



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

THESE

Pour obtenir le titre de

Docteur de l'Université Henri Poincaré – Nancy I

Mention : **Ingénierie Cellulaire et Tissulaire**

par **Emilie PIC**

Localisation des ganglions sentinelles au moyen de quantum dots :
Application au cancer du sein.

Thèse présentée et soutenue publiquement le 3 novembre 2009

Rapporteurs :

Jean-Marc CLASSE	Professeur, Nantes
Frédéric DUCONGE	Chercheur CEA (HdR), Orsay

Examineurs :

Pierre OLIVIER	Professeur, Nancy	<i>Président du jury</i>
François GUILLEMIN	Professeur, Nancy	<i>Directeur de thèse</i>
Frédéric MARCHAL	Professeur, Nancy	
Benoît DUBERTRET	Chargé de Recherche CNRS (HdR), Paris	

Invité :

Jacques DIDELON	Ingénieur INSERM, Nancy
-----------------	-------------------------

Remerciements

J'exprime mes sincères remerciements à :

Mr le Professeur François Guillemin. Ce fut un honneur pour moi qu'il ait accepté de diriger ma thèse. En m'autorisant à travailler au sein du Centre Alexis Vautrin, il a rendu possible la réalisation de ce travail dans les meilleures conditions. Je tiens à lui exprimer ma reconnaissance et toute ma considération.

Mr le Professeur Frédéric Marchal. Je tiens à lui exprimer mon admiration quant à son dévouement à l'exercice de la médecine et à la recherche. Malgré son importante charge de travail, il s'est toujours montré disponible, patient et très attentif à mes études.

Mme le Docteur Lina Bolotine pour la confiance qu'elle m'a accordé en me permettant de réaliser ce travail, et ce, dès notre première rencontre. Je lui suis infiniment reconnaissante de toutes les opportunités qu'elle m'a permis de saisir.

Mr le Professeur Alain Richard pour m'avoir accueillie au sein du Centre de Recherche en Automatique de Nancy et avoir toujours porté de l'intérêt à mon travail.

Mr le Professeur Didier Wolf pour m'avoir accueillie avec bienveillance au sein du groupe thématique Ingénierie Pour la Santé et m'avoir permis de réaliser ma thèse.

Mrs les Docteurs Benoît Dubertret et Thomas Pons pour m'avoir fourni à toute occasion et à tout moment des nanoparticules, m'ayant ainsi permis de réaliser ma thèse dans de très bonnes conditions. Je tiens également à les remercier pour leur disponibilité à mon égard, leur savoir scientifique et linguistique ainsi que leur gentillesse.

Mme le Docteur Agnès Leroux, pour sa disponibilité et son aide essentielle dans l'aboutissement de mes travaux.

La Ligue Nationale Contre le Cancer ainsi que le comité départemental des Ardennes pour avoir financé ma thèse.

Tout mon groupe de travail et en particulier Aurélie François, Saoussen Berrahmoune, Anne Robé, Victor Clausse, Noémie Thomas, Denise Bechet, Sophie Marchal, Henri-Pierre Lassalle, Julie Garrier et Dominique Marius-Leprince pour leur aide quotidienne, leur sympathie et les bons moments partagés au Laboratoire, d'avoir partagé mes joies devant les bons résultats mais aussi pour m'avoir remonté le moral quand il le fallait.

L'Unité de Biologie des Tumeurs du Centre Alexis Vautrin pour m'avoir permis de travailler dans leur Laboratoire ainsi que pour leurs conseils scientifiques et techniques qui m'ont beaucoup apporté.

Madame Anne-Laure Leblanc, animalière à l'animalerie centrale de la faculté de médecine de Nancy, pour sa sympathie, son dévouement à son travail, sa sincérité, son implication en tant qu'animalière et ses précieux conseils qui m'ont permis de mieux appréhender et manipuler les animaux.

Enfin mais surtout, à ma mère, mon père, ma sœur et Jérémy pour leur soutien inconditionnel et leur patience pendant toutes ces années passées à mes côtés.

Table des matières

Liste des figures	1
Liste des tableaux	2
Liste des abréviations	3
Introduction	5
Chapitre I : Synthèse bibliographique	7
I. Cancer du sein et technique du ganglion sentinelle	7
I.1. Epidémiologie et étiologie du cancer du sein	7
I.2. Anatomie et drainage lymphatique du sein.....	9
I.2.1 Anatomie du sein	9
I.2.2 Anatomie du drainage lymphatique du sein.....	10
I.2.2.1. Réseau lymphatique cutané.....	11
I.2.2.2. Réseau lymphatique glandulaire	11
I.2.3. Anatomie du ganglion lymphatique.....	15
I.2.4. Ganglion lymphatique et cancer	16
I.3. Technique du ganglion sentinelle	17
I.3.1. Définition et historique du ganglion sentinelle	17
I.3.2. Curage axillaire.....	17
I.3.3. Technique du ganglion sentinelle	19
I.3.3.1. Technique chirurgicale.....	20
I.3.3.2. Etude anatomopathologique du ganglion sentinelle	27
I.4. Classification des cancers du sein	31
I.4.1. Classification histologique.....	31
I.4.2. Classification du stade	31
I.4.3. Classification du grade.....	34
I.4.4. Récepteurs hormonaux.....	34
II. Quantum dots	36
II.1. Propriétés photophysiques	36
II.2. Structure d'un quantum dot biocompatible	38
II.3. Techniques de quantification.....	40
II.3.1. Quantification <i>in vivo</i>	40
II.3.1.1. Imagerie de fluorescence	40
II.3.1.2. Imagerie nucléaire	45
II.3.1.3. Imagerie par résonnance magnétique	47
II.3.2. Quantification <i>ex vivo</i>	49
II.3.2.1. Spectrofluorimétrie	49
II.3.2.2. Compteur de rayons ionisants.....	49
II.3.2.3. Spectrométrie de masse	50
II.3.3. Résumé	51
II.4. Etudes de biodistribution	52

II.4.1. Imagerie de fluorescence 2 dimensions	53
II.4.2. Imagerie nucléaire	54
II.4.3. Imagerie par résonance magnétique	56
II.4.4. Spectrofluorimétrie fibrée.....	56
II.4.5. Compteurs de rayons ionisants	57
II.4.6. Mesures élémentaires par spectrométrie de masse	58
II.4.7. Résumé	60
II.5. “Quantification techniques and biodistribution of semiconductor quantum dots”	62
II.6. Localisation des ganglions lymphatiques	72
II.7. Quantum dots en chirurgie oncologique : un rôle d’avenir pour le marquage des berges d’exérèse ?	72

Chapitre II : Localisation du ganglion axillaire au moyen de quantum dots et étude de biodistribution par spectrofluorimétrie..... 78

I. Résumé..... 78

II. “Quantum dots in axillary lymph node mapping: biodistribution study in healthy mice” 80

Chapitre III : Localisation des ganglions régionaux au moyen de quantum dots par imagerie de fluorescence et étude de biodistribution par spectrométrie de masse 90

I. Résumé..... 90

II. “Fluorescence imaging and whole-body biodistribution of near-infrared emitting quantum dots after subcutaneous injection for regional lymph node mapping in healthy mice.” 92

Chapitre IV : Détection du ganglion sentinelle axillaire au moyen de quantum dots par imagerie de fluorescence sur modèle murin de cancer du sein 122

I. Matériel et méthodes 122

I.1. Quantum dots	122
I.2. Culture cellulaire.....	122
I.3. Animaux.....	122
I.4. Induction tumorale : modèle syngénique orthotopique murin et suivi de la croissance tumorale.....	123
I.5. Imagerie de fluorescence proche infrarouge.....	123
I.6. Détection histologique des métastases ganglionnaires	124
I.7. Détection des métastases ganglionnaires par <i>reverse transcription-polymerase chain reaction</i>	125
I. 7. 1. Extraction des acides ribonucléiques totaux	125
I. 7. 2. Dosage et qualité des acides ribonucléiques totaux.....	126
I. 7. 3. Transcription inverse (<i>reverse transcription</i>)	126
I. 7. 4. Amplification en chaîne de l’ADN (<i>polymerase chain reaction</i>).....	126
I. 7. 5. Analyse des produits d’amplification	128

I.8. Analyses statistiques	129
II. Résultats et Discussion.....	129
II.1. Suivi de la croissance tumorale	129
II.2. Imagerie de fluorescence	129
II.3. Evaluation des métastases ganglionnaires	132
II.3.1. Coupes histologiques	132
II.3.2. RT-PCR	133
II.4. Comparaison des deux techniques de détection des métastases ganglionnaires	134
III. Conclusion	135
Chapitre V : Synthèse générale et perspectives.....	137
Références bibliographiques	141
Annexes.....	152
I. Développement d'un instrument portable de mesure et de localisation des quantum dots.....	152
II. Influence of incubation time and sensitizer localization on meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin(mTHPC)-induced photoinactivation of cells.	164
III. Production scientifique.....	174
IV. Résumés sélectionnés de communications scientifiques	176

Liste des figures

Figure 1. La base mammaire.....	9
Figure 2. Coupe anatomique simplifiée et schématique d'un sein.	10
Figure 3. Voie de drainage axillaire principale.....	11
Figure 4. Voies de drainage axillaire accessoires.	13
Figure 5. Voie de drainage lymphatique interne.....	14
Figure 6. Voie de drainage sus-claviculaire rétromammaire.	14
Figure 7. Schéma illustrant l'architecture d'un ganglion lymphatique.....	15
Figure 8. Définition d'un GS.	17
Figure 9. Lymphoedème du bras droit après un curage axillaire chez une patiente atteinte d'un cancer du sein.(photographie provenant du Centre Alexis Vautrin)	18
Figure 10. Parties du corps présentant de l'urticaire coloré chez 3 patientes différentes.	27
Figure 11. Modulation de la longueur d'onde d'émission des QDs.	37
Figure 12. Comparaison des spectres d'absorption (vert) et d'émission (bleu) d'un colorant organique : le FITC et de QDs (cœur CdSe) émettant à 520 nm.	37
Figure 13. Structure générale d'un QD biocompatible.	39
Figure 14. Spectres d'absorption de l'eau et de l'hémoglobine, principaux composés des tissus biologiques.	41
Figure 15. Nature diffuse des photons en milieu biologique et conséquence sur l'imagerie de fluorescence 2 dimensions.	42
Figure 16. Suivi du volume tumoral suite à l'injection s.c. de 10^6 cellules 4T1 chez la souris balb/c au niveau des mamelles thoraciques droites.	129
Figure 17. Imagerie de fluorescence <i>in vivo</i> du GAD suite à l'injection s.c. de 20 pmol de QDs.	130
Figure 18. Suivi de fluorescence <i>in vivo</i> du GAD entre 5 min et 4 h après injection s.c. de 20 pmol de QDs chez des souris saines et porteuses de tumeurs 4T1.	131
Figure 19. Fluorescence <i>ex vivo</i> du GAD 4 h après injection s.c. de 20 pmol de QDs chez des souris saines et porteuses de tumeurs 4T1.	132
Figure 20. Photographies de coupes HES de GAD provenant de souris porteuses de tumeurs 4T1.	133
Figure 21. Détection des métastases ganglionnaires par RT-PCR.....	134

Liste des tableaux

Tableau I. Classification histologique simplifiée des cancers du sein selon l’OMS.....	31
Tableau II. Classification histopathologique TNM et pTNM des cancers du sein.	33
Tableau III. Evaluation du grade des cancers du sein par la méthode SBR.....	34
Tableau IV. Principaux avantages et inconvénients des modalités d’imagerie corps entier utilisées pour détecter et quantifier les QDs in vivo.	52
Tableau V. Principaux avantages et inconvénients des techniques employées pour quantifier les QDs ex vivo.....	52
Tableau VI. Conditions expérimentales utilisées pour les études de biodistribution de QDs.	61
Tableau VII. Description des amorces utilisées pour la PCR.	127
Tableau VIII. Composition du mélange pour l’amplification des gènes codant pour la CK19 et la GAPDH.	127
Tableau IX. Cycles d’amplification du gène codant pour la CK19.....	128

Liste des abréviations

^{18}F	Fluor 18
^{64}Cu	Cuivre 64
$^{99\text{m}}\text{Tc}$	Technetium-99-métastable
^{111}In	Indium 111
^{125}I	Iode 125
$^{125\text{m}}\text{Te}$	Tellure-125-métastable
% DI	Pourcentage de la dose injectée
% DI/g	Pourcentage de la dose injectée par gramme de tissu
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
BET	Bromure d'éthidium
BSA	Albumine sérique bovine
Cd	Cadmium
CK19	Cytokératine 19
DH	Diamètre hydrodynamique
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
ER	Récepteur à œstrogène
ESM	Ecart standard à la moyenne
FDG	Fluorodéoxy-glucose
GA	Ganglion axillaire
GAD	Ganglion axillaire droit
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GTL	Ganglion thoracique latéral
Gd	Gadolinium
GS	Ganglion sentinelle
HER2	<i>Human epidermal growth factor receptor 2</i>
HES	Héματοxyline éosine safran
ICP-AES	Spectrométrie d'émission atomique couplée à un plasma inductif

ICP-MS	Spectrométrie de masse couplée à un plasma inductif
ICP-OES	Spectrométrie d'émission optique couplée à un plasma inductif
IHC	Immunohistochimie
IRM	Imagerie par résonance magnétique
OMS	Organisation mondiale de la santé
pb	Paire de bases
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PIR	Proche infrarouge
PR	Récepteur à progestérone
TNM	<i>Tumor Node Metastasis</i>
RER	Rapport d'expression relative
ROI	Region d'intérêt
RPMI	<i>Roswell park memorial institute</i>
RR	Risque relatif
RT	<i>Reverse transcription</i>
SBR	<i>Scarff Bloom Richerdson</i>
s.c.	Sous-cutané
Se	Sélénium
SRE	Système réticuloendothélial
TEP	Tomographie par émission de positons
UV	Ultraviolet
TBE	Tampon tris-borate-EDTA
Te	Tellure
TPS	Tampon phosphate salin
UA	Unité arbitraire

Introduction

Introduction

Le cancer du sein est le plus fréquent des cancers chez la femme. Depuis 2005, environ 50.000 nouveaux cas sont recensés par an en France. Ce type de cancer représente toujours, malgré l'évolution de la prise en charge pluridisciplinaire, un véritable problème de santé publique. En effet, le cancer du sein reste la première cause de décès par cancer chez la femme avec 12.000 décès par an en France correspondant à 20 % des décès par cancer chez la femme.

Dans le traitement des cancers du sein opérables, le diagnostic des métastases ganglionnaires est réalisé en parallèle à la chirurgie, par la technique du ganglion sentinelle (GS), considérée depuis peu comme la nouvelle technique de référence. Cette étape est très importante car elle détermine l'existence ou non d'un envahissement ganglionnaire, facteur pronostic le plus important, permettant d'adapter le traitement associé à la chirurgie. La technique du GS évite l'ablation de tous les ganglions de l'aisselle (curage axillaire) chez les femmes qui n'ont pas d'atteinte des GS, leur évitant des séquelles fonctionnelles ou l'apparition de gros bras (lymphœdème).

La première étape de la technique du GS consiste à repérer et prélever le premier relais ganglionnaire régional potentiellement métastatique. Le GS est localisé après injection d'un radiocolloïde quelques heures avant l'intervention puis d'un colorant physiologique bleu en peropératoire. La seconde étape correspond à l'étude anatomopathologique du ou des GS réséqués. Cependant, il y a des inconvénients inhérents à cette procédure, et notamment des risques de choc anaphylactique au colorant bleu ainsi que des tatouages cutanés persistants, l'injection du radioisotope ne peut être réalisée que par du personnel qualifié (médecin ou technicien isotopiste) dans un service spécifique.

Dans l'objectif de pallier aux différents inconvénients de la technique du GS, de nouveaux marqueurs ont été adoptés au Laboratoire : les « quantum dots » (QDs), afin de substituer les produits de contraste habituellement utilisés. Les QDs sont des nanocristaux de semi-conducteurs fluorescents, de forme sphérique dont les dimensions sont de l'ordre de 2 à 10 nm. Leurs propriétés photophysiques hors du commun en font des colorants exceptionnels.

Ce manuscrit comprend, dans un premier chapitre, la synthèse bibliographique, divisée en 2 sous-chapitres, dans lesquels seront décrits successivement l'anatomie du sein et de son

système lymphatique, la technique du GS ainsi que son implication dans le pronostic et la classification des cancers du sein. Le second sous-chapitre détaille les propriétés photophysiques des QDs, leur composition, les techniques de détection utilisées pour les quantifier ainsi que les différentes études de biodistribution réalisées *in vivo*.

Dans un deuxième chapitre, une étude sur la localisation du ganglion axillaire (GA) au moyen de QDs émettant dans le rouge, suite à une injection sous-cutanée (s.c.) chez la souris saine, sera présentée ainsi qu'une étude de biodistribution. Les QDs ont été détectés *in vivo* par spectrofluorimétrie fibrée, méthode mini-invasive, puis leur quantification *ex vivo* dans les organes, le sang et les excréments a été réalisée, après extraction chimique, par spectrométrie de fluorescence.

Afin de détecter des ganglions lymphatiques plus profonds dans les tissus, et de façon non-invasive, des QDs émettant dans le proche infrarouge (PIR) ont été employés. Ainsi, dans un troisième chapitre, une étude sur la cartographie de ganglions régionaux drainant les mamelles thoraciques de la souris et leur distribution tissulaire à moyen terme sera décrite. Les QDs ont été visualisés par imagerie de fluorescence, méthode non-invasive, et la biodistribution a été évaluée par spectrométrie de masse.

Suite aux études sur animaux sains, un travail a été conduit sur modèle tumoral murin de cancer du sein. Ainsi, dans un quatrième chapitre, le repérage du GS axillaire a été investi par imagerie de fluorescence suite à l'administration de QDs PIR sur des souris porteuses de tumeurs mammaires. L'envahissement métastatique ganglionnaire a été déterminé, soit par lecture directe des coupes colorées de GAs, soit par *reverse transcription-polymerase chain reaction* (RT-PCR), technique semi-quantitative.

Une synthèse générale des résultats ainsi que les perspectives à court et moyen terme seront développées dans un dernier chapitre.

Synthèse
bibliographique

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I. Cancer du sein et technique du ganglion sentinelle

I.1. Epidémiologie et étiologie du cancer du sein

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent mais aussi la première cause de décès par cancer chez la femme dans le monde ^[1, 2]. En 2005, en France, son incidence est de 101,5 pour 100.000 personnes, correspondant à 49.814 nouveaux cas, soit 37 % des cancers chez la femme et 11.201 décès soit un taux de mortalité de 17,7 pour 100.000 personnes ^[3, 4]. De 1980 à 2005, l'incidence du cancer du sein a augmenté de 74 %, soit une hausse annuelle constante de 2,4 %, alors que depuis 1998, le taux de mortalité diminue de 1,3 % par an. Le vieillissement de la population, les nouveaux modes de vie (obésité et alcool plus courants chez la femme depuis quelques décennies), ainsi que la mise en place du dépistage du cancer du sein contribuent à l'augmentation de cette incidence, alors que ce même dépistage, combiné à l'amélioration des stratégies thérapeutiques permettent la diminution de la mortalité ^[3, 4].

Il est à noter qu'en comparaison avec les autres pays européens, la France fait partie des pays où le taux d'incidence a augmenté le plus vite sur la période 1980-2005, avec une incidence relativement haute ^[2]. Cependant, elle reste nettement inférieure à celle des Etats-Unis qui est de 182,5 pour 100.000 personnes en 2004 ^[5].

Les facteurs de risque du cancer du sein sont nombreux et très variés ^[6, 7]. Il est possible de les classer en fonction de leur importance, donnée par la valeur du risque relatif (RR). Ainsi, plusieurs catégories peuvent être identifiées avec des risques relatifs décroissants : les risques principaux, les risques importants, les risques d'importance mineure ou dont l'importance reste à déterminer.

o Les risques principaux

Le sexe est le principal facteur de risque de cancer du sein puisqu'il concerne 99 % des femmes contre 1 % des hommes ^[5, 8].

L'âge après le sexe représente un facteur important pour tout type de cancer ^[9, 10]. Le cancer du sein affecte très rarement les femmes de moins de 30 ans, mais plus une femme

avance en âge, plus le risque de développer un cancer du sein augmente ^[6, 7]. En France, presque 10 % des femmes développent un cancer du sein : moins de 10 % surviennent avant 40 ans, 25 % avant 50 ans et près de la moitié avant 65 ans. Le RR associé à un âge supérieur à 65 ans est de 5,8 ^[11].

L'hérédité joue aussi un rôle important : 5 à 10 % des cancers du sein sont dus à une prédisposition génétique ^[12-14]. Plusieurs gènes sont connus comme associés à un risque accru de cancer du sein quand ils portent des mutations ^[13, 15]. Parmi ces gènes de prédisposition, 2 sont reconnus pour être responsables de la moitié des cancers du sein familiaux. Il s'agit des gènes BRCA1 et BRCA2, localisés respectivement sur les chromosomes 17 et 13. Etre porteur d'une mutation germinale de l'un de ces 2 gènes confère un risque cumulé élevé de développer un cancer du sein, estimé entre 60 et 85 % à 70 ans pour une femme ^[13, 15]. Un RR de plus de 200 a été estimé pour les personnes de moins de 40 ans porteuses de mutations du gène BRCA1 et un RR de 15 pour les personnes âgées de 60 à 69 ans ^[11, 16].

o Les risques importants

Les maladies histologiques du sein, même bénignes, ainsi que les antécédents de cancer, quels qu'ils soient, peuvent augmenter le risque de cancer du sein ^[7]. En effet, il a été démontré qu'un RR de 5,3 était associé à des patientes ayant un antécédent d'hyperplasie atypique et un RR de 17,3 a été estimé pour des personnes avec un historique de carcinome canalaire *in situ* ^[11].

Les antécédents familiaux sont également importants à connaître car le RR associé à un cancer diagnostiqué chez une parente du premier degré (mère, sœur ou fille) de 50 ans ou plus correspond à 1,8 alors que chez une parente du premier degré de moins de 50 ans, il équivaut à 3,3. Si 2 parentes du premier degré sont affectées, le RR augmente à 3,6. ^[11, 17].

L'exposition du tissu mammaire aux radiations ionisantes, avant l'âge de 40 ans est susceptible de provoquer un cancer du sein dans les années ultérieures, dans la mesure où ces radiations ionisantes endommagent l'ADN ^[7]. Après extrapolation des données de la littérature, un RR pour une exposition de 1 Gy après une période de latence de 10 ans a été évalué à 1,6 ^[6, 11].

L'origine géographique influence aussi le risque de cancer du sein. Ce risque augmente plus de 4 fois si la patiente est née en Amérique du Nord ou en Europe du Nord comparé à une femme née en Asie ou en Afrique ^[7].

o Les risques modérés

Beaucoup d'autres facteurs de risques liés au mode de vie tels que la consommation régulière d'alcool ^[18, 19], le tabagisme ^[20, 21], l'obésité ^[22, 23], une alimentation riche en graisse ^[24, 25] ou encore la puberté précoce ^[26], la ménopause tardive, les traitements hormonaux substitutifs de la ménopause ^[11], la contraception orale ^[27], et bien d'autres peuvent favoriser le risque de cancer du sein ^[7, 11].

I.2. Anatomie et drainage lymphatique du sein

I.2.1 Anatomie du sein

Le sein est un organe visible et palpable, innervé et richement vascularisé dont la fonction première est la production de lait maternel (lactation).

Situés à la face antérieure du thorax, les seins présentent une base mammaire s'étendant de la deuxième côte jusqu'à la sixième et du bord latéral du sternum jusqu'à la ligne axillaire antérieure ^[28]. En arrière, le sein repose non pas sur une surface plane mais sur la cage thoracique qui est nettement convexe (Figure 1). La face profonde de la glande repose sur le muscle grand pectoral.

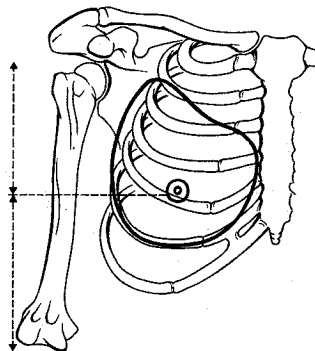


Figure 1. La base mammaire. ^[28]

Sur le plan superficiel, en avant et latéralement, le tissu glandulaire est étroitement uni au derme par des ligaments (ligaments de Cooper) qui permettent de suspendre la glande au

plan cutané et constituent son principal moyen de fixité (Figure 2). La plaque aréolo-mamelonnaire située au sommet du cône mammaire constitue également la clé de voûte en terme de stabilité et de fixation cutanée. Le mamelon est implanté sensiblement au centre de l'aréole et présente à son extrémité les orifices des 15 à 20 canaux galactophores terminaux (conduits lactifères), distinctement séparés les uns des autres. L'aréole est pourvue de fibres musculaires lisses qui contrôlent la fonction excrétrice du sein au moment de la lactation (Figure 2) ^[28].

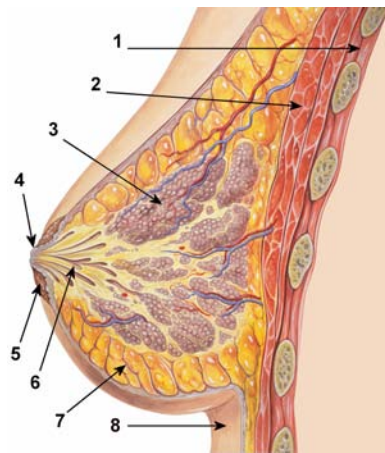


Figure 2. Coupe anatomique simplifiée et schématique d'un sein. 1 : cage thoracique, 2 : muscles pectoraux, 3 : lobule, 4 : mamelon, 5 : aréole, 6 : conduit galactophore, 7 : tissu adipeux, 8 : peau. ^[29]

Sur le plan interne, le volume mammaire n'est pas constitué uniquement de tissu glandulaire (canalaire et lobulaire) mais aussi de tissu adipeux et conjonctif. La proportion entre ces 3 éléments varie considérablement d'une femme à l'autre mais aussi chez une même femme en fonction de son âge, de son statut hormonal et de ses variations pondérales. Ceci explique les grandes variations de densité et de consistance de la glande mammaire ^[28].

I.2.2 Anatomie du drainage lymphatique du sein

Les anatomistes s'attachent à décrire les lymphatiques du sein en distinguant le réseau lymphatique superficiel drainant la peau de la région mammaire, du réseau plus profond drainant la glande mammaire elle-même ^[30, 31].

I.2.2.1. Réseau lymphatique cutané

Les lymphatiques cutanés issus de la région mammaire forment un réseau dense au niveau de l'aréole et du mamelon : le réseau aréolaire superficiel ^[32, 33].

De ce réseau aréolaire, partent en profondeur de petits canaux qui se jettent dans un plexus sous-dermique : le plexus sous-aréolaire (Figure 3). Celui-ci reçoit une grande partie des lymphatiques de la glande mammaire et constitue le centre anastomotique principal entre le réseau glandulaire et le réseau cutané. Il est formé par des troncs volumineux et bosselés. L'ensemble de ce plexus représente un disque percé à sa partie centrale d'un orifice qui circonscrit la base du mamelon. En dehors de l'aréole, ce plexus sous-aréolaire devient de moins en moins dense pour former le plexus circumaréolaire. Le réseau cutané superficiel se draine essentiellement dans les lymphonœuds (ou ganglions lymphatiques) axillaires et se continue dans le réseau des régions voisines ^[28, 30].

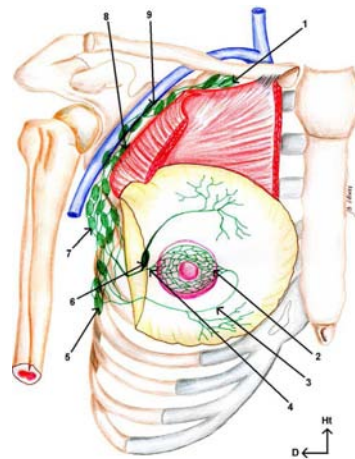


Figure 3. Voie de drainage axillaire principale. 1 : lymphonœuds sous-claviculaires, 2 : plexus sous-aréolaire de Sappey, 3 : tronc interne, 4 : tronc externe, 5 : lymphonœuds du groupe inférieur de la chaîne mammaire externe, 6 : lymphonœuds paramammaire sous-cutané de Sorgius, 7 : lymphonœuds du groupe moyen de la chaîne mammaire externe, 8 : lymphonœuds du groupe supérieur de la chaîne mammaire externe, 9 : lymphonœuds sous-scapulaires. ^[30]

I.2.2.2. Réseau lymphatique glandulaire

Les lymphatiques glandulaires naissent des lobules glandulaires par de vastes sacs périlobulaires. Ces sacs ne sont pas contenus à l'intérieur des lobules, mais ils s'étalent à leur surface. Au niveau des conduits galactophores, le réseau d'origine est formé par des capillaires, dont la direction générale est parallèle à celle des conduits excréteurs et qui

s'unissent entre eux par des anastomoses transversales. Des sacs périlobulaires partent des 2 ordres de collecteurs : les uns gagnent le plexus sous-aréolaire de Sappey en cheminant entre les conduits galactophores, et de là, rejoignent les lymphonœuds axillaires. Ils forment la voie de drainage principale de la glande mammaire. Les autres émergent au niveau de la périphérie de la glande et forment plusieurs voies accessoires ^[30].

Le drainage lymphatique proprement dit de la glande mammaire est tributaire de 3 régions lymphonodales : la région axillaire, la région mammaire interne et la région sus-claviculaire ^[28, 30, 34].

o La région axillaire

Les vaisseaux d'origine glandulaire, tributaires des lymphonœuds axillaires suivent 3 voies : l'une principale et 2 accessoires. Ces 3 voies axillaires assurent la quasi totalité du drainage lymphatique de la glande mammaire, en recueillant 75 à 95 % du flux lymphatique originaire du sein.

L'origine de la voie de drainage axillaire principale naît de 2 troncs partant de la périphérie du plexus sous-aréolaire de Sappey. Le tronc externe se porte transversalement en dehors et vers l'aisselle, et reçoit comme affluent principal un collecteur qui provient de la partie supérieure de la glande. Le tronc interne, plus volumineux, passe en dessous de l'aréole en décrivant une courbe concave en haut. Il gagne ensuite, comme le précédent, la base de la région axillaire en cheminant dans le tissu cellulaire sous-cutané, le long du bord inférieur du grand pectoral, qu'il croise au niveau de la troisième côte. Il reçoit également un ou 2 affluents principaux issus de la région inférieure de la glande (Figure 3). Ces 2 troncs principaux traversent l'aponévrose du creux axillaire après avoir contourné le bord antérieur de la base de l'aisselle, puis se terminent dans un ou 2 lymphonœuds placés sur la paroi interne de l'aisselle.

