

SUIVI IN VIVO DES NANOMEDICAMENTS: LES TECHNOLOGIES OPTIQUES EMERGENTES

PATRICK POULET

Laboratoire des Sciences de l'Ingénieur, de l'Informatique et
de l'Imagerie, UMR 7357 Université de Strasbourg / CNRS

p.poulet@unistra.fr



Plan de l'exposé

Introduction: Optique médicales et Nanoparticules

1. Principes généraux pour une détection/imagerie optique

Propagation de la lumière dans les tissus
Absorption, fluorescence et photoacoustique

2. Apport des nanoparticules

3. Conclusions et perspectives

Illustrations: exemples d'application

détection optique des ganglions sentinelles
chirurgie mini-invasive guidée par l'imagerie optique

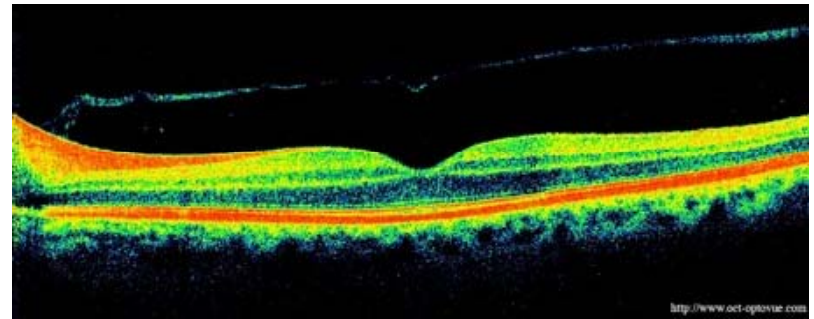
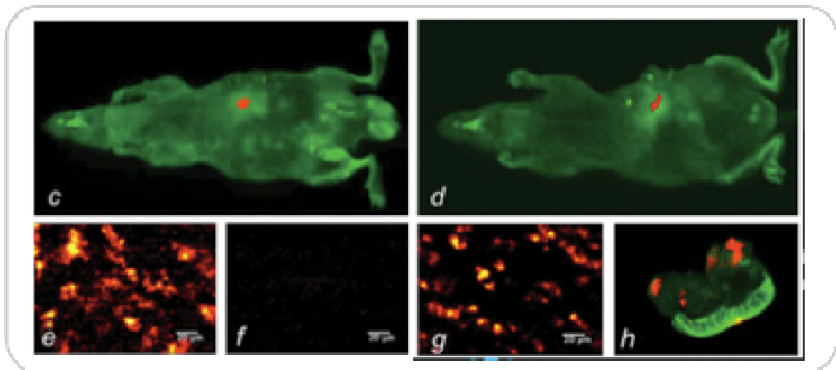
L'imagerie optique médicale

- De l'examen anatomopathologie: analyse au microscope de cellules ou de tissus prélevés

à la biopsie optique non invasive.

- De la microscopie in vivo
 - Confocale (fibrée), biphotonique < mm
 - OCT (endoscopique): > mm

à l'imagerie optique 3D profonde.

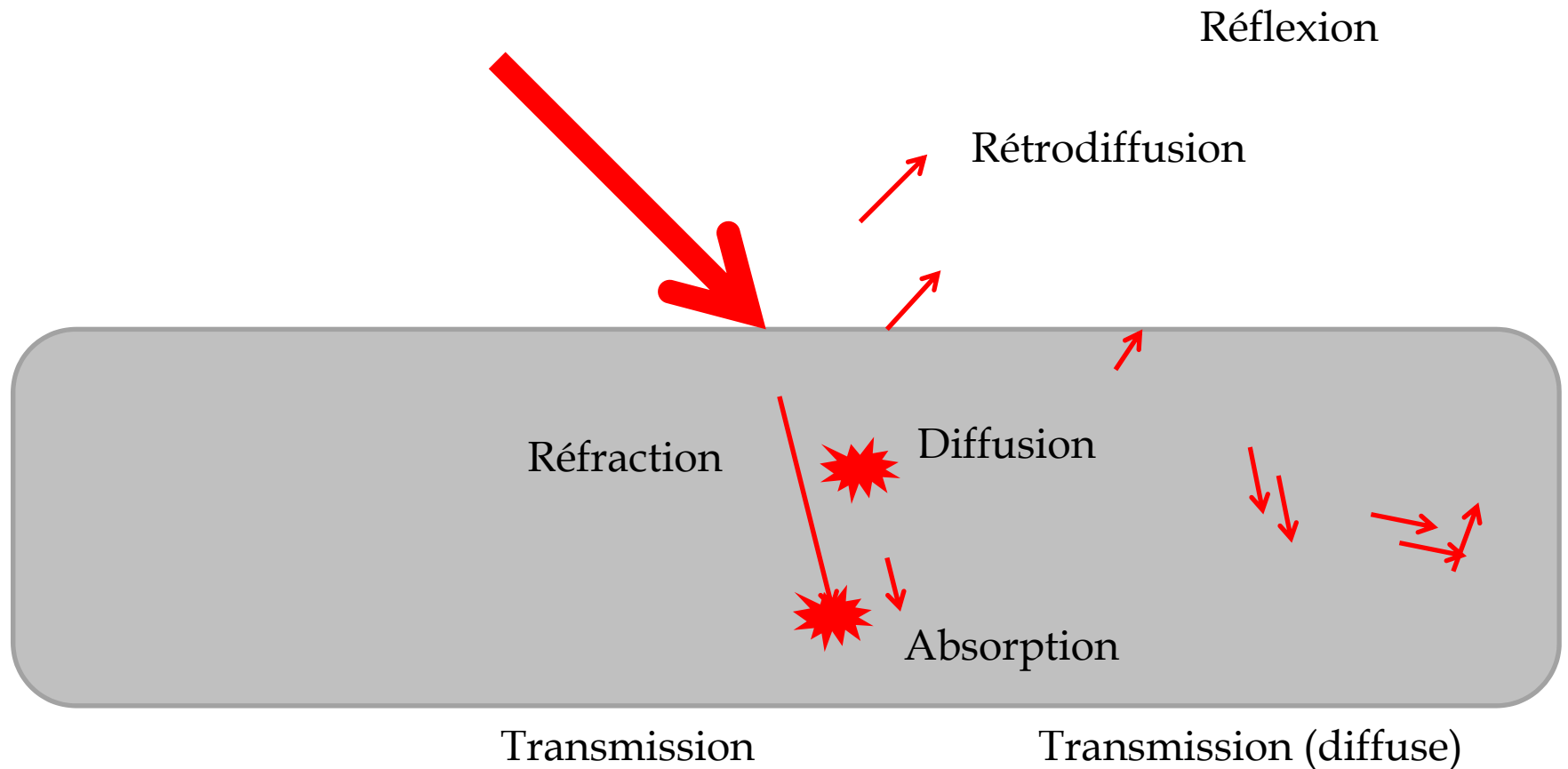


Cellvizio[®], Endomicroscopie Confocale par Minisondes. Document Mauna Kea.

