

Aiguille fibrée pour l'aide au diagnostic du cancer du sein par fluorescence endogène

René FARCY¹, C. BENOIT², R. MOUSTIE², T. EYRIGNOUX², P. BEAUMEL², A. TOULLEC², M.P. FONTAINE-AUPART³

¹ Laboratoire Aimé Cotton, Université Paris-Sud, ENS Cachan, CNRS, Université Paris-Saclay, 91405 Orsay Cedex, France

² Nodéa Médical, 1 mail du professeur Georges Mathé, 94800 Villejuif, France

³ Institut des Sciences Moléculaires d'Orsay (ISMO), Université Paris-Sud, CNRS, Université Paris-Saclay, 91405 Orsay Cedex, France

rene.farcy@u-psud.fr

Les premières étapes dans le diagnostic du cancer du sein sont la mammographie et l'échographie. Nous avons développé une aiguille fibrée biseautée pour effectuer pendant l'échographie une mesure de la fluorescence naturelle à l'intérieur du nodule suspect.

La fluorescence est la propriété de certaines molécules d'émettre des radiations de longueur d'onde plus longue que la lumière ayant servi à les éclairer. Par exemple un tissu en coton éclairé par de la lumière ultraviolette émet de la lumière blanche.

De nombreuses molécules ayant des propriétés de fluorescence naturelle (dite fluorescence endogène) sont présentes dans l'organisme. On citera par exemple le NADH coenzyme d'oxydoréduction présent dans toutes les cellules vivantes, les riboflavines (vitamine B2) ou les flavoprotéines qui ont la propriété d'émettre du vert et du rouge lorsqu'elles sont éclairées par de la lumière bleue, ou encore au niveau tissulaire le collagène et l'élastine, etc. [1].

Analyser la fluorescence d'un tissu biologique revient à analyser la concentration de ses molécules fluorescentes. Ces dernières ayant un rôle fonctionnel dans le métabolisme du tissu, leur concentration donne des indications sur l'état du tissu. Ce paramètre physicochimique est une source d'informations au même titre que la densité du tissu aux rayons X (mammographie), la réponse ultrasonore (échographie), l'élasticité du tissu (élastographie), ou encore la réponse magnétique (IRM).

On sait depuis plusieurs décennies qu'une croissance tumorale modifie les propriétés de fluorescence des tissus.

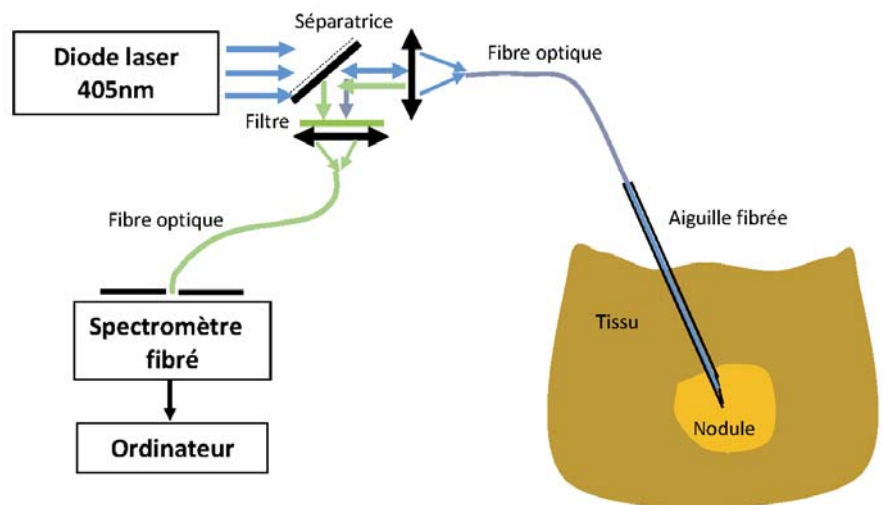


Figure 1. Schéma de principe.

Plusieurs dispositifs permettant de mesurer la fluorescence des organes creux ou les tissus pendant une opération chirurgicale ont été développés : endoscopes spéciaux ayant un éclairage d'excitation bleu et un filtre sur la caméra, systèmes fibrés placés dans le canal opérateur de l'endoscope [2-4].