Parmi les voies accessoires axillaires, on distingue la voie transpectorale et la voie rétropectorale (Figure 4). La voie transpectorale est composée de lymphatiques qui émergent de la face postérieure du parenchyme de la glande mammaire. Les uns traversent le grand pectoral avec les ramifications des artères thoraciques supérieures et acromio-thoraciques et se rendent aux ganglions lymphatiques sous-claviculaires. Les autres sont satellites des rameaux artériels qui perforent le muscle grand pectoral, au dessous du bord inférieur du petit pectoral. Ils se drainent dans les lymphonœuds de l'aisselle (Figure 4).

La voie rétropectorale est constituée par un ou 2 vaisseaux qui contournent le bord inférieur du grand pectoral et montent directement vers les lymphonœuds sous-claviculaires, en passant soit en arrière du petit pectoral, le long de la veine axillaire, soit entre les 2 muscles pectoraux. Dans ce cas, on peut rencontrer des lymphonœuds inter-pectoraux ou ganglions de Rotter (Figure 4).

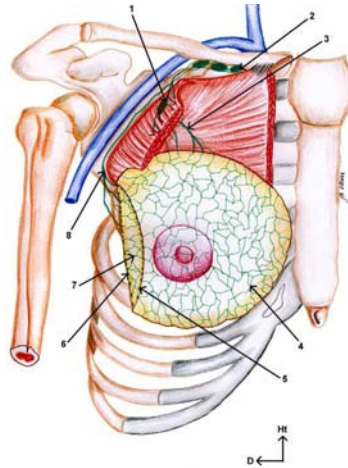


Figure 4. Voies de drainage axillaire accessoires. 1 : lymphonœud intercalaire rétropectoral de Grossmann, 2 : lymphonœuds sous-claviculaires, 3 : voie lymphatique accessoire transpectorale, 4 et 6 : plexus rétromammaire, 5 : réseau lymphatique superficiel, 7 : anastomoses lymphatiques entre les réseaux profonds et superficiels, 8 : voie lymphatique accessoire rétropectorale. ^[30]

o La région mammaire interne

Les collecteurs de la voie de drainage mammaire interne naissent de l'extrémité interne du sein. Ils suivent le trajet des artérioles que l'artère mammaire interne envoie à la glande mammaire. Selon les observations de Caplan ^[34], il existe 2 types de pédicules secondaires. Le premier, prépectoral parcourt la face antérieure du grand pectoral avant de pénétrer dans ses fibres. Ce pédicule perfore les muscles intercostaux au niveau des 2^{ème}, 3^{ème}, 4^{ème} et 5^{ème} espaces intercostaux, puis se jette dans les ganglions de la chaîne mammaire interne (Figure 5). Le second, sous-pectoral, après être sorti de la glande mammaire, se dirige vers le bord inférieur du muscle grand pectoral. Il longe ensuite la face profonde de ce muscle avant de perforer les espaces intercostaux pour rejoindre les lymphonœuds mammaires internes (Figure 5).

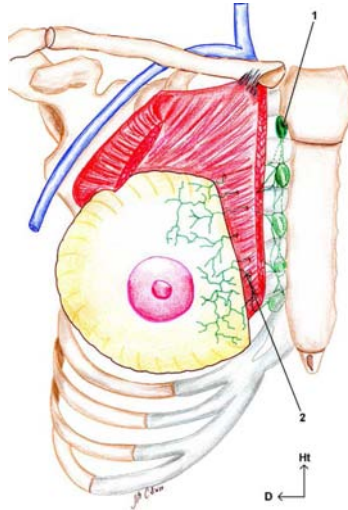


Figure 5. Voie de drainage lymphatique interne. 1 : lymphonœuds parasternaux, 2 : rameaux lymphatiques perforants. ^[30]

o La région sus-claviculaire

Rarement, un tronc lymphatique naît de la partie supéro-interne de la glande, monte en arrière des muscles pectoraux ou entre ces 2 muscles avant de s'engager sous la clavicule pour se drainer dans les relais ganglionnaires sus-claviculaires (Figure 6).

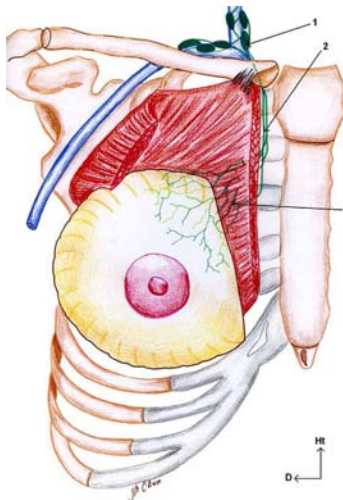


Figure 6. Voie de drainage sus-claviculaire rétro-mammaire. 1 : lymphonœuds sus-claviculaires, 2 : vaisseaux lymphatiques rétropectoraux, 3 : rameaux lymphatiques perforants. ^[30]

I.2.3. Anatomie du ganglion lymphatique

Le ganglion lymphatique (ou lymphonœud) est entouré d'une capsule fibreuse qui se prolonge dans le ganglion jusqu'aux travées (ou trabécules) (Figure 7). La substance du ganglion lymphatique est divisée en 2 parties : la médulla (interne) entourée par le cortex (externe), excepté au niveau du hile où elle entre en contact direct avec la surface.

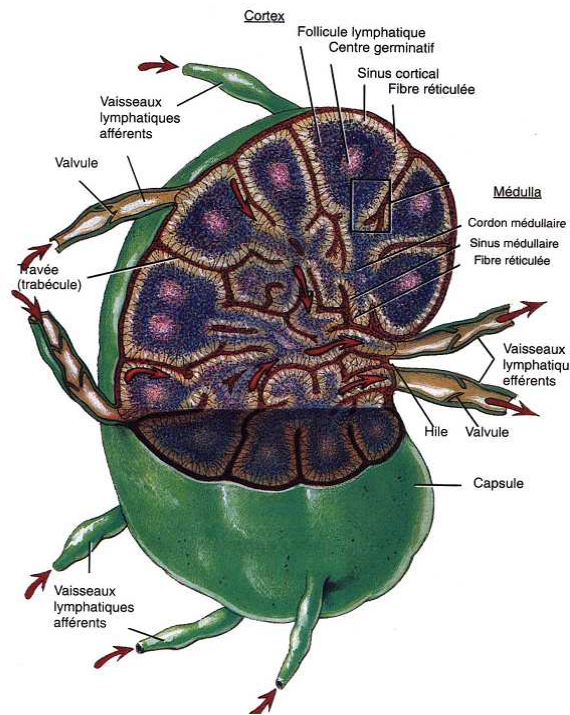


Figure 7. Schéma illustrant l'architecture d'un ganglion lymphatique. [35]

Dans le cortex, les sinus subcapsulaires, immédiatement situés sous la capsule et dont l'endothélium est en continuité avec celui des vaisseaux lymphatiques afférents, drainent les sinus corticaux. La partie externe du cortex contient principalement des lymphocytes B arrangés en follicules dont le nombre et la composition peuvent varier et pouvant développer un centre germinatif une fois en contact avec un antigène, alors que le cortex plus profond est constitué majoritairement de lymphocytes T. Il existe aussi une zone du cortex connue pour abriter des cellules dendritiques. Le cortex possède également des fibres réticulées qui fournissent un support structural mais aussi une surface d'adhésion pour les cellules dendritiques, les macrophages ou encore les lymphocytes. La médulla est composée de cordons médullaires contenant des plasmocytes et des lymphocytes B, séparés par des sinus médullaires constitués de fibres réticulées et d'histiocytes. Le côté concave du ganglion

lymphatique est appelé hile. Les vaisseaux efférents sont attachés au hile par un réticulum relativement dense et portent la lymphe hors du ganglion.

De multiples vaisseaux lymphatiques afférents introduisent la lymphe via la capsule dans le lymphonœud. Cette lymphe s'écoule dans les sinus subcapsulaires, corticaux puis médullaires pour finalement atteindre le hile et sortir par les vaisseaux lymphatiques efférents.

I.2.4. Ganglion lymphatique et cancer

Les ganglions jouent un rôle essentiel dans le contrôle de la progression tumorale. En réponse à l'antigénicité des cellules tumorales, les ganglions régionaux peuvent initier et développer des réactions immunitaires. En même temps, ils peuvent capter les cellules tumorales circulantes. Agissant comme « barrière », ils peuvent les détruire complètement ou au moins arrêter temporairement leur progression.

Les métastases ganglionnaires sont le reflet de la diffusion et de la prolifération de cellules venues de la tumeur primitive par les canaux lymphatiques afférents et retenues dans les sinus ganglionnaires. Classiquement, le premier ganglion de drainage se comporte comme un « filtre ». Tant qu'il n'est pas débordé par un afflux massif de cellules néoplasiques issues de la tumeur primitive, il formera un barrage efficace. La dissémination s'effectue de proche en proche par embols dans les vaisseaux lymphatiques efférents. Dans les ganglions, les cellules tumorales colonisent dans un premier temps le sinus périphérique, puis elles pénètrent le ganglion par les sinus médullaires, la médullaire et le cortex. Dans certains cas, cela aboutit à l'effacement complet du parenchyme ganglionnaire par le processus métastatique. Une dissémination extra ganglionnaire est également possible après rupture de la capsule ganglionnaire.

Cependant, l'observation de ganglions distaux envahis alors que les premiers ganglions du relais sont indemnes (skip métastases), suggère l'implication d'autres mécanismes. Des métastases rétrogrades, controlatérales ou paradoxales sont parfois rencontrées. Elles peuvent s'expliquer par des shunts, des blocages circulatoires (dans certains ganglions envahis) ou par des particularités immunologiques de certaines cellules tumorales. En fait, les vraies skip métastases resteraient rares (3 à 4 %) ^[36].

I.3. Technique du ganglion sentinelle

I.3.1. Définition et historique du ganglion sentinelle

Selon la définition originale de Morton ^[37], le ganglion sentinelle (GS) est le premier relais ganglionnaire drainant la tumeur et donc le premier relais lymphatique potentiellement métastatique. En réalité, le plus souvent, il existe plusieurs GS (Figure 8).

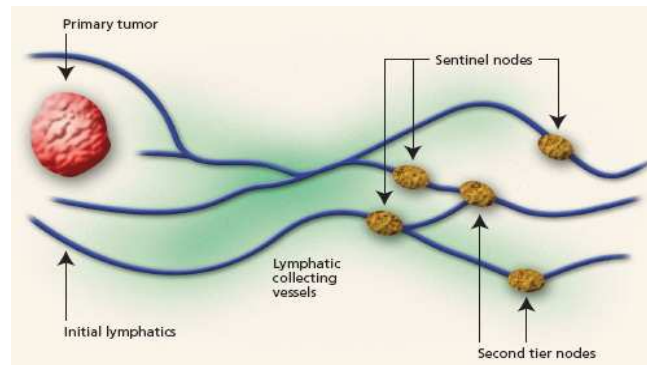


Figure 8. Définition d'un GS. ^[38]

Gould a été le premier à employer le terme de « ganglion sentinelle » en 1960 pour décrire le ganglion situé au confluent des veines faciales antérieures et postérieures ^[39]. Ce ganglion prédisait le statut des ganglions du cou des patients atteints de cancer de la parotide.

La première utilisation pratique du GS remonte à 1977 par Cabañas dans le cancer de la verge ^[40]. Il a décrit que si le ganglion était indemne de métastase, les autres ganglions seraient dépourvus de tout envahissement métastatique. Ce principe a été appliqué, à la suite des travaux de Morton en 1992 au drainage des mélanomes ^[37]. Viennent ensuite les études de Krag en 1993 ^[41] et Giuliano en 1994 ^[42] appliquées au cancer du sein. Ils ont ainsi initié les grandes études cliniques pour valider la technique du GS sur un grand nombre de patients et validé cette approche diagnostique.

I.3.2. Curage axillaire

Le statut ganglionnaire a la valeur pronostique la plus importante avec la taille de la tumeur ^[42], le taux de survie étant corrélé au nombre de ganglions envahis ^[43]. Le curage axillaire était, jusqu'à récemment, le seul moyen d'obtenir une évaluation pronostique et était le traitement de référence des cancers du sein opérables. Son objectif est double : réaliser le

diagnostic histopathologique des ganglions des premiers étages potentiellement envahis (I et II de Berg) après leur ablation et améliorer le contrôle de la maladie. Un curage axillaire est considéré comme significatif si au moins 10 ganglions sont prélevés.

Le curage axillaire est à l'origine de nombreuses complications locales ou locorégionales, dont les plus communes sont le lymphœdème (ou œdème lymphatique), la formation de lymphocèle, les troubles moteurs et/ou sensitifs (engourdissements, raideurs, mouvements limités de l'épaule ou du bras, sensations altérées,...), la douleur ou encore les infections post-opératoires qui ont une incidence non négligeable sur la qualité de vie des patients ^[44, 45].

Le lymphœdème, communément appelé « gros bras » lorsqu'il survient au niveau du bras, est défini comme une accumulation anormale généralisée ou régionale excessive de fluide interstitiel riche en protéines due à une obstruction des vaisseaux lymphatiques, ayant pour résultat la formation d'œdème, l'apparition d'inflammations chroniques et de fibroses (Figure 9). Le lymphœdème représente l'une des principales complications après un curage axillaire et peut survenir de nombreuses années après la chirurgie. Il implique souvent des séquelles fonctionnelles, avec une incidence de 2 à 56 % selon les études et ces méthodes de détection ^[44, 46].



Figure 9. Lymphoedème du bras droit après un curage axillaire chez une patiente atteinte d'un cancer du sein. (photographie provenant du Centre Alexis Vautrin)

La formation de lymphocèle définie comme un épanchement de liquide lymphatique en dehors du système circulatoire est la complication la plus fréquente suite à un curage axillaire, avec une incidence de 5 à 80 % suivant les études rapportées ^[44, 47].

Les incidences reportées sur les problèmes fonctionnels (mouvements limités, perte de force musculaire) du bras et de l'épaule après un curage axillaire sont de 8 à 73 %, dépendant de la définition de ces complications mais aussi de la durée de leur suivi ^[48]. Il est à noter que ces limitations motrices peuvent significativement affecter la qualité de vie des patients.

La douleur post-opératoire suite à un curage est décrite comme continue et durable au niveau de l'aire axillaire, du bras et de la paroi thoracique latérale et est rencontrée dans 2,5 à 30 % des cas ^[44].

Des altérations sensorielles (pertes de sensations, picotements ou paresthésies) sont aussi rencontrées surtout au niveau du bras et sont majoritairement dues au traumatisme du nerf intercostobrachial et de ses ramifications ^[49].

Enfin, des infections post-opératoires peuvent survenir, aggravant la stase lymphatique par fibrose post-infectieuse des canaux lymphatiques. Ainsi, un lymphœdème définitif peut apparaître ou un lymphœdème déjà installé peut s'aggraver. Les incidences rapportées dans la littérature varient de 5 à 19 % ^[47].

Il faut noter que plus de 70 % des tumeurs de taille inférieure à 2 cm n'ont pas d'envahissement ganglionnaire. Ces patients ont alors un curage axillaire considéré comme « inutile ». L'avènement du dépistage systématique du cancer du sein permet actuellement de diagnostiquer à un stade plus précoce avec pour conséquence une diminution du risque d'avoir une atteinte ganglionnaire. Ainsi, suite aux constatations liées à la morbidité du curage axillaire et au faible taux d'envahissement ganglionnaire pour les stades précoces de cancer du sein, une nouvelle technique s'est développée : la technique du GS.

I.3.3. Technique du ganglion sentinelle

La technique du GS ou encore appelée biopsie du GS consiste en un prélèvement du ou des premiers relais ganglionnaires considérés comme « représentatifs », évitant ainsi de prélever l'ensemble de la chaîne ganglionnaire. Cette technique s'effectue, en général, en parallèle à la tumorectomie. Elle se décompose en 2 étapes : une étape chirurgicale qui permet l'identification du ou des GS et une étape anatomopathologique qui permet de faire le

diagnostic histopathologique du ou des GS et ainsi déterminer s'ils présentent ou non un envahissement tumoral ^[50].

Le GS peut être repéré soit par une méthode isotopique, soit par une injection de colorant physiologique, soit par une technique combinant les 2 ^[51]. De nombreuses observations ont conduit à recommander l'utilisation de la technique combinée pour l'identification du GS ^[51-53].

I.3.3.1. Technique chirurgicale

o Repérage du GS par radioisotopes

La réalisation d'une lymphoscintigraphie préopératoire apparaît comme facultative et cette cartographie lymphatique, bien qu'informative, mérite d'être laissée à la discrétion de chaque équipe. En effet, si l'individualisation du GS à l'imagerie est corroborée par le succès de la détection peropératoire ^[54], inversement, la négativité de l'imagerie préopératoire ne prédit pas forcément l'échec de la radiodétection à la sonde ^[55]. Quant à l'injection du colloïde marqué, elle peut s'avérer problématique, en termes non seulement d'horaire, mais aussi de modalités d'exécution.

Le radiotracer habituellement utilisé pour l'imagerie scintigraphique de la circulation lymphatique est une suspension de nanocolloïdes marqués au technetium-99-métastable (^{99m}Tc). Les données physiologiques montrent que, parmi les caractéristiques des particules administrées, la taille joue, en général, le rôle le plus important sur la cinétique de circulation lymphatique. Ainsi, la taille optimale des traceurs serait comprise entre 10 et 100 nm ^[31]. Les colloïdes de petites tailles (< 10 nm) peuvent passer rapidement entre les jonctions inter-endothéliales des lymphatiques et permettent de visualiser directement les GS. L'inconvénient est que ces petites particules sont peu retenues dans les ganglions et migrent rapidement vers les autres relais ganglionnaires. A l'inverse, les molécules de grosse taille (> 100 nm) ont tendance à migrer très lentement voire à rester au niveau du site d'injection mais ne diffusent pas à travers d'autres ganglions. De plus, il faut souligner le manque de renseignements précis fournis par les différents fabricants sur la distribution de la taille de leur préparation colloïdale. Cette insuffisance s'explique par le fait que la mesure de la taille des colloïdes est techniquement délicate et que les résultats obtenus varient suivant la méthode utilisée. Deux préparations sont autorisées en France à ce jour : Nanocis[®] (Schering CIS Bio International)

qui contient des particules colloïdales de sulfure de rhénium d'un diamètre moyen d'environ 100 nm alors que Nanocoll[®] (Amersham Health) est constitué de nanocolloïdes d'albumine humaine de diamètre inférieur à 80 nm ^[56]. Nanocis[®] a été utilisé dans la plupart des études rapportées au niveau national, en raison de son antériorité de mise sur le marché mais peut-être aussi du fait qu'il ne contient pas d'albumine d'origine humaine ^[57].

L'administration du colloïde marqué doit être idéalement réalisée, selon Schneebaum ^[58] et Noguchi ^[55], dans une fenêtre de 1 à 24 h précédant l'intervention. En effet, du fait de leur grande taille (environ 100 nm), les radiocolloïdes sont captés par les macrophages, impliquant une migration lente vers le GS. La possibilité d'injection du traceur la veille de l'intervention a grandement facilité la participation des équipes chirurgicales ne disposant pas d'un service de médecine nucléaire intégré dans leur institution et a permis d'optimiser la planification opératoire de procédures de détection du GS multiples et successives. Le site d'injection du radioisotope a fait l'objet de diverses études comparant l'injection intra et péri-tumorale, sous-cutanée, intradermique en regard de la tumeur, péri-aréolaire ou encore sous-aréolaire ^[59, 60]. La technique retenue comme étant la plus simple, standardisable et reproductible pour des praticiens qui n'ont pas l'habitude de palper un sein (médecine nucléaire) est l'injection sous-cutanée au niveau de l'aréole (dans le derme profond où se trouve le réseau lymphatique) ^[59, 61].

Au-delà de la controverse portant sur les contraintes logistiques et financières représentées par la réalisation d'une lymphoscintigraphie préopératoire, cette dernière permet l'identification du site (axillaire ou extra-axillaire) et du nombre de GS, le marquage cutané de ce dernier, enfin la détection d'éventuels ganglions non sentinelles, dits aussi de « second-échelon » ^[62]. De plus, l'imagerie préalable permet d'éviter une recherche longue et vaine lorsque le ganglion ne capte pas le radiotraceur, une réinjection peut alors être proposée ^[63]. Il est clair que cette attitude est privilégiée par les équipes chirurgicales situées dans des structures où l'accès au service de médecine nucléaire est facile.

Cette modalité technique utilisant un radiocolloïde permet surtout la réalisation d'une incision axillaire sélective de petite taille soit à l'aplomb du repère cutané du GS mis en place en préopératoire à l'issue de la lymphoscintigraphie, soit directement par le chirurgien après exploration transcutanée à la microsonde, à la recherche du « *hot-spot* » cutané axillaire.

La définition du GS à la sonde de détection peropératoire apparaît moins consensuelle. Pour Borgstein ^[64], le GS est constitué par le ganglion siège de la plus haute activité. Les ganglions sont dits non sentinelles lorsqu'ils comportent une activité inférieure à 50 % de celle du GS. D'autres auteurs ont recours à des ratios (rapports d'activité), plus reproductibles, mesurés tantôt *in vivo* (activité du GS/activité du bruit de fond), tantôt *ex vivo* (activité du GS/activité du ganglion non sentinelle). Les ratios en faveur du GS doivent excéder respectivement 2/1 ou 3/1 *in vivo* et 10/1 *ex vivo* ^[54, 65, 66]. L'activité résiduelle du creux axillaire après exérèse du GS nécessite d'être mesurée à la sonde de détection peropératoire et devra s'apparenter à celle du bruit de fond, et dans tous les cas, ne pas excéder 10 % de l'activité maximale du GS *ex vivo*. Pour Cox ^[66, 67], si l'activité axillaire résiduelle reste supérieure à 1,5 fois le bruit de fond, il faudra s'employer à rechercher un GS additionnel laissé en place.

o Repérage du GS par colorants physiologiques

En France, seul le bleu patenté est utilisé. Administré, dilué ou non selon les auteurs, sous un volume de 1-2 ml pouvant aller jusqu'à 5 mL chez les femmes obèses ^[68], le colorant est injecté à des sites éminemment variables selon les équipes ^[69-71] : intratumoral, péri-tumoral et sous-cutané (intradermique, sous-dermique et sous-aréolaire). Le site d'injection péri-aréolaire, région siège d'une importante condensation lymphatique, s'avère particulièrement séduisant dans les tumeurs infracliniques (T0), multicentriques ainsi que dans les localisations tumorales médianes et des quadrants supéro-externes ^[70].

Du fait de sa petite taille, entre 5 et 10 nm, le bleu patenté migre très rapidement et de façon passive dans les canaux lymphatique. Ainsi, il est impératif de respecter un délai de 5 à 10 minutes après injection pour visualiser le GS afin d'éviter que le colorant ne migre dans les ganglions de second échelon ^[68]. La pratique de massages glandulaires doux, immédiatement après l'injection, est recommandée ^[72, 73], permettant ainsi une meilleure migration du colorant dans les canalicules lymphatiques. La chronologie des incisions (axillaire, mammaire) est variable selon les auteurs. La topographie de l'incision axillaire (à la limite inférieure de la zone pileuse) est primordiale, tout particulièrement lors de la réalisation d'un geste mammaire conservateur. Mal positionnée, elle peut en effet être un facteur d'échec de l'individualisation du GS. Menée de façon soigneuse, rapide et atraumatique, la dissection axillaire vise à repérer sélectivement le(s) canalicule(s) (et non d'emblée le ganglion)

lymphatique(s) opacifié(s) qui conduira(ont) au GS idéalement coloré en bleu selon des nuances (bleu marine, bleu turquoise, bleu ardoisé) et une intensité variables ^[72]. La découverte d'un canalicule dilaté aboutissant à un ganglion faiblement ou non opacifié devra faire évoquer son atteinte métastatique. En effet, la colonisation du ganglion par des cellules cancéreuses gêne ou s'oppose à la captation passive du colorant lymphotrope.

Il faut également signaler l'existence possible de plusieurs canalicules menant à un seul et même GS. Si le drainage en série (un canalicule menant à un ganglion) est classique, l'éventualité d'un drainage en parallèle (canalicules multiples conduisant à plusieurs ganglions) n'est pas exceptionnelle. En tout état de cause, la palpation digitale du creux axillaire en peropératoire est essentielle pour ne pas omettre un envahissement ganglionnaire évident. L'isolement du GS est au mieux réalisé par clipage de ce dernier pour prévenir l'extravasation du colorant et permettre ainsi un meilleur contrôle de qualité histopathologique de ce ganglion témoin tel qu'il a pu être préconisé par certaines équipes ^[74].

o Repérage du GS par la technique combinée

La technique combinée est la seule recommandation validée à ce jour ^[52]. Il a été démontré que l'association des méthodes isotopique et colorimétrique donnait un meilleur taux d'identification du GS, de l'ordre de 97 % ^[75]. Cependant, elle impose une harmonie parfaite dans l'intervention des acteurs (médecin nucléaire, chirurgien, pathologiste) dans la multidisciplinarité qu'elle requiert à tout instant de son déroulement. Elle suppose une logistique parfaitement rodée, une réalisation dans un environnement structuré et calme par des praticiens hautement « motivés ».

L'injection synchrone d'un mélange colorant et colloïde doit être fermement proscrite en raison de l'obtention d'un précipité ^[76]. Le principal intérêt de la technique combinée consiste en un parfait positionnement de l'incision axillaire (sélectivement à l'aplomb du repère mis en place à l'issue de la lymphoscintigraphie), en la confirmation formelle de la nature sentinelle du ganglion identifié (bleu et/ou chaud) conduisant à une réduction du taux des faux négatifs, enfin en une révision du creux axillaire en fin d'intervention (absence d'activité résiduelle). Certains opérateurs utilisent la sonde pour identifier le GS, argumentant la possibilité de réaliser aussi une dissection axillaire plus limitée qu'avec le seul colorant. D'autres l'emploient pour confirmer la localisation du GS, ou pour guider la dissection

lorsque l'identification des canalicules s'avère difficile, notamment en cas de faible opacification (volontiers observée dans les seins en involution lipomateuse de la femme âgée ou volumineux) ^[76].

Si la lymphoscintigraphie est négative, la technique avec le colorant bleu est également potentiellement négative. Cependant, elle n'interdit pas de réaliser une recherche des ganglions à l'aide de la sonde isotopique. On peut soit rechercher un ganglion bleu soit faire d'emblé un curage réglé, considérant l'échec de la technique. En effet, un ganglion massivement envahi ne capte ni les colorants lymphotropes, ni les radiotraceurs, un curage axillaire est alors envisagé ^[68].

o Facteurs limitants et effets indésirables de la technique chirurgicale

Des limitations sont connues concernant aussi bien l'utilisation des produits radioactifs que des colorants physiologiques ^[77, 78].

L'identification isotopique du GS se heurte à de multiples difficultés. Cette technique est venue s'ajouter à des programmes d'activité déjà chargés. Les services d'isotopes doivent faire face à la demande croissante de TEP-scan (tomographie à émission de positons couplée à la tomographie à rayons X) ^[77]. Il faut donc « faire de la place » pour des injections qui ne peuvent être réalisées, en France, qu'en milieu spécialisé. Les médecins nucléaires sont peu habitués à injecter des produits radioactifs dans les seins des femmes. Il faut, de plus, trouver des places sous les appareils de scintigraphie pour obtenir des cartographies préopératoires. Le consensus n'est pas fait sur l'utilité de ces cartographies préopératoires. Les sondes de détection peuvent, en effet, permettre de suivre le traceur sur la paroi thoracique de la patiente vers le creux axillaire et son accumulation dans le GS. Cependant, seule la cartographie permet d'identifier avec précision des drainages ectopiques vers les chaînes mammaires internes ou claviculaires, ces drainages pouvant être exclusifs dans respectivement 13 et 5 % des cas, quel que soit le siège de la tumeur dans le sein ^[79]. Si on se limite à l'étude du seul creux axillaire, la cartographie n'est pas absolument indispensable. Le nombre de patientes recevant une injection de radioisotopes n'est donc plus limité par la place sous la caméra. Certains centres peuvent alors faire des injections à plus de 10 malades par jour. Si, en revanche, on souhaite connaître le drainage ganglionnaire de la tumeur dans son ensemble, et si, comme dans certaines équipes, un curage mammaire interne est réalisé en cas de drainage

interne mis en évidence par la cartographie, celle-ci est indispensable et le problème des places sous les caméras peut limiter l'utilisation des radiocolloïdes.

Si certains centres de traitement ont un service d'isotopes sur le site, d'autres doivent faire les injections à leurs malades dans un lieu différent du centre chirurgical. La logistique de l'acte chirurgical et du centre de soin doit être organisée en conséquence ^[77]. Enfin, si le praticien chargé d'injecter les radioisotopes n'a pas de problème en cas de lésion palpable, il en va tout autrement en cas de lésion non palpable. C'est d'ailleurs une des raisons qui a conduit à la réalisation d'injections péri-aréolaires ^[61, 71, 80]. On peut encore demander un repérage échographique avant l'injection des radioisotopes. Chaque médecin sait néanmoins que plus une procédure est complexe et réclame d'intervenants, moins il y a de chances que les choses se déroulent de façon satisfaisante. Là encore, certaines équipes ayant constitué des réseaux privilégiés à l'intérieur d'un centre de soins, la technique d'identification s'y déroule alors dans la sérénité. Ailleurs, des organisations spécifiques doivent être trouvées pour pouvoir travailler dans les conditions optimales ; tout changement, toute nouveauté prenant la place d'autres examens ou d'autres méthodes rencontre de ce fait des résistances, parfois surprenantes.

Un consensus doit être établi sur le siège de l'injection, péri-tumorale ou péri-aréolaire, entre isotopistes et chirurgiens. Ce consensus est rarement défini dans les publications. La radio-activité délivrée par ces isotopes est faible et leur durée de vie courte. Le personnel de salle d'opération et du service d'histopathologie est parfois inquiet et réticent à manipuler des pièces ayant reçu des produits radioactifs. Le bloc opératoire et le service de pathologie doivent observer des procédures spéciales de traitement des déchets radioactifs : des consignes particulières sont à respecter pour le traitement du matériel et des déchets qui ont été en contact avec le radioproduit. La demi-vie courte et les doses très faibles de radioactivité employées ont été étudiées et ont fait la preuve de leur innocuité pour l'ensemble des personnels médicaux et paramédicaux concernés ^[81].

Il a également été rapporté de rares cas de réactions allergiques suite à l'administration de radiocolloïdes. En 2003, Burton rapporte un cas de réaction allergique chez un patient admis pour une technique du GS suite au diagnostic d'un mélanome ^[82]. Dix minutes après injection intradermique de colloïdes marqués au ^{99m}Tc conjugué à de l'albumine, le patient présentait un urticaire très étendu. Un cas similaire a également été rencontré en 2007, 1 h après injection du même radiocolloïde, suite à une biopsie du GS pour un cancer du sein ^[83].

Le colorant bleu est gérable entièrement par le chirurgien contrairement aux radioisotopes. Sa simplicité d'emploi fait qu'il est utilisable en toute circonstance et en tout lieu. Son coût est dérisoire. Son défaut principal est la coloration bleue qu'il donne au champ opératoire. Injecté en préopératoire ou dans le lit de la tumorectomie, il colore le lit opératoire. Les champs, les gants sont tachés et une opération en règle propre et non hémorragique se transforme en un « océan bleu »^[77].