<http://www.oct-optovue.com/>

L'imagerie optique médicale

- Interactions lumière matière



Absorption et diffusion

Définitions

Coefficient d'absorption: $\mu_a = 1/L_a$

L_a : longueur moyenne de propagation avant absorption

Coefficient de diffusion: $\mu_s = 1/L_s$

L_s : longueur moyenne de propagation entre 2 diffusions

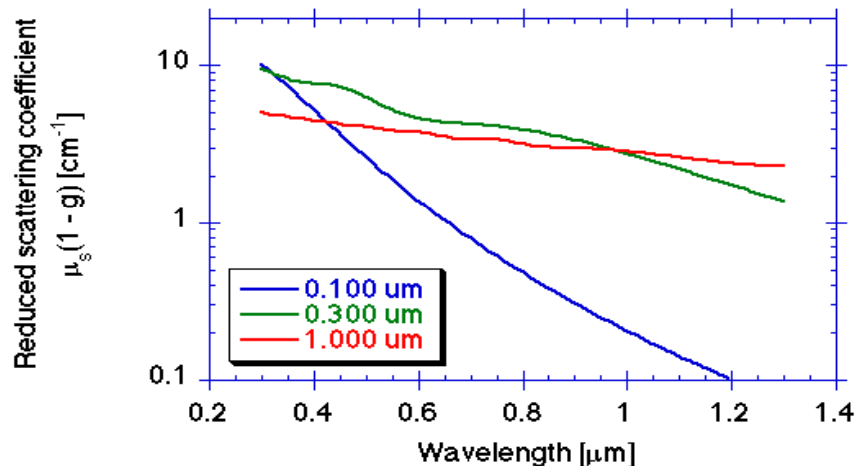
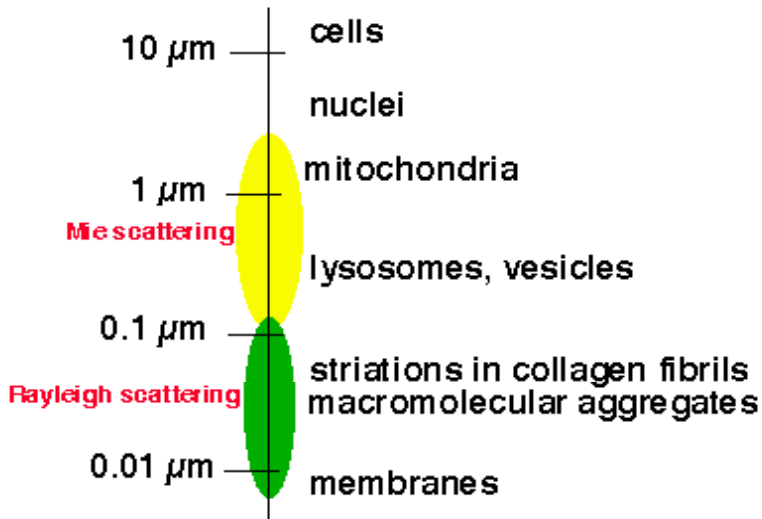
Coefficient de diffusion réduit: $\mu'_s = (1-g) \cdot \mu_s = 1/L'_s$

$g = \cos(\theta)$, θ : angle moyen de diffusion

L'_s : longueur moyenne de propagation avant perte orientation initiale (= diffusion isotrope)

Absorption et diffusion

- Diffusion des tissus
 - Toute surface avec rupture d'indice de réfraction
 - Diffusion (scattering) = réflexion + réfraction + diffraction
 - $\mu'_s(\lambda) = f(\lambda, \Delta n, C, \Phi \text{ des particules})$



Sphères $n_p = 1.57$ dans eau ($n = 1.33$)
 $C = 0.1\%$ volume

Absorption et diffusion

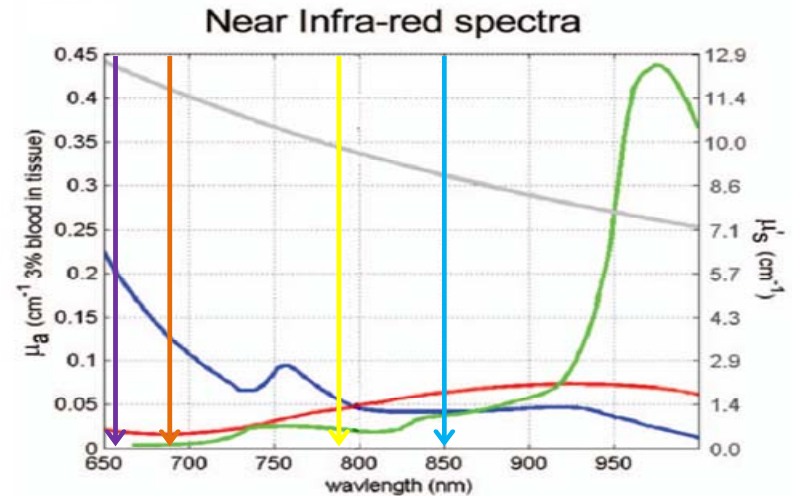
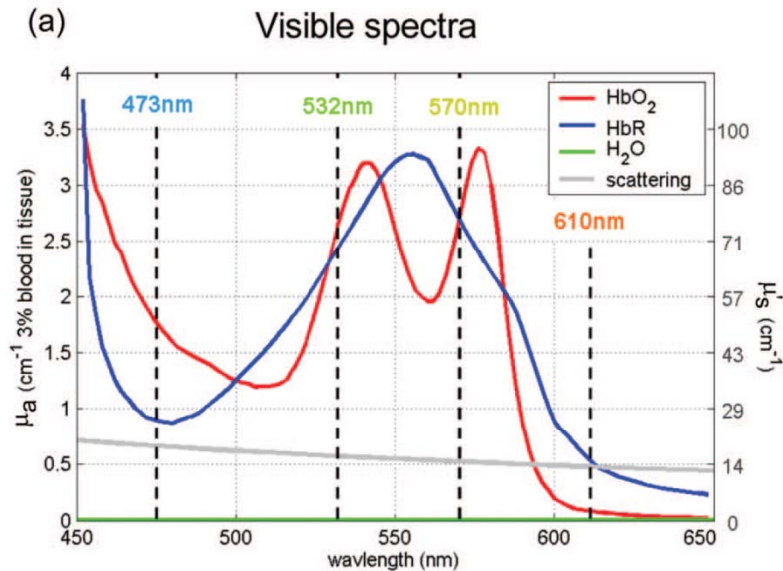
□ Absorption des tissus

■ Sang (hémoglobine)

Eau

Graisse

■ $\mu_a(\lambda) = \ln(10) \cdot (\sum \epsilon_i(\lambda) \cdot C_i)$ C_i concentration du chromophore i



Eau (vert), Hb (bleu) et HbO₂ (rouge)

E.M.C. Hillman JBO (2007)

Absorption et diffusion

Proche infrarouge

Fenêtre diagnostique
(680 à 900 nm)

- faible absorption (sang, eau ...)
- faible diffusion (tissus hétérogènes) (/ visible)

$$\mu_a < 0,01 \text{ mm}^{-1} \quad L_a > 100 \text{ mm}$$

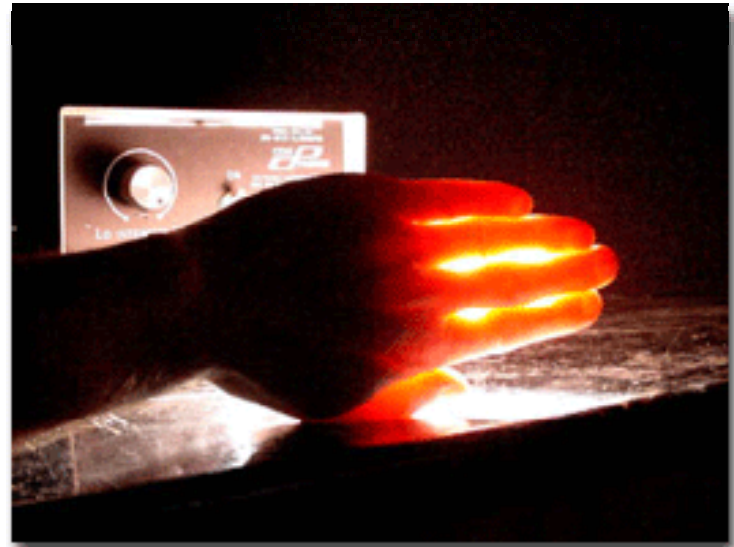
Mais

$$\mu'_s > 1 \text{ mm}^{-1} \quad L'_s < 1 \text{ mm}$$

Bonne profondeur de pénétration, mais non connaissance
des trajets parcourus

L'imagerie optique médicale

Bonne profondeur de pénétration, mais non connaissance des trajets parcourus



Imagerie optique
Acquisition tomographique + Reconstruction
Problème difficile
Outils technologiques + Agents de contraste.

L'imagerie optique médicale

□ Imagerie optique

- Acquisition tomographique (TOD / FTOD)
- Reconstruction des images d'absorption et diffusion
 - Apports technologiques (Techniques Résolues en Temps)

□ Imagerie fonctionnelle

- Contraste intrinsèque: oxymétrie, perfusion
- Agents de contraste
 - Biodistribution, pharmacocinétique
 - Simplification du problème de reconstruction (multimodalité, détection fond noir, ...)

Reconstruction en TOD

1° Objet homogène

Point source interne, détecteur en surface

Question: Quel est le chemin des photons ?

Réponse: Carte de sensibilité.

Probabilité des chemins suivis par les photons détectés.

