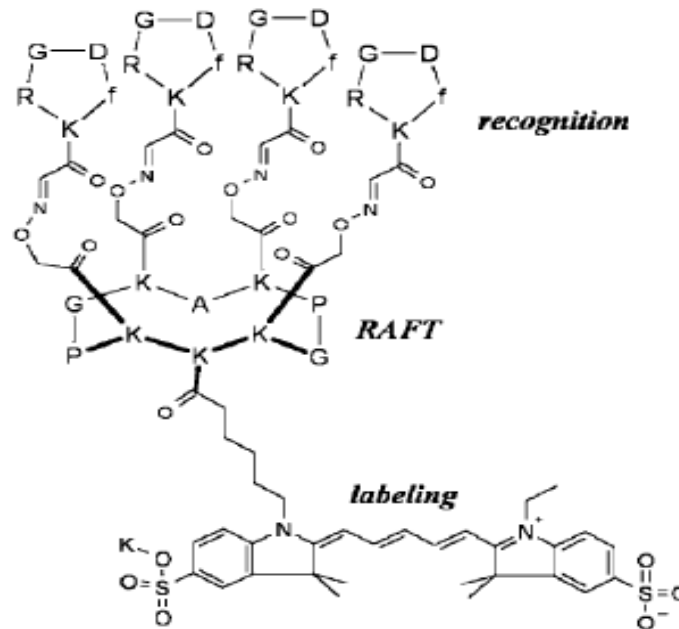
☐ R → Arginine

☐ G → Glycine

☐ D → Acide Aspartique



➤ L'AngioStamp, commercialisé par Fluoptics



Structure du RAFT-c(RGDfk)₄-Cy5

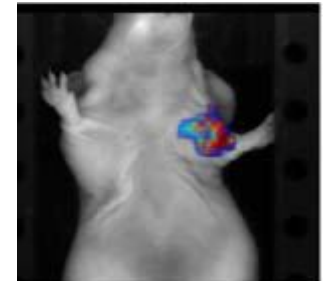
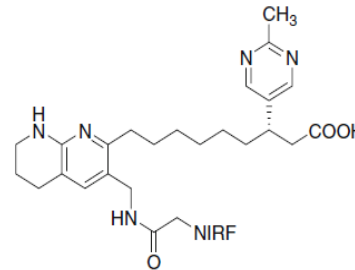
• Utilisation en Imagerie de ciblage

Axe majeur de l'utilisation des motifs RGD pour différentes techniques d'imagerie

- La Tomographie d'Emission de Positons (TEP) → 18F-Galacto-RGD
- La Tomographie par Emissions MonoPhotoniques (TEMP) → Oxotechnetium
- L'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) → Oxyde de fer super paramagnétique
- L'Echographie → Microbulles
- La Fluorescence

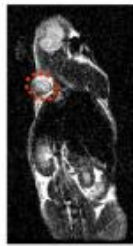
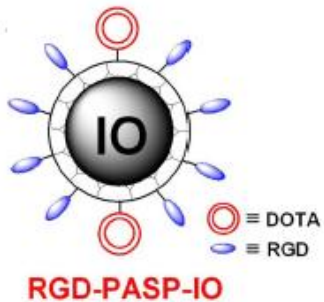
Les sondes fluorescentes sont les plus avancées :

- IntegriSense® (PerkinElmer)
- AngioStamp® (Fluoptics)

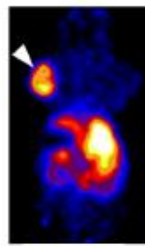


Kossodo, 2009

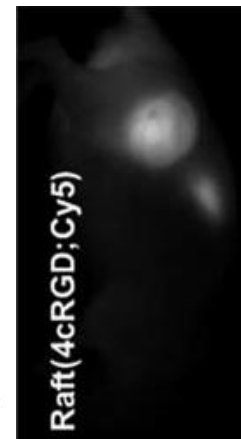
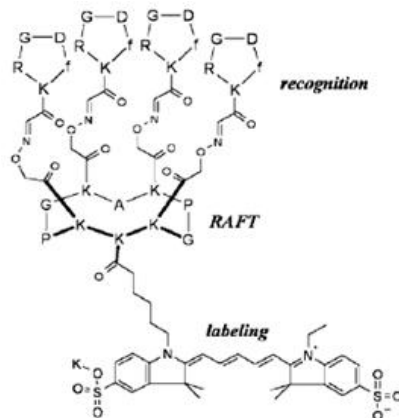
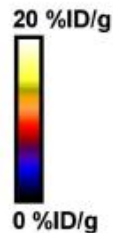
- Les sondes multimodales