Le passage vasculaire du colorant peut modifier artificiellement le recueil automatique de l'oxymétrie et perturber le fonctionnement des appareils en salle d'opération. L'étude de Momeni a montré une chute significative de 33 % de l'oxymétrie après injection de colorants^[84]. En règle générale, cet effet dure moins de 6 h. Ainsi, les anesthésistes doivent en être prévenus.

Une coloration cutanée grisâtre des patientes en postopératoire est très fréquente, ce qui peut inquiéter familles et infirmières lors du réveil. Enfin, une coloration bleutée des urines et verte des selles est attendue : les patientes doivent en être prévenues. Les tatouages cutanés, lorsque le colorant est injecté en intradermique ou en sous-cutané, sont longs à disparaître et peuvent perdurer de une semaine jusqu'à 2 ans après l'intervention chirurgicale. Dans 41 % des cas, le tatouage cutané persiste durant un an lorsque l'injection est intradermique^[85].

Des réactions d'hypersensibilité immédiate ou retardée (environ 1 h après injection) au bleu patenté ne sont pas rares (Figure 10), représentant 0,6 à 2,8 % des patients, provoquant urticaire « bleuté », angioœdème, bronchospasme ou encore choc anaphylactique^[86]. En effet, les risques de réactions allergiques sont connus et variables et sont également rapportés pour d'autres colorants physiologiques tels que le bleu isosulfan ou le bleu de méthylène, ce dernier étant moins allergisant que les autres colorants^[87-89]. Devant un terrain allergique important connu ou une personne atopique, il peut être préférable de ne pas réaliser l'injection de bleu et de n'utiliser que la technique isotopique. Ainsi, les risques rapportés précédemment justifient la présence de l'anesthésiste au bloc opératoire au moment de l'injection mais également pendant l'intervention.



Figure 10. Parties du corps présentant de l'urticaire coloré chez 3 patientes différentes. L'urticaire était présent sur tout le corps des patientes. A, B ^[87] et C (provient du Centre Alexis Vautrin).

Les anatomopathologistes peuvent être très réticents, lors de l'examen extemporané ou après la fixation en paraffine, à fournir un diagnostic sur une pièce colorée par le bleu. Le bleu patenté gêne en effet l'examen macroscopique visuel, en extemporané comme après fixation par le formol, ce qui, avec l'expérience, est compensé par une palpation soigneuse de la pièce. Cependant, le bleu patenté ne gêne ni l'étude histologique, ni l'étude du grade tumoral, ni celle des facteurs biologiques pronostiques par immunohistochimie.

L'étude du GS rencontre un autre problème pour le colorant bleu mais aussi pour les radioisotopes : l'obésité. Jamais clairement indiquée dans les publications comme facteur d'échec, l'obésité représente une limite de la méthode pour tous ceux qui pratiquent le GS. Le colorant et/ou le radiocolloïde se dilue dans la graisse et, ne trouvant aucun ganglion lymphatique, ne migre pas. On peut rapprocher de cette situation les personnes âgées dont le tissu glandulaire a été progressivement remplacé par une glande mammaire déshabillée de son tissu épithélial. Ces contre-indications relatives de la méthode doivent être prises en compte dans l'évaluation de la faisabilité de la technique ^[77].

I.3.3.2. Etude anatomopathologique du ganglion sentinelle

L'analyse anatomopathologique permet de faire le diagnostic histopathologique du GS et donc de déterminer s'il y a ou non envahissement métastatique. La découverte d'un GS envahi impose à l'heure actuelle la réalisation d'un curage axillaire. Différents types d'examens peuvent être pratiqués sur les GS, rassemblés en 2 groupes : extemporanés et définitifs ^[90].

o Examen extemporané

L'examen extemporané a pour but de permettre au chirurgien la réalisation d'un curage axillaire dans le même temps opératoire que le GS, si l'analyse de ce dernier s'avère être positive. L'examen extemporané d'autres ganglions est interrompu en cas de mise en évidence d'une métastase ganglionnaire. Il faut donc disposer d'un examen histologique extemporané ayant la meilleure sensibilité possible. Actuellement, l'utilisation de cette technique dépend des équipes de pathologistes et du protocole établi avec le reste de l'équipe réalisant la technique du GS.

L'examen macroscopique du GS est peu fiable et ne permet de détecter que des métastases de taille importante. De telles métastases entraînent généralement une déformation et une induration des ganglions et sont alors palpables, ce qui contre indique la poursuite de la procédure et préconise la réalisation d'un curage axillaire. La sensibilité de l'examen macroscopique est faible, de l'ordre de 22 % ^[91]. Ainsi, 2 autres méthodes sont utilisées : l'apposition cytologique (ou empreinte) et les examens sur coupes congelées.

L'apposition cytologique est la technique la plus employée. Elle se fait en apposant sur une lame une tranche de GS, la lame étant ensuite colorée par une méthode rapide. Les tranches de section du ganglion sont secondairement fixées puis incluses en paraffine pour un examen histologique définitif. La sensibilité de cette technique est variable, allant de 33 à 96 % ^[92, 93]. Cependant, elle peut être améliorée par l'entraînement de l'équipe de pathologistes et par l'augmentation du nombre de tranches de ganglion effectué. Cette technique a l'avantage d'être rapide, peu coûteuse et préserve le tissu lymphoïde. Cependant, une cytologie négative n'exclut pas un résultat positif à l'examen définitif ^[94] et un résultat douteux sera considéré comme non informatif pour le diagnostic final. La chirurgie, au niveau axillaire, est alors interrompue dans l'attente de résultats histologiques ultérieurs.

Pour la réalisation de coupes congelées, une tranche de ganglion est immergée dans un fixateur spécial puis des coupes fines congelées sont réalisées, fixées sur lames puis colorées rapidement soit au bleu Toluidine, soit par coloration hématoxyline éosine safran (HES). Le risque de cette technique est la destruction de tissu potentiellement informatif pour le diagnostic histologique, son exploitation nécessite de dégrossir le prélèvement pouvant porter du tissu lymphoïde pouvant être porteur de micrométastases ^[94]. De plus, les coupes congelées

sont rarement aussi bien réalisées qu'avec un tissu directement fixé dans des solvants formolés : des sections incomplètes peuvent exclure les sinus subcapsulaires où l'on rencontre majoritairement les micrométastases. La congélation peut également compromettre la qualité des sections de tissus fixés par la suite dans la paraffine, où il est possible de retrouver des artéfacts de congélation lors de ces coupes. Cependant, selon l'équipe de Van Diest, la coupe en congélation de la moitié d'un ganglion ou d'une tranche a une meilleure sensibilité que la cytologie seule pour la détection de métastases, avec des valeurs respectives de 91 % et 63 %^[92, 95]. Cette sensibilité augmente avec le nombre de tranches examinées et le nombre de niveaux de coupe, pouvant aller de 52 % à 96 % selon les équipes^[93]. Elle dépend aussi du type histologique de la tumeur : la sensibilité de la technique étant de 18 % pour les GS prélevés dans les carcinomes lobulaires infiltrants^[96]. Cependant, la technique sur coupes congelées est plus coûteuse et demande plus de temps pour sa réalisation que l'empreinte cytologique.

Cependant, divers problèmes persistent concernant ces 2 méthodes. Quelle que soit la technique utilisée, la sensibilité de détection extemporanée pour les micrométastases est très faible par rapport aux métastases de taille supérieure à 2 mm^[96, 97]. Ainsi, ces méthodes ne sont pas sensibles pour la détection des micrométastases^[98, 99]. L'examen extemporané reste difficile pour les petits ganglions ainsi que pour les ganglions graisseux surtout pour la technique de congélation des tissus. Contrairement à cette dernière, la technique de l'empreinte ne permet pas d'examiner beaucoup de cellules et nécessite donc l'avis d'un pathologiste expérimenté. Les taux de faux négatifs sont aussi variables avec des valeurs de 9 % à 52 % pour la technique sur coupes congelées et de 5 % à 70 % pour la cytologie^[92].

Certains auteurs ont alors cherché à augmenter la sensibilité de la technique en pratiquant une étude immunohistochimique extemporanée rapide applicable sur coupes congelées à l'aide d'anticorps anti-cytokératines. Cette méthode de détection, sensible mais très coûteuse allonge le temps d'analyse extemporanée du GS et mobilise un technicien et un pathologiste pendant plus d'une heure. Elle est peu développée en pratique courante, quelques équipes la réservent en cas d'envahissement ganglionnaire douteux sur coupes congelées.

Les recommandations actuelles qu'elles soient européennes ou nord-américaines sont en faveur de l'utilisation de l'empreinte même si les Européens proposent d'adapter la technique en fonction des équipes et de l'expérience des pathologistes. L'analyse

extemporanée est généralement pratiquée pour les ganglions indurés ou suspects en peropératoire^[68, 92].

o Examen définitif

La détection de cellules métastatiques par immunohistochimie (IHC) est souvent couplée à la réalisation de coupes sériées. Elle utilise le plus souvent des anticorps dirigés contre des cytokératines et permet de visualiser des micrométastases non visibles en coloration standard. Il s'agit le plus souvent d'embols sous-capsulaires formés d'amas tumoraux pluricellulaires, voire de cellules isolées. Il est important de confirmer par HES qu'il s'agit bien de cellules tumorales et non de macrophages. Cette technique permet d'augmenter la détection de métastases dans 4 à 14 % des cas, par rapport à l'analyse histologique standard^[92].

L'utilisation de l'IHC est recommandée dans les carcinomes lobulaires infiltrants où les cellules tumorales peuvent être disséminées. En effet, il a été montré que l'IHC révèle entre 40 et 50 % de métastases occultes pour ce type de cancer, dans les ganglions qui apparaissent négatifs en routine par HES^[100]. L'IHC des kératines ayant grandement facilité la détection des micrométastases, l'*American Joint Committee on Cancer* (AJCC) a décidé, en 2006, d'incorporer cette analyse dans la classification des cancer du sein^[101]. Des essais sont en cours pour déterminer la valeur pronostique des métastases ainsi détectées devant le risque d'une éventuelle surévaluation du statut ganglionnaire secondaire à l'utilisation de cette technique.

o Biologie moléculaire

Parmi les méthodes en émergence, la méthode de *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) permet de détecter un très faible nombre de cellules métastatiques (une sur un million de cellules), avec une sensibilité de 100 %^[94]. Ainsi, cette technique permettrait de retrouver entre 8 et 13 % de métastases dans les GS qui étaient négatifs histologiquement. Ainsi, cette technique permettrait l'analyse rapide du tissu ganglionnaire dans sa globalité, de manière plus exhaustive que les coupes histologiques étagées. Cependant, la méthodologie d'analyse par biologie moléculaire nécessite de définir un seuil de sensibilité lié à la technique, pouvant parfois se traduire par une perte d'informations : tout signal inférieur au seuil de sensibilité doit être négligé, bien qu'il puisse s'agir d'une vraie positivité liée à la détection d'une très faible quantité d'acide ribonucléique (ARN) tumoral.

De plus, cette technique entraîne une destruction complète des tissus et donc une perte de matériel biologique^[90], mais ce n'est pas rédhibitoire.

I.4. Classification des cancers du sein

La classification des cancers du sein est réalisée selon celle de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) de 2003^[102] et fait suite à celle de 1981, qui était basée uniquement sur les aspects morphologiques. Les critères utilisés sont le stade, le statut histologique, le grade de différenciation ainsi que l'expression de gènes ou de protéines au niveau de la tumeur. L'évaluation de ces paramètres est fortement corrélée au pronostic et représente un critère essentiel pour la détermination du traitement approprié.

I.4.1. Classification histologique

L'étude histologique (observation microscopique) montre l'existence de différents types de cancers du sein. Cette classification est réalisée selon les recommandations de la dernière classification histologique de l'OMS parue en 2003. Celle-ci met en évidence 8 grands groupes de cancers du sein (Tableau I)^[102]. Les cancers épithéliaux infiltrants (ou invasifs) de type canaux sont les cancers du sein les plus fréquemment rencontrés (tumeurs épithéliales) et représentent 70 à 80 % des cas.

Tableau I. Classification histologique simplifiée des cancers du sein selon l'OMS*.^[102]

Tumeurs épithéliales	Tumeurs du mamelon
Lésions myoépithéliales	Lymphomes malins
Tumeurs mésenchymateuses	Tumeurs métastatiques
Tumeurs fibroépithéliales	Tumeurs du sein chez l'homme

*Le tableau ci-dessus inclut les tumeurs bénignes ainsi que les tumeurs malignes

I.4.2. Classification du stade

La classification du stade ou extension de la tumeur suit un code standard international représenté par la classification TNM (*Tumor Node Metastasis*). Les 3 lettres symbolisent la propagation de la maladie sur le site de la tumeur primitive (T), dans les ganglions lymphatiques régionaux (N) ainsi qu'à distance pour d'éventuelles métastases (M). Chaque lettre est affectée d'un coefficient. Dans son principe, cette classification considère seulement les données cliniques et ne s'applique qu'à des cancers qui n'ont pas encore été

traités. Chaque organe ou groupe d'organes possède une classification TNM qui lui est propre, celle des cancers du sein a été révisée pour la dernière fois en 2002 (6^{ème} édition) et est applicable depuis janvier 2003 (Tableau II) ^[103, 104].

La technique du GS a induit la mise en évidence d'éléments du stade ganglionnaire que l'étude conventionnelle du curage axillaire complet n'aurait pas permis grâce à l'analyse histologique approfondie des GS sur coupes sériées, couplée à des méthodes d'IHC, voire de biologie moléculaire. Ainsi, la classification TNM a été améliorée avec des nouvelles données post-opératoires concernant l'analyse des GS et est nommée pTNM, le préfixe « p » signifiant que la classification est post-opératoire. La classification pTNM est identique à la TNM en ce qui concerne les données sur la tumeur primaire (T) et les métastases à distance (M) mais des données supplémentaires ont été rajoutées dans la section adénopathies régionales (N) (Tableau II).

Ainsi, la détection de cellules tumorales isolées est maintenant classée dans une nouvelle catégorie pN0(i+), définie comme des amas cellulaires tumoraux de moins de 0,2 mm de diamètre marqués en IHC mais non détectés en HES. Ainsi, la classification TNM actuelle ne reconnaît pas la possibilité de détecter des cellules isolées ou micro-amas tumoraux de moins de 0,2 mm en coloration standard, bien que cette circonstance soit régulièrement rencontrée en pratique courante.

Par extension, pour standardiser la classification, toute métastase dont la taille est inférieure à 0,2 mm, détectée en IHC et/ou en HES, est actuellement classée dans la catégorie pN0(i+). Les métastases découvertes en biologie moléculaire sont classées pN0(mol+).

Les micrométastases sont définies comme des métastases de plus de 0,2 mm et inférieures ou égales à 2 mm. Elles sont classées pN1mi : N1 car elles sont considérées comme des métastases à part entière et le suffixe « mi » est utilisé pour « micrométastase ».

Concernant le cancer du sein, cette classification ne s'applique qu'aux carcinomes (tumeurs malignes). Une confirmation histologique est donc nécessaire. En cas de tumeurs multiples dans le même sein, la tumeur ayant la classification T la plus élevée sera retenue. Les cancers bilatéraux simultanés seront classés séparément pour permettre une codification par types histologiques ^[102].

Tableau II. Classification histopathologique TNM et pTNM des cancers du sein. ^[102]

T : TUMEUR PRIMITIVE	
Tx	tumeur primitive ne peut être évaluée
T0	pas de tumeur primitive décelable
Tis	carcinome <i>in situ</i>
Tis (CCIS)	carcinome canalaire <i>in situ</i>
Tis (CLIS)	carcinome lobulaire <i>in situ</i>
Tis (Paget)	maladie de Paget du mamelon sans tumeur
T1	tumeur ≤ 2 cm
T1mic	micro-invasion ≤ 0,1 cm
T1a	0,1 cm ≤ tumeur ≤ 0,5 cm
T1b	0,5 cm ≤ tumeur ≤ 1 cm
T1c	1 cm ≤ tumeur ≤ 2 cm
T2	2 cm ≤ tumeur ≤ 5 cm
T3	tumeur ≥ 5 cm
T4	tumeur de n'importe quelle taille avec extension directe
T4a	extension à la cage thoracique
T4b	œdème (y compris la "peau d'orange") ou ulcération de la peau du sein ou nodule de perméation cutané localisé sur le même sein
T4c	association de T4a et T4b
T4d	cancer du sein inflammatoire
N : ADENOPATHIES REGIONALES	
Nx	adénopathies régionales ne peuvent être évaluées
N0	pas d'adénopathie régionale métastatique
N1	adénopathie(s) métastatique(s) régionale(s) axillaire(s), homolatérale(s) mobile(s)
N2	métastase(s) ganglionnaire(s) axillaire(s) homolatérale(s) fixée(s) ou métastases(s) ganglionnaire(s) mammaire(s) interne(s) homolatérale(s) cliniquement apparente(s) en l'absence de métastase ganglionnaire axillaire cliniquement évidente
N2a	métastase(s) ganglionnaire(s) axillaire(s) homolatérale(s) fixée(s) l'une à l'autre ou à d'autres structures
N2b	métastase(s) ganglionnaire(s) uniquement mammaire(s) interne(s), homolatérale(s) et cliniquement apparente(s), sans métastase ganglionnaire homolatérale cliniquement évidente
N3a	métastase(s) ganglionnaire(s) sous-claviculaire(s) homolatérale(s)
N3b	métastase(s) ganglionnaire(s) mammaire(s) interne(s) et axillaire(s) homolatérale(s)
N3c	métastase(s) ganglionnaire(s) sus-claviculaire(s) homolatérale(s)
M : METASTASES A DISTANCE	
Mx	renseignements insuffisants pour classer la métastase à distance
M0	absence de métastase à distance
M1	présence de métastase(s) à distance

pN : ADENOPATHIES REGIONALES	
pNx	adénopathies régionales ne peuvent être évaluées
pN0	pas d'adénopathie régionale métastatique
pN0(i-)	pas de métastase ganglionnaire régionale par histologie et négatif par IHC
pN0(i+)	pas de métastase ganglionnaire régionale par histologie et positif par IHC
pN0(mol-)	pas de métastase ganglionnaire régionale par histologie et négatif par RT-PCR
pN0(mol+)	pas de métastase ganglionnaire régionale par histologie et positif par RT-PCR
pN1mi	0,2 mm < micrométastases < 2 mm et aucune > 2 mm
pN1	adénopathie(s) métastatique(s) régionale(s) axillaire(s), homolatérale(s) mobile(s)
pN2	métastase(s) ganglionnaire(s) axillaire(s) homolatérale(s) fixée(s) ou métastases(s) ganglionnaire(s) mammaire(s) interne(s) homolatérale(s) cliniquement apparente(s) en l'absence de métastase ganglionnaire axillaire cliniquement évidente
pN2a	métastase(s) ganglionnaire(s) axillaire(s) homolatérale(s) fixée(s) l'une à l'autre ou à d'autres structures
pN2b	métastase(s) ganglionnaire(s) uniquement mammaire(s) interne(s), homolatérale(s) et cliniquement apparente(s), sans métastase ganglionnaire homolatérale cliniquement évidente
pN3a	métastase(s) ganglionnaire(s) sous-claviculaire(s) homolatérale(s)
pN3b	métastase(s) ganglionnaire(s) mammaire(s) interne(s) et axillaire(s) homolatérale(s)
pN3c	métastase(s) ganglionnaire(s) sus-claviculaire(s) homolatérale(s)

I.4.3. Classification du grade

La majorité des systèmes de classification du grade tumoral pour le cancer du sein combine 3 paramètres morphologiques : le pléomorphisme nucléaire, la formation de tubules et le compte de mitoses. Chaque élément est évalué individuellement et un score de 1 à 3 lui est attribué. Le grade histologique résulte de l'addition de ces 3 scores ^[102, 103, 105]. Différents systèmes de grading existent, le plus ancien et le plus utilisé étant celui de Scarff Bloom Richardson (SBR) ^[106] (Tableau III). Des modifications ont été apportées sur ce système en raison du manque de précision des 3 critères. Ainsi, un nouveau système fut créé, le système Nottingham ^[105], se basant sur le grading SBR et précisant les critères afin d'améliorer la reproductibilité du grade et sa valeur pronostic.

Tableau III. Evaluation du grade des cancers du sein par la méthode SBR. ^[106]

Grade Tumoral	Scores Additionnés
G1 ou bas grade	3 - 5
G2 ou grade intermédiaire	6 - 7
G3 ou haut grade	8 - 9

I.4.4. Récepteurs hormonaux

Le statut hormonal de la tumeur du sein a été utilisé pour prédire la réponse du patient à l'hormonothérapie. Historiquement, le statut du récepteur à oestrogènes (ER) seul a été utilisé. Cependant, il a été constaté que le pouvoir prédictif est amélioré lorsque les statuts aux ER et aux récepteurs à progestérone (PR) sont examinés conjointement ^[107, 108]. En outre, un gradient de sensibilité à l'hormonothérapie et de la survie en fonction du statut ER/PR a été mis en évidence. La majorité des femmes avec un statut ER+/PR+ répondent favorablement à l'hormonothérapie, tandis que près d'un tiers avec un statut ER+/ PR- et seulement 10 % avec un statut ER- PR+ répondent favorablement.

D'autres marqueurs sont aussi utilisés tels que le statut du récepteur au facteur de croissance épidermique humain 2 (HER2 pour *human epidermal growth factor receptor 2*). Le statut HER2 est un facteur prédictif à la réponse à des thérapies systématiques particulières et notamment au trastuzumab (anticorps anti-HER2) ^[109]. Il peut également prédire la réponse à différentes chimiothérapies. Des résultats préliminaires suggèrent que des tumeurs HER2+ peuvent être plus sensibles aux anthracyclines et aux taxanes ^[110, 111].

Ainsi, l'ensemble de ces éléments cliniques et histologiques sont indispensables et servent de base solide pour déterminer la prise en charge thérapeutique des patients atteints d'un cancer du sein.

II. Quantum dots

Pour pallier aux inconvénients énumérés précédemment, concernant l'utilisation des radioisotopes et colorants physiologiques pour la technique du GS dans les cancers du sein opérables, de nouveaux marqueurs ont été proposés comme alternative. Depuis 1993, il existe de nouvelles sondes fluorescentes pour l'imagerie *in vivo* appelées quantum dots (QDs) ou encore boîtes quantiques ^[112]. Les QDs sont des cristaux de semi-conducteurs fluorescents de forme généralement sphérique dont les dimensions sont de l'ordre de 2 à 10 nm ^[113].

II.1. Propriétés photophysiques

Les QDs sont dotés de propriétés physiques uniques et fort intéressantes. La fluorescence des QDs résulte du phénomène suivant : lorsqu'on excite un QD avec une longueur d'onde donnée, on crée dans le cristal une paire électron-trou (un exciton) qui se déplace dans le nanocristal ^[113, 114]. Lorsque cette paire se recombine, elle émet un photon ayant une énergie plus faible que celle du photon absorbé. Le rayon de Bohr ou « taille caractéristique » de la fonction d'onde associée à cette paire électron-trou est plus grand que les dimensions du QD. On a donc des effets de confinement qui sont responsables des changements de couleur d'émission des QDs en fonction de leur taille. Plus le confinement est important, c'est-à-dire plus le QD est petit, plus l'énergie émise est grande et l'émission tend vers les ultraviolets (UV) ^[113, 115]. Il est ainsi possible grâce aux multiples matériaux à disposition, de synthétiser des QDs émettant de 400 à 2000 nm ^[116].

L'intérêt des QDs est donc de pouvoir modifier leurs propriétés optiques à loisir simplement en changeant leur taille, leur forme (pour obtenir de la lumière polarisée, par exemple) ou leur composition (Figure 11). Ainsi, dans le cas de QDs formés d'un coeur en alliage de sélénure de cadmium (CdSe), les particules de 2,1 nm de diamètre émettent dans le bleu (autour de 470 nm) alors que les plus grosses de 7,5 nm émettent dans le rouge (autour de 650 nm) (Figure 11A). De plus, pour des coeurs de QDs de même taille (5 nm) mais de composition différente, il est possible de faire varier l'émission des QDs de 620 nm pour des coeurs CdSe jusqu'à 800 nm pour des coeurs en alliage de tellure et de sélénure de cadmium (CdTeSe) (Figure 11B).

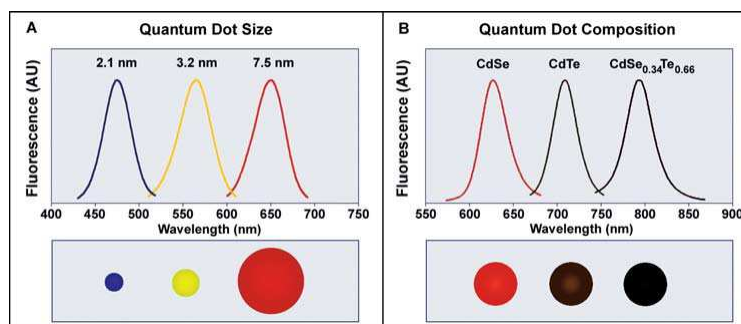


Figure 11. Modulation de la longueur d'émission des QDs. A) La composition du cœur reste la même : CdSe, et son diamètre est modulé (2,1-7,5 nm) B) Le diamètre du cœur est de 5 nm et sa composition varie (CdSe, CdTe et CdSeTe). ^[115]

Les QDs ont des propriétés optiques hors du commun qui permettent de déplacer certaines limitations inhérentes aux marqueurs ou colorants fluorescents organiques largement utilisés que sont la fluorescéine, la rhodamine, ou encore la GFP (*green fluorescent protein*) ^[114]. Les QDs présentent un large spectre d'absorption de l'UV jusqu'à l'infrarouge, un spectre d'émission à mi-hauteur étroit de 20-70 nm de largeur et symétrique, contrairement aux fluorophores conventionnels qui ont un spectre d'absorption étroit et un spectre d'émission large (Figure 12) ^[116].

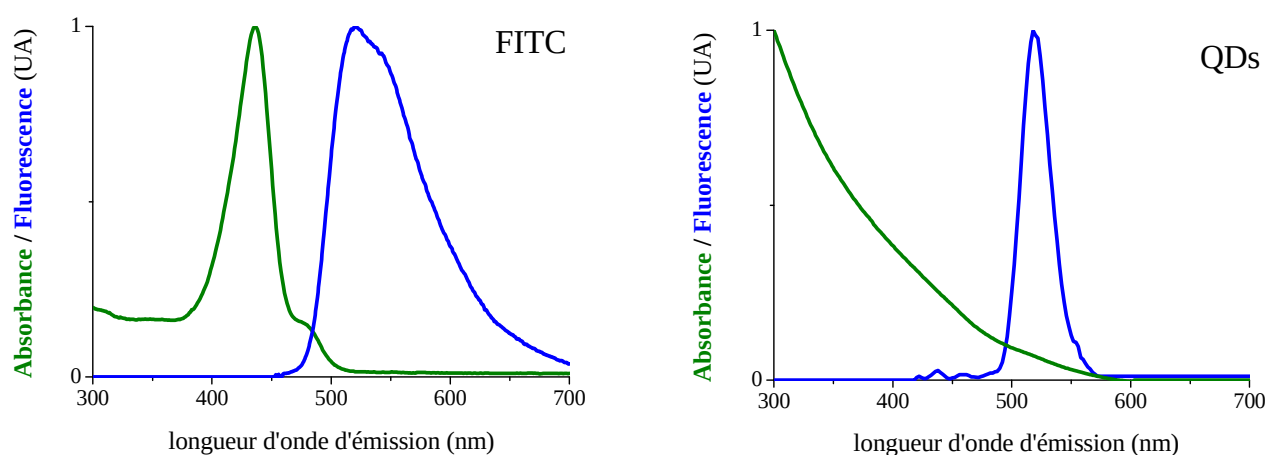


Figure 12. Comparaison des spectres d'absorption (vert) et d'émission (bleu) d'un colorant organique : le FITC et de QDs (cœur CdSe) émettant à 520 nm. Note : le spectre d'émission des QDs est plus étroit et symétrique et leur spectre d'absorption est large. ^[115]

De plus, un recouvrement des spectres d'absorption et d'émission est observé pour les fluorochromes classiques tels que le FITC (*fluorescein isothiocyanate*), dérivé de la fluorescéine, alors que pour les QDs, ce recouvrement est facilement évité grâce à leur large *Stokes shift* (différence de longueurs d'onde entre le pic d'absorption et le pic d'émission) (Figure 12) ^[116]. Ainsi, il est possible de visualiser simultanément plusieurs QDs émettant à des longueurs d'onde différentes avec un même jeu de filtres, sur un même échantillon biologique ^[117, 118]. Cette forte séparation entre la longueur d'onde d'excitation et le maximum d'émission a pour effet de réduire l'autofluorescence des milieux biologiques et donc d'augmenter la sensibilité de détection des QDs par rapport aux fluorophores organiques ^[119].

Une autre propriété remarquable des QDs est leur haute résistance à la dégradation métabolique mais surtout au photoblanchiment. En effet, les QDs sont 100 fois plus photostables et possèdent une durée de vie de fluorescence 10 fois plus importante (20-30 ns) comparés aux fluorochromes conventionnels ^[119]. Concernant leur rendement quantique de fluorescence, celui-ci peut atteindre 89 % à température ambiante (fonction des matériaux utilisés). Leur coefficient d'extinction molaire est 10 à 100 fois plus important (10^5 à 10^6 $M^{-1}.cm^{-1}$) que celui des colorants classiques, ce qui les rend beaucoup plus brillants et permet d'obtenir un meilleur contraste en imagerie. Ils ont également une bonne section efficace d'absorption.

Toutes ces propriétés optiques permettent la visualisation d'un QD unique en fluorescence pendant plusieurs minutes, ainsi que la détection de molécules uniques. Cependant, à l'échelle du QD unique, on observe des clignotements de la fluorescence. Ce phénomène qui dépend de la nature de la particule, de son environnement et de la puissance d'excitation n'est pas encore complètement compris mais est lié à l'ionisation réversible du cœur du QD. Suite à cet inconvénient, des études ont été réalisées et le clignotement de QDs a été partiellement voire complètement éliminé ^[120, 121].

II.2. Structure d'un quantum dot biocompatible

Les QDs biocompatibles et ainsi utilisables pour des applications biologiques sont composés d'au minimum 3 couches que sont le cœur, la coque inorganique, la coque organique, et parfois, des ligands biologiques peuvent être greffés à leur surface pour améliorer leur sélectivité ou réaliser du ciblage (Figure 13) ^[122].