Nous développons un dispositif constitué d'une aiguille fine biseautée « minimale invasive¹ » pour mesurer la fluorescence des nodules à l'intérieur des tissus. Les questions à résoudre sont :

- Comment prélever les signaux de fluorescence endogène qui sont généralement très faibles au travers d'une aiguille biseautée de faible diamètre ?
- Comment surmonter les contraintes d'un dispositif in vivo ?
- Comment contribuer à l'amélioration du diagnostic du nodule suspect ?

Principe et choix technologiques

Le schéma de principe est exposé à la figure 1. Il repose sur le principe le plus élémentaire de spectroscopie de

¹ « Minimal invasif » est un terme utilisé surtout en chirurgie pour les actes permettant de réduire au maximum les conséquences traumatiques sur le patient.

fluorescence. La lumière émise par la diode laser est injectée dans une fibre optique unique, collée à l'intérieur de l'aiguille et polie en bout d'aiguille pour épouser le biseau de l'aiguille. La lumière renvoyée par le nodule est récupérée dans la même fibre et renvoyée par la séparatrice sur un filtre qui élimine la lumière d'excitation. Elle est ensuite réinjectée dans une fibre qui la conduit à un spectromètre. L'information collectée est constituée de l'intensité et du spectre de la fluorescence renvoyée par le tissu biologique analysé [5].

L'acte médical consiste à faire parvenir la pointe de l'aiguille dans le nodule grâce à un guidage échographique, et à relever le signal de fluorescence en différents points du nodule. La *figure 2* est une image échographique de l'aiguille à l'intérieur du nodule au moment de la prise de mesure.

Une première question est le choix de la lumière d'excitation. Excitation continue ? Excitation par pulses picoseconde pour faire de la spectroscopie résolue dans le temps ? Excitation multi longueur d'onde, mono longueur d'onde etc. ? Quelle(s) longueur(s) d'onde choisir ? Le véritable problème est la méconnaissance du comportement des substances fluorescentes *in vivo* à l'intérieur des nodules cancéreux et bénins. Les petits avantages bien connus d'une approche par rapport à l'autre ont peu d'importance, par rapport au besoin de collecter de nombreux cas cliniques, condition incontournable pour avoir les moyens de faire le lien entre le comportement de la fluorescence intra tissulaire et la grande diversité des pathologies bénignes et malignes.

La longueur d'onde d'excitation inoffensive qui génère un signal conséquent de fluorescence est le bleu ou le proche UV (supérieur à 360 nm). Il s'agira donc d'une excitation continue à 405 nm, grâce à la facilité de se procurer ce rayonnement à bas coût, et le peu de différences observées avec les longueurs d'ondes voisines.

Un second problème est le biseau très affûté de 15° des aiguilles hypodermiques. Le risque d'éclatement de la pointe de l'aiguille pendant l'acte médical a été résolu en scellant la fibre dans une colle époxy biocompatible ayant les bonnes propriétés. Nos aiguilles conçues pour l'usage

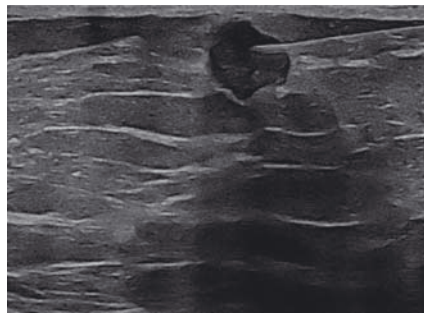


Figure 2. Image échographique de l'aiguille dans le nodule.