MRI
Zhang, 2011

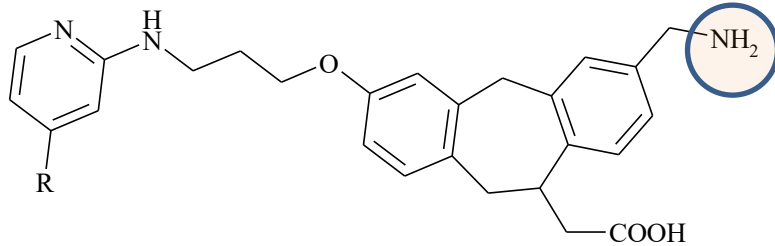


PET



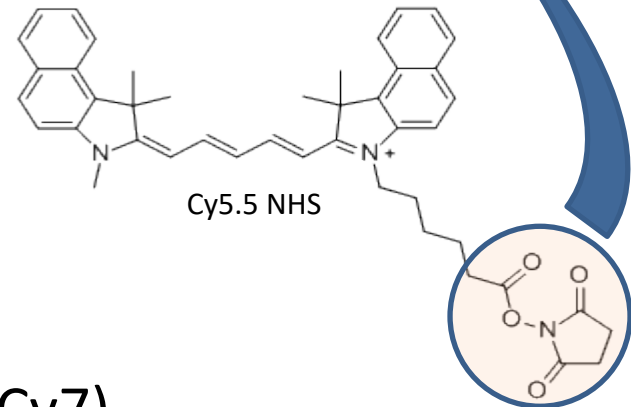
Garanger, 2005

➤ Synthèse du mime RGD (s46744)



(II)

	Cy3	Cy5.5	Cy7
Excitation	550 nm	675 nm	743 nm
Emission	570 nm	694 nm	767 nm

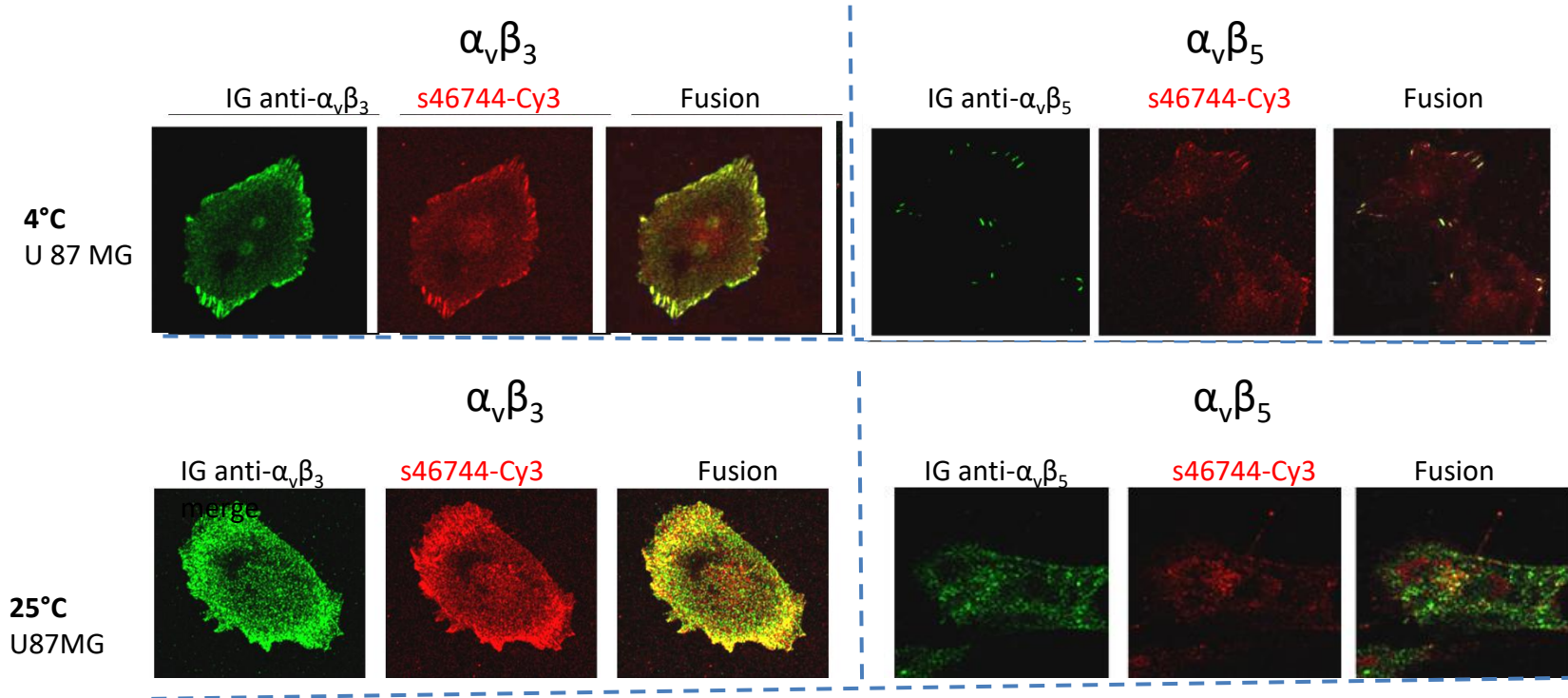


➤ Couplages aux Cyanines (Cy3, Cy5.5 et Cy7)

- Etudes en cytométrie de flux et microscopie
- Imagerie in vitro et in vivo

➤ Ciblage tumoral in vitro

- Etude de ciblage des intégrines $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_v\beta_5$ (Microscopie Confocale)
- Incubation du s46744-Cy3 + Anticorps anti-intégrines



Co-localisation du s46744-Cy3 avec les Intégrines $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_v\beta_5$

EXPÉRIENCE PERSONNELLE :