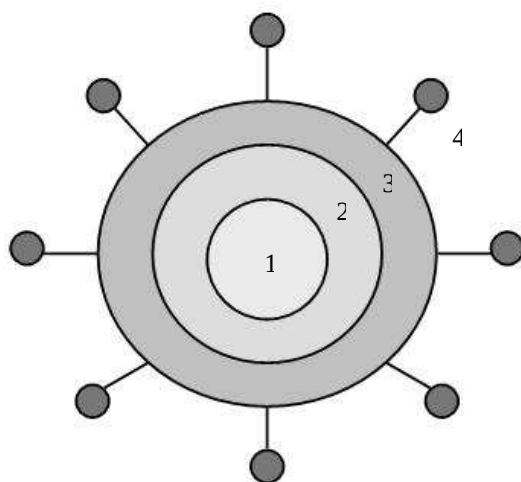


Figure 13. Structure générale d'un QD biocompatible. 1 : cœur, 2 : coque inorganique, 3 : coque organique, 4 : ligands biologiques. ^[122]

Les QDs sont ainsi composés d'un cœur d'au moins 2 métaux semi-conducteurs tels que le cadmium (Cd), le sélénium (Se) ou encore le tellure (Te) qui sont actuellement les plus utilisés. Pour limiter tout risque de toxicité potentielle, due au relargage d'ions Cd^{2+} , Se^{2-} ou Te^{2-} , en cas d'oxydation du cœur par des rayons UV ou par l'air ^[123, 124], celui-ci peut être protégé avec une coque inorganique, généralement faite de sulfate de zinc (ZnS) ou de sulfate de cadmium (CdS) dont l'épaisseur peut être maîtrisée lors de sa synthèse.

Cependant, à ce stade, les QDs sont recouverts de ligands hydrophobes et sont insolubles en milieu aqueux ^[113]. Malgré ces propriétés optiques attrayantes, les QDs n'ont été que très peu utilisés comme marqueur fluorescent en biologie jusqu'aux années 2000. Ceci est dû aux difficultés à solubiliser les QDs en milieu aqueux tout en conservant 3 propriétés essentielles : une bonne fluorescence, une stabilité colloïdale et une faible adsorption non spécifique. Ce n'est que depuis 2002, que ces conditions commencent à être satisfaites simultanément ^[125-127]. Ainsi, pour rendre les QDs hydrosolubles et stables en milieux biologiques, ils peuvent être encapsulés dans une seconde coque de matériaux organiques, de polymères ou encore dans des couches à base de lipides ^[128]. Des ligands organiques peuvent être ajoutés à la surface des QDs hydrosolubles pour améliorer leur sélectivité vis-à-vis de fluides ou de compartiments biologiques ou pour cibler spécifiquement un organe d'intérêt ou une tumeur.

Parmi ces ligands, on trouve des groupements fonctionnels tels que les groupements amines ^[129, 130], carboxyles ^[117, 131, 132] ou encore hydroxyles ^[133]. Il a été montré que les molécules anioniques s'accumulaient rapidement dans le système lymphatique, avec une

rétenion excellente dans les ganglions lymphatiques ^[132, 134] ou la peau ^[135], comparé à des particules neutres.

D'autres molécules plus complexes et actives peuvent être couplées à la surface des QDs telles que des protéines ^[136, 137], des peptides d'intérêts ^[138-142], largement utilisés dans le domaine de la recherche dans le diagnostic de tumeurs par imagerie, ou encore des anticorps, de plus en plus développés pour réaliser simultanément de l'imagerie et de la thérapie ciblée ^[143, 144].

Des radioisotopes tels que le fluor 18 (¹⁸F) ^[145], le cuivre 64 (⁶⁴Cu) ^[142, 146] le ^{99m}Tc ^[118, 147] ou encore le carbone 14 (¹⁴C) ^[148] ont également été fixés aux QDs, ainsi que des particules paramagnétiques comme le gadolinium (Gd) ^[141, 149-151] ou l'hydrogène 3-cholesteryl oleyl éther (³H-cholesteryl oleyl éther) ^[152]. Ces particules ainsi appelées hybrides ou parfois sondes bi- ou encore multi-modales ont été développées et permettent de réaliser de l'imagerie multimodale : fluorescence couplée à de l'imagerie nucléaire ou à de l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et ainsi obtenir des informations supplémentaires par rapport à de l'imagerie de fluorescence seule, par exemple.

II.3. Techniques de quantification

Différentes techniques sont utilisées pour quantifier les QDs et de nouvelles se développent. *In vivo*, les techniques employées permettent une quantification souvent relative (recueil de signaux émis) et parfois absolue (valeur de concentrations) des QDs, alors que *ex vivo*, les méthodes utilisées rendent toujours possible leur quantification absolue ^[122].

II.3.1. Quantification *in vivo*

II.3.1.1. Imagerie de fluorescence

Les techniques d'imagerie optique attirent de plus en plus l'attention pour des applications médicales, dues en particulier à leurs procédures non-invasives, leur haute résolution temporelle et leur coût relativement bas. L'imagerie de fluorescence dans les longueurs d'onde du visible est largement utilisée en routine pour de la microscopie conventionnelle ou intravitale ^[153].

L'inconvénient majeur de cette technique pour l'imagerie *in vivo* est sa profondeur de pénétration limitée dans le visible, du fait de la forte absorption et diffusion de la lumière dans les tissus biologiques. En effet, pour étudier et suivre les signaux biologiques sur le corps

entier des animaux, la lumière incidente doit traverser les tissus biologiques d'au moins quelques millimètres. Pour pallier à cette contrainte, et rendre possible l'imagerie sur animaux vivants, il est recommandé de travailler avec une fenêtre spectrale dans le proche infrarouge (PIR) entre 700 et 900 nm, dans laquelle les principaux chromophores endogènes incluant l'hémoglobine, l'eau ou encore la mélanine absorbent beaucoup moins (Figure 14).

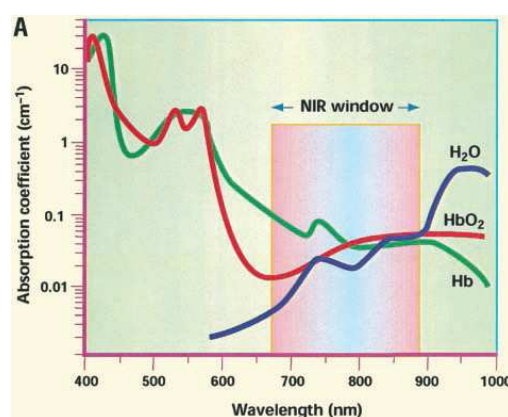


Figure 14. Spectres d'absorption de l'eau et de l'hémoglobine, principaux composés des tissus biologiques. ^[154]

L'équipe de Weissleder a été la première à développer et tester un système d'imagerie de fluorescence 2 dimensions expérimental sensible aux sondes émettant dans le PIR et dédié au petit animal ^[155]. En 2002, le groupe de Frangioni a introduit le concept d'un système d'imagerie PIR peu coûteux, sans danger et facile d'utilisation pour les gros animaux tels que le cochon ^[156], puis a développé cet imageur qui permet maintenant au chirurgien de « voir » simultanément l'anatomie et la fluorescence émise par les marqueurs pendant l'opération, de façon non-invasive, avec une forte résolution spatiale et en temps réel ^[157]. En 2004, Kim a ainsi conduit la première étude d'imagerie de fluorescence en temps réel, sur des animaux, avec comme agent de contraste des QDs émettant à 840-860 nm ^[158]. Depuis, cette équipe a réalisé plusieurs travaux sur la localisation des ganglions lymphatiques au moyen de QDs chez la souris, le rat et le cochon ^[134, 159-166].

Cependant, la quantification absolue des QDs n'a jamais été réalisée *in vivo* dans la fenêtre spectrale 700-900 nm à cause de la diffusion des photons dans les tissus. En effet, en imagerie de fluorescence 2 dimensions, l'apparence des structures profondes est fortement estompée et le signal détecté provenant de ces structures est significativement atténué en fonction de leur profondeur ^[167]. De plus, l'atténuation des photons n'est pas linéaire en

fonction de la profondeur et l'hétérogénéité optique des tissus obscurcit la quantification du signal de fluorescence. Par exemple, une petite structure avec une forte concentration en agent de contraste, située profondément dans les tissus peut fournir le même signal de fluorescence qu'une plus grosse structure contenant une faible concentration en fluorochrome mais située à la surface des tissus (Figure 15). Ainsi, l'interprétation des données et des images requiert des logiciels de traitement avancés capables de prendre en compte la nature diffuse des photons de propagation dans les tissus ^[167]. Ainsi, l'émergence des modèles mathématiques, associée avec le développement technologique des appareils d'illumination et de détection ont amélioré la visualisation des agents de contrastes dans les tissus.

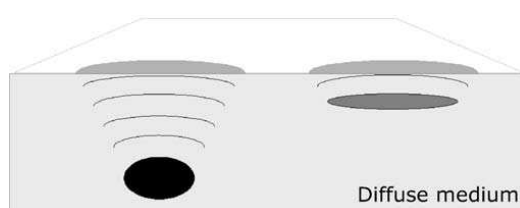


Figure 15. Nature diffuse des photons en milieu biologique et conséquence sur l'imagerie de fluorescence 2 dimensions. Des structures de taille et en concentration de produit de contraste différentes, incluses dans un milieu diffusant à différentes profondeurs, peuvent avoir la même apparence en surface, empêchant ainsi toute quantification absolue. ^[167]

Grâce aux avancées technologiques dans de nombreux domaines, de nouveaux systèmes d'imagerie de fluorescence 2 dimensions ont été créés et commercialisés tels que le « Maestro In Vivo Imaging System » (CRI Inc, Woburn, MA, USA), le « Xenogen IVIS-20 Optical In Vivo Imaging System » (Xenogen-Caliper, LS, Alameda CA, USA), ou encore le Fluobeam® (Fluoptics, Grenoble, France) utilisé dans notre Laboratoire. Tous ces instruments contiennent une caméra CDD haute résolution, hautement sensible dans le domaine spectral du PIR et sont capables de semi-quantifier des signaux de fluorescence émis par un fluorophore ^[122].

L'avantage de cette modalité est qu'elle permet l'analyse du même animal plusieurs fois pendant une longue période expérimentale, celui-ci étant son propre témoin. Avec ce système d'imagerie, le nombre d'animaux utilisé est réduit et les variations intra-individuelles sont minimisées, améliorant ainsi les données obtenues. Pour quantifier les QDs *in vivo*, la première étape est d'acquérir la « ligne de base » des animaux avant injection des QDs qui comprend le bruit de l'appareil ainsi que l'autofluorescence des tissus. Ce bruit de fond doit

être enregistré pour chaque animal et sera par la suite soustrait des images de fluorescence acquises après injection de l'agent de contraste. La seconde étape consiste en l'injection des QDs et l'acquisition des images aux différents temps désirés après leur administration. La dernière étape est le traitement des données enregistrées. Les intensités de fluorescence sont délimitées en sélectionnant des régions d'intérêts (ROIs) provenant des images acquises. Cette technique présente un inconvénient car elle ne fournit pas d'information sur la concentration absolue des QDs. Néanmoins, il est possible de comparer les intensités de fluorescence normalisées extraites de différentes ROIs, en fonction du temps, par exemple. L'imagerie de fluorescence permet donc l'évaluation semi-quantitative des QDs en se basant sur les changements d'intensité de fluorescence provenant des QDs dans les ROIs étudiées [122]. Bien que cette modalité soit attrayante, peu d'études sur la quantification des QDs *in vivo* ont été réalisées.

La première étude pour laquelle des QDs émettant dans le PIR ont été semi-quantifiés par imagerie de fluorescence a été rapportée par l'équipe de Morgan en 2005 [168]. Les auteurs ont mesuré l'intensité de fluorescence des QDs en fonction du temps sur un modèle tumoral murin de carcinome épidermoïde après injection intraveineuse (i.v.) des QDs et ont enregistré les changements dynamiques d'intensité de fluorescence des QDs dans quelques organes. Ils ont observé la captation et l'élimination des QDs par les tissus tumoraux, avec une phase d'élimination plus lente comparée à l'élimination des QDs du système sanguin, suggérant que l'échange de QDs entre la circulation sanguine et la tumeur peut être différent. De plus, ils ont fourni des données préliminaires quant à l'élimination des QDs contenus dans différents tissus tels que le cœur, les aires abdominales ou le sang.

Cai et *al.* ont démontré que des QDs couplés à un peptide (arginine-glycine-acide aspartique) ciblant la vascularisation tumorale reconnaissaient spécifiquement des glioblastomes humains greffés chez la souris [140]. Ils ont comparé la distribution intra-tumorale des QDs couplés ou non au peptide après leur injection i.v. en mesurant l'intensité de fluorescence émise par la tumeur en fonction du temps. Ils ont montré que la quantité de QDs couplés dans la tumeur était 4 fois plus importante que pour les non couplés, 6 h après administration.

L'équipe de Diagaradjane a montré que des QDs greffés avec du facteur de croissance épidermoïde (EGF) pouvaient être utilisés comme agent de contraste semi-quantifiable et

reproductible chez des souris porteuses de tumeurs colorectales surexprimant le récepteur à l'EGF ^[169]. Les auteurs ont aussi observé que 6 h après injection i.v., la tumeur accumulait 2,5 fois plus de QDs couplés comparé à ceux qui ne l'étaient pas.

Le groupe de Gao a testé l'habilité de QDs émettant à 607 nm, liés à de l'agglutinine de germe de blé, à passer la barrière hémato-encéphalique après leur administration intranasale chez la souris ^[170]. Ils ont détecté par imagerie de fluorescence des QDs dans le cerveau des souris dès 2 min après leur inhalation et ont observé un maximum de fluorescence 4 h après injection, correspondant à 13 fois le signal obtenu à 2 min.

Papagiannaros et *al.* ont comparé l'accumulation de 2 QDs émettant à 800 nm (commerciaux et synthétisés dans leur Laboratoire) sur un modèle tumoral murin ^[171]. L'intensité de fluorescence maximale dans la tumeur a été atteinte après 1 h pour les QDs synthétisés au sein de leur Laboratoire, contre 4 h pour les commerciaux. De plus, le signal de fluorescence émis par les QDs de l'équipe était plus important que le signal d'une demi dose de QDs commerciaux.

Des études sur la quantification des QDs *ex vivo* ont également été réalisées par imagerie de fluorescence sur des organes disséqués, apportant toujours des données semi-quantitatives ^[118, 142, 169-172]. L'imagerie de fluorescence *ex vivo* est toujours associée à une imagerie *in vivo* et confirme généralement les données obtenues *in vivo*, et dans certains cas, les QDs non détectés *in vivo*, le sont *ex vivo*. Cependant pour une application *ex vivo*, cette modalité d'imagerie perd ses principaux avantages que sont son caractère non-invasif et la possibilité de faire de l'imagerie à répétition sur les mêmes animaux, même si elle permet la visualisation directe des QDs dans les organes d'intérêt.

Très récemment, de nouveaux systèmes d'imagerie de fluorescence ont été développés. Il s'agit de tomographes de fluorescence 3 dimensions, le plus souvent couplés à un scanner à rayons X ou à IRM qui fournissent des données anatomiques. Ce système d'imagerie permet de quantifier de manière absolue la concentration d'un fluorophore dans différents compartiments biologiques chez l'animal vivant. Plusieurs tomographes de fluorescence 3 dimensions ont été créés tels que le « FMT System » et le « FMT 2500 System », commercialisés par VisEn Medical Inc (Woburn, MA, USA) ou encore un imageur développé par le CEA-LETI (Grenoble, France) en collaboration avec la société Cyberstar

(Grenoble, France). Cependant, à l'heure actuelle, aucun article n'est paru sur la détection et/ou la quantification de QDs *in vivo* au moyen de ces instruments.

II.3.1.2. Imagerie nucléaire

Deux modalités d'imagerie nucléaire peuvent être utilisées pour détecter les émissions de radioactivité chez le petit animal. Ces techniques permettent de faire de l'imagerie en série sur des animaux vivants, évitant ainsi de nombreux sacrifices et minimisant les variations interindividuelles ^[122].

La première technique est la scintigraphie pour laquelle les émetteurs gamma les plus utilisés sont le ^{99m}Tc , l'iode 125 (^{125}I) ou encore l'indium 111 (^{111}In), généralement greffés à des macromolécules telles que l'albumine, des anticorps ou des globules blancs, par exemple. Ils s'accumulent dans différents compartiments de l'organisme, en fonction de leur voie d'injection, leur perfusion relative et leur affinité pour les différents composants de l'organisme. La gamma caméra estime l'activité du radioisotope dans chaque position du corps en détectant les rayons gamma émis suite à sa désintégration et selon différentes vues. La résolution des images générées est dépendante de l'ouverture via laquelle le rayonnement est détecté et est relativement faible. Cependant, cette modalité, du fait de sa haute sensibilité, joue un rôle crucial car elle fournit des informations fonctionnelles, métaboliques et pharmacocinétiques, ceci étant dû à son habilité à fournir des informations en 3 dimensions ^[173]. Cependant, les radionucléides utilisés sont exclusivement synthétisés dans des cyclotrons, peu présents sur le territoire français, et de ce fait très demandés, posant des problèmes d'approvisionnement et rendant ces radioproduits très coûteux. De plus, les demi vies des radioéléments sont relativement courtes : 6 h pour le ^{99m}Tc , 13 h pour l' ^{125}I et 67 h pour l' ^{111}In , indiquant que des études à long terme ne peuvent être envisagées. Cependant, contrairement à l'imagerie de fluorescence 2 dimensions, la scintigraphie fournit des données quantitatives sur la concentration absolue des radioisotopes *in vivo* lorsque les différents compartiments biologiques sont délimités. Les contours des organes peuvent être déterminés manuellement, au moyen d'algorithmes mathématiques ou avec des données anatomiques lorsque la scintigraphie est couplée à un scanner à rayons X ou à une modalité d'imagerie par résonance magnétique. Le plus souvent les concentrations en radioisotopes sont exprimée en pourcentage de la dose injectée (% DI) ou en pourcentage de la dose injectée par gramme de tissu (% DI/g) après sélection de ROIs ^[122].

La seconde technique d'imagerie nucléaire utilisée pour détecter des produits radioactifs est la tomographie par émission de positons (TEP). La TEP produit des images en 3 dimensions ou des cartographies fonctionnelles de l'organisme après leur injection, généralement i.v., dans l'organisme ^[173]. Le radiotraceur émet des positons dont l'annihilation, correspondant au choc entre un positon et un électron, produit elle-même une paire de photons avec un angle de 180°. La détection de la trajectoire de ces photons par le collimateur de la caméra permet de localiser le lieu de leur émission et donc la concentration du traceur en chaque point de l'organe. En utilisant des radioisotopes émetteurs de positons, des images en 3 dimensions peuvent être reconstruites, et comme pour la scintigraphie, lorsque les contours des organes sont délimités, il est possible de fournir des informations sur la concentration absolue de ces radioisotopes et leur localisation dans l'organisme, ceci, grâce à la haute sensibilité de la TEP à détecter des espèces moléculaires ^[174]. Le radiotraceur le plus couramment utilisé en TEP est le fluorodéoxy-glucose (FDG), marqué au fluor-18 (¹⁸F) ayant une demi vie d'environ 2 h. Les concentrations en radiotraceurs sont quantifiées et fournissent des données sur l'activité métabolique des tissus, en terme de captation du glucose pour le FDG. L'intérêt récent pour l'imagerie du petit animal a mené au développement de TEP à haute résolution dédiée pour l'imagerie du petit animal : la microTEP. Cette modalité d'imagerie a les mêmes inconvénients que l'imagerie par scintigraphie, c'est à dire une pauvre résolution spatiale (de l'ordre du millimètre), des coûts de fabrication des marqueurs radioactifs élevés et des émetteurs de positons au demi vies courtes : 2 h pour le ¹⁸F ou 12,7 h pour le cuivre-64 (⁶⁴Cu), ce qui rend les études à long terme irréalisables ^[122].

En 2006, Cai et ses collaborateurs ont démontré la spécificité de ciblage *in vivo* de QDs conjugués à un peptide (arginine-glycine-acide aspartique) pour des glioblastomes humains greffés chez la souris par imagerie de fluorescence ^[140]. Cependant, ils ont été limités par la faible pénétration de la lumière d'excitation dans les tissus. Pour cette raison, ils ont synthétisé une nouvelle sonde hybride bi-fonctionnelle composée de QDs émettant dans le PIR, couplés à du ⁶⁴Cu et labellisés ou non avec le peptide (arginine-glycine-acide aspartique) ^[142]. Après analyse des ROIs, ils n'ont pas observé de différence significative quant à l'accumulation *in vivo* des QDs conjugués ou non au peptide dans le foie. La captation de ces 2 QDs par le foie était d'environ 50 % DI/g tout au long de l'étude, indiquant que la majorité des doses injectées était captée par le système réticuloendothélial (SRE). L'accumulation des 2 QDs dans la tumeur était significativement différente à tous les temps sauf à 1 h post-injection. Les QDs non couplés au peptide ont été peu captés par la tumeur (< 1 % DI/g),

suggérant un faible ciblage passif de la tumeur alors que les QDs labellisés avec le peptide se sont beaucoup plus accumulés dans la tumeur (2,2 ; 4,0 et 4,3 % DI/g à 5 h, 18 h et 25 h après injection, respectivement). Par microTEP, ils ont ainsi évalué quantitativement l'efficacité de ciblage de leur sonde hybride envers la tumeur et ont montré qu'avec cette modalité d'imagerie non-invasive, leur nouvelle sonde permettait de réaliser des mesures robustes et fiables de distribution des QDs *in vivo*.

Récemment, cette même équipe a utilisé des QDs couplés à du ^{64}Cu mais conjugués à un autre peptide d'intérêt : le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) afin de visualiser la vascularisation tumorale chez la souris vivante ^[175]. Les images de TEP ont montré que les QDs conjugués ou non au peptide s'accumulaient rapidement dans le foie et que la captation par la tumeur des QDs conjugués était 3,5 à 5,5 fois plus élevée par rapport au QDs sans peptide entre 1 h et 24 h après leur administration.

II.3.1.3. Imagerie par résonnance magnétique

Depuis 2008, une nouvelle modalité d'imagerie a été utilisée pour quantifier les QDs chez les animaux vivants : l'IRM. Elle est réalisée en plaçant le sujet dans un fort champ magnétique typiquement de 1,5 à 3 Tesla pour les scanners IRM chez l'homme et compris généralement entre 4 et 21 Tesla pour des scanners IRM dédié au petit l'animal ou encore appelé microIRM ^[174]. La résonance magnétique nucléaire exploite le fait que les noyaux de certains atomes possèdent un moment magnétique de spin. En IRM, les atomes que l'on veut étudier sont placés dans un champ magnétique constant et on leur applique une onde électromagnétique oscillante à une fréquence bien particulière dite fréquence de résonance ou fréquence de Larmor. En effet, pour que le champ oscillant puisse avoir un effet notable sur les atomes, il faut qu'il entre en résonance avec ceux-ci, c'est-à-dire que sa fréquence soit ajustée au « mouvement de rotation » de ces spins ^[174]. Le choix de cette fréquence permet ainsi de cibler spécifiquement les atomes à imager en fonction de l'intensité du champ magnétique appliquée. En IRM, l'atome d'hydrogène est le plus utilisé. Il est constitué d'un seul proton et est très abondant dans les tissus biologiques. Ainsi, sous l'effet du champ magnétique statique B_0 , les moments magnétiques de spin vont progressivement s'aligner dans une direction initialement parallèle à celui-ci et donner lieu à une aimantation globale dans la direction du champ B_0 ou direction longitudinale (z). L'onde magnétique oscillante, notée B_1 va faire « basculer » les moments magnétiques de spin pour les placer dans un plan perpendiculaire à la direction du champ statique B_0 , ce phénomène est appelé

excitation. Lorsque le champ oscillant B_1 est interrompu, les moments magnétiques qui se sont écartés de leur axe initial vont revenir vers la direction z sans cesser de tourner. Ce mouvement de rotation des spins sous la forme d'un signal oscillant qui a la même fréquence que l'onde excitatrice, appelé précession, correspond au signal mesuré par les antennes réceptrices du scanner IRM^[174].

Les 2 principaux avantages de l'IRM sont son excellent contraste tissulaire et la non utilisation de rayons ionisants. Le rapport signal-à-bruit et la résolution peuvent être améliorés en utilisant une bobine réceptrice avec un petit rayon et une haute résistance de champ magnétique. Cependant, la nécessité d'un fort champ magnétique est problématique dans les applications cliniques en raison des effets physiologiques surgissant tels que des nausées ou des anomalies visuelles. De plus, une intensité de champ plus élevée mène à d'autres défis techniques comprenant une augmentation de la fréquence d'opération, qui génère potentiellement des artefacts^[174].

Oostendorp et *al.* ont étudié l'angiogénèse d'adénocarcinomes colorectaux humains et l'accumulation de nanoparticules paramagnétiques par IRM, suite à leur injection i.v. chez la souris immunodéprimée^[141]. Des QDs ont été couplés à du Gd ainsi qu'à un peptide d'intérêt qui cible spécifiquement une isoforme de CD13 (aminopeptidase N), glycoprotéine transmembranaire surexprimée par les cellules endothéliales des vaisseaux tumoraux. Dix minutes après administration, les auteurs ont trouvé une colocalisation des QDs couplés au peptide avec les cellules endothéliales de la tumeur 3 fois plus importante par rapport aux QDs contrôles, non couplés au peptide.

L'équipe de Cormode a étudié l'utilisation de QDs multifonctionnels fixés à des lipoprotéines de haute densité et du Gd sur un modèle murin d'athérosclérose^[149]. En effet, les lipoprotéines de haute densité sont connues pour jouer un rôle clé dans le transport du cholestérol dans l'organisme et éliminent le cholestérol des macrophages au niveau des plaques athérosclérotiques. Avant et 24 h après injection i.v. des QDs, l'aorte abdominale (porteuse de plaques de cholestérol) des souris a été imagée par IRM. Ils ont observé une augmentation de l'intensité du signal dans la paroi aortique et l'analyse des ratios normalisés avant et 24 h après injection révèle une augmentation du signal de $69 \pm 23 \%$.

II.3.2. Quantification *ex vivo*

II.3.2.1. Spectrofluorimétrie

La spectrofluorimétrie permet la quantification des QDs en solution en prenant en compte la partie linéaire de la courbe de calibration préalablement établie. La quantification des QDs dans des organes requiert des solvants d'extraction spécifiques pour éviter leur dégradation ^[122]. En effet, si les cœurs des QDs sont détériorés, ils perdent leur propriété à émettre de la fluorescence.

Manabe et ses collaborateurs ont étudié l'effet de QDs émettant dans le rouge, conjugués à un anti-hypertenseur après injection dans la carotide chez le rat ^[176]. Ils ont mesuré par spectrométrie de fluorescence la concentration en QDs conjugués dans le plasma de 0,5 à 96 h post-injection et ont montré que cette concentration diminuait mono-exponentiellement avec une demi vie de circulation de 0,65 h.

De même, Yang et *al.* ont utilisé la spectrofluorimétrie pour évaluer la pharmacocinétique plasmatique de QDs émettant dans le PIR de 1 h à 14 jours après leur administration i.v. chez la souris ^[177]. Ils ont ainsi trouvé que la clairance plasmatique de ces QDs était de 2,3 mL/h/kg.

II.3.2.2. Compteur de rayons ionisants

L'imagerie nucléaire, comme la scintigraphie ou la TEP, est largement utilisée pour des études de biodistribution chez des animaux vivants, fournissant des données quantitatives *in vivo*. Cependant, après injection d'un radioisotope chez l'animal, différents organes peuvent être prélevés et analysés individuellement *ex vivo* sans perturbation du milieu biologique environnant au moyen des modalités d'imagerie nucléaire ou de compteurs détectant les rayons ionisants. Ces techniques sont le plus souvent utilisées en supplément à l'imagerie nucléaire *in vivo* pour confirmer les données obtenues. Cependant appliquée *ex vivo*, ces modalités de détection, bien que quantitatives, perdent leurs principaux atouts que sont leur caractère non-invasif et la possibilité de faire de l'imagerie à répétition sur les mêmes animaux.

Plusieurs études de biodistribution ont été réalisées suite à l'injection de QDs couplés à des radioéléments et détectés *ex vivo* et seront présentées dans la partie « II.4. Etudes de biodistribution ».

II.3.2.3. Spectrométrie de masse

De nombreuses techniques de spectrométrie de masse existent. Les plus utilisées en recherche pour effectuer des analyses sur échantillons biologiques sont la spectrométrie d'émission atomique couplée à un plasma inductif (ICP-AES) ou la spectrométrie de masse couplée à un plasma inductif (ICP-MS).

L'ICP-AES ou encore appelée spectrométrie d'émission optique couplée à un plasma inductif (ICP-OES) est une technique analytique utilisée pour détecter des métaux à l'état de traces. C'est un type de spectrométrie d'émission qui utilise un plasma inductif pour produire des atomes et des ions dits « excités » qui vont par la suite émettre des radiations électromagnétiques à une longueur d'onde caractéristique d'un élément chimique particulier. L'intensité du signal émis indique la concentration de l'élément dosé dans un échantillon. Pour analyser les QDs, soit en solution, soit dans des organes, les échantillons doivent être détruits pour quantifier les métaux lourds présents tels que le Cd, le Se ou le Te qui sont les plus employés pour la synthèse de QDs ^[122]. Plusieurs techniques peuvent être utilisées dans ce but, comme le traitement des échantillons à l'acide nitrique, à l'acide chlorhydrique ou suivant un protocole spécifique. La concentration en élément est établie après réalisation d'une courbe de calibration, puis convertie en concentration de QDs.

Actuellement, seules 2 équipes ont utilisé cette technique. L'équipe de Fischer fut la première à employer cette technique pour doser des QDs sur échantillons biologiques (dosage du Cd) et à étudier leur l'interaction avec les éléments sanguins, chez le rat ^[178]. Ils ont testé la variabilité des interactions entre des QDs et le sang en administrant une dose de QDs via la veine jugulaire et ont fait des prélèvements sanguins entre 2 et 90 min après injection. Les analyses par ICP-AES ont montré des variations de concentrations sanguines en QDs en fonction du temps et suggèrent qu'il existe bien des interactions entre les QDs et le sang chez le rat.

Le même groupe a évalué la limite de détection par ICP-AES de 5 nanoparticules différentes parmi lesquelles des QDs avec un cœur CdSe et un DH de 5 nm ont été testés ^[179].

Il a été démontré que les QDs pouvaient être détectés dans des tissus jusqu'à une concentration de 10 pmol/g après une destruction complète des échantillons biologiques par l'acide nitrique.

L'autre technique de spectrométrie de masse largement utilisée et hautement sensible est l'ICP-MS, capable de détecter des métaux ainsi que d'autres éléments non métalliques à des concentrations de l'ordre du picomolaire. Cette méthode est basée sur la combinaison d'un plasma inductif produisant des ions (ionisation) avec un spectromètre de masse qui permet la séparation et la détection de ces ions. L'ICP-MS est aussi capable de différencier les espèces isotopiques d'un même élément présentes dans un échantillon ^[122]. L'ICP-MS est connue pour être la technique de référence des dosages au niveau élémentaire.