unique résistent à plus d'une centaine d'entrées dans des nodules durs, la pointe d'inox s'é moussent totalement bien avant le détachement d'une partie du bout de la fibre. Le biseau de 15° pose également un problème optique, la lumière d'excitation se réfléchit totalement sur le biseau de la fibre (fonction de l'indice de fibre utilisé voisin de 1,5, et celui des tissus voisin de 1,35, la réflexion totale devient importante pour les angles de biseau inférieurs à 25°). Cette lumière réfléchie ne fait plus partie des rayons guidés de la fibre à cause de son angle trop élevé par rapport à l'axe, elle traverse donc la gaine optique et va diffuser dans la colle (*figure 3*). L'excitation se fait par le couplage entre l'onde évanescente générée par la réflexion totale sur le biseau et le milieu biologique. La surface de la fibre biseautée avec un angle de 15° présente l'avantage d'être 15 fois plus grande que celle de la fibre perpendiculaire, le couplage pour le signal retour entre la fibre et la fluorescence générée à la surface de la fibre est efficace. Ceci a permis d'obtenir du flux avec un faible diamètre de fibre compatible avec les aiguilles d'injection intradermique 25G (type vaccin) de 0,3 mm de diamètre intérieur et 0,5 mm de diamètre extérieur. Cela laisse la place à une fibre de cœur de 200 μm, et à un joint de colle d'épaisseur 50 μm. Par contre de la lumière d'excitation bleue entre dans la colle et malheureusement les colles aux bonnes propriétés mécaniques fluorescentes, et se photoblanchissent de manière réversible. Ceci a posé des difficultés dans le processus de calibration des aiguilles. Pour parvenir à un étalonnage des propriétés des aiguilles avant examen médical, il s'est avéré utile de ne pas faire un polissage

Analyseur de spectre **OSA20**



Rapide et précis

Plage spectrale
1250-1700 nm

Vitesse maximale
2000 nm/s

Résolution spectrale
20 pm

Nouvelles fonctions disponibles !

- **OSNR** pour les signaux multiplexés en polarisation
- **Grille CWDM**
- **Contrôle à distance** de l'affichage à l'écran

Découvrez toutes les autres fonctionnalités sur
www.yenista.com/osa20

Yenista
OPTICS

Tél. : +33 (0)2 96 48 37 16
sales-emea@yenista.com
www.yenista.com

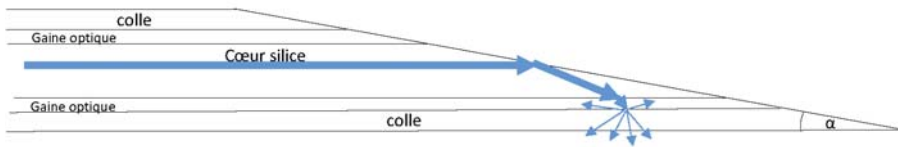


Figure 3. Réflexion totale sur le biseau de la fibre.



Figure 4. Comparaison des dimensions de l'aiguille à celle d'une aiguille de micro biopsie.

parfait de la surface. Un polissage suivant les configurations entre 1 et 15 μm avec un bon sens des stries a permis d'avoir une sortie contrôlée de lumière diffuse en plus de l'onde évanescente permettant un étalonnage simple et fiable de l'aiguille juste avant son utilisation.

Quant au dispositif optique, l'adaptation des multiplexeurs conçus pour les télécoms au domaine du visible ont permis d'avoir un montage totalement fibré, ce qui a permis non seulement un gain de poids, de robustesse des réglages, de coût, mais aussi de flux collecté.

Contraintes d'un dispositif in vivo

La figure 4 montre une photo de notre aiguille (25G) comparée à une aiguille de micro-biopsie (14G) utilisée pour prélever des échantillons de nodule. Même si nous qualifions le dispositif de minimal invasif, il n'en reste pas moins soumis à l'ensemble des contraintes d'un dispositif destiné à pénétrer dans le corps humain.

Une aiguille fine biseautée ne peut pas être utilisée autrement qu'en usage unique. En effet l'extrémité de la pointe en inox est peu robuste et perd son tranchant au bout de quelques usages. Pour pouvoir faire des premiers essais cliniques in vivo chez l'homme, il a fallu plusieurs années pour que l'ensemble du dispositif puisse répondre à toutes les normes. Nous avons fini la première partie de l'étude clinique avec 60 patients, et suite aux résultats encourageants, nous effectuons la seconde partie de 250 cas.

Concernant l'effet atténuateur de l'hémoglobine sur le signal in vivo, nous avons confirmé les effets observés sur le petit animal. L'aiguille en pénétrant dans le tissu produit une micro-hémorragie. Par contre le sang met quelques secondes à arriver au niveau de la pointe de l'aiguille, il y a un délai de 3 ou 4 secondes pour prendre la mesure (à condition de ne pas être dans un vaisseau). Si on avance un peu plus profondément l'aiguille, on peut reprendre une mesure sans l'effet hémorragique. Par contre si le médecin fait un geste de retrait partiel de l'aiguille avant ou pendant la mesure, le signal de fluorescence sera largement sous-évalué à cause des liquides hémorragiques et du mauvais contact de la fibre avec les bords du tissu.