DÉTECTION DU MICRO-ENVAHISSEMENT DU GANGLION SENTINELLE

EXPLORATIONS PAR **IMAGERIE MULTIMODALITE**

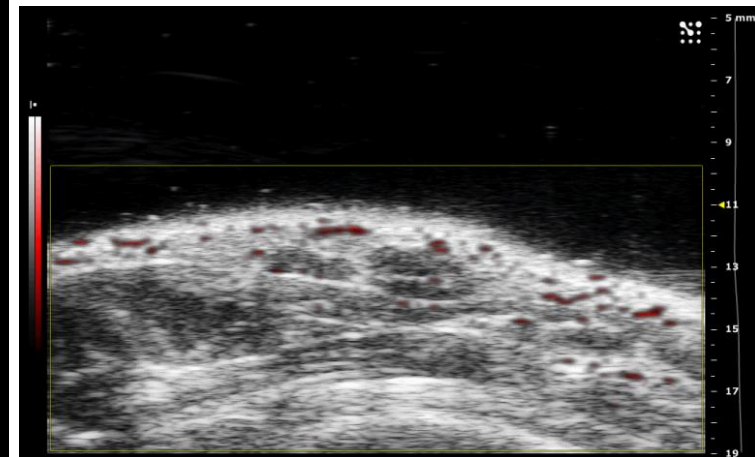
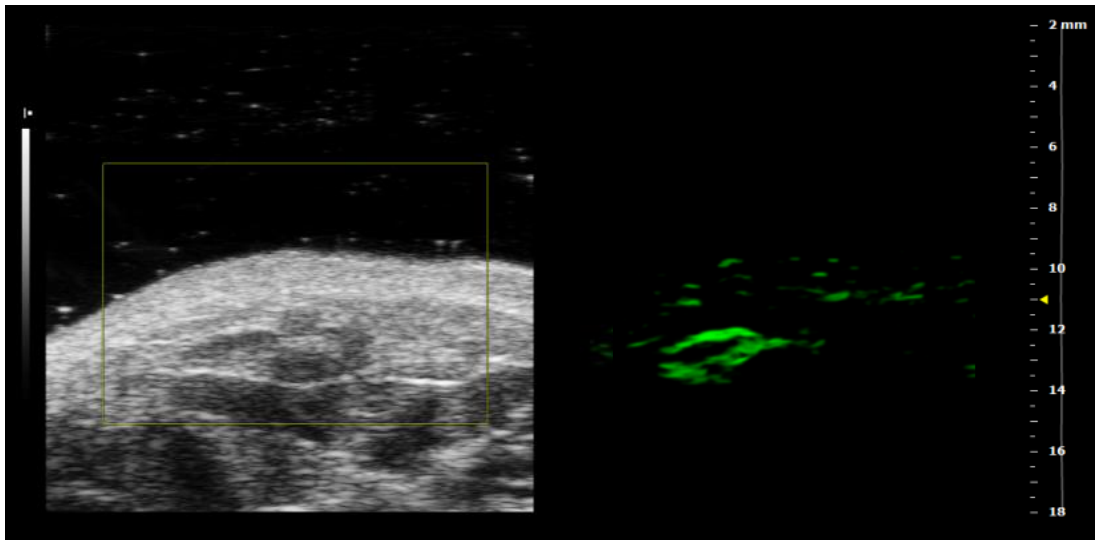
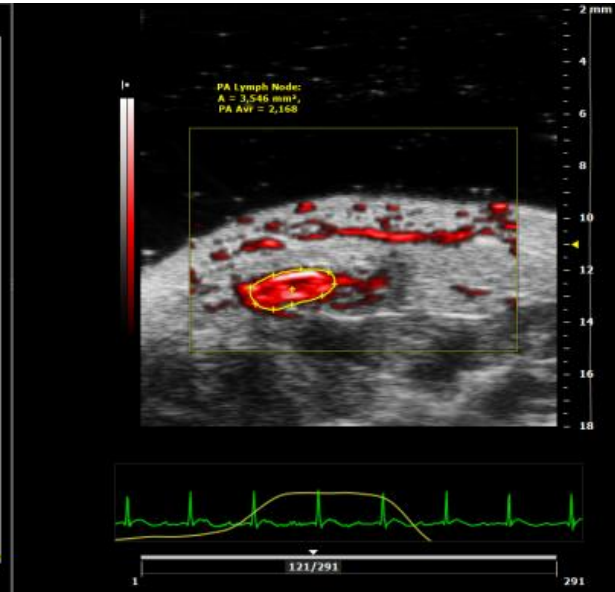
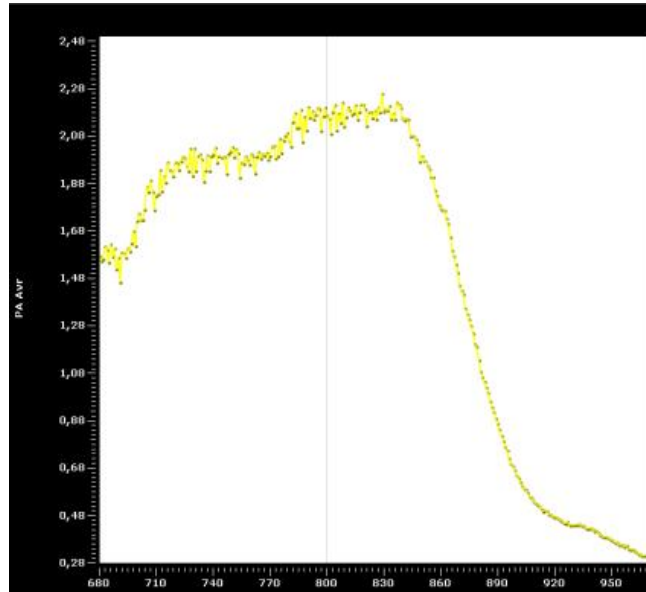
- D'une part :
 - **L'échographie** pour sa résolution anatomique dans l'identification du Ganglion Sentinelle (GS)
 - **La Photo Acoustique (PA)** pour mettre en évidence l'évolution de la micro-biodistribution d'un agent diffusible, le **vert d'indocyanine dans le GS** (lymphographie dynamique) avec un VEVO LAZR / FUJIFILM VisualSonics .
- D'autre part :
 - **Bioluminescence et Imagerie de fluorescence proche IR** avec un IVIS-Lumina II /Perkin Elmer .