La quantification de QDs par ICP-MS a été rapportée pour la première fois par le groupe de Gopee ^[180]. Les auteurs ont étudié la biodistribution de QDs émettant dans le rouge, après injection intradermique dans le dos de souris sur une période de 24 h.

Ces 2 techniques de spectrométrie de masse sont largement utilisées pour des études de biodistribution qui seront présentées dans la partie « II.4. Etudes de biodistribution ».

II.3.3. Résumé

Différentes modalités d'imagerie ont été utilisées pour détecter et quantifier *in vivo* les QDs en fonction du temps, sur des mêmes animaux. Ces diverses techniques permettent la réalisation d'images fonctionnelles et métaboliques et présentent chacune des avantages et inconvénients (Tableau IV) qui doivent être connus afin d'orienter au mieux le choix de la technique d'imagerie à employer et permettre de répondre à la problématique scientifique posée.

Tableau IV. Principaux avantages et inconvénients des modalités d'imagerie corps entier utilisées pour détecter et quantifier les QDs *in vivo*.

	Imagerie de fluorescence	Imagerie nucléaire (Scintigraphie/TEP)	IRM
Avantages	rayons non ionisants large choix de marqueurs imagerie à long terme faible coût	modalité la plus sensible large choix de marqueurs	rayons non ionisants imagerie anatomique
Inconvénients	faible profondeur de pénétration de la lumière sensibilité fonction de la profondeur	rayons ionisants imagerie de courte durée coût élevé	faible choix de marqueurs faible sensibilité coût élevé

La quantification absolue des QDs peut aussi être effectuée *ex vivo*, suite au prélèvement des différents tissus à analyser mais nécessite un grand nombre d'animaux à utiliser. Les principaux avantages et limitations des techniques employées sont synthétisés dans le Tableau V.

Tableau V. Principaux avantages et inconvénients des techniques employées pour quantifier les QDs *ex vivo*.

	Spectrofluorimétrie	Compteurs de rayons ionisants	Spectrométrie de masse (ICP-MS/ICP-AES)
Avantages	corrélation directe avec la concentration en QDs faible coût	pas de dégradation de l'échantillon	technique la plus sensible pas de solvant spécifique
Limitations	solvants spécifiques pour extraire les QDs dégradation de l'échantillon	rayons ionisants coût élevé	dégradation de l'échantillon coût élevé

II.4. Etudes de biodistribution

Du fait de la grande diversité des QDs administrés (composition, chimie de surface, taille, quantité administrée), des voies d'injection et des techniques de détection utilisées, les études de biodistribution seront présentées en fonction des modalités de détection des QDs employées.

II.4.1. Imagerie de fluorescence 2 dimensions

Inoue et *al.* ont utilisé l'imagerie de fluorescence sur souris vivantes après administration systémique de QDs commerciaux émettant à 705 nm pour étudier leur répartition anatomique ^[181]. Les auteurs ont réalisé des profils temporels d'intensité de fluorescence pour plusieurs organes pendant 28 jours. Pour évaluer la distribution des QDs *in vivo*, une ROI a été définie pour chaque organe et l'intensité moyenne du signal pour chaque structure a été déterminée. L'équipe a observé une élévation de l'intensité de fluorescence dans le foie, la rate, le squelette et les ganglions lymphatiques dès 1 h après injection des QDs, indiquant une accumulation préférentielle au niveau du SRE et a déterminé un intervalle de temps optimal pour effectuer le scanning des animaux : entre 3 h et 6 h après injection. Ils ont aussi montré que le foie, le squelette et les ganglions lymphatiques étaient clairement détectables 28 jours après délivrance des QDs alors que la rate est quasi indétectable dès 14 jours. Ainsi, ils ont démontré que la détection par imagerie de fluorescence répétée et à long terme du SRE était faisable après une seule injection de QDs.

L'équipe de Diagaradjane a développé et testé une nouvelle nanosonde fluorescente ciblant le récepteur à l'EGF, récepteur surexprimé dans les tissus tumoraux ^[169]. La biodistribution *in vivo* de QDs émettant à 800 nm couplés ou non à l'EGF a été suivie par imagerie de fluorescence entre 2 min et 24 h après leur injection i.v. chez des souris porteuses de tumeurs colorectales humaines. Ils ont montré que dès 3 min après administration des 2 types de QDs, de fortes intensités de fluorescence étaient visualisées au niveau du foie et des ganglions puis diminuaient à partir de 1 h post-injection. Après 4 h, l'intensité de fluorescence des QDs conjugués à l'EGF reste élevée dans le foie par rapport aux QDs non couplés, et à 24 h, seule la ligne de base (bruit de fond) a été observée chez les animaux. Ces données ont été validées par imagerie de fluorescence des organes *ex vivo*.

Kim et ses collègues ont étudié l'effet du pourcentage d'acide hyaluronique greffés (0, 35 et 68 %) à la surface de QDs émettant dans le PIR sur leur distribution tissulaire *in vivo* après injection i.v. chez la souris par imagerie de fluorescence ^[182]. Les auteurs ont montré que 6 min post-administration, les QDs couplés à 35 % avec de l'acide hyaluronique se distribuaient préférentiellement au niveau du thorax alors que ceux conjugués à 68 % se retrouvaient dans tout l'organisme. Ces données ont été confirmées *ex vivo* par imagerie de fluorescence.

Gao et *al.* ont synthétisé une nouvelle sonde fluorescente pour l'imagerie cérébrale et ont testé son habilité à passer la barrière hémato-encéphalique chez la souris ^[170]. Cette sonde était composée d'agglutinines de germes de blé, greffées à des QDs émettant dans le rouge et administrés via les voies intranasales, une demi dose dans chaque narine. L'accumulation cérébrale des QDs a été suivie par imagerie de fluorescence entre 2 min et 8 h après leur administration. Ils ont observé une augmentation rapide de la fluorescence dans le cerveau durant les 3 premières heures, avec un maximum d'accumulation 4 h après délivrance du produit correspondant à 13 fois l'intensité du signal visualisée à 2 min, puis une disparition des QDs du cerveau après 8 h. La biodistribution *ex vivo* des QDs a été menée 3 h post-injection par imagerie de fluorescence et a montré que les organes captant le plus les QDs étaient le cerveau, les poumons, le foie et les reins, respectivement.

L'équipe de Papagiannaros a comparé la biodistribution *in vivo* de 2 types de QDs émettant à 800 nm, les uns commerciaux et les autres synthétisés au sein de leur Laboratoire, encapsulés tous les 2 dans du poly-éthylène-glycol (PEG) et détectés par imagerie de fluorescence après injection i.v. chez des souris porteuses de tumeurs mammaires. Entre 1 h et 4 h post-administration, la biodistribution des QDs produits par leur Laboratoire était similaire et les nanoparticules tendaient à s'accumuler fortement dans le foie, les reins et la rate alors que les QDs commerciaux dont la fluorescence était moindre ont été très difficilement observés *in vivo* chez la souris.

Récemment, Daou et ses collaborateurs ont étudié l'effet de la longueur des chaînes de PEG greffées sur des QDs émettant à 705 nm, suite à leur injection i.v. chez la souris saine et leur détection par imagerie de fluorescence jusqu'à 24 h ^[172]. Ils ont observé que plus la longueur des PEG était grande, moins les QDs s'accumulaient dans le foie. Par exemple, des QDs encapsulés dans des PEG2750 s'accumulaient 2 fois plus dans le foie que des QDs insérés dans des PEG22000, 10 min après leur administration. Une étude *ex vivo* a également été rapportée et a montré une accumulation majoritaire des QDs au niveau du foie et de l'estomac à 24 h.

II.4.2. Imagerie nucléaire

Schipper et *al.* ont été les premiers à étudier la biodistribution de QDs commerciaux couplés à un émetteur de positons : le ^{64}Cu (^{64}Cu -QDs), pendant 36 h ^[146]. La distribution de

QDs de différentes tailles a été étudiée : des QDs émettant à 525 nm avec un DH de 12 nm et des QDs émettant à 800 nm de DH égal à 21 nm. De plus, ils ont étudié l'influence de la PEGylation des QDs, déjà connue pour allonger la demi vie de circulation des QDs *in vivo* après injection i.v. ^[183]. L'imagerie dynamique par microTEP des 2 types de QDs (12 et 21 nm) PEGylés a révélé une accumulation rapide *in vivo*, dès 2 min après administration et prédominante dans le foie (22 et 16 % DI/g pour les petits et les gros QDs, respectivement), suivi par la rate (7 et 6 % DI/g) et les os (5 et 4 % DI/g), et ce, pendant toute la période de l'étude. Contrairement aux QDs PEGylés, les non PEGylés n'ont pas montré d'accumulation dans les os mais une forte activité a été observée dans le foie et la rate.

La même équipe a récemment étudié par microPET l'influence de la taille (5 et > 20 nm de DH), de la PEGylation, et de la chimie de surface (couplage à des peptides ou non) sur 3 types de QDs suite à leur administration chez la souris ^[184]. Ainsi, ils ont montré que le couplage de peptides sur les gros QDs PEGylés prolongeait leur temps de circulation après injection i.v. chez la souris et diminuait leur excrétion via les urines. Inversement, le couplage de peptides à des petits QDs (5 nm) non PEGylés a permis leur élimination à travers les reins, bien que le foie ait évacué la majorité de l'activité injectée.

L'équipe de Cai a étudié l'efficacité de ciblage de QDs couplés ou non à un peptide (arginine-glycine-acide aspartique ou RGD), dirigé contre la vascularisation tumorale, envers des glioblastomes humains greffés chez des souris ^[142]. Ces QDs ont été en parallèle conjugués à du ⁶⁴Cu et repérés *in vivo* par microTEP. Les auteurs ont montré la spécificité des QDs couplés au peptide à se fixer au niveau de la tumeur par rapport aux QDs non couplés. Une étude de biodistribution *in vivo* a également été réalisée jusqu'à 25 h après injection des 2 types de QDs. Ceux-ci présentaient des profils d'accumulation identiques dans les organes (exceptés au niveau de la tumeur) et étaient captés principalement par le foie et la rate.

Ce groupe a menée exactement la même étude que celle citée ci-dessus, en changeant le peptide d'intérêt fixé ou non aux QDs qui était du VEGF, ciblant aussi les vaisseaux tumoraux ^[175]. Ils ont constaté les mêmes résultats, à savoir une bonne efficacité de ciblage vis-à-vis des glioblastomes des QDs couplés au peptide par rapport aux non couplés et une distribution anatomique des QDs conjugués ou non, identique et forte au niveau du foie et de la rate.

Ducongé et *al.* sont les seuls à avoir utilisé des QDs conjugués au ¹⁸F pour évaluer leur profil d'accumulation par microTEP après injection i.v. chez le rongeur ^[145]. Ils ont montré

que les organes accumulant le plus de QDs radio-couplés étaient le foie (10 % DI/g) et la rate (6 % DI/g) et que 87 % de la radioactivité était retrouvée dans les urines 90 min après administration.

II.4.3. Imagerie par résonance magnétique

Oostendorp et *al.* ont étudié la biodistribution de QDs hybrides 1 h après injection i.v. chez la souris saine ^[141]. Des QDs ont été couplés au Gd ainsi qu'à un peptide d'intérêt qui cible spécifiquement une isoforme de CD13 (aminopeptidase N), glycoprotéine transmembranaire surexprimée par les cellules endothéliales des vaisseaux tumoraux. Les QDs ont été détectés par IRM, les signaux ont été normalisés par rapport au muscle des pattes postérieures, les résultats ont été donnés en intensité relative du signal. Ils ont montré que chez des souris saines, la distribution *in vivo* des QDs greffés ou non au peptide était la même et que ceux-ci s'accumulaient préférentiellement dans la rate, le foie et les reins.

II.4.4. Spectrofluorimétrie fibrée

L'équipe de Karabanovas a administré *per os* des QDs émettant à 596 nm sous forme de 2 préparations : ils étaient soit mélangés à des lipides, soit soniqués avec de l'eau pendant 30 min, afin d'étudier leur distribution et leur stabilité dans le système digestif chez le rat ^[185]. Ils ont détecté les QDs par spectrofluorimétrie fibrée *ex vivo* suite au sacrifice des animaux à 15 et 30 min puis 1 h post-administration. Cette technique ne permet que d'affirmer ou non la présence des nanoparticules dans les organes étudiés et rend impossible la quantification absolue ou relative des QDs dans les différents tissus, du fait de sa mesure très locale de fluorescence. Les auteurs ont repéré les 2 types de QDs dans l'œsophage, l'estomac, le duodénum et le petit intestin à 15 et 30 min mais étaient absents de tous ces organes 1 h après injection. Ils ont aussi constaté que les QDs étaient absents du foie, du pancréas, des reins, du sang, des urines et des fèces jusqu'à 48 h. Un shift vers les UV a été observé uniquement pour la fluorescence des QDs soniqués dans plusieurs organes, allant de 596 à 552 nm. Ils ont expliqué ce phénomène par la détérioration des QDs par l'acide et les enzymes gastriques et ont ainsi mis en évidence la stabilité des QDs préparés avec des lipides suite à leur administration orale.

II.4.5. Compteurs de rayons ionisants

Woodward et *al.* ont synthétisé des QDs dont le cœur était radioactif, composé de tellure-125-métastable (^{125m}Te) et de Cd ($\text{Cd}^{125m}\text{Te}$) puis conjugués avec un anticorps monoclonal reconnaissant spécifiquement les vaisseaux sanguins des poumons et ont étudié leur biodistribution *ex vivo* chez l'animal ^[186, 187]. De 1 h à 19 jours après injection i.v. des QDs, différents organes ont été collectés, coupés puis analysés par un compteur de rayons gamma et par radiographie *ex vivo*. Leur étude a montré la spécificité de l'anticorps conjugué aux QDs à cibler les poumons. En effet, ils ont observé que 4 h après injection, les QDs couplés à l'anticorps s'accumulaient environ 70 fois plus dans les poumons (276 % ID/g) que les QDs sans anticorps (4,1 % ID/g) et 100 fois plus à 24 h. Les auteurs ont aussi synthétisé d'autres QDs radioactifs par couplage avec de l'iode 125 (^{125}I), toujours conjugués avec le même anticorps, mais ont montré que ces nanoparticules couplées à ^{125}I étaient très rapidement deshalogénées *in vivo*, limitant ainsi la collection de données utiles ^[187].

Soo Choi et ses collaborateurs ont également utilisé un compteur à scintillations pour réaliser la distribution *ex vivo* de plusieurs QDs conjugués à du ^{99m}Tc , dans des organes réséqués 4 h après leur injection chez la souris ^[118]. Les auteurs ont montré que les QDs de grosse taille avec un DH de 8,65 nm s'accumulaient beaucoup plus dans certains organes que les petits QDs de DH égal à 4,36 nm. Dans le foie, les gros QDs s'accumulaient 6,5 fois plus que les petits (26 et 4 % DI/g, respectivement), 12 fois plus dans la rate (6 et 0,5 % DI/g) et 18 fois plus dans les poumons (9 et 0,5 % DI/g).

Récemment, les mêmes auteurs ont étudié l'influence du nombre de PEG (entre 2 et 22) fixés à des QDs InAs/ZnS (cœur/coque) couplés à du ^{99m}Tc , sur leur biodistribution et leur clairance chez le rat, 4 h après injection i.v. ^[147]. L'augmentation du nombre de PEG autour des QDs a eu pour conséquence leur augmentation en taille, une élévation significative de leur temps de rétention dans la circulation sanguine ainsi qu'une diminution des excréctions rénales et hépatiques. Par exemple, 4 h après administration, les QDs couplés avec 4 PEG ont été retrouvés principalement dans la vessie (47 % DI), les reins (7,9 % DI), le foie (8,1 % DI) et les intestins (7,5 % DI) alors que les QDs avec 14 PEG s'accumulaient majoritairement dans le foie (18,6 % DI) et les intestins (21,4 % DI) et étaient absents des reins et de la vessie. De plus, ils ont observé que la demi vie des QDs dans le sang était 2 fois plus importante avec 14 PEG (922 min) qu'avec 4 PEG (395 min).

L'équipe de Schipper a évalué la biodistribution de 2 types de QDs couplés au ^{64}Cu par microTEP, *in vivo* et *ex vivo* au moyen d'un compteur Geiger ^[146]. Ils ont montré une accumulation rapide dans le foie et la rate, dès 10 min après injection des QDs et leur rétention dans ces organes jusqu'à 35 h. Une quantité stable de QDs a été observée dans le foie de 10 min à 35 h pour les 2 types de QDs radio-conjugués, entre 30 et 45 % DI/g pour les QDs émettant à 525 nm et entre 33 et 55 % pour les QDs émettant à 800 nm.

Très récemment, l'équipe de Kostarelos a élaboré des QDs encapsulés dans des liposomes et radio-couplés avec du ^{14}C afin d'étudier leur accumulation dans l'organisme et dans des mélanomes sur un modèle murin ^[148]. Les organes, le sang ainsi que la tumeur ont été prélevés et la radioactivité a été mesurée avec un compteur à scintillations, après l'injection i.v. soit de liposomes seuls, soit de QDs encapsulés dans ces liposomes, et cela, pendant 72 h. Les auteurs ont observé que les QDs encapsulés avaient une distribution tissulaire (foie, rate, reins, poumons et sang) et une accumulation tumorale (5 % DI) similaires à celle des liposomes vides.

II.4.6. Mesures élémentaires par spectrométrie de masse

Fischer et *al.* ont conduit la première étude de biodistribution de QDs qui a été réalisée chez le rat ^[136]. Les auteurs ont étudié la distribution par ICP-AES de 2 types de QDs après leur injection i.v. au niveau de la veine jugulaire, un type de QDs ayant un DH de 25 nm et l'autre étant couplé à de l'albumine sérique bovine (BSA) avec un DH de 80 nm (QDs-BSA). Ils ont observé que la demi vie de circulation des QDs non couplés (58,5 min) était significativement plus longue que pour les QDs-BSA (38,7 min). De plus, ils ont montré qu'il y avait une forte différence de distribution tissulaire entre les 2 QDs étudiés, dans le foie, la rate, les poumons et les reins. En effet, l'accumulation des QDs non couplés dans le foie (36,4 % ID) était significativement plus faible que pour les QDs-BSA (99,5 % ID), 90 min après leur injection. Au contraire, la séquestration des QDs non conjugués est double dans les poumons et quadruple dans les reins par rapport aux QDs-BSA. Dans la rate, les QDs-BSA ont rapidement été captés en comparaison aux QDs sans BSA, alors que 90 min après leur administration, il n'y avait plus de différence (2,19 et 2,07 % ID, respectivement).

La quantification de QDs par ICP-MS a été rapportée pour la première fois par le groupe de Gopee ^[180]. Les auteurs ont étudié la biodistribution de QDs émettant dans le rouge

après injection intradermique dans le dos des souris, pendant 24 h. Ils ont montré que dans la majorité des organes du SRE (foie, rate et ganglions lymphatiques), la quantité de QDs augmentait brusquement pendant les 12 premières heures, avec un pic maximal d'accumulation après 24 h, alors que le niveau de QDs dans le sang restait inchangé sur une période de 24 h.

Yang et *al.* ont suivi l'accumulation de QDs par ICP-MS, 1 et 24 jours après leur injection via la veine caudale chez la souris ^[177]. Ils ont observé qu'une forte quantité de QDs était séquestrée dans le foie (29 à 40 % DI), la rate (4,8 à 5,2 % DI) et les reins (1,5 à 9,1 % DI) pendant toute la durée de l'expérience.

La même équipe a conduit une étude pharmacologique avec les mêmes QDs, de 1 h à 6 mois après leur injection i.v. chez la souris ^[188]. Sur la base de leurs études expérimentales, ils ont développé un modèle mathématique simulant la pharmacocinétique des QDs *in vivo* après leur administration i.v., ce programme étant capable de prédire la cinétique d'accumulation de ces QDs dans les tissus murins en fonction du temps. Ils ont également montré que les QDs étaient retenus dans la rate, le foie et les reins pendant au moins 28 jours et qu'ils étaient graduellement et partiellement éliminés de l'organisme à partir de 28 jours post-injection et jusqu'à 6 mois.

Ce groupe a également étudié la stabilité de ces QDs *in vivo*, toujours dans les mêmes conditions expérimentales entre 4 et 16 semaines après leur injection ^[189]. Les auteurs ont observé que ces QDs n'étaient ni stables, ni biologiquement inertes puisque du Cd libre a été retrouvé dans les reins des animaux, provenant de la dégradation des QDs.

L'équipe de Chen a réalisé une étude de biodistribution par ICP-MS après injection i.v. de QDs encapsulés dans de la silice chez la souris ^[133]. Ils ont montré que ces QDs s'accumulaient préférentiellement dans le foie, les reins, la rate et les poumons et que la moitié de la dose injectée était excrétée par les urines (33,3 % DI) et les fèces (23,8 % DI), 5 jours post-injection.

Ducongé et *al.*, outre leur étude de biodistribution par microTEP, ont également dosé le Cd dans les organes par ICP-MS, 90 min après injection des QDs couplés au ¹⁸F ^[145]. Ils ont observé que le foie et la rate étaient les organes qui accumulaient le plus les QDs, ces résultats étant corrélés avec leur étude par microTEP.

Geys et *al.* ont évalué la biodistribution de 2 types QDs dotés d'un ensemble cœur/coque identique mais avec une chimie de surface différente, composée soit de groupements carboxyles, soit de groupements amines, par ICP-OES ^[190]. Ils ont observé, 1 h après injection i.v. d'une forte dose de QDs (144 pmol) chez la souris, que les QDs fonctionnalisés avec des amines s'accumulaient 7 fois plus dans le foie (34,3 % DI) que les QDs greffés avec des fonctions carboxyles (4,9 % DI), alors qu'ils étaient présents en quantité identique dans les poumons (3,9 % et 4,4 % DI, respectivement).

Kostarelos et ses collaborateurs ont comparé l'accumulation de QDs encapsulés ou non dans des liposomes dits « fluides » ou « rigides » par ICP-MS chez des souris porteuses de mélanomes après leur injection i.v. ^[148]. Ils ont observé que la circulation sanguine des QDs englobés dans des liposomes fluides était jusqu'à 3 fois plus importante, comparée aux QDs encapsulés dans des liposomes rigides sur les 4 premières heures. De plus, les QDs « fluides » ont aussi montré une plus faible accumulation dans le foie et la rate par rapport aux QDs « rigides » jusqu'à 72 h post-injection.

II.4.7. Résumé

Une vingtaine d'études sur la biodistribution de QDs ont été rapportées à ce jour, alors que des centaines d'articles sur leur utilisation en imagerie biomédicale *in vivo* ou sur des tests *in vitro* ont été publiés. La majorité de ces études de biodistribution, dont les conditions expérimentales sont résumées dans le Tableau VI, ont été réalisées dans le but de localiser les QDs chez l'animal, et en particulier les rongeurs (souris et rats), afin de déterminer leur toxicité potentielle. Cependant, ces études ne peuvent être comparées entre elles, du fait que les QDs utilisés diffèrent en terme de composition chimique, de taille, de chimie de surface ou encore de quantité administrée, facteurs déterminant leur distribution anatomique ^[122].

Tableau IVI. Conditions expérimentales utilisées pour les études de biodistribution de QDs.

Références	Cœur	Coque	Chimie de surface	Emission (nm)	Taille (nm)	Modèle animal	Voie injection	Dose injectée	Temps de mesure	Méthode de quantification	Organes principaux fixant les QDs
[136]	CdSe	ZnS	lysine modifiée albumine bovine sérique	NC NC	25 80	rat sprague-dawley	i.v.	5 nmol	15, 20, 30, 60, 90 min	ICP-AES	foie > rate > reins foie > rate > reins
[186]	Cd ^{125m} Te	ZnS	Ac anti-poumons Ac contrôle	NC NC	NC NC	souris balb/c femelle	i.v.	NC	1, 4, 24, 72, 144 h	compteur Geiger	poumons > rate > foie foie > rate > reins
[180]	CdSe	CdS	PEG	621	37	souris SKH-1	i.d. (au niveau du dos)	48 pmol	4, 8, 12, 24 h	ICP-MS	foie > ganglions > reins
[181]	CdTe	ZnS	PEG-NH ₂	705	NC	souris balb/c nu/nu femelle	i.v.	100 pmol	1, 3, 6, 24 h ; 3, 7, 14, 21, 28 jours	imagerie de fluorescence	foie > rate > os
[142]	CdTe	ZnS	⁶⁴ Cu RGD- ⁶⁴ Cu	705	NC	souris nude femelle porteuse de glioblastome	i.v.	20 pmol	1, 5, 18, 25 h	microTEP	foie > rate > reins foie > rate > tumeur
[177]	CdTe	ZnS	PEG	705	13	souris ICR male	i.v.	40 pmol	1, 4, 24 h ; 3, 7, 14, 28 jours	ICP-MS	foie > rate > reins
[118]	CdSe	ZnS	cystéine- ^{99m} Tc cystéine- ^{99m} Tc	515 575	4 9	souris CD-1	i.v.	300 pmol	4 h	compteur Geiger	vessie > foie > reins foie > poumons > rate
[146]	CdSe	ZnS	NH ₂ -PEG- ⁶⁴ Cu COOH- ⁶⁴ Cu NH ₂ -PEG- ⁶⁴ Cu COOH- ⁶⁴ Cu	525 525 800 800	12 12 21 21	souris nude	i.v.	25 pmol	10, 20, 60 s ; 5, 60 min ; 3, 6, 12, 36 h	microTEP + compteur Geiger	foie > rate > os Foie > rate > os foie > rate > os foie > rate > os
[169]	CdSeTe	ZnS	NH ₂ NH ₂ -EGF	800 800	21 26	souris nude male	i.v.	10 pmol	3, 15, 30 min ; 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 18, 24 h	imagerie de fluorescence	foie > reins > rate foie > tumeur > reins
[187]	Cd ^{125m} Te	ZnS	Ac anti-poumons Ac contrôle Ac anti-poumons- ¹²⁵ I	NC NC NC	NC NC NC	souris balb/c femelle	i.v.	47 µg	1 h ; 1, 7, 19 jours	compteur Geiger	poumons > rate > foie foie > rate > poumons poumons > rate > foie
[133]	CdSeS	SiO ₂	OH	570	22	souris ICR male	i.v.	5 nmol	1, 6, 12, 24, 48, 72, 120 h	ICP-MS	foie > reins > rate
[185]	CdSe	ZnS	aucune	596	4	rat wistar	per os	NC	15, 30, 60 min	spectro-fluorimètre	œsophage > estomac > intestin
[175]	CdTe	ZnS	⁶⁴ Cu VEGF- ⁶⁴ Cu	705	NC	souris nude femelle porteuse de glioblastome	i.v.	20-22 pmol	4 h	microTEP	foie > rate > os foie > rate > os
[145]	CdS	CdZnS	PEG-18F	600	20-25	souris nude	i.v.	1 nmol	10, 20, 30, 60, 90 min	microTEP + ICP-MS	foie > rate > reins
[182]	NC NC NC	NC NC NC	COOH (35 %) acide hyaluronique (68 %) acide hyaluronique	800	38 46 68	souris nude	i.v.	10 pmol	24 h	imagerie de fluorescence	foie > reins > rate foie > reins > rate foie > reins > rate
[141]	CdSe	ZnS	PEG-streptavidine- biotine-Gd PEG-streptavidine- biotine-Gd-cNGR	585	15	souris swiss nude male porteuse de tumeur colorectale	i.v.	NC	1 h	IRM	reins > foie > rate reins > foie > rate
[170]	CdSe	ZnS	PEG-lectine	607	95	souris balb/c male	intranasale	800-960 pmol	2 min ; 1, 2, 3, 4, 8 h	imagerie de fluorescence	cerveau > poumons > foie
[184]	NC NC NC NC InAs InAs	NC NC NC NC aucune aucune	NH ₂ -PEG- ⁶⁴ Cu NH ₂ -PEG-peptide- ⁶⁴ Cu COOH- ⁶⁴ Cu COOH-peptide- ⁶⁴ Cu PEG-peptide- ⁶⁴ Cu peptide- ⁶⁴ Cu	800	21 19 5	souris nude	i.v.	20 pmol	10, 20, 60 s ; 5, 60 min ; 3, 6, 12, 36 h	microTEP	foie > rate > os foie > rate > os foie > rate > os foie > rate > os foie > rate > reins foie, rate > reins
[190]	CdSe	ZnS	NH ₂ COOH	NC	93 104	souris balb/c male	i.v.	720 ; 144 ; 14,4 ; 1,44 pmol	1, 4, 24 h	ICP-OES	foie > poumons foie > poumons
[171]	NC NC	NC NC	PL PEG	800	18	souris balb/c femelle porteuse de cancer du sein	i.v.	40 pmol	1, 2, 3, 4 h	imagerie de fluorescence	rate > reins > tumeur reins > rate > tumeur
[172]	CdTe	ZnS	PEG2750 PEG4000 PEG7000 PEG12000 PEG22000	705	23 26,5 32 43 48	souris NMRI nude femelle	i.v.	40 pmol	24 h	imagerie de fluorescence	estomac > rate > reins foie > estomac > rate estomac > foie > rate estomac > foie > rate estomac > foie > rate
[189]	CdSeTe	ZnS	PEG	705	20	souris ICR male	i.v.	40 pmol	24 h ; 1, 2, 4, 16 semaines	ICP-MS	foie > reins > rate
[147]	InAs InAs	ZnS ZnS	4PEG-99mTc 14PEG-99mTc	5,6 8,7	5,6 8,7	rat sprague-dawley	i.v.	5-10 nmol	4 h	compteur Geiger	vessie > foie > reins intestins > foie > reins
[148]	CdSe	ZnS	PEG-COOH PEG-PLf PEG-PLf-PEG PEG-PLr-PEG PEG-PLr-PEG-14C	520	39 113 108 110 110	souris C57BL6 femelle porteuse de mélanome	i.v.	33 pmol NC	4, 24, 72 h	ICP-MS + compteur à scintillations	foie > rate > reins foie > rate > reins foie > rate > reins foie > rate > reins foie > rate > reins

NC = non communiqué ; PLf = phospholipide fluide, PLr = phospholipide rigide

Il est à noter que la plupart des études sont effectuées après injection i.v. soit dans la veine caudale ou la veine jugulaire chez les rongeurs. La première équipe à avoir rapporté une étude de biodistribution de QDs chez le rongeur est l'équipe de Fischer en 2006, suite à leur injection i.v. ^[136]. Depuis, des études de distribution tissulaire après administration i.v. de QDs ont été régulièrement rapportées.