Améliorer la prise en charge du patient dans le cas du cancer du sein (98 % de femmes et 2 % d'hommes)

La capacité de ce dispositif à mesurer la fluorescence à l'intérieur des tissus in vivo n'aurait absolument aucun intérêt s'il ne répondait pas à un problème médical. Nous travaillons aussi sur le cancer du foie et du poumon. Chaque cancer ayant sa propre problématique, nous exposons uniquement de manière très simplifiée celle du sein.

La croissance d'amas cellulaires non fonctionnels est à l'origine de nodules se formant dans la masse tissulaire. Certains nodules, même de taille très importante, n'auront aucune conséquence sur la santé de la personne, ce sont les nodules bénins. D'autres vont de manière plus ou moins rapide se propager à des organes vitaux et leur faire perdre leur fonctionnalité avec des effets très graves, ce sont les nodules cancéreux. Dans le sein, on dit qu'il y a un continuum qui va du bénin au pathologique, certaines tumeurs bénignes ayant une certaine probabilité de devenir plus tard malignes. Il n'y pas de critère de signalisation universel du caractère cancéreux du nodule, beaucoup de cancers se détectent uniquement grâce à des effets secondaires bénins, des microcalcifications visibles à la radio par exemple, qui pourtant souvent ne cachent pas de cancer. De nombreuses tumeurs malignes sont étoilées, peu élastiques, hypo-échogènes, mais il en existe d'autres très sphériques, élastiques et hyper-échogènes etc. L'examen radiologique détecte les nodules par leur densité, le caractère étoilé est un mauvais signe. Mais ce n'est pas suffisant pour prendre une décision [6]. La suite de l'examen est l'échographie, qui attribue des propriétés supplémentaires au nodule : hypo ou hyper-échogène, délimitation des contours, ombre acoustique, état de la vascularisation etc. À ce stade le radiologue va émettre un pronostic selon le classement ACR. Le classement ACR3 signifie que la probabilité de malignité est inférieure à 2 % et que la surveillance est renforcée, ACR4 signifie une probabilité de malignité entre 2 % et 95 % et ACR 5 plus de 95 %. Dans le cas des ACR4 et 5 on effectue une micro-biopsie,

Le saviez-vous ?

Le développement de nouveaux systèmes optiques d'imagerie intra-vitale est en plein essor. Ainsi, M. Gora et ses collaborateurs de la Harvard Medecine School, à Boston aux USA, ont mis au point une petite capsule contenant un OCT miniaturisé (tomographe par cohérence optique) et attachée à un cathéter très fin. Ce dispositif est simplement avalé par le patient, ce qui permet d'imager l'œsophage avec une résolution d'environ 10 μm sans aucune anesthésie (référence : M. Gora *et al.*, Nat. Medecine 19 (2013)).

c'est-à-dire le prélèvement d'une carotte de tissu de typiquement 3 mm de diamètre et 10 mm de long qui sera observé sous microscope pour analyser la forme des cellules, la taille du noyau, les types d'amas etc. La décision chirurgicale se fera à l'issue de la biopsie. Des échantillons de la pièce opératoire seront ensuite analysés avec un procédé voisin de celui de la carotte de biopsie. Chaque examen augmente la probabilité de diagnostic correct sans être infaillible. En effet, la biopsie a pu être faite dans une partie du nodule qui n'est pas cancéreux [7], la structure des amas cellulaires observés au microscope peut être douteuse, d'autres facteurs entrent en compte comme l'âge du patient, les antécédents familiaux, la présence de certains gènes etc. Notre examen se situe entre l'échographie et la biopsie, l'objectif étant d'éviter les biopsies inutiles, d'avoir une confirmation supplémentaire du caractère bénin du nodule quand la biopsie ne se justifie pas, ou encore d'émettre des alertes sur des cas apparemment peu suspects. Pour cela nous travaillons sur deux axes : les critères de fluorescence suspects ou rassurants, et l'analyse différentielle de pathologies bénignes ou malignes qui peuvent se confondre à l'imagerie. À titre d'exemple des adénoses ou fibroadénomes bénins (que l'on retrouve d'ailleurs très fréquemment dans les ACR4) sont connus pour souvent ressembler au carcinome canalaire infiltrant malin. Par contre sur la signature de fluorescence in vivo il y a des caractéristiques les distinguant clairement (*figure 5*) du moins sur l'ensemble des cas que nous avons observés. Il ne faut pas oublier non plus que la physiologie des pathologies évolue dans le temps, les vieux fibroadénomes se calcifient fréquemment, le centre des carcinomes se nécrose avec le temps et peut perdre en intensité de fluorescence. Il faut donc toujours rester prudent et modeste