METHODE

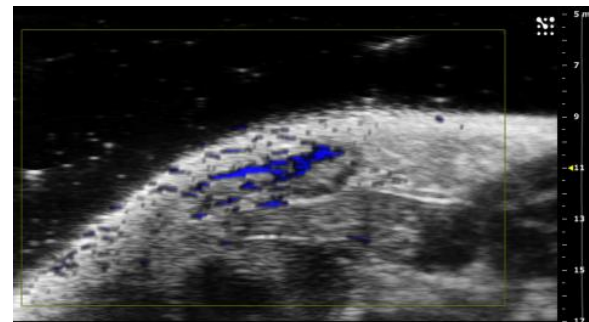
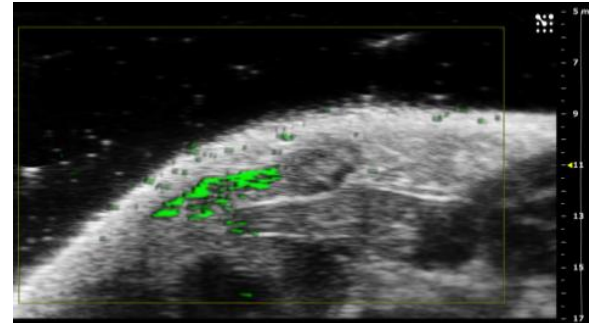
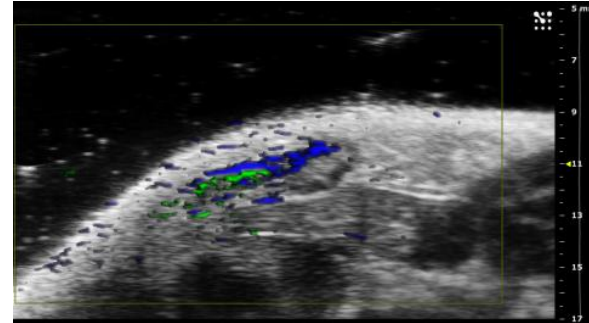
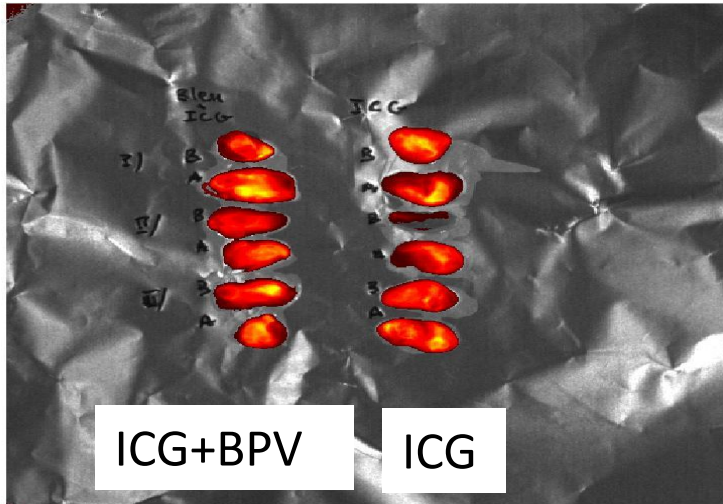
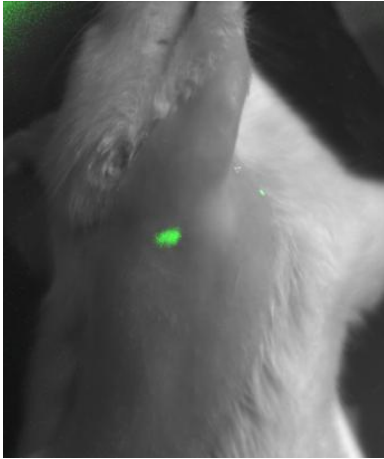
- **Rats et souris** nude femelles
- Modèle adénocarcinome mammaire humain **MDA-MB-231-luc** (exprimant les deux intégrines), 1 Million de cellules sous 25 μ l ,injection interdigitée patte avant .
- **BLI : évaluation de l'invasion du GS**; 2mg de luciférine ,25 μ l en interdigité.
- **Injection IV du mime RGD-AF 750, formulation hautement diffusible**, 24 H avant imagerie sur ganglion prélevés, ex vivo.
- Traitement d'image avec Spectral unmixing