En résumé, sur les 24 études de biodistribution citées précédemment, 21 ont été réalisées suite à une injection i.v. et 3 après administration intradermique dans le dos, *per os* ou intranasale des QDs, toujours injectés sous forme liquide. Diverses modalités de détection des QDs ont été employées *in vivo* et/ou *ex vivo*, invasives ou non-invasives, certaines étant plus sensibles que les autres. Les techniques utilisées *in vivo* rendent possible le suivi de l'accumulation des QDs dans tout l'organisme sur les mêmes animaux, permettant de diminuer les variabilités intra-individuelles. Cependant, certaines modalités d'imagerie ne fournissent que des données qualitatives quant à l'accumulation de l'agent de contraste *in vivo*. De ce fait, pour obtenir des données quantitatives en terme de concentration de QDs dans les différents organes *ex vivo*, d'autres méthodes sont utilisées, nécessitant le sacrifice des animaux, la technique de référence étant l'ICP-MS. La majorité des ces études ont été menées pour déterminer la toxicité potentielle *in vivo* de QDs non spécifiques s'accumulant préférentiellement dans le SRE. Cependant, quelques équipes ont travaillé avec des QDs conjugués à des anticorps ou des peptides d'intérêts pour vérifier leur efficacité à cibler spécifiquement des tumeurs exprimant ou surexprimant certains récepteurs pour les utiliser en imagerie diagnostique ou pour élaborer de nouvelles thérapies ciblées.

II.5. “Quantification techniques and biodistribution of semiconductor quantum dots”

Pic E., Bezdetnaya L., Guillemin F., Marchal F.

Anticancer Agent Med Chem, 2009, 9(3): 295-303.

Les 2 derniers sous-chapitres présentés ci-dessus, II.3. et II.4. ont fait en partie l'objet d'une revue de la littérature résumant les différentes techniques utilisées pour quantifier les QDs et les diverses études de biodistribution réalisées suite à l'administration de QDs chez les rongeur.

Quantification Techniques and Biodistribution of Semiconductor Quantum Dots

Emilie Pic, Lina Bezdetnaya, François Guillemin, Frédéric Marchal*

CRAN, Nancy-University, CNRS, Centre Alexis Vautrin, avenue de Bourgogne, 54511 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France

Abstract: Quantum dots (QDs) are fluorescent inorganic nanocrystals with advantageous optical properties, which have been applied for biomedical purposes including imaging, diagnostic, drug delivery or therapy. Potential toxicity of QDs remains the major barrier to clinical translation, and as such the precise analysis of *in vivo* QDs distribution and pharmacokinetics is of major importance. Biodistribution studies in animal models are, however, sparse. The present review provides in a first lieu a summary of different techniques, which are currently used for relative quantification of QDs *in vivo* or their absolute quantification *ex vivo*. Fluorescence and radioactivity based techniques along with mass-spectrometry detection at the elementary level are addressed in this review. We further introduce biodistribution studies in animal models and discuss the possibilities to modify quantum dots biodistribution in function of different injection ways.

Key Words: Quantum dots, *in vivo*, detection, fluorescence, radioactivity, mass-spectroscopy, biodistribution.

1. INTRODUCTION

Quantum dots (QDs) are fluorescent inorganic nanocrystals with remarkable unique optical and physical properties, namely high fluorescent quantum yield, large molar extinction coefficient and particularly high resistance to photobleaching [1-3]. QDs are composed of a fluorescent core of semiconductor heavy metals such as cadmium, selenium or tellurium which are actually the most commonly used (Fig. (1)). In order to limit their potentially toxicity due to the release of Cd^{2+} , Se^{2-} or Te^{2-} ions in case of oxidation of the core by ultraviolet light or air [4, 5], the core can be protected with a first inorganic shell, and to render them water soluble and stable in biologic environments [6], it can also be encapsulated in a second shell of organic material, polymeric or lipid-based layers [7]. QDs are thus biocompatible and can be used for various *in vitro* and *in vivo* biological applications [6-12]. Organic ligands can be added on the shell surface of QDs to improve their selectivity in organs of interests or in biological fluids since anionic molecules have rapid uptake into lymphatics and excellent retention in lymph nodes [13] or in skin [14] compared with neutral molecules. Other active molecules such as antibodies or peptides can also be coupled to QDs to target specific cells [15-19]. Thereby, QDs are very interesting candidates for clinical applications [20], such as guidance cancer surgery in sentinel lymph node mapping [21-27], as diagnostic imaging tools [25, 28-33] or for therapeutic purposes as drug delivery to cancer treatment [16, 34].

Questions regarding the *in vivo* distribution, pharmacokinetic and toxicity of QDs have not been thoroughly investigated. It is however an important issue in the view of potential toxicity of QDs. Akerman *et al.* [35] and Gao *et al.* [34] have provided the first qualitative glimpses into *in vivo* distribution of QDs. Ballou *et al.* [36] conducted the first studies on QDs *in vivo* kinetics by using whole animal fluorescent imaging and their results provided a qualitative assessment of surface chemistry-dependent kinetics of QDs in mice. Fischer *et al.* [37] have been the first to assess quantitatively biodistribution, sequestration and clearance of two chemically different QDs in rats. Since then, several biodistribution studies of QDs have been realized in rodents.

The present review will consider the biodistribution studies of quantum dots, which are indispensable for the eventual toxicity assays. The review will provide in a first lieu a summary of different techniques, which are currently used for relative or absolute quantification of QDs *in vivo* and *ex vivo*. The second part will

address biodistribution studies in animal models in function of the different injection ways.

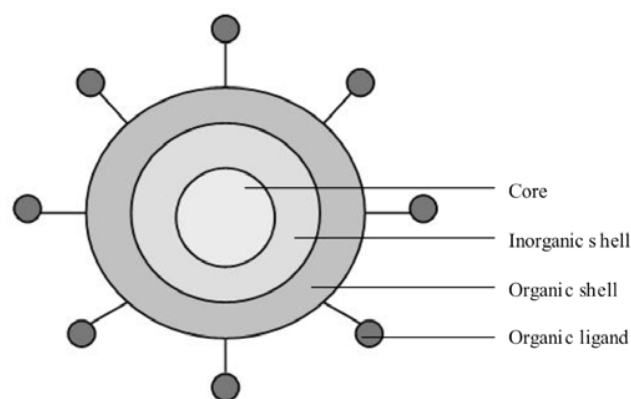


Fig. (1). General structure of biocompatible QDs.

2. QDs QUANTIFICATION

2.1. Relative Quantification (*In Vivo*)

2.1.1. Fluorescence Measurements

Optical imaging technique recently attracted a lot of interest in the medical applications due to its non-invasive procedure, high temporal resolution and relative low cost. Fluorescence imaging in the visible-wavelength range is routinely used for conventional and intravital microscopy [38]. The major drawback of this technique for *in vivo* imaging is the limited penetration depth of the visible light because of high absorption and scattering that occur in biological tissues. Indeed, to study and follow biological signals in whole-body animal, light must penetrate living tissues several millimeters. To overcome this constraint and make possible the *in vivo* imaging, it is preferable to work in the near infrared (NIR) spectral range (700-900 nm), in which the most endogenous chromophores, including haemoglobin or melanin and water absorb clearly less. Weissleder *et al.* have been the first to build and test a whole-body experimental imaging system dedicated for small animals that was sensitive to NIR fluorescent probes [39]. Frangioni's group have introduced the concept of a low-cost, safe, and easy-to-use NIR fluorescence imaging system for large animals that permits the surgeon to "see" surgical anatomy and NIR fluorescence simultaneously, non-invasively, with high spatial resolution, in real-time, and without moving parts [40]. Kim and al. [22] conducted the first real-time NIR fluorescence imaging study on animals with QDs as

* Address correspondence to this author at the CRAN, Nancy-University, CNRS, Centre Alexis Vautrin, avenue de Bourgogne, 54511 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France; Tel: (+33) 3 83 59 83 06; Fax: (+33) 3 83 59 83 78; E-mail: f.marchal@nancy.fnclcc.fr

NIR contrast agent (emitting between 840 and 860 nm) with above-mentioned intraoperative NIR fluorescent imaging system developed by Nakayama and co-authors [40]. Then, De Grand and Frangioni [41] have developed a new operational NIR fluorescence imaging system specifically for use during large animal surgery and carried out several studies on sentinel lymph node mapping with NIR emitting QDs on mice, rats and pigs [13, 21, 23, 24, 26, 27, 42-44]. However, absolute QDs quantification has never been done *in vivo* because of the nature of diffuse photon into tissue in a NIR range. Indeed, with fluorescence imaging, the appearance of deeper structures is significantly blurred and the detected signal from them is significantly attenuated as a function of structure depth [45]. Moreover, photon attenuation is nonlinear as a function of depth and the optical heterogeneity of tissue, which obscures signal quantification [46]. For example, a small structure with high contrast agent concentration that is deeper into tissue could provide the same fluorescence signal as a larger structure with low contrast agent concentration that is closer to the surface. Thus, interpretation of NIR data and images requires advanced data processing techniques to account for the diffuse nature of photon propagation in tissue [38]. However, emergence of mathematical models associated with technological developments concerning illumination and detection devices have improved visualisation of contrast agents in tissue. Thus, new *in vivo* fluorescence imaging systems have been created and marketed such as Maestro *In Vivo* Imaging System (CRI Inc, Woburn, MA, USA) or Xenogen IVIS-200 Optical *In Vivo* Imaging System (Xenogen-Caliper, LS, Alameda CA, USA) or Fluobeam (Fluoptics, Lyon, France) and they all are composed of a high resolution CCD camera which is highly sensitive in NIR range. These devices are able to semi-quantify NIR contrast agents *in vivo*. The advantage of this imaging modality is that it permits to analyse the same animal several times over a long time period. Thus, NIR fluorescence imaging system spares the animals and minimizes intra-individual variations, resulting in improved data. To quantify QDs *in vivo*, the first stage is to acquire the baseline images in animals without injection of QDs. This background signal has to be generated for each animal and will be further subtracted from fluorescence images created after contrast agent injection. Second step is to inject QDs into animals and acquire fluorescence images at desired times after injection. Fluorescence intensities are further noted by selecting the specific region of interests (ROIs) from the obtained images. This technique has a disadvantage since it does not give information on the absolute concentration of QDs. Nevertheless, it is possible to compare normalized fluorescence intensities at different ROIs in function of time after injection. Thus, *in vivo* fluorescence imaging systems permit semi-quantitative QDs evaluation according to the changes of fluorescence intensity of QDs in ROIs. The first study in which NIR QDs were semi-quantified using NIR fluorescence imaging system *in vivo* was performed by Morgan and al. [47]. The authors have measured fluorescence intensity of QDs in function of time in squamous carcinoma tumour model in mice after intra-venous (i.v.) injection of QDs and have registered the dynamic changes of QDs in different organs. They have observed that QDs are both uptaken and eliminated from tumour tissue but elimination phase is slower compared to that of the blood draws, suggesting that exchange of the QDs between circulation and tumour tissue may be different. Moreover, they have provided preliminary data on the elimination of QDs from various tissues such as heart, abdominal areas, or the blood. Inoue and al. [48] have performed *in vivo* fluorescence imaging in living mice after systemic administration of commercial NIR QDs to investigate their use for optical mapping of mouse anatomy. The authors have performed temporal profiles of fluorescence intensity for several organs during 28 days. To assess the temporal pattern of NIR QDs uptake semi-quantitatively, a ROI was defined for different organs, and the mean signal intensity for each structure was determined. It was observed that already 1 h after QDs injection, fluorescence signal intensity was elevated in liver, spleen,

skeleton and lymph nodes, indicating preferential accumulation of QDs in reticuloendothelial system (RES) and optimal time point for scanning was found to be between 3 and 6 h post-injection. They have also shown that liver, skeleton and lymph nodes were clearly detectable even at 28 day after injection whereas spleen was almost undetectable at 14 days and later. Thus, an evidence was provided that long-term, repeated imaging of RES was feasible after a single injection of NIR QDs. Moreover, in spite of prolonged retention of QDs in RES, the authors did not see apparent signs of toxicity caused by QDs and body weight of the mice was similar during the course of the study. However, a detailed assessment of toxicity was not performed, so, potential toxicity of QDs in organs has not been demonstrated. It is highly probable that a long-term sequestration of QDs in RES could be toxic if QDs were degraded releasing the Cd²⁺ ions which are known to be toxic to liver, kidneys, lungs or gastro-intestinal tracts. Cai and al. [17] have demonstrated the specific *in vivo* targeting of an arginine-glycine-aspartic acid peptide (which targets tumour vasculature) labelled NIR QDs into mice bearing human glioblastoma tumours. They have compared distribution into tumour of peptide-labelled and unlabelled QDs after their i.v. injection by measuring fluorescence intensity emitted by tumour in function of time. It has been shown that the peptide labelled QDs quantity in the tumour was considerably higher 6 h after injection, with a tumour-to-background ratio 4 times more than for the tumours with unlabelled QDs. Very recently, Diagaradjane and colleagues [31] have demonstrated that NIR QDs coupled to epidermal growth factor (EGF) could be used as semi-quantifiable and reproducible fluorescent imaging agent in mice grafted with human colorectal tumour that overexpresses EGF receptor. The authors demonstrated that 6 h after i.v. injection of QDs, tumour accumulated 2.5 times more coupled compared to uncoupled QDs.

2.1.2. Radioactivity Measurements

Two different nuclear imaging modalities can be used to detect radioactivity emissions in small animals. These techniques allow a serial imaging of live animals, obviating a need to sacrifice animals, and minimizing interindividual variation. The first one is the single photon emission computed tomography nuclear imaging (SPECT) for which the most commonly used gamma-emitting radionuclide tracer such as 99-metastable-technetium (^{99m}Tc), iodine-125 (¹²⁵I) or indium-111 (¹¹¹In) are injected i.v. [49]. They accumulate at different locations in the body depending on the relative perfusion and affinity for the compound containing the radioisotope. The SPECT camera then estimates the relative amount of activity at each position in the body by detecting the emission of gamma rays from series of angular views. The resolution of the resulting image is dependent on the aperture through which the radiation is detected. Thus, this emission imaging plays a crucial role because of functional, metabolic and pharmacokinetic information that it can bring due to its ability to provide true three-dimensional information. However, this technique has limitations. Radionuclides can be exclusively synthesized in a specific device called cyclotron which is very expensive and not always available. Moreover, radiocolloid physical half-lives are short : 6 h for ^{99m}Tc, 13 h for ¹²⁵I and 67 h for ¹¹¹In, thus indicating that the SPECT studies cannot be done over a long time span. Furthermore, as for fluorescence imaging system, SPECT imaging provides semi-quantitative information on the radioisotope concentration *in vivo* and are often expressed as the percentage of injected dose (% ID) or as the percentage of injected dose per gram of tissue (% ID/g) after selection of ROIs. Thus, it can be possible to compare radioactivity of different ROIs as a function of time. Soo Choi and al. [50] have precisely defined the requirements for renal filtration and urinary excretion of inorganic, metal-containing nanoparticles. There is actually the only one group which has developed a technique to label the QDs surface covalently with a chelated form of the gamma ray-emitting isotope ^{99m}Tc to realize semi-quantitative measurement of QDs behaviour in mice. Using several ^{99m}Tc-labelled QDs with different hydrody-

nanometric diameters (HD) from 4.36 to 8.65 nm, they have followed distribution and clearance in all organs, and from the body itself, over time. The authors have shown that radiolabelled QDs remained intact, even after excretion into urine, suggesting that gamma ray emission could be used as a reliable surrogate for QDs distribution. Four h after i.v. injection of QDs with a HD of 4.36 nm, the dominant signal was detected in the bladder and the only appreciable distribution in other organs was in the liver (4.5 ± 1.0 % ID) and kidney (2.6 ± 0.4 % ID). In contrast, QDs with a HD of 8.65 nm have exhibited high uptake in liver (26.5 ± 3.9 % ID), lung (9.1 ± 4.0 % ID) and spleen (6.3 ± 2.4 % ID) and a proportionally lower signal in bladder. Thus, the authors have suggested that metal-containing nanoparticles will have limited clinical utility and that new nanoparticles have to be developed with a formulation with completely non-toxic components and/or a biodegradability to clearable components and a final HD lower than 5.5 nm to be eliminated from the body. It should be noted however that in such small QDs the band gap between the conducting and non-conducting bands increases and the emission is shifted towards the blue which might impede the imaging in the NIR window.

The second nuclear medicine imaging technique used to measure radioactivity is positron emission tomography (PET). PET produces a three-dimensional image or map of functional processes in the body. The system detects pairs of gamma rays emitted indirectly by a positron-emitting radioisotope tracer, which is introduced into the body on a biologically active molecule, usually into blood circulation [49]. Images of tracer concentration in 3-dimensional space within the body are then reconstructed by computer analysis. The radionuclide most commonly used for this purpose is fluorodeoxyglucose (FDG), a derivative of glucose, for which the physical half-life is 2 h. The concentrations of imaged tracer are semi-quantitative and provide tissue metabolic activity, in terms of regional glucose uptake. The recent interest in imaging of genetically altered mice has led to the development of high-resolution PET scanners custom designed for small animal imaging (microPET). PET imaging has the same disadvantages than SPECT with regard to the radioisotope production and a short physical half-life of the positron-emitting radionuclide of 2 h for FDG or 12.7 h for copper 64 (^{64}Cu), which is an isotope of copper. Schipper and co-workers have been the first to study biodistribution of commercial QDs radiolabelled with positron-emitting tracer in living animal during 36 h [51]. QDs have been radiolabelled with ^{64}Cu and studied by serial microPET with ROIs analysis. Larger (800 nm emission wavelength; 21 nm HD) and smaller (525 nm emission wavelength; 12 nm HD) QDs have been studied in mice. Moreover, this group has also investigated whether surface coating with 2,000 molecular weight polyethylene-glycol (PEG) may prolong the circulating half-life of the molecules *in vivo* as has been earlier demonstrated in the study of Ballou and al. [36]. Dynamic imaging of microPET-based *in vivo* biodistribution of both pegylated QDs revealed a rapid and predominant uptake in liver, followed by spleen and bone already 2 min after tail vein injection of radiolabelled QDs and lasting till 36 h. Contrary to pegylated QDs, unpegylated QDs have shown no relevant bone uptake but a high activity in liver and spleen. Further, no difference was observed in biodistribution between smaller and larger QDs. Previously, Cai and al. [17] have demonstrated the specific *in vivo* targeting of an arginine-glycine-aspartic acid peptide labelled NIR QDs into mice bearing human glioblastoma tumour by using NIR fluorescence imaging system. However, they have been limited by small tissue penetration of optical imaging. For this reason, they have synthesized a new dual-function probe made up of NIR QDs coupled with ^{64}Cu and labelled or not with arginine-glycine-aspartic acid peptide [52]. After quantitative ROIs analysis they did not observe significant difference in the liver uptake of the two radiolabelled QDs. The uptake of both has been about 50 % ID/g throughout the study, indicating that the majority of each injected QDs has been taken up by the RES. The difference in the tumour uptake of the two conjugated QDs has been significant

at all time points examined, except 1 h after injection. The tumour uptake of QDs unlabelled with peptide has been less than 1 % ID/g, suggesting minimal passive targeting in the tumour, whereas the uptake of QDs labelled with peptide has been significantly higher (2.2 ± 0.3 , 4.0 ± 1.0 , and 4.3 ± 0.5 % ID/g at 5, 18, and 25 h after injection, respectively). Thus, this group has quantitatively evaluated the tumour-targeting efficacy of dual-function QD-based probes using PET imaging. They have also demonstrated that non-invasive PET with conjugated radiolabelled QDs provided a robust and reliable measure of *in vivo* probe distribution. This approach overcame the tissue penetration limitation of NIR fluorescence imaging, thereby allowing quantitative *in vivo*-targeted imaging in deep tissue. Very recently, this group has used a new dual-function QDs coupled with another peptide of interest which target vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor radiolabelled with ^{64}Cu for NIR fluorescence imaging and PET of tumour vasculature [53]. The results of PET imaging have shown that QDs coated or not with VEGF were taken up rapidly by the liver and that tumour uptake of QDs coupled with VEGF was 3.5 to 5.5 times more compared to QDs without peptide, at 1 h and 24 h respectively.

2.2. Absolute Quantification (Ex Vivo)

2.2.1. Fluorescence Measurements

Fluorescence spectroscopy or fluorometry or spectrofluorimetry analyzes emitted fluorescence from a sample after its excitation by light. This technique allows quantification of QDs in solution by taking into account a linear part of the previously established calibration curve. QDs quantification from animal organs requires special solvents for extraction, in order to avoid its deterioration. Manabe and colleagues [54] have investigated the medicinal effect of red-emitting QD-conjugated with an anti-hypertension agent captopril after carotid artery injection in rats. The authors have measured by spectrofluorimetry the concentration of conjugated QD in the plasma from 0.5 to 96 h after their injection and demonstrated that its concentration decreased monoexponentially with a half-life time of 0.65 h. In the same way, Yang and al. [55] have used fluorescence spectroscopy to study plasma pharmacokinetics from 1 h to 14 days after tail vein injection of NIR QDs into the mice. They have found that QDs clearance from the blood was 2.3 mL/h/kg. We have recently conducted a biodistribution study in mice quantifying by spectrofluorimetry red-emitting QDs (Invitrogen) in organs after subcutaneous (s.c.) injection in the right anterior paw [56] and demonstrated that QDs have only been present at the injection site and in the right axillary lymph node with a maximal accumulation at 60 min post-injection.

2.2.2. Radioactivity Measurements

Nuclear medicine imaging as SPECT or PET are largely used for biodistribution studies in living animals, albeit these techniques are semi-quantitative. After radionuclide injection in animals, the different organs can be removed and analysed quantitatively by gamma-counter detector. Schipper and al. [51] have evaluated the biodistribution of two QDs labelled with a gamma-emitter ^{64}Cu by microPET *in vivo* which is a semi-quantitative method and *ex vivo* with a gamma-counter detector providing quantitative results in % ID/g. They have shown the rapid uptake and retention in liver and spleen with a stable level of QDs in the liver from 10 min to 35 h for both labelled QDs. Soo Choi and colleagues [50] have also used gamma-detector for *ex vivo* biodistribution in mice to quantify radioactivity of several QDs labelled with $^{99\text{m}}\text{Tc}$ in resected organs 4 h after injection. Woodward and al. [57, 58] have synthesized QDs, which were composed of 125-metastable-tellurium, $\text{Cd}^{125\text{m}}\text{Te}/\text{ZnS}$ core/shell conjugated with specific antibody targeting the lung blood vessels and investigated *ex vivo* quantitative biodistribution in mice. From 1 h to 19 days after i.v. injection of conjugated radiolabelled QDs, various organs have been collected, sliced and analysed for biodistribution analysis using gamma-detector and autoradiography.

diography. This study demonstrated the specificity of antibody coupled to Cd^{125m}Te/ZnS QDs to target the lung within 1 h after i.v. injection. Moreover, they have synthesized another radioactive QDs by coupling CdTe QDs with a monoclonal antibody (mAb) targeted to lung vessels bound to ¹²⁵I but have shown that this iodinated nanoparticles were dehalogenated very rapidly in mice, limiting the collection of useful information.

2.2.3. Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectroscopy (ICP-AES) Measurements

ICP-AES, also referred to as inductively coupled plasma - optical emission spectrometry (ICP-OES), is an analytical technique used for the detection of the traces of metals. It is a type of emission spectroscopy that uses the inductively coupled plasma to produce excited atoms and ions that emit electromagnetic radiation at wavelengths characteristic of a particular chemical element. The intensity of this emission is indicative of the concentration of the element within the sample. To analyze QDs either in solution or in animal organs, samples have to be destroyed to quantify heavy metals present in QDs core such as cadmium, selenium or tellurium which are the most commonly used for QDs synthesis. Several techniques can be used with this aim, such as treatment of the sample with nitric acid, chloridric acid or following a specific protocol. Similar to fluorescence emission measurements, the concentration of the element is converted into QDs concentration using a mass-spectrometry assessed calibration plot. Fischer and al. are actually the only one group who have used this technique to carry out a study on the interactions of cadmium selenium/zinc sulfide (CdSe/ZnS) core/shell QDs with whole blood components in rats [59]. They have tested a variability of QDs-blood interactions *in vivo* by administering an i.v. dose of QDs through jugular vein cannulation of rats and removing blood samples from 2 to 90 min after injection. Further ICP-AES analysis has demonstrated the variations of QD concentrations in the whole blood with time after injection. Moreover, their results have suggested that there are indeed interactions between blood components and QDs. Another study from the same group [37] has investigated the biodistribution in rats of two CdSe/ZnS core/shell QDs after jugular vein injection, one of the QDs was free of coating and had a HD of 25 nm and the other one was coated with bovine serum albumin (BSA) with a HD of 80 nm (QDs-BSA). Cadmium concentration in each organ has been measured by ICP-AES and further correlated with QDs concentration. Authors have observed that the half-life for non-coated QDs (58.5 ± 17 min) was significantly longer than that of QDs-BSA (38.7 ± 3.5 min). Furthermore, Fischer and colleagues have shown that there was a big quantitative difference in tissue distribution between uncoated and BSA coated QDs in the liver, spleen, lungs and kidneys. Indeed, accumulation of uncoated QDs (36.4 ± 8.1 % ID) in the liver was significantly lower than that of QDs-BSA (99.5 ± 9.2 % ID) at 90 min post-injection. On the contrary, sequestration of uncoated QDs was double in the lungs and fourfold in the kidneys that of QDs-BSA. In the spleen, QDs-BSA were more rapidly taken up in comparison to uncoated QDs but 90 min after QDs administration the % ID is not significantly different between QDs-BSA and uncoated QDs (2.19 ± 0.7 % ID and 2.07 ± 0.43 % ID respectively). This difference in the pharmacokinetics and biodistribution between the two types of QDs could be explained by surface modification resulting in the size increase increase of QDs-BSA. Finally, the same group investigated the limit of ICP-AES detection in several rat organs of 5 engineered nanoparticles among which were the QDs with a CdSe core and a HD of 5 nm [60]. It has been demonstrated that QDs could be detected in the tissues in the concentrations as low as 10 pmol per gram of tissue after complete destruction of biological samples in nitric acid.

2.2.4. Inductively Coupled Plasma - Mass-Spectroscopy (ICP-MS) Measurements

ICP-MS is a highly sensitive type of mass-spectroscopy able to detect the range of metals and several non-metals at the picomolar

concentrations. It is based on the combination of inductively coupled plasma as a method of producing ions (ionization) with a mass spectrometer as a method of separating and detecting the ions. ICP-MS is also capable of monitoring isotopic species for the ions of choice. For the first time, quantification of QDs using ICP-MS was reported by Gopee's group [61]. The authors have investigated the biodistribution of red-emitting QDs after dorsal intradermal (i.d.) injection in mice during 24 h. They have found that in majority of organs of RES (spleen, liver, lymph nodes), QDs level increased sharply by 12 h, peaking a maximum at 24 h post injection, whereas the level of QDs in the blood did not change during 24 h. Nearly at the same time, Yang and al. have followed an accumulation of NIR QDs with a HD of 13 nm in mice by ICP-MS after tail vein injection at 1 and 28 days after injection [55]. They have observed that high levels of NIR QDs persisted in the liver (29.0 to 40.0 % ID), spleen (4.8 to 5.2 % ID) and kidneys (1.5 to 9.1 % ID) throughout the whole experimental period and that in the liver and kidneys there was even the tendency of increasing of QDs concentration with time. Recently, Chen and al. [62] have performed a quantitative biodistribution ICP-MS study of silica coated yellow-emitting QDs in mice after i.v. injection. They have shown that QDs have an affinity for the lung and spleen and that they were cleared *via* urine and feces.