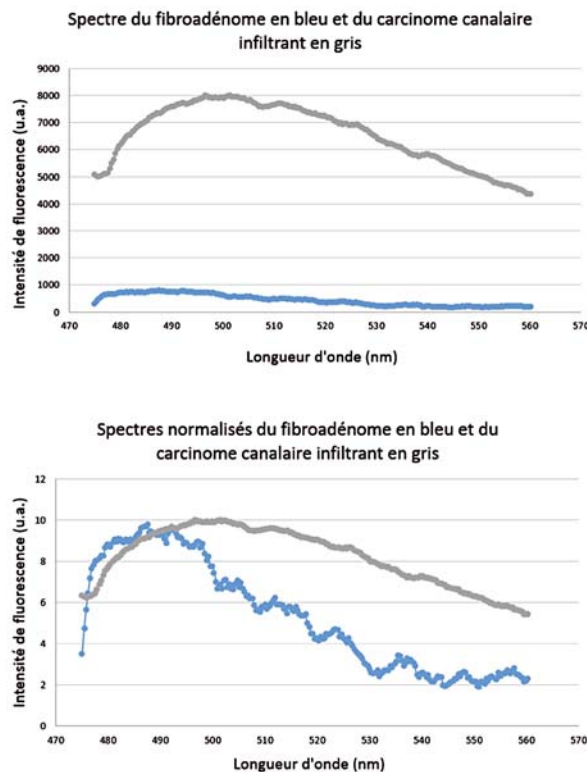


Figure 5. Exemples typiques de spectres.

dans ce domaine, la diversité des formes que peuvent prendre les pathologies tant bénignes que malignes est telle, que ce n'est qu'avec le temps et de très nombreux cas que l'on arrivera à définir l'apport durable de ce type d'information dans la prise en charge du patient.

Références

- [1] G.A. Wagnieres, W.M. Star, B.C. Wilson, *Photochem. Photobiol.* 68(5), 603–632 (1998)
- [2] R.R. Alfano, D.B. Tata, J. Cordero, P. Tomashefsky, F.W. Longo, M.A. Alfano, *IEEE J. Quant. Elec.* 20, 1507 (1984)
- [3] S. Villette, S. Pigaglio-Deshayes, C. Vever-Bizet, P. Validire, G. Bourg-Heckly, *Photochem. Photobiol. Sci.* 5, 483–492 (2006)
- [4] D.A. Peyrot et al., *Biomed. Opt. Express* 3(5), 840–853 (2012)
- [5] L. Alchab, G. Dupuis, C. Balleyguier, M.-C. Mathieu, M.-P. Fontaine-Aupart, R. Farcy, *J. Biophoton.* 1–12 (2009)
- [6] J.R. Harris, M.E. Lippman, M. Morrow, C.K. Osborne, *Diseases of the Breast*, 2nd edn. (Lippicott & Wilkins, Philadelphia, 2000)
- [7] A. Zajdela, N.A. Ghossein, J.-P. Pilleron, A. Ennuyer, *Cancer* 35(2), 499–506 (1974)



P O U R
V O I R
P L U S
L O I N
I L F A U T
Ê T R E
P R É C I S



**ANALYSEUR DE
FRONT D'ONDE
MIROIR DÉFORMABLE
OPTIQUE ADAPTATIVE**

*Métrie optique et optique adaptative
pour lasers et microscopie*

www.imagine-optic.com