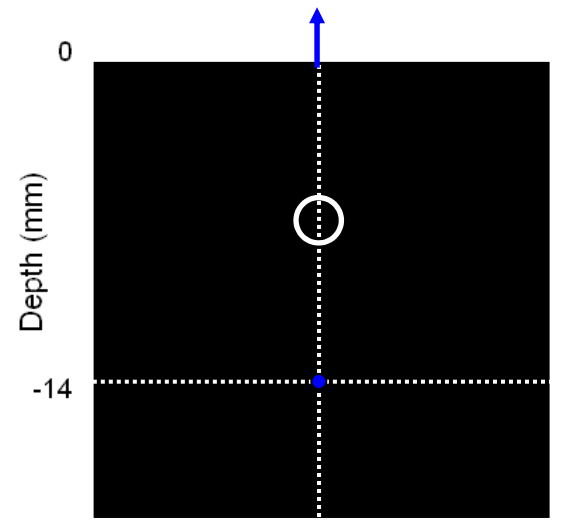
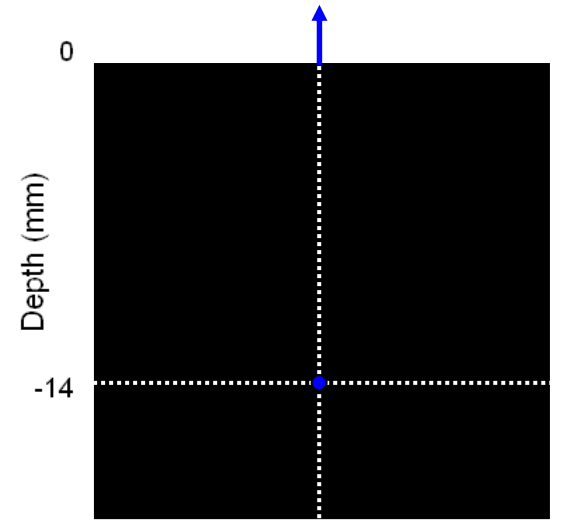
2° Présence d'une zone + absorbante

La carte de sensibilité est modifiée !

Le volume entier est exploré selon les propriétés optiques des tissus (que l'on veut déterminer).

Conclusion

L'obtention des cartes des propriétés optiques et de la localisation de sources (fluorescence) requiert une acquisition tomographique et une étape de reconstruction complexe.



Reconstruction en TOD (FTOD)

- Approximation de diffusion: si $\mu'_s \gg \mu_a$

Et nombreux évènements de diffusion avant détection

Densité de photons ϕ

- Equation de diffusion:
$$\frac{\partial \phi}{\partial t} - \nabla \kappa \nabla \phi + \mu_a c \phi = -q(t, r_0)$$

q_0 : source de lumière $\kappa = c/3(\mu_a + \mu'_s)$

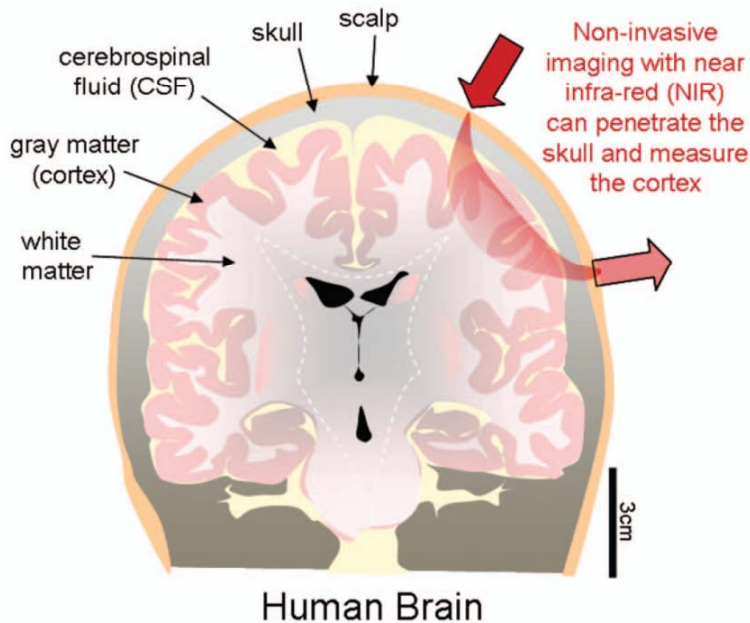
- Fluorescence:
$$\frac{\partial \phi_2}{\partial t} - \nabla \kappa \nabla \phi_2 + \mu_a c \phi_2 = -\frac{\eta c}{\tau} (\phi \otimes e^{-t/\tau})$$

η : rendement quantique, τ : temps de vie de fluorescence

- Outils informatiques adaptés mais problème mal posé. Frein au développement de la TOD !

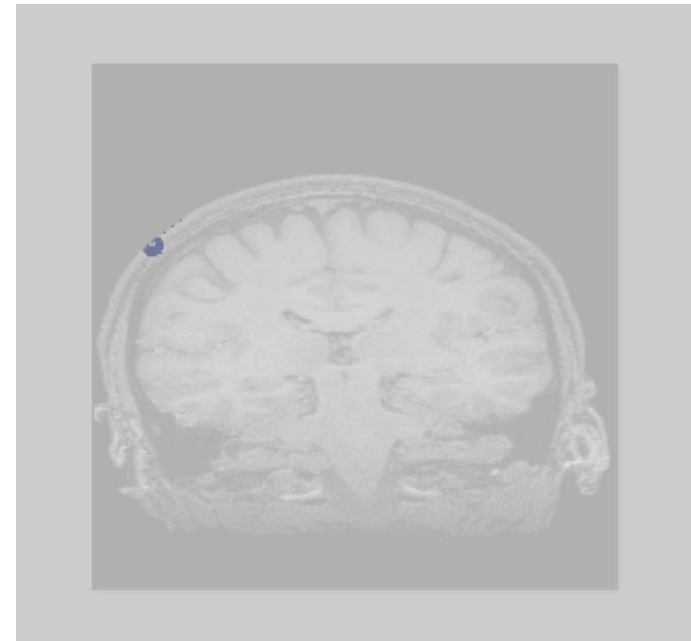
Absorption et diffusion

Pénétration de la lumière proche infrarouge dans le crâne



	μ_a (mm ⁻¹)	μ_s' (mm ⁻¹)
Peau	0,018	1,9
Crâne	0,016	1,6
Méninges	0,004	0,24
Matière grise	0,036	2,2
Matière blanche	0,014	9,1

Propriétés optiques à 800 nm

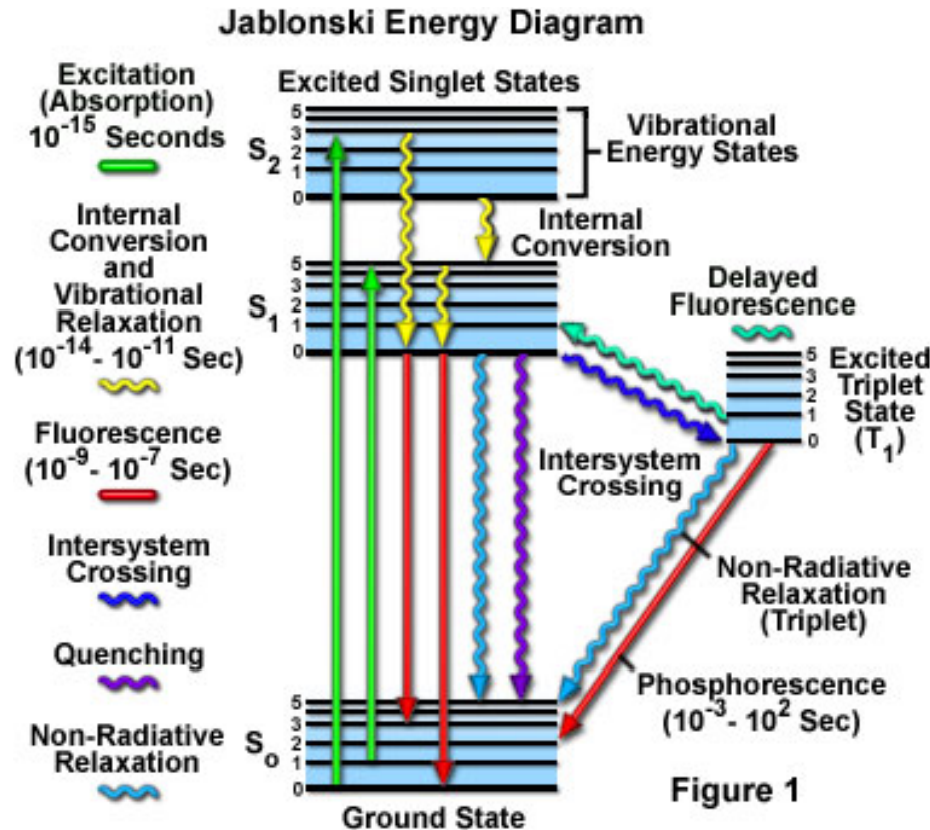


Agents de contraste

- Interactions marqueur – lumière
 - Cartes de diffusion et et d'absorption (agent de contraste et tissus) par détection tomographique des photons diffusés par les tissus.
 - Evolution de l'énergie absorbée (marquage, bilan énergétique ?)
 - Détection tomographiques des photons de fluorescence
 - Liaisons et activation des marqueurs, temps de vie ...
 - Détection des transitions non radiatives (conversion en chaleur) par effet photoacoustique
 - Réactions photochimiques (PDT)