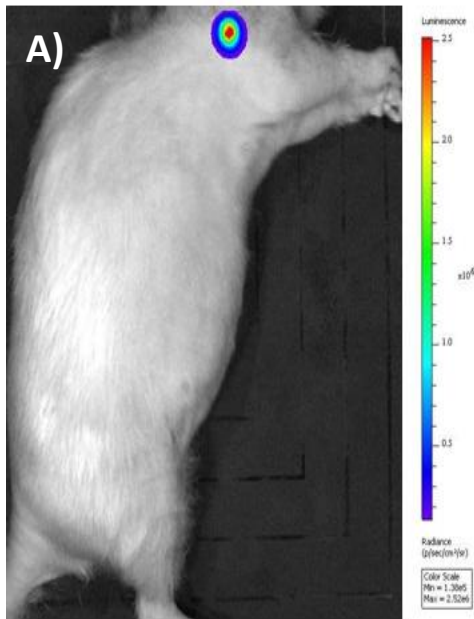
RESULTATS

Lymphographie par du vert d'indocyanine (ICG)

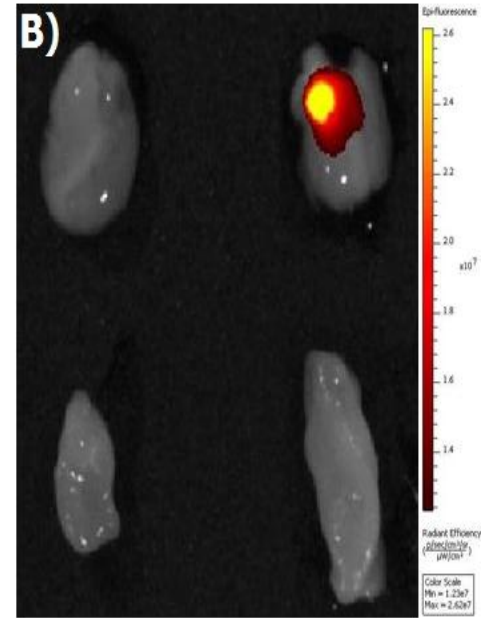


Recherche d'une interférence entre l'ICG et le bleu patenté de repérage en chirurgie





A) Bioluminescence du ganglion axillaire droit chez un rat nude , J5 post-inj de MDA-MB-231 dans la patte avant droite .



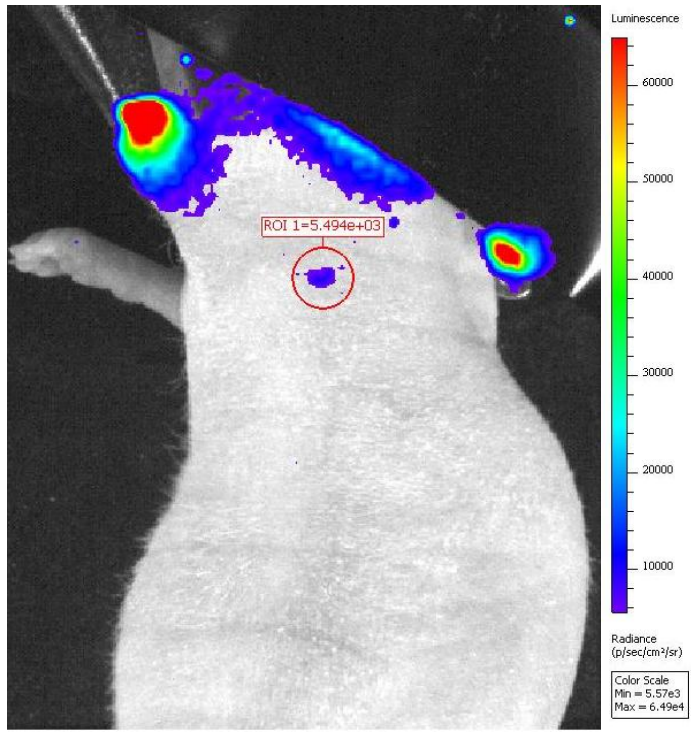
B) Fluorescence du mime-RGD sur ganglion excisé (axillaire droit et gauche en haut, inguinal droit et gauche en bas).

- **Modèle Rat : Immuno-compétence résiduelle et taches pigmentées noires sur la peau, (gênant la PA & NIRF).**
- **Poursuite des études sur modèle souris**

MDA MD 231 luc:
Minimal invasion of SLN
Based on bioluminescence

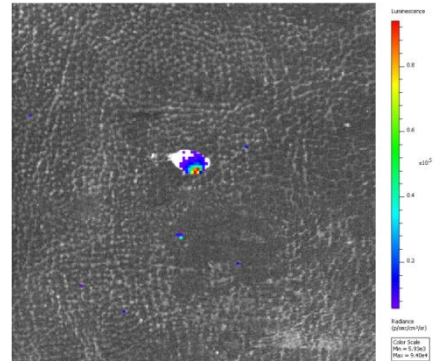
RGD mimetic IV inj.