Détection d'un agent de contraste

- Interactions marqueur – lumière



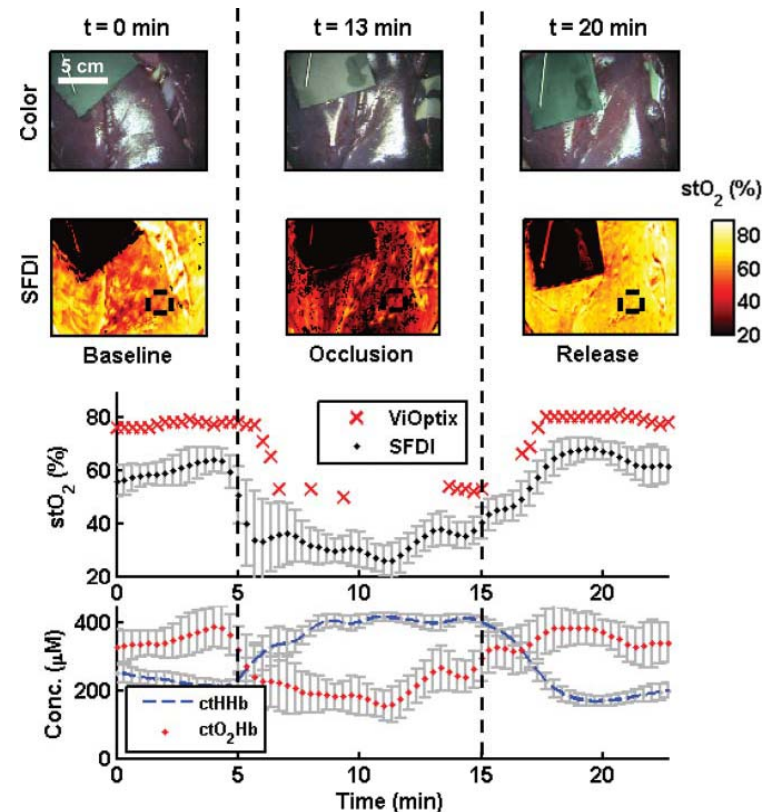
Détection des photons diffusés

□ Actuel:

Spectroscopie proche infrarouge (Oxymétrie tissulaire)

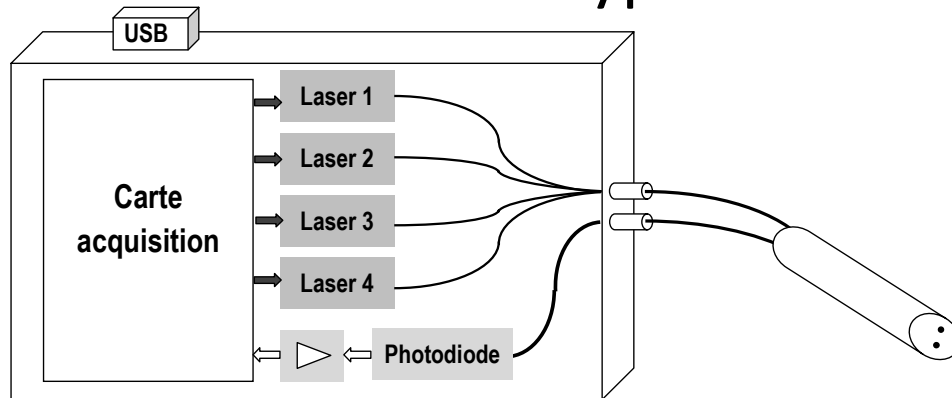
□ Evolution:

Imagerie Multispectrale

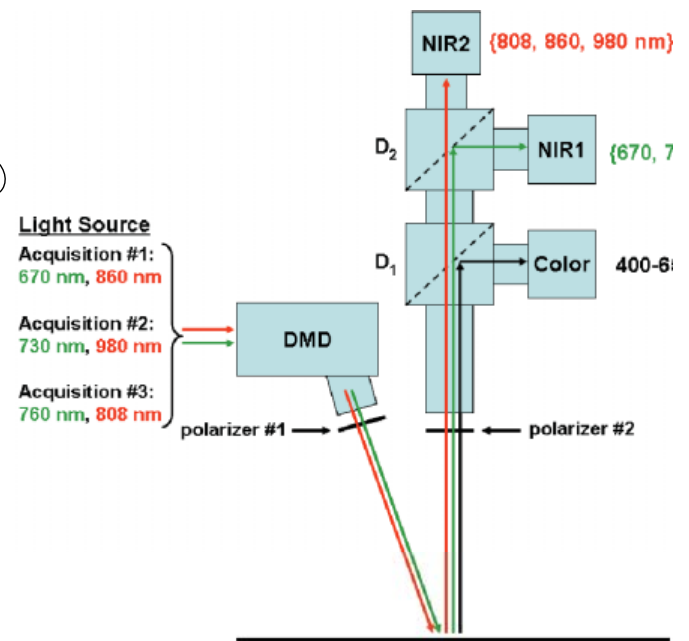
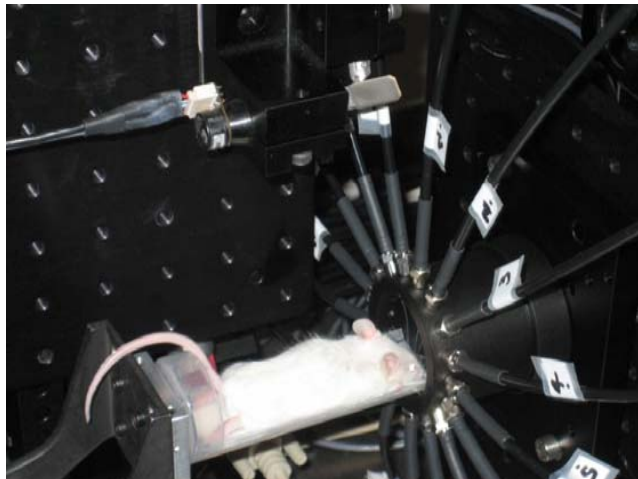


Détection des photons diffusés

□ Instrumentation type



Tellier F. et al Optdiag 2011



Gioux S. et al JBO 2011

Poulet P. et al NIMA 2006

Détection des photons diffusés

□ Avantages et Limites

+ Sensibilité

μ_a tissus $\approx 5 \cdot 10^{-3} \text{ mm}^{-1}$ et Coef. Extinction molaire $\approx 10^5 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$

$\Rightarrow C_{\text{equiv.}} \approx 0,2 \text{ } \mu\text{mol/L}$

Sensibilité de détection $\approx 2 \text{ nmol/L}$

+ Dynamique élevée

- Non Linéarité (loi de Beer Lambert non valable en milieu diffusant)
- Quantification non encore possible (tomographie requise)
- Mauvaise résolution spatiale (tomographie requise)
- Absorption du marqueur et des chromophores intrinsèques (analyse multispectrale)

Détection par fluorescence

- Actuel:

Angiographie de fluorescence (ophtalmo) au vert d'indocyanine (ICG)

Imagerie préclinique (2D et 3D)

- En évaluation:

Guidage opératoire par imagerie de l'ICG

- détection du ganglion sentinelle

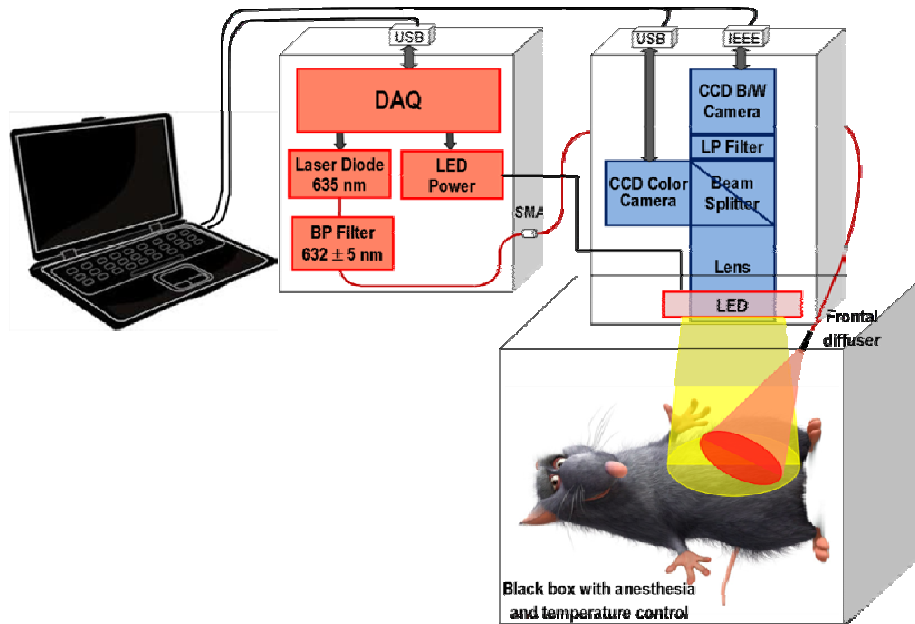
- laparoscopie

- Evolution:

Utilisation de nouveaux marqueurs (spécifiques) molécules et nanoparticules fluorescentes

Détection par fluorescence

- Instrumentation type (2D)



Détection par fluorescence

□ Avantages et Limites

+ Sensibilité

Sensibilité de détection \approx ou < 1 nmol/L

+ Marquage spécifique

- Dynamique limitée (auto-absorption)

- Non Linéarité (absorption/diffusion et autoabs.)

- Quantification difficile

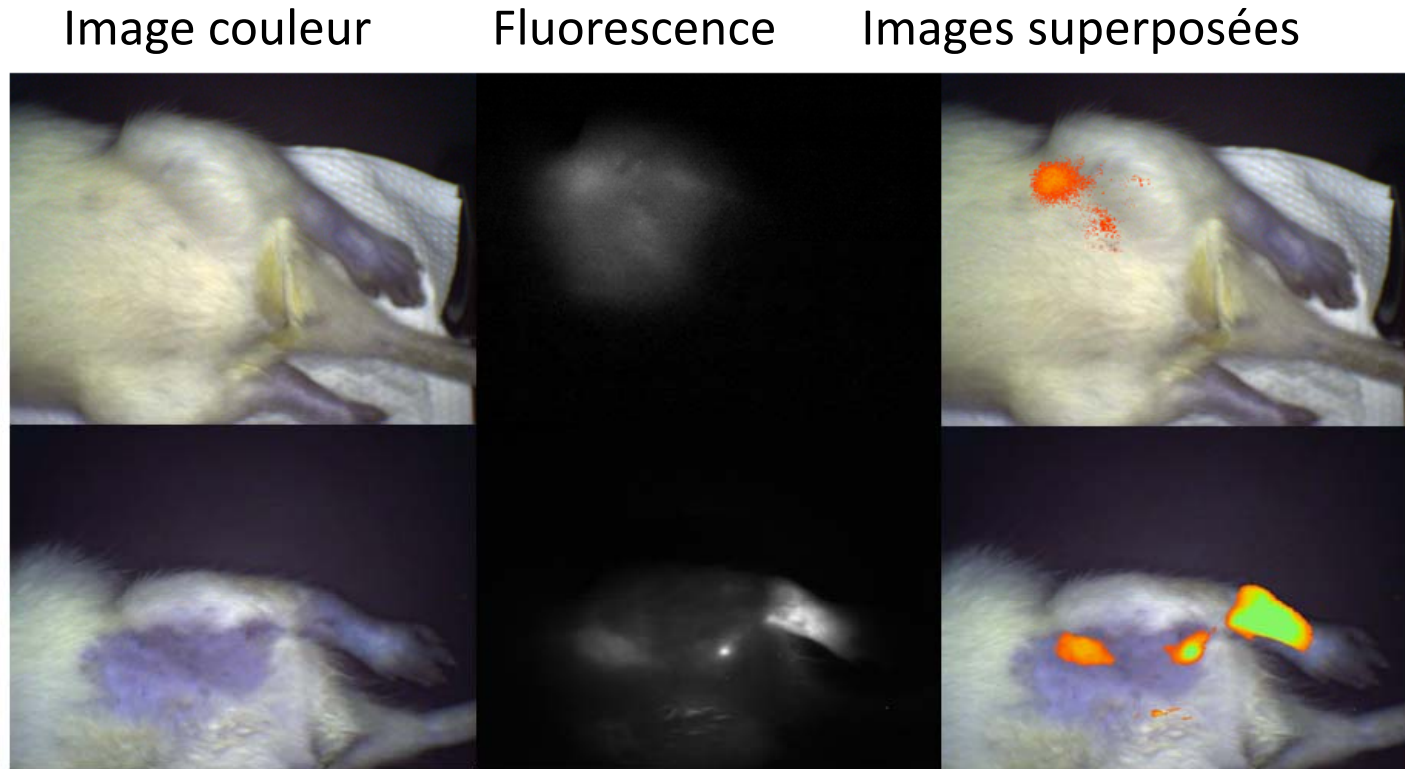
- Mauvaise résolution spatiale (tomographie requise)

- Auto-fluorescence des tissus (faible dans le PIR)

- Puissance surfacique d'illumination requise

Exemple: Bleu Patenté V

□ Résultats chez l'animal



Images de fluorescence PBV dans l'albumine sérique de rat (500 μ L).
(haut) : [PBV] = 20 μ mol/L (bas) [PBV] = 500 μ mol/L, rat épilé.

Exemple: Vert d'indocyanine

- Imagerie de fluorescence à l'ICG

Color

Fluorescence

Merged

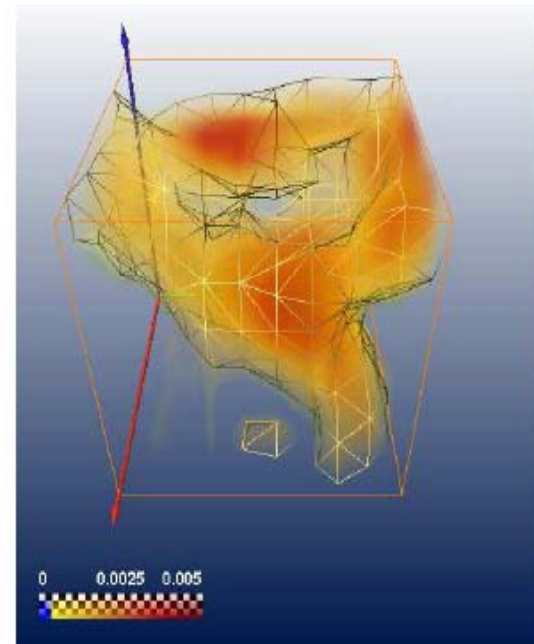
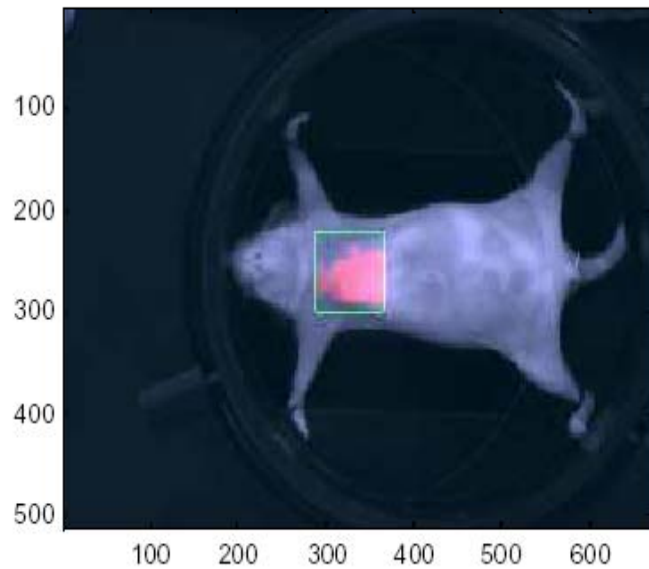