Day 47

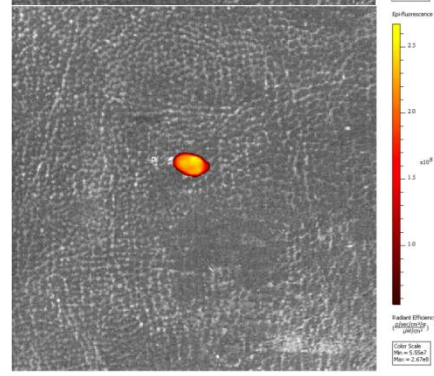


Excised LN

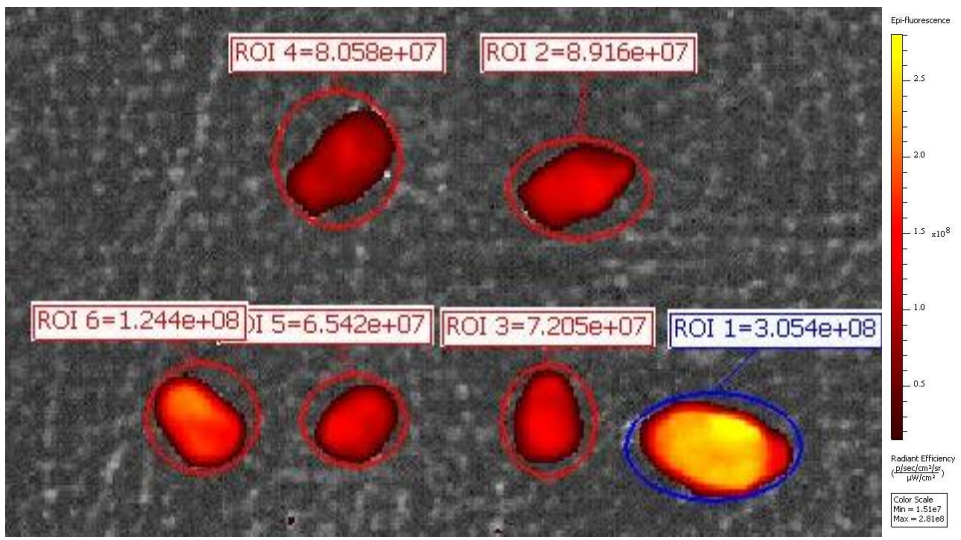
BLI



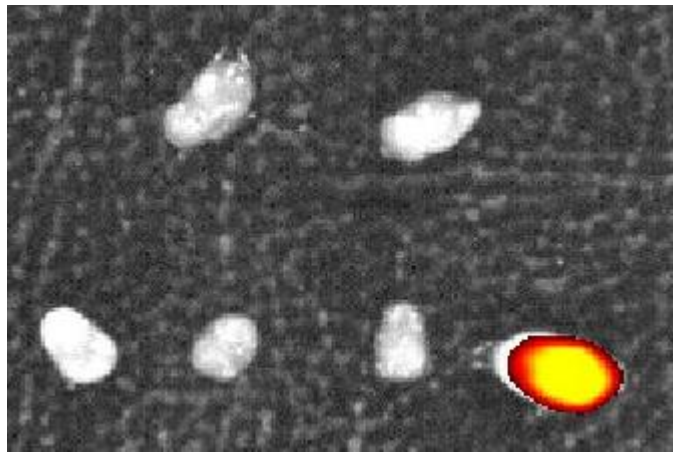
FLUO



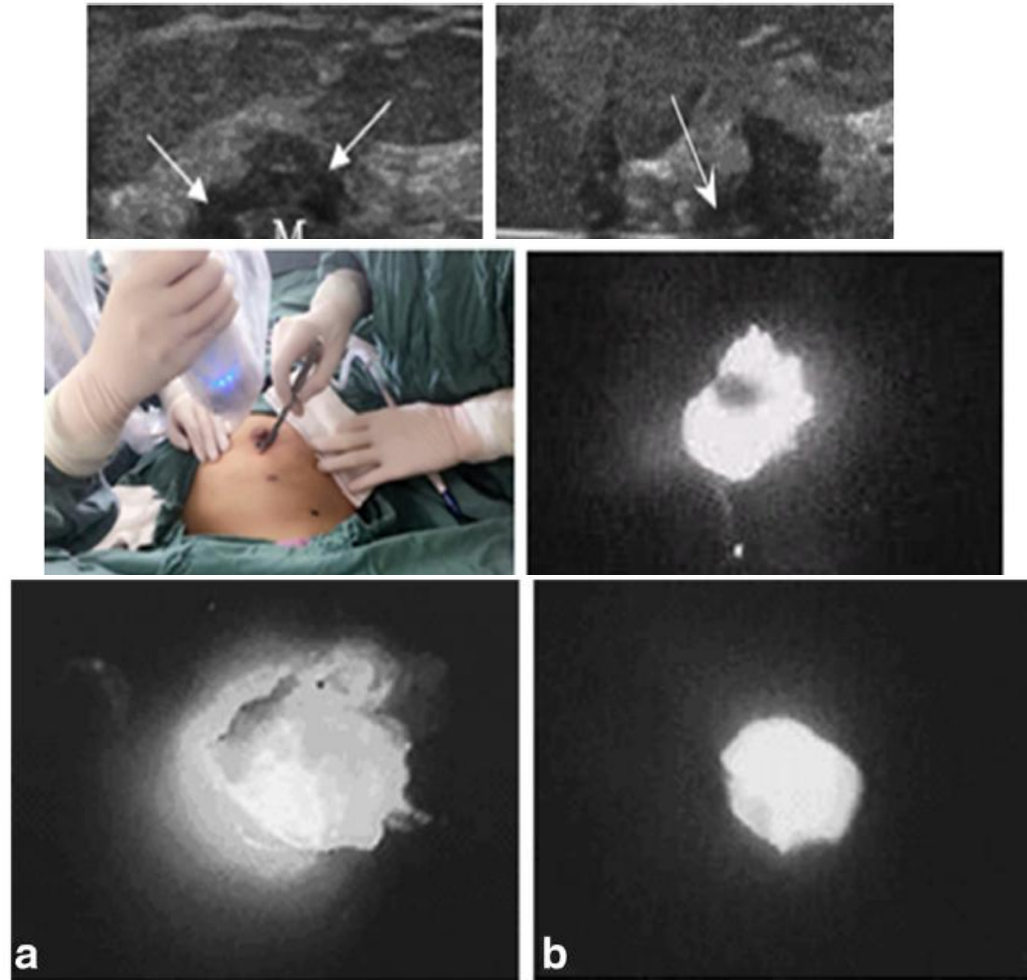
FLUO: Comparison of invaded SLN to other LNs