Injection Site ICG
Lymphatic Channels



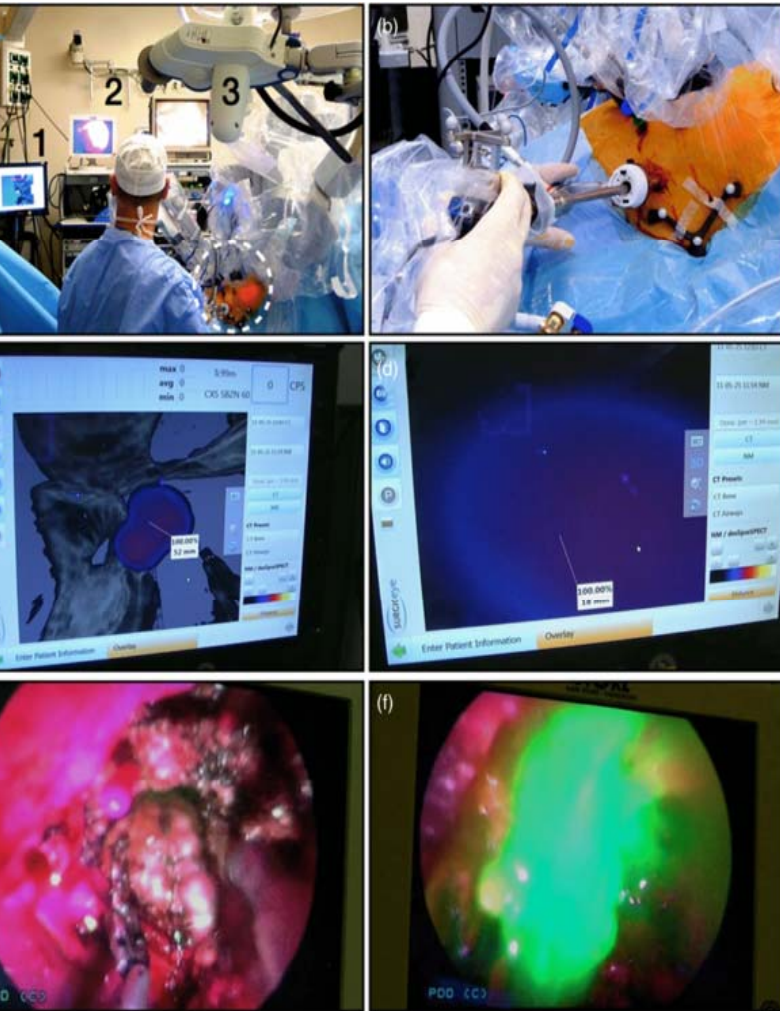
Sentinel Lymph Node

3D Fluorescence Tomography



Dinten JM et al, SPIE 2006

Imagerie de fluorescence laparoscopique



Fluorescence laparoscopic navigation toward the prostate in a patient undergoing robot-assisted prostatectomy.

Oscar R Brouwer et al, Phys. Med. Biol. 2012

Détection Photoacoustique

- Actuel:

Imagerie préclinique

- En évaluation:

Couplage avec imagerie ultrasonore

Mammographie, détection GS

- Evolution:

Couplage avec TOD/FTOD

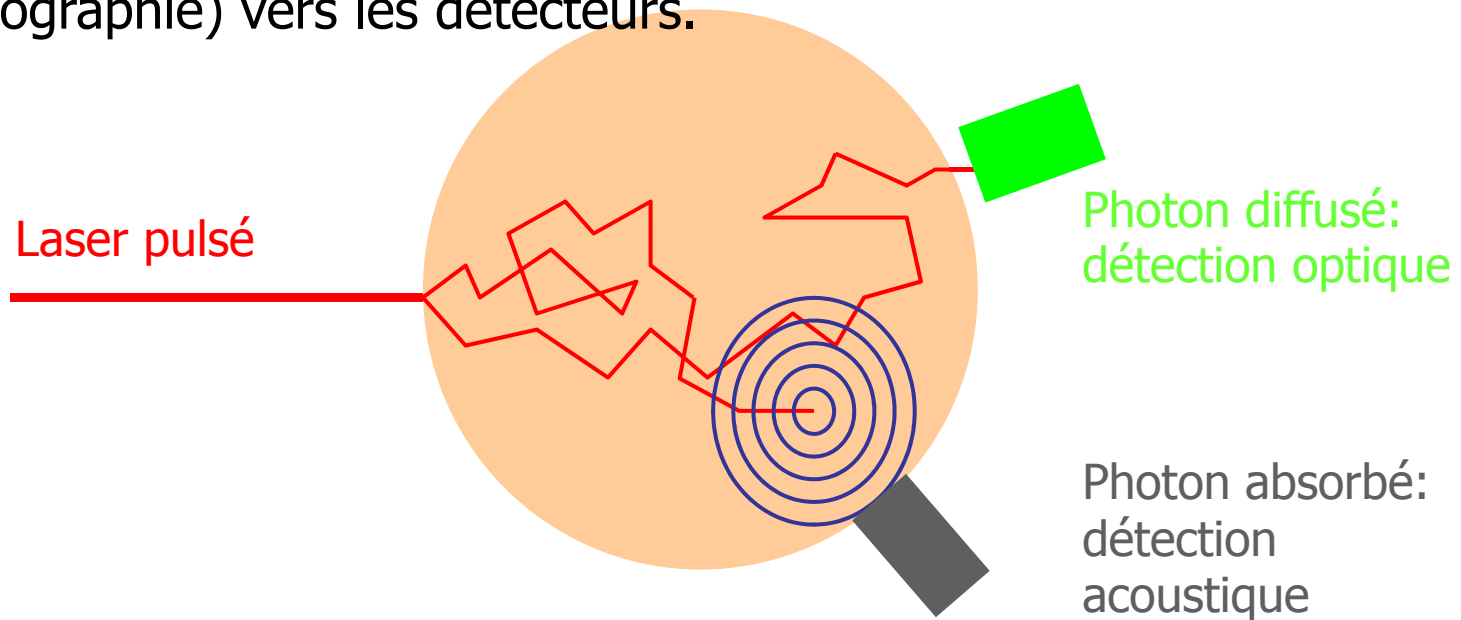
Quantification

Utilisation de nouveaux marqueurs, autre domaine EM (RF)

Détection Photoacoustique

Principe

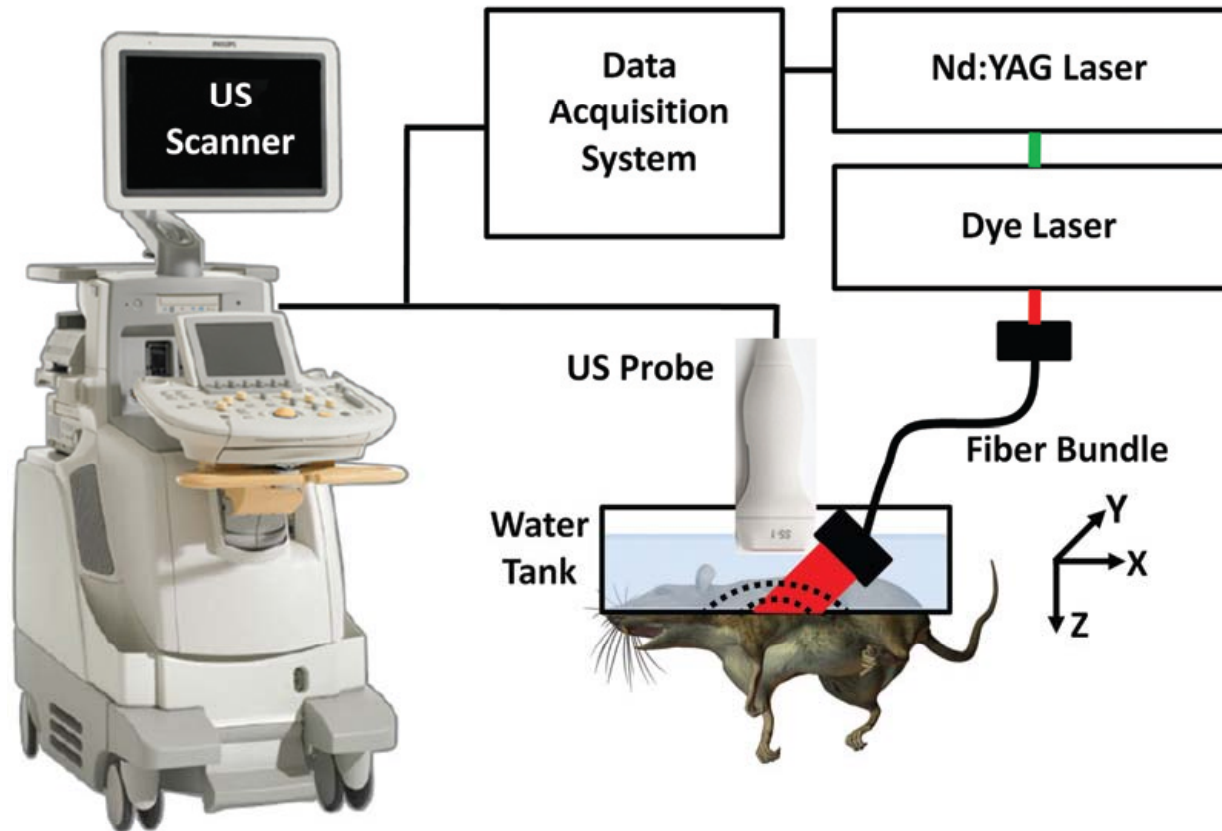
L'absorption d'une impulsion lumineuse génère un train d'onde ultrasonore. Cette onde se propage dans un milieu faiblement diffusant (cf échographie) vers les détecteurs.



Les temps d'arrivée des ondes US permettent de recalculer les cartes d'absorption: coefficient d'absorption x énergie lumineuse.

Détection Photoacoustique

□ Instrumentation type



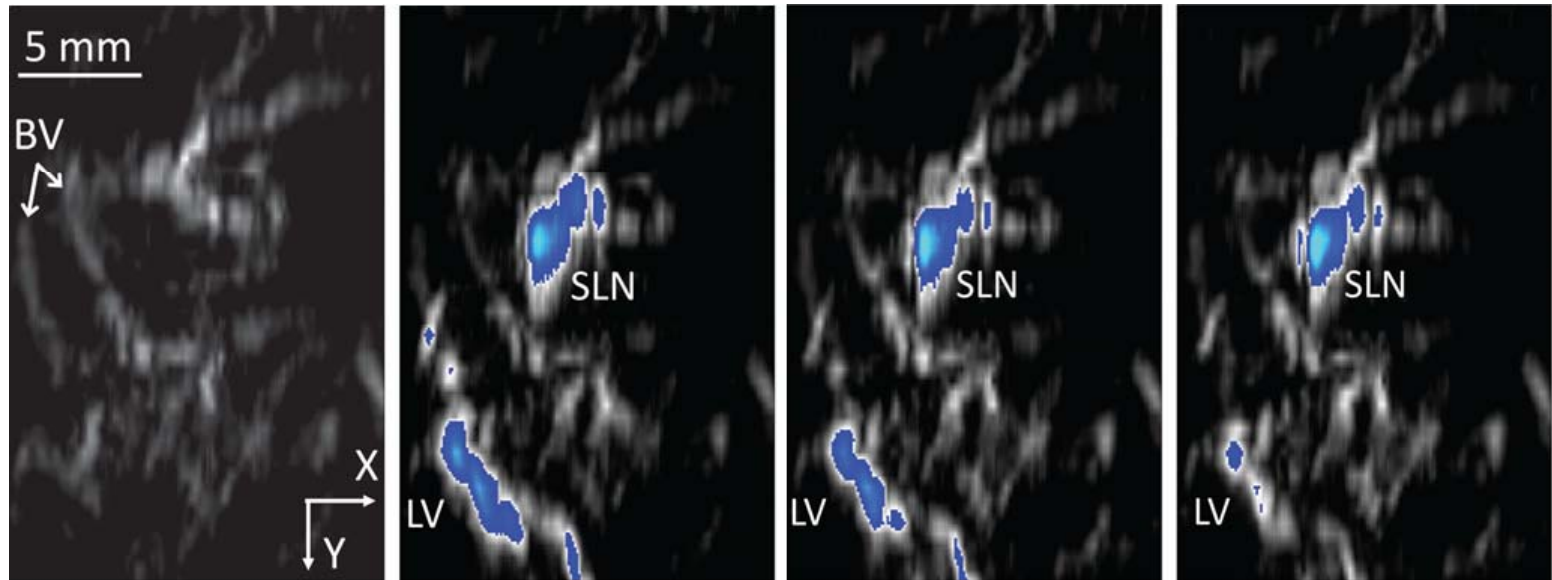
Détection Photoacoustique

□ Avantages et Limites

- + Résolution spatiale
- + Reconstruction + robuste (diffusion des US négligeable)
- + Possibilité de marquage
- Sensibilité
- Non Linéarité (absorption/diffusion)
- Quantification difficile
- Contact capteur US/tissus
- Puissance d'illumination requise

Exemple: Bleu de méthylène

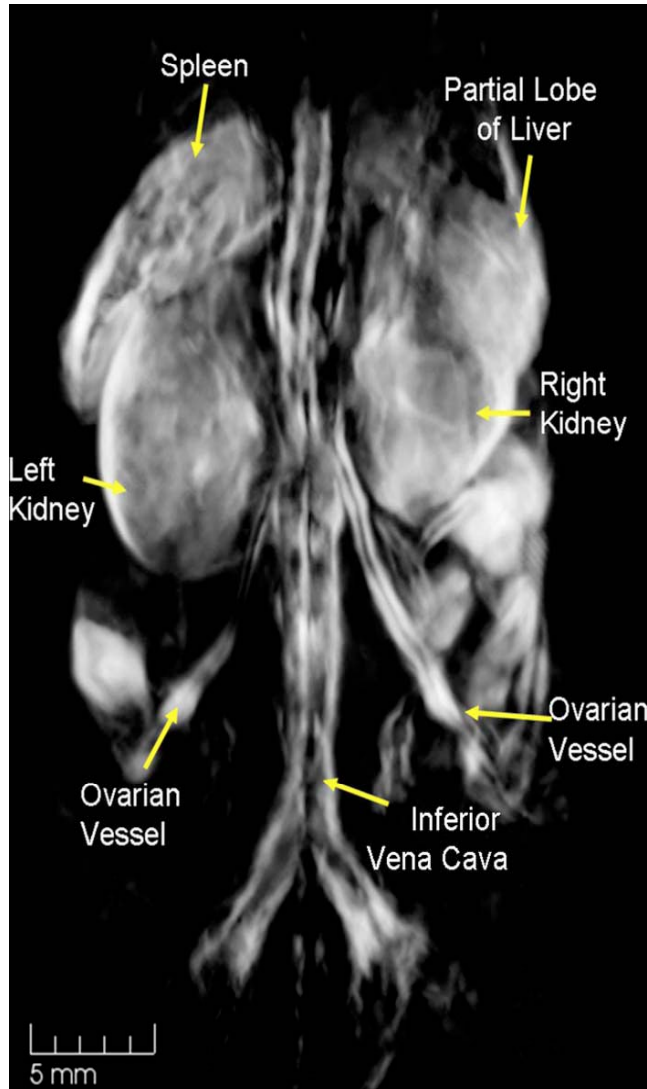
□ Imagerie Photoacoustique du MB



In vivo coregistered photoacoustic and US images of rat axillary region.

(a) control , (b, c, d) images collected 6, 20, and 31 minutes following methylene blue injection.

Imagerie Photoacoustique



- Three-dimensional photoacoustic volume of a nude mouse illuminated at 755 nm
- Brecht et al JBO 2009

Molécules et nanoparticules

- Colorants disposant d'une AMM

Molécule	Dénominations	Albumine	λ_{exc} (nm)	ϵ (mol ⁻¹ .L.cm ⁻¹)	λ_{em} (nm)	ϕ (%)
ICG	IC Green, Pulsion, Infracyanine	Libre	780	114.000	806	2,7
		Liée	805		825	9,3
PBV	Patent Blue V	Libre	638	120.000	660	0,05
		Liée	640	100.000	660	1,5
MB	Proveblue	Libre	664	84.500	690	2,0

Molécules et nanoparticules

- Molécules fluorescentes dans le PIR (sélection)

Molécule	Type	λ_{exc} (nm)	λ_{em} (nm)	ϕ (%)
Cyanine	Cy-5	646	663	28
	Cy-7	749	774	13
Alexa	Alexa660	660	690	37
	Alexa750	750	780	12
Irdye	800CW	775	789	3.4

Nanoparticules pour l'optique

- Grains quantiques (Quantum Dots, QD)

Coeur: nanocristal semiconducteur (CdSe ...) dont la taille détermine la longueur d'onde de fluorescence



Corr S.A. et al Nanoscale Res. Lett. 2008

Coque inorganique assure la stabilité du QD et le confinement des électrons du cœur

Solubilisation assurée par encapsulation dans des phospholipides.