Fluo Spectral unmixing



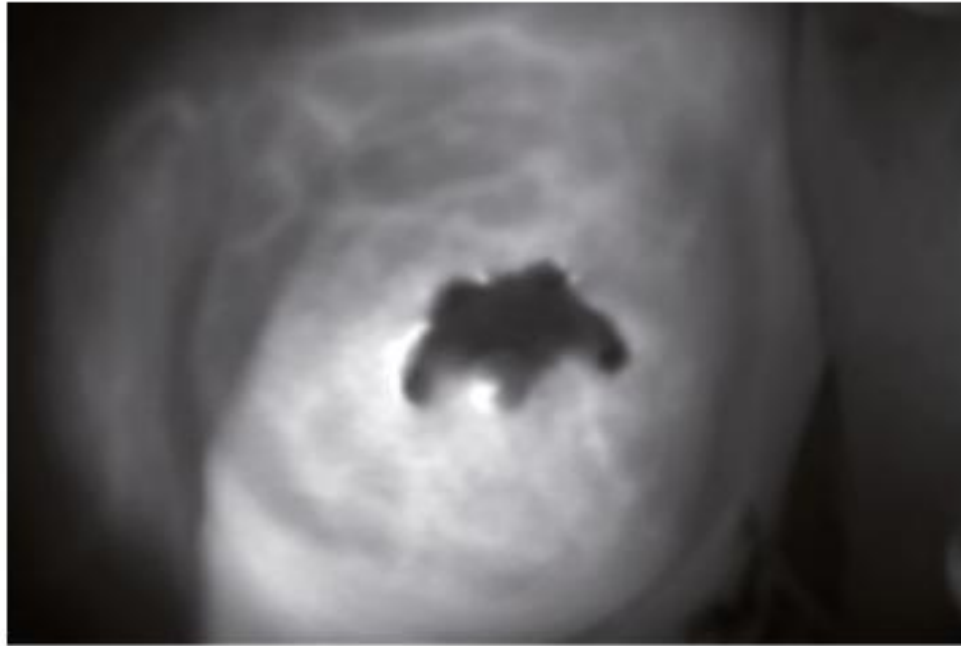
NIRF ET **CHIRURGIE CONSERVATRICE** POUR DES TUMEURS NON PALPABLES DU SEIN



a The resection margins were defined under the guidance of fluorescence imaging; **b** appearance of the specimen after excision

NIRF DANS L'ÉVALUATION DE LA VASCULARISATION DES LAMBEAUX CUTANÉS DE MASTECTOMIE EN RECONSTRUCTION MAMMAIRE IMMÉDIATE

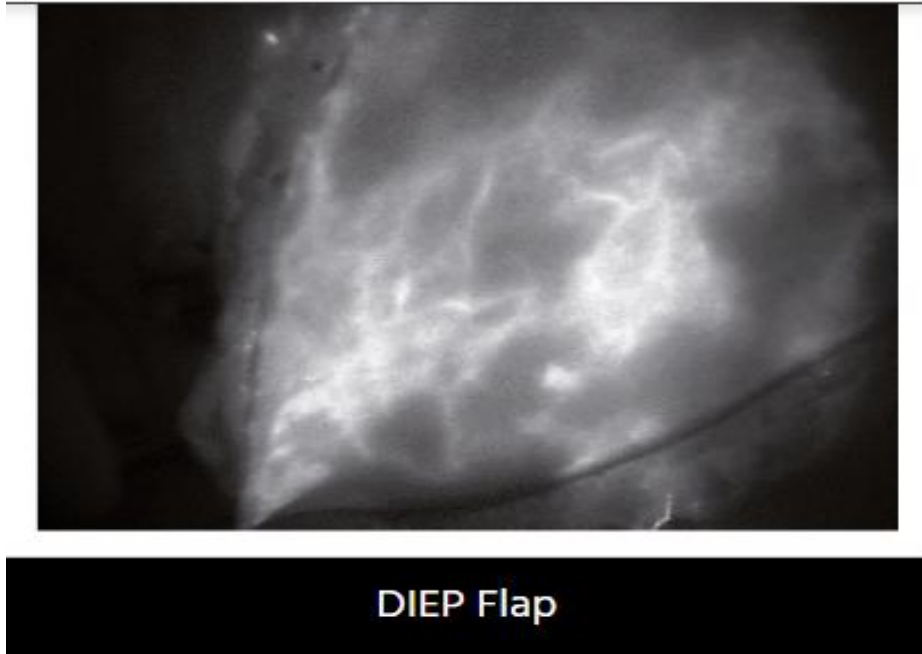
Evaluation en **peropératoire** de la **perfusion des lambeaux** cutanés de mastectomie et guidage de **l'excision des tissus cutanés à haut risque** de nécrose



Breast Reconstruction

NIRF DANS LA RECONSTRUCTION MAMMAIRE AUTOLOGUE PAR **LAMBEAUX LIBRES**

- Contrôle de la perfusion d'un lambeau libre **avant son sevrage**
- Guidage de l'**excision** des zones à risque de **nécrose**



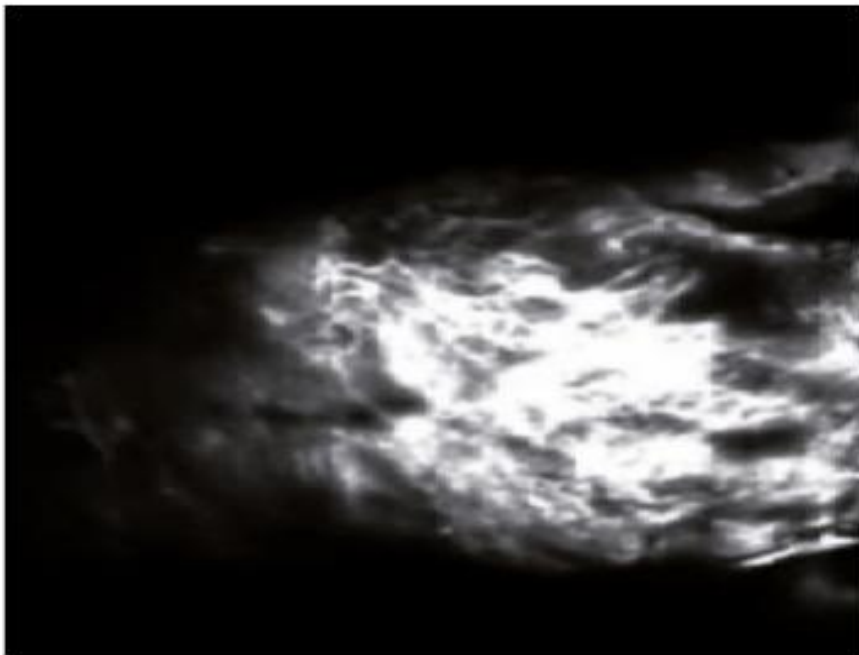
(Deep Inferior Epigastric Perforator)

Lambeau de peau et de graisse prélevé sur l'abdomen

Avantage : propres tissus de la femme

NIRF DANS LA CHIRURGIE DU **LYMPHOEDÈME** SECONDAIRE DES MEMBRES

- Diagnostic et bilan du lymphœdème
- Réalisable en consultation, non irradiant, cout faible,
- Sensibilité > lympho-scintigraphie
- Repérage lymphatique pour une anastomose lymphatico-veineuse



Lymphedema



Functional Lymphatic Vessels

CONCLUSION

La fluorescence infra rouge **alternative valable** pour le repérage in vivo des GS par rapport aux colloïdes technétiés.

Combinaison **BPV + ICG** démarche **robuste** et à **moindre cout**

Perspectives de développement du ciblage tumoral en imagerie de fluorescence peropératoire

Technologie très utile en chirurgie de reconstruction mammaire et du lymphodème secondaire des membres

Intérêt d'études pilotes pour le développement de la NIRF au Sénégal

RÉFÉRENCES

- COHEN, E., BRICOU, A., BOUJENAH, J., et al. **Mise au point sur les méthodes de détection des ganglions sentinelles dans le cancer du sein.** Gynécologie Obstétrique & Fertilité, 2016, vol. 44, no 1, p. 35-42.
- STRUK, S., HONART, J.-F., QASSEMYAR, Q., et al. **Utilisation du vert d'indocyanine en chirurgie sénologique et reconstruction mammaire.** In : Annales de Chirurgie Plastique Esthétique. Elsevier Masson, 2017.
- VERMERSCH, Charlotte, BARJAT, Tiphaine Raia, PERROT, Marianne, et al. **Place du vert d'indocyanine couplée à l'imagerie par fluorescence dans la recherche du ganglion sentinelle du cancer du sein.** Bulletin du Cancer, 2016, vol. 103, no 4, p. 381-388.
- VINCENT, Laura, MARGUERITTE, François, UZAN, Jennifer, et al. **Synthèse des recommandations nationales et internationales concernant les indications de la technique du ganglion sentinelle et du curage axillaire complémentaire après ganglion sentinelle positif dans la prise en charge des cancers du sein.** *Bulletin du Cancer*, 2017, vol. 104, no 4, p. 356-362.

**Merci de
votre
attention**