Nanoparticules pour l'optique

- Grains quantiques (Quantum Dots QD)

- Avantages:

- Absorption et rendement de fluorescence élevés

- Stabilité (pas de photodégradation)

- Taille (10-100 nm) adaptée au marquage des ganglions lymphatiques (injection sc)

- Inconvénients:

- Toxicité potentielle (Cd)

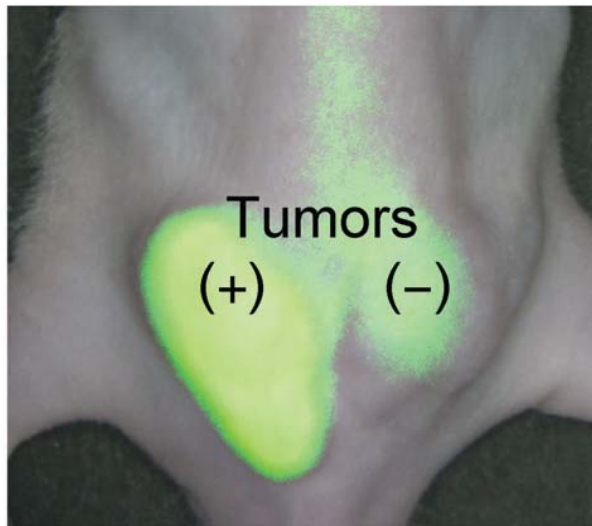
- Evolution vers des QD (à base d'indium) à toxicité réduite (Helle M. et al Plos One, 2012)

Example: QD

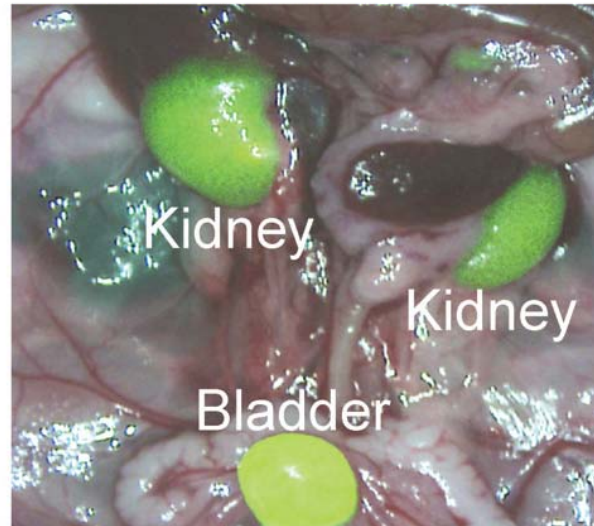
- QD with peptide targeting ligands

Injection: 10 pmol/g; imaging: 4h post injection

Prone (Intact)



Supine (Surgical)



Nanoparticules pour l'optique

- Nanoparticules de silice renfermant des agents fluorescents

Nanoparticules de SiO_2 de 5 à 100 nm,

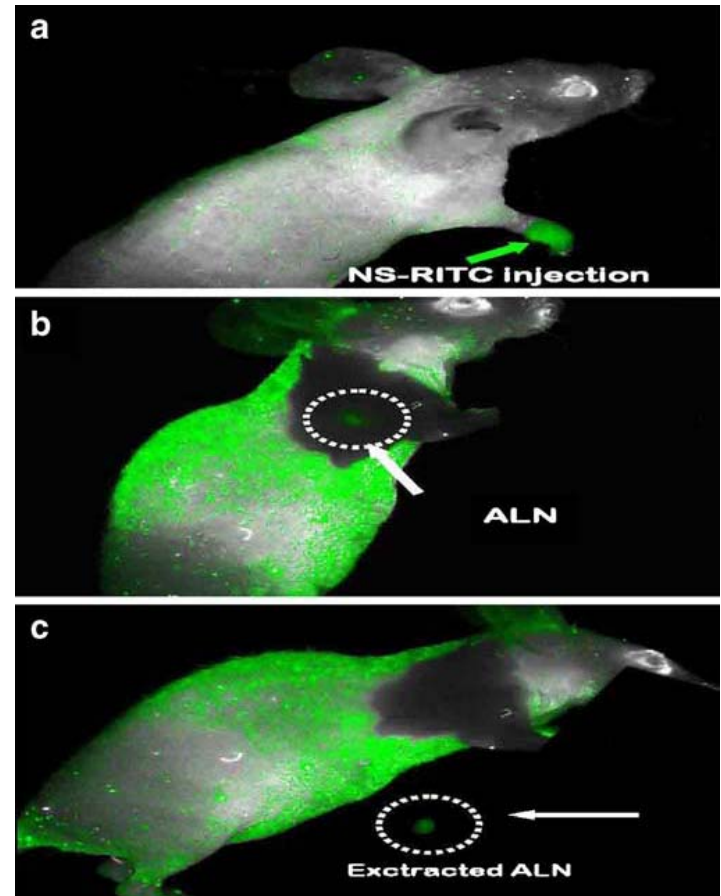
Fluorescence liée à la molécule, avec rendement amplifié

Fonctionnalisation de surface (PEG, anticorps, agents anticancéreux ...)

Exemple: NP Silice

□ Imagerie préclinique

NP de silice + rhodamine B



Jeon Y.H. et al
Mol. Imag. Biol. 2010

Nanoparticules pour l'optique

- Nanoparticules d'or
- Nanoparticules d'oxydes de fer
- Nanotubes de carbone, fullerènes
- Nanoparticules organiques
 - NP lipidiques, toxicité limitée
 - albumine colloïdale, (ICG – Nanocoll)
 - liposomes
 - PFC

Review by Choi and Frangioni Mol. Imag. 2010

Conclusions et perspectives

- Imagerie optique « profonde » en médecine
 - ✓ Alternative aux méthodes isotopiques (GS +)
 - ✓ Complémentaire des méthodes d'imagerie conventionnelle
 - ✓ Intérêt majeur dans le guidage de la chirurgie mini-invasive

- Avenir
 - ✓ Evolutions instrumentales (sources, détecteurs) et logicielles pour améliorer la reconstruction 3D et la quantification
 - ✓ Imagerie multimodale
 - ✓ Intérêt des agents de contraste (nanoparticules) pour améliorer la sensibilité de détection et le ciblage.

Exemple d'évolution instrumentale

Spectroscopie Proche Infrarouge par Imagerie Temporelle

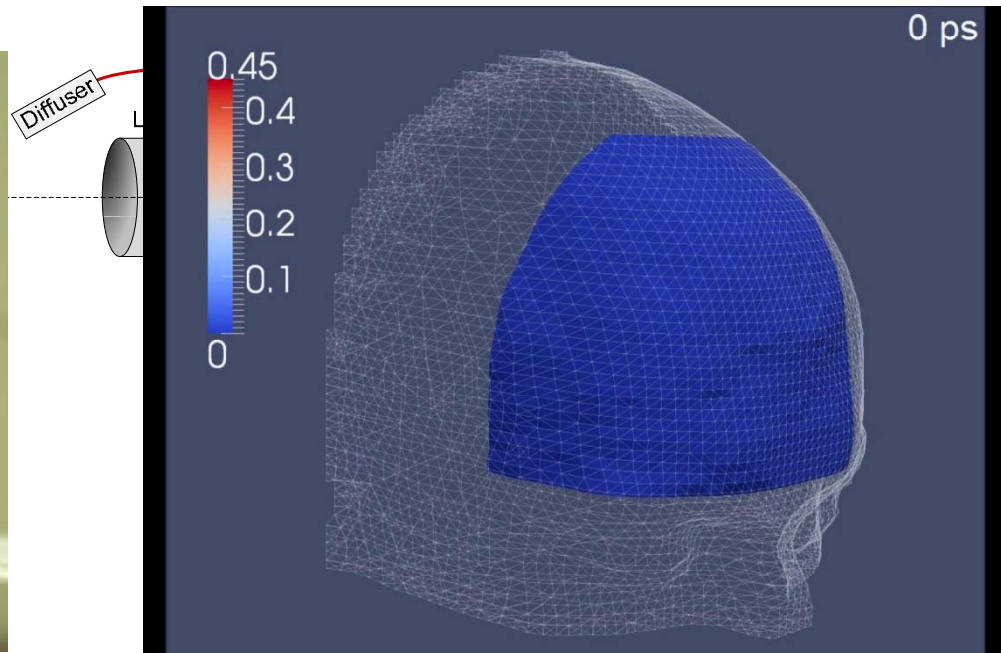
Séquenceur - 4 drivers de diodes laser picoseconde

Diffuseur frontal: éclairage d'une zone d'intérêt

Caméra à porte temporelle picoseconde *Intensificateur MCP*



Couplage laparoscope



Collaborations

- ❑ IPCMS

Geneviève Pourroy



- ❑ Centre Régional de Lutte Contre le Cancer de Strasbourg

Jean François Rodier

- ❑ Fluoptics Grenoble



Remerciements

Renée Chabrier, Franklin Tellier, Murielle Torregrossa,
Wilfried Uhring et Virginie Zint

ICUBE - Strasbourg