3. QDs BIODISTRIBUTION

3.1. Intra-Venous (i.v.) Injection of QDs

To date, only 8 biodistribution studies were carried out in animal models after i.v. injection of QDs whereas hundreds of articles were published on the use of QDs in biomedical imaging and on *in vitro* toxicity of QDs. The majority of these distribution studies, which are summarized in Table 1, were performed to localize QDs in a whole animal body, and thus, to determine their toxicity. However, these studies cannot be compared between themselves since QDs used are all different in terms of chemical composition, size or coating (Table 1). Fischer *et al.* [37] have been the first to realize *in vivo* distribution study after jugular vein injection of QDs in rats. They have compared the distribution of two chemically different QDs by ICP-AES, estimated the *in vivo* pharmacokinetics and plasma clearance of QDs and their uptake by various organs, and finally identified the substructures of organs and cells that are responsible for the sequestration of QDs. The results have revealed that the main portion of two QDs was in liver and in particular in Kupffer cells (Fig. (2)) and that there was a big quantitative difference in tissue distribution between both QDs in liver, spleen, lung and kidney. Surprisingly, they have failed to observe a degradation of the inorganic core/shell part of the QDs, or excretion of the QDs in a short timeframe, but QDs were sequestered in the RES cells. In the same way, Yang's group [55] have determined quantitatively the blood and tissue kinetics of commercial NIR QDs in mice after single i.v. injection for up to 28 days by ICP-MS and have localized NIR QDs in major vital organs using fluorescence microscopy. Moreover, they have chosen to perform mass balance studies at the beginning (1 day) and the end (28 days) of the experiment to assess the persistence of NIR QDs in the body. They have been able to recover 100 % of an i.v. dose of NIR QDs from the body at both 1- and 28-day time points, indicating very little excretion during 28 days. Tissue localization of NIR QDs has appeared especially prominent at the linings of hepatic sinusoids, red pulps of spleen, renal vessels, and glomerular vasculature in the kidneys. The long-term accumulation of NIR QDs in vascular-rich areas will most likely result in toxicity in organs due to the presence of heavy metals in NIR QDs and their possible release in the organism. Thus, toxicology studies including ultrastructural examinations will have to be carried out with these NIR QDs or another perspective will have to be followed in terms of QDs synthesis and formulation to render possible their excretion by animals. Recently, Chen and colleagues [62] have also used ICP-MS to measure the concentration of yellow-emitting QDs between 1 h and 120 h after tail vein

Table 1. Experimental Conditions Used to QDs Biodistribution Studies

Ref. ^a	QDs Core	QDs Shell	QDs Surface	Specific Binding	Emission Peak of QDs	QDs Size	Animal Model	QDs Administration	Administered Quantity of QDs	Time Exposure of QDs	Method of Detection	Principle Organ Accumulation
Fischer, 2006	CdSe	ZnS	lysine-modified BSA	no	ND ^b ND ^b	25 nm 80 nm	sprague-dawley rats	i.v.	5 nmol	15- 90 min	ICP-AES	liver liver
Woodward, 2007	Cd ^{125m} Te	ZnS	mAb to mouse lung control mAb	yes no	ND ^b ND ^b	ND ^b ND ^b	female Balb/c mice	i.v.	ND ^b	1-144 h	gamma counter detector	lung liver
Gopee, 2007	CdSe	CdS	PEG	no	621 nm	37 nm	SKH-1 mice	i.d. (in dorsal part)	48 pmol	0-24 h	ICP-MS	liver
Yang, 2007	CdTe	ZnS	PEG	no	705 nm	13 nm	male ICR mice	i.v.	40 pmol	1 h -28 days	ICP-MS	liver
Soo Choi, 2007	CdSe	ZnS	cystein- ^{99m} Tc cystein- ^{99m} Tc	no no	515 nm 575 nm	4 nm 9 nm	CD-1 mice	i.v.	300 pmol	4 h	gamma counter detector	bladder liver
Schipper, 2007	CdSe	ZnS	NH ₂ -PEG- ⁶⁴ Cu COOH- ⁶⁴ Cu NH ₂ -PEG- ⁶⁴ Cu COOH- ⁶⁴ Cu	no	525 nm 525 nm 800 nm 800 nm	12 nm 12 nm 21 nm 21 nm	nude mice	i.v.	25 pmol	10 min-36 h	gamma counter detector	liver liver liver liver
Diagaradjane, 2008	CdSeTe	ZnS	NH ₂ NH ₂ -EGF	no yes	800 nm 800 nm	21 nm 26 nm	male nude mice	i.v.	10 pmol	3 min-24 h	fluorescent imaging system	liver liver
Kennel, 2008	Cd ^{125m} Te CdTe	ZnS	mAb to mouse lung control mAb mAb to mouse lung- ¹²⁵ I	yes no yes	ND ^b ND ^b ND ^b	ND ^b ND ^b ND ^b	female Balb/c mice	i.v.	47 µg	10 min-90 days	gamma counter detector	lung liver lung
Robé, 2008	CdSe	ZnS	COOH	no	655 nm	16 nm	female nude mice	s.c. (in the right anterior paw)	20 pmol	5 min-24 h	spectro-fluorimeter	axillary lymph node
Chen, 2008	CdSeS	SiO ₂	OH	no	570 nm	22 nm	male ICR mice	i.v.	5 nmol	1-120 h	ICP-MS	liver
Karabanovas, 2008	CdSe	ZnS	nothing	no	596 nm	4 nm	wistar rats	per os	ND ^b	15 min-48 h	spectro-fluorimeter	digestive system

^a see references [31, 37, 46, 47, 51-54, 57, 58, 62]; ^b ND = No Data.

injection in plasma, organs and excretion samples collected in mice. They have observed that QDs were mainly accumulated in the liver, kidney, spleen and lung with a peak concentration of QDs accumulation 6 h after injection. QDs have been observed especially in liver lobules till 120 h by fluorescent microscopy. Moreover, they have demonstrated that these QDs were cleared *via* urine and feces to a total value of 25 % and 33 % respectively, which is very high compared to preceding studies. Other groups [50, 51, 57, 58] have used radioactive QDs and have assessed QDs concentration in removed organs by gamma-counter measurements. Soo Choi and al. [50] have labelled small QDs to ^{99m}Tc which have been i.v. administered in mice. Mice have been sacrificed 4 h after injection, organs have been resected and radioactivity have been measured by gamma-counter detector. The authors have observed that the dominant signal after injection of the smallest ^{99m}Tc-labelled QDs (4 nm in HD) was in bladder and that the only appreciable distribution in other organs was in liver and kidney. In contrast, the largest ^{99m}Tc-labelled QDs (9 nm in HD) have exhibited high uptake in liver, lung, spleen and a proportionally lower signal in the bladder. Schipper and colleagues [51] have also developed radioactive QDs coupled with an other gamma-ray emitter which is ⁶⁴Cu to perform *ex vivo* biodistribution study in mice after i.v. injection. They have noted rapid uptake and retention of ⁶⁴Cu-labelled QDs in liver and spleen 10 min after injection. However, liver and spleen uptake at 10 min have not been significantly different from uptake at 35 h. Woodward *et al.* [57] have synthesized radioactive Cd^{125m}Te/ZnS QDs which have been coated either with a control mAb or with a

specific mAb targeted to mouse lung thrombomodulin. The authors have measured the targeting efficacy of specific radioactive QDs in mice after i.v. injection till 6 days and have found that 1 h after injection, lung accumulation represented a 100-fold increase in targeting efficacy versus control and that after 6 days, the amount of radioactivity retained in lung was approximately 30 times higher than that initially observed in the lungs of the control mice. This was the first demonstration of the specificity to lung of their new radioactive QDs and its potential for radioimaging. Kennel and al. [58], using the same experimental conditions as in the previous study, have recently conducted a biodistribution study over 19 days and have performed microdistribution in lung and liver of radioactive QDs by autoradiography on tissue sections. They have confirmed Woodward's results and have shown that QDs labelled with specific mAb targeted lung vessels were uniformly distributed throughout the lung and in punctuate spots in the liver. Moreover, in the same study, they have coupled CdTe QD with ¹²⁵I bound to specific mAb and have tested these new radioactive QDs in mice. QDs coupled with ¹²⁵I were accumulated in lung but at relatively low levels (48 % ID/g) compared to Cd^{125m}Te QDs (95 % ID/g). The plausible explanation could be the loss of ¹²⁵I from the QD since a large fraction of ¹²⁵I was found in the thyroid. Diagaradjane and al. [31] have developed a specific optical imaging nanoprobe by coupling commercial NIR QDs with EGF (QDs-EGF) and tested it in mice bearing human colorectal tumour that overexpresses EGF receptor. Their biodistribution study has been carried out *ex vivo* with a fluorescent NIR imaging system after systemic injection of

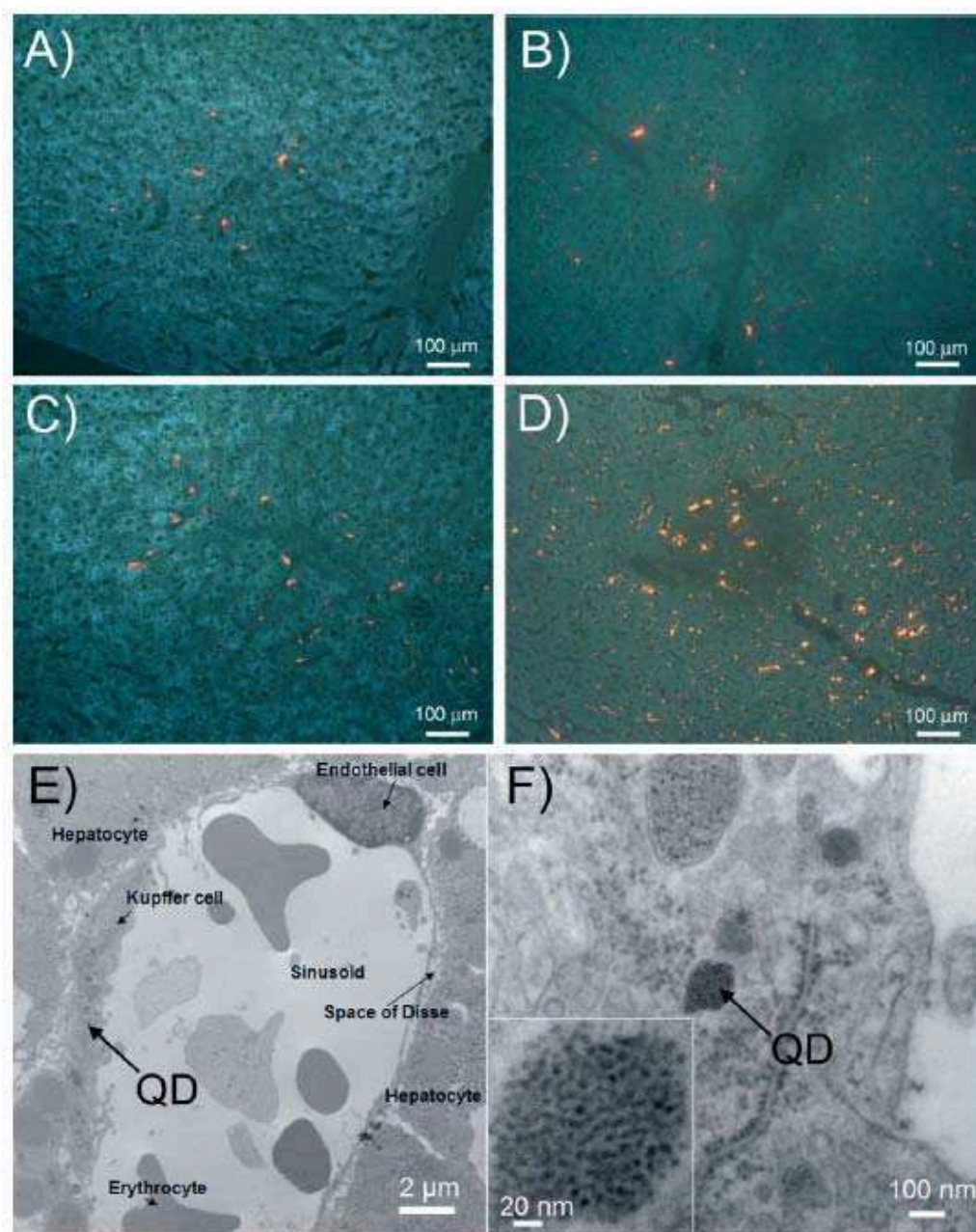


Fig. (2). Optical fluorescence images showing accumulation of the QDs in the liver. Notably, the uncoated QDs at 30 min (A) shows less accumulation than QDs-BSA at 30 min (B). At 90 min, both uncoated QDs (C) and QDs-BSA (D) show an increased accumulation relative to the corresponding images at 30 min. Images A–D were generated with an inverted epifluorescence microscope, at 20× (NA 0.50). (E) Transmission electron microscopy image shows uptake in a Kupffer cell at the boundary of a hepatic sinusoid, and sequestration in phagosomes. The Kupffer cell can be identified by its active phagocytic surface morphology, and location within the sinusoid. (F) A detailed microscopy image of the Kupffer cell shows QDs accumulation in a cellular vesicle. For all fluorescence and transmission electron microscopy imaging, the tissue sections were prepared using standard histology techniques. Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Reproduced with permission.

QDs and QDs-EGF. Liver and lymph nodes have shown the most prominent fluorescence signal in all animals during 24 h. Three distinct phases of tumour influx, clearance, and equilibration/accumulation of QDs nanoparticles and QDs-EGF nanoprobe have been seen. During the first phase (influx), rapid non-specific enhancement in QDs and QDs-EGF fluorescence have been observed within 3 min after injection. The QDs nanoparticles exhibited a 50 % higher peak of fluorescence than that of QDs-EGF. During the second phase (clearance), from 3 to 60 min, an exponential decrease in QDs and QDs-EGF nanoprobe fluorescence intensity has

been noted. After initial rapid influx and clearance from tumour attributable to increased tumour vessels permeability, at 1 h post-injection, fluorescence from both QDs and QDs-EGF nanoprobe have attained an apparent dynamic equilibrium between the vascular and extracellular space/perivascular compartments of the tumour. Thus, they have demonstrated that QDs-EGF with favourable biodistribution and good binding affinity to EGF receptors permitted quantifiable imaging of EGF receptors expression in human colorectal cancer xenografts in mice.

3.2. Other Ways of QDs Administration (i.d., s.c., *per os*)

Topical exposure to nanoscale materials is likely from a variety of sources including sunscreens and cosmetics. Because the *in vivo* disposition of nanoscale materials is not well understood and because QDs have been observed to penetrate skin *in vitro* [63-65], Gopee and al. [61] have evaluated the distribution of red-emitting QDs into hairless mice as a model system for determining tissue localization following i.d. infiltration. The QDs have been injected i.d. on the right dorsal flank. Within minutes after QDs administration, the highly QDs fluorescent could be observed moving from the injection sites apparently through the lymphatic duct system to regional lymph nodes. Residual fluorescent QDs remained at the site of injection until necropsy at 24 h. Quantification of QDs levels in multiple tissues, using ICP-MS have shown a time dependent loss of QDs from the injection site, and accumulation in the liver, regional draining lymph nodes, kidney, spleen, and hepatic lymph node. Fluorescence microscopy has corroborated the ICP-MS results regarding the tissue distribution of QDs. The results have indicated that i.d. injected QDs remained as a deposit in skin and penetrated the surrounding viable subcutis, that QDs were distributed to draining lymph nodes through the s.c. lymphatics and to the liver and other organs, and that sentinel organs were effective locations for monitoring transdermal penetration of nanoscale materials into animals. Another application of QDs, which was initiated by Frangioni's group, is intraoperative lymph node mapping of various organs [13, 21-24, 26, 27, 42]. However, a biodistribution study has never been conducted. Our laboratory has performed biodistribution study in healthy mice after s.c. injection of commercial red-emitting QDs in the distal part of the right anterior paw [56]. Quantification of QDs has been realized *ex vivo* by spectrofluorometry. We have shown that QDs were present in the right axillary lymph node till 5 min post-injection (Fig. (3)) and at the point of injection but absent

from the other organs, plasma, urine and feces till 24 h after QDs administration. The maximum of QDs concentration in right axillary lymph node have been reached at 60 min post-injection and have decreased after 24 h. Thus, we have demonstrated the potential of QDs to detect axillary lymph nodes in mice after s.c. administration. Another route of QDs administration has been recently studied by Karabanovas and colleagues [66]. They have investigated the distribution of hydrophobic CdSe/ZnS core/shell QDs in the digestive tract of rats after oral administration of QDs. They have shown that QDs were degraded in the digestive system of animals and did not eliminate from the organism neither with urine nor excrements. It seems likely that QDs undergone chemical and enzymatic degradation in the organs of the digestive system. QDs were detected in oesophagus, stomach and duodenum but not in liver, pancreas and spleen.

4. CONCLUSION

QDs are the most promising biological nanoprobe for imaging, diagnostic, drug delivery or therapy. Various methods are used to detect QDs *in vivo* such as fluorescent or nuclear imaging systems (SPECT and PET). These different techniques make possible to follow QDs in a whole body over several days but give only a semi-quantitative aspect of QDs concentration *in vivo*. To measure QDs concentration, other quantitative methods have to be applied. The most significant techniques are those which detect QDs at the elementary level (Cd, Te, Se) after its degradation, such as ICP-MS and ICP-AES, followed by fluorescent and radioactivity measurements which allow to quantify directly QDs. However, these four last techniques can only be used *ex vivo* after resection and specific preparations of biological samples. Nevertheless, despite numerous techniques for the detection of QDs, biodistribution studies *in vivo* are sparse. After i.v. or i.d. injections of non-targeting QDs, the

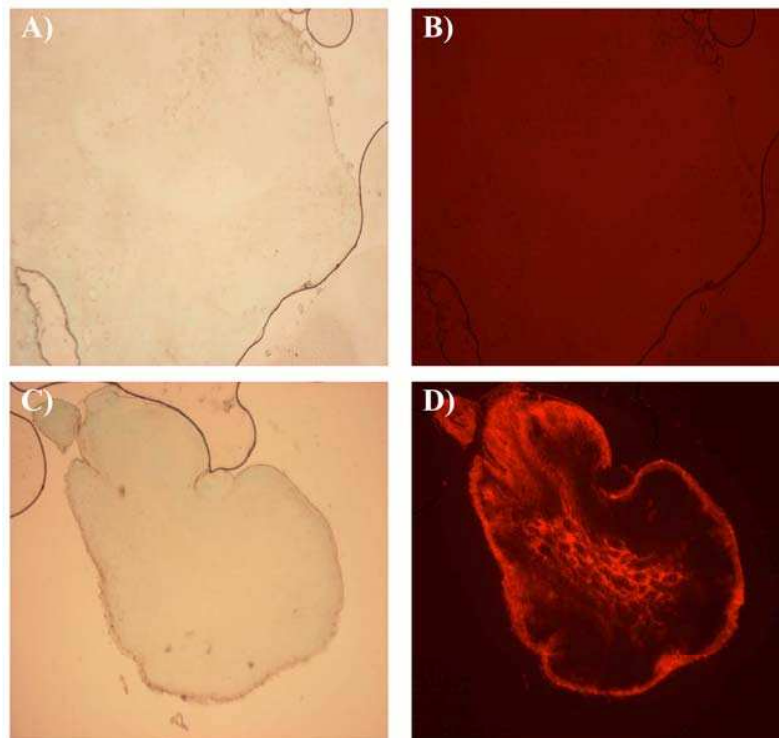


Fig. (3). Transmission and fluorescence microscopy images of axillary lymph node frozen sections. Nude mice were injected with 20 pmol of QDs or PBS (control) in the right anterior paw. Panels **A, B**: transmission and fluorescence images of axillary lymph node control; Panels **C, D**: transmission and fluorescence images of axillary lymph node 5 min after QDs injection (40 × enlargement). Robé and al. Quantum dots in axillary lymph node mapping: biodistribution study in healthy mice. *BMC Cancer*, 2008, 8, 111.

principal organ accumulating QDs is the liver followed by spleen what proves that QDs are uptaken by RES. However, after s.c. administration of non-specific QDs, they accumulate specifically in the regional axillary lymph node and are not notable in other organs. Thus, in function of the way of administration, the ligand or the size of QDs, it is possible to image, diagnose, target or treat a specific zone in the body.

ABBREVIATIONS

¹¹¹ In	= Indium-111
¹²⁵ I	= Iode-125
^{125m} Te	= 125-metastable-tellurium
⁶⁴ Cu	= Copper-64
^{99m} Tc	= 99-metastable-technetium
BSA	= Bovine serum albumin
EGF	= Epidermal growth factor
FDG	= Fluorodeoxyglucose
HD	= Hydrodynamic diameter
i.d.	= Intradermal
i.v.	= Inta-venous
ICP-AES	= Inductively coupled plasma - atomic emission spectroscopy
ICP-MS	= Inductively coupled plasma - mass spectroscopy
ICP-OES	= Inductively coupled plasma - optical emission spectrometry
ID	= Injected dose
ID/g	= Injected dose per gram of tissue
mAb	= Monoclonal antibody
ND	= No data
NIR	= Near infrared
PEG	= Polyethylene glycol
PET	= Positron emission tomography
QDs	= Quantum dots
RES	= Reticuloendothelial system
ROIs	= Region of interests
s.c.	= Subcutaneous
SPECT	= Single photon emission computed tomography
VEGF	= Vascular epidermal growth factor

REFERENCES

- Alivisatos, A.P. Semiconductor clusters, nanocrystals, and quantum dots. *Science*, **1996**, *271*, 933-937.
- Bruchez, M., Jr.; Moronne, M.; Gin, P.; Weiss, S.; Alivisatos, A.P. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. *Science*, **1998**, *281*(5385), 2013-2016.
- Murray, C.B.; Norris, D.G.; Bawendi, M.G. Synthesis and characterization of nearly monodisperse CdE (E = S, Se, Te) semiconductor nanocrystallites. *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115*, 8706-8715.
- Ipe, B.I.; Lehnig, M.; Niemeyer, C.M. On the generation of free radical species from quantum dots. *Small*, **2005**, *1*(7), 706-709.
- Derfus, A.; Chan, W.; Bhatia, S. Probing the Cytotoxicity of Semiconductor Quantum Dots. *Nano Lett.*, **2004**, *4*(1), 11-18.
- Jamieson, T.; Bakhshi, R.; Petrova, D.; Pocock, R.; Imani, M.; Seifalian, A.M. Biological applications of quantum dots. *Biomaterials*, **2007**, *28*(31), 4717-4732.
- Wang, X.; Yang, L.; Chen, Z.G.; Shin, D.M. Application of nanotechnology in cancer therapy and imaging. *CA Cancer J. Clin.*, **2008**, *58*(2), 97-110.
- Azzazy, H.M.; Mansour, M.M.; Kazmierczak, S.C. From diagnostics to therapy: prospects of quantum dots. *Clin. Biochem.*, **2007**, *40*(13-14), 917-927.
- Michalet, X.; Pinaud, F.F.; Bentolila, L.A.; Tsay, J.M.; Doose, S.; Li, J.J.; Sundaresan, G.; Wu, A.M.; Gambhir, S.S.; Weiss, S. Quantum dots for live cells, *in vivo* imaging, and diagnostics. *Science*, **2005**, *307*(5709), 538-544.
- Arayne, M.S.; Sultana, N. Nanoparticles in drug delivery for the treatment of cancer. *Pak J. Pharm. Sci.*, **2006**, *19*(3), 258-268.
- Hezinger, A.F.; Tessmar, J.; Gopferich, A. Polymer coating of quantum dots--a powerful tool toward diagnostics and sensorics. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **2008**, *68*(1), 138-152.
- Smith, A.M.; Ruan, G.; Rhyner, M.N.; Nie, S. Engineering luminescent quantum dots for *in vivo* molecular and cellular imaging. *Ann. Biomed. Eng.*, **2006**, *34*(1), 3-14.
- Frangioni, J.V.; Kim, S.W.; Ohnishi, S.; Kim, S.; Bawendi, M.G. Sentinel Lymph Node Mapping With Type-II Quantum Dots. *Methods Mol. Biol.*, **2007**, *374*, 147-160.
- Lee, H.A.; Imran, M.; Monteiro-Riviere, N.A.; Colvin, V.L.; Yu, W.W.; Riviere, J.E. Biodistribution of quantum dot nanoparticles in perfused skin: evidence of coating dependency and periodicity in arterial extraction. *Nano Lett.*, **2007**, *7*(9), 2865-2870.
- Jayagopal, A.; Russ, P.K.; Haselton, F.R. Surface engineering of quantum dots for *in vivo* vascular imaging. *Bioconjug. Chem.*, **2007**, *18*(5), 1424-1433.
- Tada, H.; Higuchi, H.; Wanatabe, T.M.; Ohuchi, N. *In vivo* real-time tracking of single quantum dots conjugated with monoclonal anti-HER2 antibody in tumors of mice. *Cancer Res.*, **2007**, *67*(3), 1138-1144.
- Cai, W.; Shin, D.W.; Chen, K.; Gheysens, O.; Cao, Q.; Wang, S.X.; Gambhir, S.S.; Chen, X. Peptide-labeled near-infrared quantum dots for imaging tumor vasculature in living subjects. *Nano Lett.*, **2006**, *6*(4), 669-676.
- Gao, X.; Chung, L.W.; Nie, S. Quantum dots for *in vivo* molecular and cellular imaging. *Methods Mol. Biol.*, **2007**, *374*, 135-146.
- Jackson, H.; Muhammad, O.; Daneshvar, H.; Nelms, J.; Popescu, A.; Vogelbaum, M.A.; Bruchez, M.; Toms, S.A. Quantum dots are phagocytized by macrophages and colocalize with experimental gliomas. *Neurosurgery*, **2007**, *60*(3), 524-529; discussion 529-530.
- Iga, A.M.; Robertson, J.H.; Winslet, M.C.; Seifalian, A.M. Clinical potential of quantum dots. *J. Biomed. Biotechnol.*, **2007**, *2007*(10), 76087.
- Parungo, C.P.; Colson, Y.L.; Kim, S.W.; Kim, S.; Cohn, L.H.; Bawendi, M.G.; Frangioni, J.V. Sentinel lymph node mapping of the pleural space. *Chest*, **2005**, *127*(5), 1799-1804.
- Kim, S.; Lim, Y.T.; Soltesz, E.G.; De Grand, A.M.; Lee, J.; Nakayama, A.; Parker, J.A.; Mihaljevic, T.; Laurence, R.G.; Dor, D.M.; Cohn, L.H.; Bawendi, M.G.; Frangioni, J.V. Near-infrared fluorescent type II quantum dots for sentinel lymph node mapping. *Nat. Biotechnol.*, **2004**, *22*(1), 93-97.
- Parungo, C.P.; Ohnishi, S.; Kim, S.W.; Kim, S.; Laurence, R.G.; Soltesz, E.G.; Chen, F.Y.; Colson, Y.L.; Cohn, L.H.; Bawendi, M.G.; Frangioni, J.V. Intraoperative identification of esophageal sentinel lymph nodes with near-infrared fluorescence imaging. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, **2005**, *129*(4), 844-850.
- Soltesz, E.G.; Kim, S.; Laurence, R.G.; DeGrand, A.M.; Parungo, C.P.; Dor, D.M.; Cohn, L.H.; Bawendi, M.G.; Frangioni, J.V.; Mihaljevic, T. Intraoperative sentinel lymph node mapping of the lung using near-infrared fluorescent quantum dots. *Ann. Thorac. Surg.*, **2005**, *79*(1), 269-277; discussion 269-277.
- Hama, Y.; Koyama, Y.; Urano, Y.; Choyke, P.L.; Kobayashi, H. Simultaneous two-color spectral fluorescence lymphangiography with near infrared quantum dots to map two lymphatic flows from the breast and the upper extremity. *Breast Cancer Res. Treat.*, **2007**, *103*(1), 23-28.
- Parungo, C.P.; Soybel, D.I.; Colson, Y.L.; Kim, S.W.; Ohnishi, S.; DeGrand, A.M.; Laurence, R.G.; Soltesz, E.G.; Chen, F.Y.; Cohn, L.H.; Bawendi, M.G.; Frangioni, J.V. Lymphatic drainage of the peritoneal space: a pattern dependent on bowel lymphatics. *Ann. Surg. Oncol.*, **2007**, *14*(2), 286-298.
- Soltesz, E.G.; Kim, S.; Kim, S.W.; Laurence, R.G.; De Grand, A.M.; Parungo, C.P.; Cohn, L.H.; Bawendi, M.G.; Frangioni, J.V. Sentinel lymph node mapping of the gastrointestinal tract by using invisible light. *Ann. Surg. Oncol.*, **2006**, *13*(3), 386-396.
- So, M.K.; Xu, C.; Loening, A.M.; Gambhir, S.S.; Rao, J. Self-illuminating quantum dot conjugates for *in vivo* imaging. *Nat. Biotechnol.*, **2006**, *24*(3), 339-343.

Quantification Techniques and Biodistribution

- [29] Maysinger, D.; Behrendt, M.; Lalancette-Hebert, M.; Kriz, J. Real-time imaging of astrocyte response to quantum dots: *in vivo* screening model system for biocompatibility of nanoparticles. *Nano Lett.*, **2007**, 7(8), 2513-2520.
- [30] Karwa, A.; Papazoglou, E.; Pourrezaei, K.; Tyagi, S.; Murthy, S. Imaging biomarkers of inflammation *in situ* with functionalized quantum dots in the dextran sodium sulfate (DSS) model of mouse colitis. *Inflamm. Res.*, **2007**, 56(12), 502-510.
- [31] Diagaradjane, P.; Orenstein-Cardona, J.M.; E Colon-Casasnovas, N.; Deorukhkar, A.; Shentu, S.; Kuno, N.; Schwartz, D.L.; Gelovani, J.G.; Krishnan, S. Imaging Epidermal Growth Factor Receptor Expression *In vivo*: Pharmacokinetic and Biodistribution Characterization of a Bioconjugated Quantum Dot Nanoprobe. *Clin. Cancer Res.*, **2008**, 14(3), 731-741.
- [32] Chen, H.; Wang, Y.; Xu, J.; Ji, J.; Zhang, J.; Hu, Y.; Gu, Y. Non-invasive Near Infrared Fluorescence Imaging of CdHgTe Quantum Dots in Mouse Model. *J. Fluoresc.*, **2008**, 18(5), 801-811.
- [33] Lidke, D.S.; Nagy, P.; Heintzmann, R.; Arndt-Jovin, D.J.; Post, J.N.; Grecco, H.E.; Jares-Erijman, E.A.; Jovin, T.M. Quantum dot ligands provide new insights into erbB/HER receptor-mediated signal transduction. *Nat. Biotechnol.*, **2004**, 22(2), 198-203.
- [34] Gao, X.; Cui, Y.; Levenson, R.M.; Chung, L.W.; Nie, S. *In vivo* cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots. *Nat. Biotechnol.*, **2004**, 22(8), 969-976.
- [35] Akerman, M.E.; Chan, W.C.; Laakkonen, P.; Bhatia, S.N.; Ruoslahti, E. Nanocrystal targeting *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **2002**, 99(20), 12617-12621.
- [36] Ballou, B.; Lagerholm, B.C.; Ernst, L.A.; Bruchez, M.P.; Waggoner, A.S. Noninvasive imaging of quantum dots in mice. *Bioconjug. Chem.*, **2004**, 15(1), 79-86.
- [37] Fischer, H.; Liu, L.; Pang, K.; Chan, W. Pharmacokinetics of Nanoscale Quantum Dots *In Vivo* Distribution, Sequestration, and Clearance in the Rat. *Adv. Funct. Mater.*, **2006**, 16, 1299-1305.
- [38] Weissleder, R.; Ntziachristos, V. Shedding light onto live molecular targets. *Nat. Med.*, **2003**, 9(1), 123-128.
- [39] Mahmood, U.; Tung, C.H.; Bogdanov, A., Jr.; Weissleder, R. Near-infrared optical imaging of protease activity for tumor detection. *Radiology*, **1999**, 213(3), 866-870.
- [40] Nakayama, A.; del Monte, F.; Hajjar, R.J.; Frangioni, J.V. Functional near-infrared fluorescence imaging for cardiac surgery and targeted gene therapy. *Mol. Imaging*, **2002**, 1(4), 365-377.
- [41] De Grand, A.M.; Frangioni, J.V. An operational near-infrared fluorescence imaging system prototype for large animal surgery. *Technol. Cancer Res. Treat.*, **2003**, 2(6), 553-562.
- [42] Knapp, D.W.; Adams, L.G.; Degrand, A.M.; Niles, J.D.; Ramos-Vara, J.A.; Weil, A.B.; O'Donnell, M.A.; Lucroy, M.D.; Frangioni, J.V. Sentinel lymph node mapping of invasive urinary bladder cancer in animal models using invisible light. *Eur. Urol.*, **2007**, 52(6), 1700-1708.
- [43] Kim, S.W.; Zimmer, J.P.; Ohnishi, S.; Tracy, J.B.; Frangioni, J.V.; Bawendi, M.G. Engineering InAs(x)P(1-x)/InP/ZnSe III-V alloyed core/shell quantum dots for the near-infrared. *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127(30), 10526-10532.
- [44] Tanaka, E.; Ohnishi, S.; Laurence, R.G.; Choi, H.S.; Humblet, V.; Frangioni, J.V. Real-time intraoperative ureteral guidance using invisible near-infrared fluorescence. *J. Urol.*, **2007**, 178(5), 2197-2202.
- [45] Ntziachristos, V.; Bremer, C.; Weissleder, R. Fluorescence imaging with near-infrared light: new technological advances that enable *in vivo* molecular imaging. *Eur. Radiol.*, **2003**, 13(1), 195-208.
- [46] Ntziachristos, V.; Ripoll, J.; Wang, L.V.; Weissleder, R. Looking and listening to light: the evolution of whole-body photonic imaging. *Nat. Biotechnol.*, **2005**, 23(3), 313-320.
- [47] Morgan, N.Y.; English, S.; Chen, W.; Chernomordik, V.; Russo, A.; Smith, P.D.; Gandjbakhche, A. Real time *in vivo* non-invasive optical imaging using near-infrared fluorescent quantum dots. *Acad. Radiol.*, **2005**, 12(3), 313-323.
- [48] Inoue, Y.; Izawa, K.; Yoshikawa, K.; Yamada, H.; Tojo, A.; Oh-tomo, K. *In vivo* fluorescence imaging of the reticuloendothelial

Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry, 2009, Vol. 9, No. 3 9

- system using quantum dots in combination with bioluminescent tumour monitoring. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **2007**, 34(12), 2048-2056.
- [49] McVeigh, E.R. Emerging imaging techniques. *Circ. Res.*, **2006**, 98(7), 879-886.
- [50] Soo Choi, H.; Liu, W.; Misra, P.; Tanaka, E.; Zimmer, J.P.; Itty Ipe, B.; Bawendi, M.G.; Frangioni, J.V. Renal clearance of quantum dots. *Nat. Biotechnol.*, **2007**, 25(10), 1165-1170.
- [51] Schipper, M.L.; Cheng, Z.; Lee, S.W.; Bentolila, L.A.; Iyer, G.; Rao, J.; Chen, X.; Wu, A.M.; Weiss, S.; Gambhir, S.S. microPET-based biodistribution of quantum dots in living mice. *J. Nucl. Med.*, **2007**, 48(9), 1511-1518.
- [52] Cai, W.; Chen, K.; Li, Z.B.; Gambhir, S.S.; Chen, X. Dual-Function Probe for PET and Near-Infrared Fluorescence Imaging of Tumor Vasculature. *J. Nucl. Med.*, **2007**, 48(11), 1862-1870.
- [53] Chen, K.; Li, Z.B.; Wang, H.; Cai, W.; Chen, X. Dual-modality optical and positron emission tomography imaging of vascular endothelial growth factor receptor on tumor vasculature using quantum dots. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **2008**, DOI: 10.1007/s00259-008-0860-8.
- [54] Manabe, N.; Hoshino, A.; Liang, Y.Q.; Goto, T.; Kato, N.; Yamamoto, K. Quantum dot as a drug tracer *in vivo*. *IEEE Trans. Nanobioscience*, **2006**, 5(4), 263-267.
- [55] Yang, R.S.; Chang, L.W.; Wu, J.P.; Tsai, M.H.; Wang, H.J.; Kuo, Y.C.; Yeh, T.K.; Yang, C.S.; Lin, P. Persistent Tissue Kinetics and Redistribution of Nanoparticles, Quantum Dot 705, in Mice: ICP-MS Quantitative Assessment. *Environ. Health Perspect.*, **2007**, 115(9), 1339-1343.
- [56] Robe, A.; Pic, E.; Lassalle, H.P.; Bezdetnaya, L.; Guillemin, F.; Marchal, F. Quantum dots in axillary lymph node mapping: biodistribution study in healthy mice. *BMC Cancer*, **2008**, 8, 111.
- [57] Woodward, J.D.; Kennel, S.J.; Mirzadeh, S.; Dai, S.; Wall, J.S.; Richey, T.; Avenell, J.; Rondinone, A.J. *In vivo* SPECT/CT imaging and biodistribution using radioactive Cd125mTe/ZnS nanoparticles. *Nanotechnology*, **2007**, 18(17), 1-5.
- [58] Kennel, S.J.; Woodward, J.D.; Rondinone, A.J.; Wall, J.; Huang, Y.; Mirzadeh, S. The fate of MAB-targeted Cd(125m)Te/ZnS nanoparticles *in vivo*. *Nucl. Med. Biol.*, **2008**, 35(4), 501-514.
- [59] Fischer, H.C.; Liu, L.; Pang, K.S.; Chan, W.C.W. Preliminary results: Exploring the interactions of quantum dots whole blood components. *Proc. of SPIE*, **2005**, 5969, 1-6.
- [60] Fischer, H.C.; Fournier-Bidoz, S.; Pang, K.S.; Chan, W.C.W. Quantitative detection of engineered nanoparticles in tissues and organs: an investigation of efficacy and linear dynamic using ICP-AES. *Nanobiotechnol.*, **2007**, 3, 46-54.
- [61] Gopee, N.V.; Roberts, D.W.; Webb, P.; Cozart, C.R.; Siitonen, P.H.; Warbritton, A.R.; Yu, W.W.; Colvin, V.L.; Walker, N.J.; Howard, P.C. Migration of intradermally injected quantum dots to sentinel organs in mice. *Toxicol. Sci.*, **2007**, 98(1), 249-257.
- [62] Chen, Z.; Chen, H.; Meng, H.; Xing, G.; Gao, X.; Sun, B.; Shi, X.; Yuan, H.; Zhang, C.; Liu, R.; Zhao, F.; Zhao, Y.; Fang, X. Biodistribution and metabolic paths of silica coated CdSeS quantum dots. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **2008**, 230(3), 364-371.
- [63] Ryman-Rasmussen, J.P.; Riviere, J.E.; Monteiro-Riviere, N.A. Penetration of intact skin by quantum dots with diverse physicochemical properties. *Toxicol. Sci.*, **2006**, 91(1), 159-165.
- [64] Ryman-Rasmussen, J.P.; Riviere, J.E.; Monteiro-Riviere, N.A. Surface coatings determine cytotoxicity and irritation potential of quantum dot nanoparticles in epidermal keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.*, **2007**, 127(1), 143-153.
- [65] Ryman-Rasmussen, J.P.; Riviere, J.E.; Monteiro-Riviere, N.A. Variables influencing interactions of untargeted quantum dot nanoparticles with skin cells and identification of biochemical modulators. *Nano Lett.*, **2007**, 7(5), 1344-1348.
- [66] Karabanovas, V.; Zakarevicius, E.; Sukackaite, A.; Streckyte, G.; Rotomskis, R. Examination of the stability of hydrophobic (CdSe)ZnS quantum dots in the digestive tract of rats. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2008**, 7(6), 725-729.

II.6. Localisation des ganglions lymphatiques

En 2004, l'équipe de Kim est la première à avoir utilisé des QDs pour localiser les ganglions axillaires chez la souris et les ganglions fémoraux chez le cochon ^[158]. Les QDs émettaient dans le PIR à 840-860 nm et ont été repérés *in vivo* dès 3 min après leur injection sous-cutanée (s.c.), en temps réel au moyen d'un imageur de fluorescence opérationnel développé au sein de leur groupe ^[156, 157]. De plus, ils ont administré de la même façon que les QDs, du bleu isosulfan 1 %, utilisé en clinique dans la technique du GS aux USA et ont montré une colocalisation de ces 2 marqueurs dans les ganglions étudiés. Les auteurs ont ainsi montré que les QDs pouvaient être utilisés comme agent de contraste pour la cartographie des ganglions lymphatiques.

Depuis, d'autres études ont été conduites, portant sur la localisation des ganglions lymphatiques gastro-intestinaux ^[162], de l'espace pleural ^[159], pulmonaires ^[163], de l'œsophage ^[160], de la peau ^[191], de l'aire axillaire ^[117, 192, 193] ou encore de la vessie ^[164] chez les rongeurs et le cochon, au moyen de QDs émettant dans le PIR, suite à leur injection i.v., s.c. ou directement dans l'organe d'intérêt et détectés par imagerie de fluorescence. Cependant, aucune équipe n'a suivi l'accumulation des QDs dans des ganglions au delà de 4 h après leur injection et aucune étude de biodistribution des QDs n'a été menée suite à une injection s.c. pour leur application dans la technique du GS.

II.7. Quantum dots en chirurgie oncologique : un rôle d'avenir pour le marquage des berges d'exérèse ?

Marchal F., **Pic E.**, Pons T., Dubertret B., Bolotine L., Guillemin F.

Bull Cancer, 2008, 95(12): 1149-1153.

Pour clore ce chapitre, nous présentons l'article du Pr. Frédéric Marchal auquel nous avons collaboré. Il présente les perspectives d'utilisation des QDs en chirurgie oncologique et en particulier dans la technique du GS, la détection de tumeurs primitives et des métastases ainsi que pour la délimitation des marges chirurgicales.

DOSSIER THÉMATIQUE

© John Libbey Eurotext

Bull Cancer 2008 ; 95 (12): 1149-53

Quantum dots en chirurgie oncologique : un rôle d'avenir pour le marquage des berges d'exérèse ?

*Quantum dots in oncological surgery:
the future for surgical margin status?*

F. MARCHAL¹
E. PIC¹
T. PONS²
B. DUBERTRET²
L. BOLOTINE¹
F. GUILLEMIN¹

¹ Centre de recherche en automatique
de Nancy,
université de Nancy,
CNRS, centre Alexis-Vautrin,
avenue de Bourgogne,
54511 Vandœuvre-les-Nancy, France
<f.marchal@nancy.fnclcc.fr>

² Laboratoire photons et matières,
CNRS UPRA 0005,
école supérieure de physique
et chimie industrielles,
10, rue Vauquelin,
75005 Paris, France

Article reçu le 29 septembre 2008,
accepté le 27 octobre 2008

Résumé. Les 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 brillance 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. Les QDs émettant dans le proche infrarouge trouvent leur application dans l'identification du ganglion sentinelle. La conjugaison des QDs avec des biomolécules peut servir à cibler les tumeurs *in vivo*. Cet article fait le point sur les récents développements en nanotechnologie, en détaillant les applications en chirurgie. ▲

Mots clés : quantum dots, fluorescence, chirurgie oncologique, marges

Abstract. Quantum dots (QDs) are semi-conductor nanocrystals that emit fluorescence on excitation with a light source. They have excellent optical properties, including high brightness and resistance to photobleaching. Their spectroscopic properties can be modulated by many factors. Recent progress in developing QDs enable us to control the size, shape and surface functionality of nanoparticles for potential application in cancer imaging. QDs with near-infrared emission could be applied to identify sentinel lymph-node. Conjugation of QDs with biomolecules could be used to target tumors *in vivo*. This article reviewed recent developments and issues in nanotechnology with a particular focus on applications to the surgery. ▲

Key words: quantum dots, fluorescence, oncological surgery, margins

Quantum dots

Les quantum dots (QDs) (boîtes quantiques) sont des cristaux fluorescents de semi-conducteurs de dimension nanométrique. Leurs propriétés photophysiques en font des colorants supérieurs aux marqueurs fluorescents organiques pour la détection et l'imagerie biologique. Schématiquement, un QD est constitué de deux parties, inorganique et organique (figure 1). La partie inorganique du nanocristal est composée de semi-conducteurs binaires des groupes d'éléments II-VI ou III-V de la table périodique et peut éventuellement avoir une structure cœur/coque [1]. Sa taille varie entre 2 et 10 nm (10^{-9} m) et sa forme est en général sphérique, mais de légères modifications des synthèses classiques permettent d'obtenir des QDs en forme de bâtonnets ou de tétrapodes. Enfin, des molécules organiques, appelées ligands, sont accrochées sur la surface du QD. Les ligands

ont deux rôles essentiels : ils empêchent les QDs de s'agréger lorsqu'ils sont en solution et ils passivent les états électroniques de la surface du QD [1].

Ces QDs possèdent des propriétés optiques très attractives du point de vue de leurs propriétés spectrales et de leur grande brillance et photorésistance [2]. Ils possèdent en effet des spectres d'émission de fluorescence très fins, dont la longueur d'onde dépend à la fois de la taille et du semi-conducteur utilisé, leur longueur d'onde se décalant vers le bleu lorsque la taille diminue (figure 2). Ainsi, les QDs les plus étudiés et utilisés ont un cœur composé de sélénure de cadmium (CdSe) et ont une longueur d'émission typiquement comprise entre le bleu (520 nm pour des cœurs de 2 nm de diamètre) et le rouge (655 nm pour des cœurs de 7 nm de diamètre). Des QDs de nouvelle génération, appelés type II, présentent un potentiel important pour l'imagerie *in vivo*. Ils sont constitués d'un cœur de tellure de cadmium (CdTe) entouré par une enveloppe CdSe. Ils émettent dans le rouge et le proche infrarouge (700–900 nm), la fenêtre

Tirés à part : F. Marchal

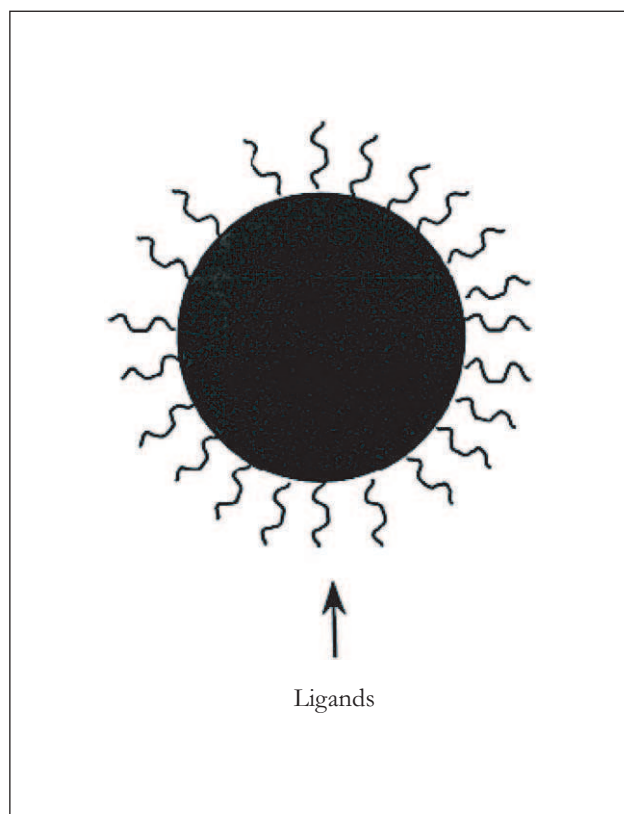


Figure 1. Représentation schématisée d'un quantum dot (QD) avec ses deux parties essentielles : le nanocrystal et les ligands de surface.

idéale pour l'imagerie *in vivo* permet de diminuer l'effet de l'absorption et de l'autofluorescence des tissus [3]. Enfin, les QDs possèdent un spectre d'excitation très large dans le bleu et l'ultraviolet. Avec la même longueur d'onde d'excitation (par exemple, 450 nm), il est ainsi possible de visualiser quatre ou cinq couleurs différentes, à l'aide d'un seul jeu de filtres [1], contrairement aux colorants organiques qui nécessitent chacun une longueur d'onde d'excitation différente.

En outre, les QDs présentent d'autres avantages comparés aux fluorophores traditionnels (vert d'indocyanine, fluorescéine...). Ils ont une brillance bien plus importante quand ils sont excités, en raison de leur très grand coefficient d'extinction molaire et de leur rendement quantique de fluorescence élevé. Ils sont également très résistants au photoblanchiment (c'est-à-dire à la perte d'émission de fluorescence après une certaine durée d'excitation), ce qui est crucial pour une imagerie en temps réel de longue durée. Cette photostabilité, bien supérieure aux marqueurs fluorescents organiques, a notamment permis de pousser la détection jusqu'à la visualisation de marqueurs uniques.

L'utilisation des QDs dans le domaine biologique a été longtemps retardée par des problèmes de solubilité en milieu aqueux. En effet, les QDs doivent être solubles et conserver trois propriétés essentielles : une fluorescence importante, une stabilité colloïdale et une faible adsorption non spécifique [4]. À l'issue de leur synthèse, les QDs sont recouverts de ligands hydrophobes. Pour les solubiliser dans l'eau, il

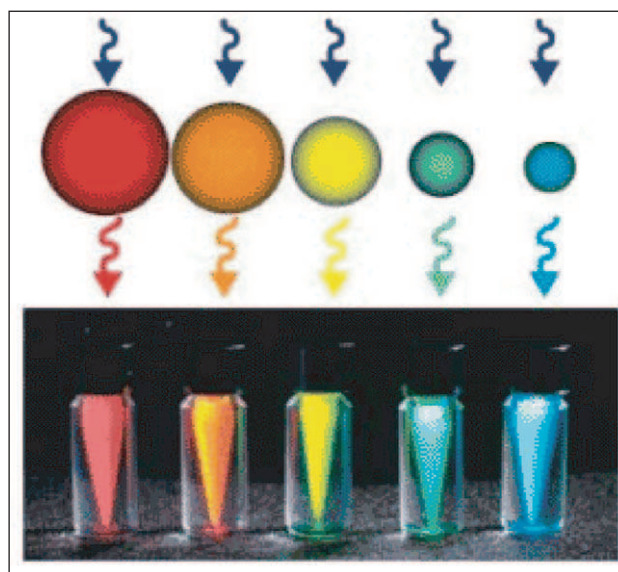


Figure 2. QD émettant à une longueur d'onde directement liée à leur taille.

faut les rendre hydrophiles tout en protégeant leur surface des charges présentes en solution (ces charges détruisent la fluorescence des QDs). Plusieurs stratégies existent pour cela. On peut, par exemple, effectuer un échange de ligands pour remplacer les ligands initiaux hydrophobes par des ligands hydrophiles. Il est également possible d'encapsuler les QDs hydrophobes à l'aide de molécules amphiphiles. Par exemple, l'équipe de Dubertret a ainsi montré qu'en gardant les ligands hydrophobes à la surface des dots, il était possible de les encapsuler au cœur d'une micelle de phospholipides (c'est-à-dire une boule de polymères orientés radialement comme les épines d'un hérisson) [2]. La stabilité de la micelle est très améliorée par la présence du QD en son cœur, et ces micelles sont stables pendant plusieurs mois en solution aqueuse. Cette nouvelle méthode d'encapsulation permet d'obtenir rapidement (10 minutes pour l'encapsulation, 2 heures pour la purification) des QD-micelles régulières, dont la taille, la forme et la structure sont homogènes. Après encapsulation, le diamètre hydrodynamique des QDs est compris entre 20 et 25 nm. L'encapsulation des QD au cœur d'une micelle permet en outre, de fonctionnaliser ces QDs. En effet, la micelle peut porter un ou plusieurs groupes réactifs sur lesquels il est possible de greffer, par exemple, des protéines ou des molécules d'ADN [4].

Cela offre aux chercheurs un champ d'investigation très large, que ce soit pour la détection biomoléculaire *in vitro* ou pour l'imagerie cellulaire *in vivo*. Wu et al. [5] ont utilisé des QDs couplés à la streptavidine pour des marquages immunologiques mettant, par exemple, en évidence la structure du cytosquelette ou d'autres cibles cellulaires de manière très détaillée. La photostabilité importante des QDs permet l'acquisition de multiples images de plan focal successif, de manière à reconstruire l'information en trois dimensions en haute résolution. Dahan et al., et Lidke et al. [6, 7] sont allés plus loin en visualisant en temps réel le mouvement de molécules uniques dans la cellule, ce qui était alors impossible avec des colorants organiques classi-

ques. La visualisation de molécules uniques au sein de la cellule ouvre de nouvelles perspectives dans l'étude de la dynamique de diffusion de récepteurs, dans l'interaction récepteur-ligand, le transport de biomolécules et l'activité enzymatique. Les QDs ont enfin apporté des développements importants pour la détection de biomolécules *in vitro*, comme la détection par marquage immunologique ou par transfert d'énergie de type Förster, pour la détection de petites molécules, de toxines, de protéines, d'ADN, etc.

Utilisation des QDs en chirurgie

• QD et ganglion sentinelle

Récemment, l'application des QDs *in vivo* a été développée pour la détection des ganglions sentinelles *in vivo* [8-13]. Les QDs sont injectés dans la tumeur et sont drainés par la lymphe jusqu'au ganglion sentinelle, qui peut être ensuite repéré par leur fluorescence. Dans les quatre études rapportées dans la littérature (à partir d'un modèle animal), les QDs utilisés ont des propriétés d'émission de fluorescence dans le proche infrarouge (800-850 nm), afin d'imager en profondeur dans le tissu biologique. Ces études démontrent la possible utilisation des QDs en peropératoire, afin d'obtenir des images en temps réel des ganglions sentinelles, de manière à ce que le chirurgien puisse les localiser et les enlever avec précision. L'intérêt des QD en remplacement du colloïde marqué et du colorant bleu est multiple. Il n'y a pas d'utilisation de produits radioactifs nécessitant une qualification et un environnement particuliers (sécurité vis-à-vis des radiations ionisantes). Leur utilisation est simple, nécessitant uniquement, soit une caméra pour l'imagerie, soit une sonde pour la détection peropératoire. Tout se fait en une seule fois, par opposition aux deux injections, celle du colloïde marqué et celle du bleu. Cela peut avoir un intérêt particulier pour les viscères profonds non accessibles de manière aisée à une injection préopératoire de radio-isotope (utérus, côlon, poumon, etc.) [14-16]. L'injection des QDs est faite en peropératoire, ce qui diminue le temps nécessaire pour obtenir l'information de localisation [8, 12]. L'avantage des QDs sur un colorant organique, comme le bleu, est que la fluorescence des QDs permet de les localiser en profondeur, au sein d'un tissu graisseux, beaucoup plus facilement qu'avec un colorant organique. L'étude anatomopathologique peut se focaliser peut-être plus précisément sur les zones fluorescentes, sites privilégiés de localisation des cellules cancéreuses.

Cependant, beaucoup de travaux restent à faire avant une utilisation de manière routinière. Notamment, le développement de QDs avec des propriétés plus spécifiques, à savoir un lymphotropisme accru, une plus faible toxicité, une émission de fluorescence encore plus intense dans le proche infrarouge.

QD et détection de la tumeur primitive et de ses métastases

Lorsqu'une cellule normale se transforme en cellule cancéreuse, son profil d'expression protéique change radicalement. Certaines protéines (antigènes) sont exprimées à la surface des cellules cancéreuses, comme par exemple MUC1 (CD227) qui est surexprimée dans 90 % des cancers mammaires humains [17] ou l'antigène prostatique membranaire

spécifique (PSMA). Ces antigènes fortement exprimés ne sont pas toujours nécessaires à la prolifération tumorale, mais peuvent être utilisés comme cible thérapeutique. Pour l'imagerie des tumeurs, ces antigènes servent de cibles ou de marqueurs pour le diagnostic. La reconnaissance de la tumeur primitive et l'identification de métastases régionales ou à distances sont possibles avec des QDs conjugués à des anticorps spécifiques de ces antigènes. Gao *et al.* ont utilisé des anticorps anti-PSMA couplés à des QDs CdSe pour marquer des tumeurs prostatiques [18]. Ces QDs étaient injectés par voie intraveineuse à des souris nudes porteuses de tumeurs prostatiques xénogreffées. Après 2 heures de circulation, ces QDs conjugués étaient localisés sur la tumeur [18].

Pour passer du stade de la recherche sur le petit animal au stade de la clinique, la recherche sur les QDs doit concentrer ses efforts à mettre en évidence les petites tumeurs non détectables par les méthodes d'imagerie conventionnelle, à la fois pour la tumeur primitive et les métastases, comme les micrométastases des ganglions sentinelles. Au-delà du système lymphatique, l'utilisation de QDs conjugués permettra d'identifier les micrométastases dans les organes solides. Cela permettra d'améliorer le *staging* peropératoire et d'adapter la chirurgie [19].

Perspectives et avenir : QDs et marges chirurgicales ?

L'utilisation de nanoparticules comme aide à la chirurgie a été rapportée seulement en neurochirurgie [20]. La délimitation entre tumeur et tissu sain est difficile, car souvent la texture ou la couleur est identique. Les nanoparticules utilisées sont composées d'oxyde de fer et servent en préopératoire pour l'imagerie IRM. Vingt-quatre heures après injection, ces nanoparticules enrobées de dextran se concentrent dix fois plus dans la tumeur que dans le tissu sain péri-tumoral [21]. En peropératoire, le contraste est suffisant pour pouvoir réséquer les gliomes en passant en zone saine tout en épargnant les tissus sains [22-24]. Un deuxième type de nanoparticules composées d'oxyde de fer et de polyacrylamide ont la particularité de se fixer à la périphérie de la tumeur, au niveau des cellules réactives comme les macrophages et les astrocytes [25]. Dans une autre étude, la clorotoxine, peptide ciblant le gliome, était attachée aux nanoparticules. Ces nanoparticules permettaient de réaliser l'imagerie préopératoire dans les gliosarcomes, de guider le geste de résection et de valider l'exérèse *in sano* en postopératoire grâce à leur longue durée de vie [23]. Les nanorods (nanoparticules en forme de bâtonnets) d'or sont aussi une alternative à l'imagerie peropératoire. Ce sont des particules biocompatibles, faciles à synthétiser, peu toxiques et résistantes au photoblanchiment [26].

L'utilisation des QDs comme marqueur des marges chirurgicales est une technique en devenir. L'utilisation de QDs couplés à des antigènes spécifiques de la tumeur permettra de visualiser la tumeur et ses micrométastases au pourtour de la tumeur primitive. Toutefois, plusieurs verrous technologiques doivent être levés avant de pouvoir passer en clinique humaine :

- la toxicité potentielle des QDs est due aux métaux lourds composant leur noyau. Les QDs ne sont pas toxiques tant que leur enveloppe de polymère reste stable [2, 27, 28]. Toutefois, des études toxicologiques et pharmacodynami-

ques sont nécessaires pour déterminer ce que deviennent à long terme les QDs injectés chez un animal. Sont-ils rapidement éliminés ou sont-ils stockés dans certains organes ou tissus ? L'autre voie de recherche est la mise au point de QDs sans métaux lourds, avec par exemple un cœur constitué de phosphate d'indium (InP) ;

- le ciblage spécifique des QDs nécessitera d'avoir accès à la tumeur primitive afin de déterminer quels sont les antigènes spécifiques de cette tumeur, pour pouvoir ensuite fixer des anticorps correspondants sur les QDs ;
- l'imagerie peropératoire doit être portable et facilement utilisable. Fluoptics, *start-up* grenobloise issue du CEA-Léti, a développé un appareil portable, le Fluobeam [29, 30]. Le Fluobeam (figure 3) permet de réaliser des mesures de fluorescence en proche infrarouge avec une excitation à 690 nm et une lecture des longueurs d'ondes supérieures à 750 nm. Ce système est optimisé pour des fluorochromes organiques ayant un maximum d'émission à 750 nm. Un système de filtrage approprié des sources de lumières ambiantes permet de travailler avec Fluobeam dans un environnement très éclairé, comme un champ opératoire, sans qu'il soit nécessaire d'être dans l'obscurité. Cette fonctionnalité permet de vérifier en temps réel les zones de fluorescence lors de l'exérèse chirurgicale. Cette caméra est couplée à un tomographe optique. Cet instrument permet, en effet, de reconstruire en 3D les zones de fluorescence à partir d'images prises sous différents angles et éclairages.



Figure 3. Sonde Fluobeam (Fluoptics) : instrument d'imagerie pour la chirurgie fonctionnant sur la base d'un système d'optique de fluorescence.

Conclusion

Le développement rapide des QDs a permis l'émergence de nouvelles technologies en médecine. Premièrement, l'encapsulation des QDs dans des polymères hydrosolubles ou au cœur de micelles de phospholipides a permis leur utilisation en milieu aqueux. Deuxièmement, les QDs sont relativement inertes et stables à court terme. Troisièmement, la conjugaison de ces QDs avec des biomolécules rend possible la détection des tumeurs et de leurs micrométastases. Mais il reste à augmenter la sensibilité, la spécificité et à minimiser la toxicité avant de pouvoir utiliser les QDs en pratique clinique, comme pour l'étude peropératoire des marges d'exérèse. ▼

RÉFÉRENCES

1. Dubertret B. Vers de nouveaux marqueurs fluorescents. *Photoniques* 2008 ; 8 : 56-60.
2. Dubertret B, Skourides P, Norris DJ, Noireaux V, Brivanlou AH, Libchaber A. *In vivo* imaging of quantum dots encapsulated in phospholipid micelles. *Science* 2002 ; 298 : 1759-62.
3. Zhang H, Yee D, Wang C. Quantum dots for cancer diagnosis and therapy: biological and clinical perspectives. *Nanomed* 2008 ; 3 : 83-91.
4. Dubertret B. A new fluorescent marker for *in vivo* imaging. *Med Sci (Paris)* 2003 ; 19 : 532-4.
5. Wu X, Liu H, Liu J, Haley KN, Treadway JA, Larson JP, et al. Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semi-conductor quantum dots. *Nat Biotechnol* 2003 ; 21 : 41-6.
6. Lidke DS, Nagy P, Heintzmann R, Arndt-Jovin DJ, Post JN, Grecco HE, et al. Quantum dots ligands provide new insights into erbB/HER receptor-mediated signal transduction. *Nat Biotechnol* 2004 ; 22 : 198-203.
7. Dahan M, Levi S, Luccardini C, Rostaing P, Riveau B, Triller A. Diffusion dynamics of glycine receptors revealed by single-quantum dot tracking. *Science* 2003 ; 302 : 442-5.
8. Soltesz EG, Kim S, Laurence RG, DeGrand AM, Parungo CP, Dor DM, et al. Intraoperative sentinel lymph node mapping of the lung using near-infrared fluorescent quantum dots. *Ann Thorac Surg* 2005 ; 79 : 269-77 (discussion -77).
9. Parungo CP, Colson YL, Kim SW, Kim S, Cohn LH, Bawendi MG, et al. Sentinel lymph node mapping of the pleural space. *Chest* 2005 ; 127 : 1799-804.
10. Parungo CP, Ohnishi S, Kim SW, Kim S, Laurence RG, Soltesz EG, et al. Intraoperative identification of esophageal sentinel lymph nodes with near-infrared fluorescence imaging. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005 ; 129 : 844-50.
11. Parungo CP, Soybel DI, Colson YL, Kim SW, Ohnishi S, DeGrand AM, et al. Lymphatic drainage of the peritoneal space: a pattern dependent on bowel lymphatics. *Ann Surg Oncol* 2007 ; 14 : 286-98.
12. Kim S, Lim YT, Soltesz EG, De Grand AM, Lee J, Nakayama A, et al. Near-infrared fluorescent type II quantum dots for sentinel lymph node mapping. *Nat Biotechnol* 2004 ; 22 : 93-7.
13. Yezhelyev MV, Gao X, Xing Y, Al-Hajj A, Nie S, O'Regan RM. Emerging use of nanoparticles in diagnosis and treatment of breast cancer. *Lancet Oncol* 2006 ; 7 : 657-67.

14. Clement D, Morel O, Malartic C, Akerman G, Barranger E. Hysteroscopic injection in sentinel node biopsy for endometrial cancer increases the frequency of para-aortic drainage: is it necessary to reconsider the role of para-aortic lymphadenectomy? *Bull Cancer* 2007 ; 94 : 675-9.
15. Narducci F, Sabban F, Vanlerenberghe E, Lesoin A, Chevalier A, Gauthier H, *et al.* What is new in the surgical treatment of pelvic gynecologic cancers? *Bull Cancer* 2006 ; 93 : 43-9.
16. Querleu D, Leblanc E, Ferron G, Narducci F, Rafii A, Martel P. Laparoscopic surgery and gynaecological cancers. *Bull Cancer* 2007 ; 94 : 1063-71.
17. Mukherjee P, Tinder TL, Basu GD, Pathangey LB, Chen L, Gendler SJ. Therapeutic efficacy of MUC1-specific cytotoxic T lymphocytes and CD137 co-stimulation in a spontaneous breast cancer model. *Breast Dis* 2004 ; 20 : 53-63.
18. Gao X, Cui Y, Levenson RM, Chung LW, Nie S. *In vivo* cancer targeting and imaging with semi-conductor quantum dots. *Nat Biotechnol* 2004 ; 22 : 969-76.
19. McElroy M, Kaushal S, Luiken GA, Talamini MA, Moossa AR, Hoffman RM, *et al.* Imaging of primary and metastatic pancreatic cancer using a fluorophore-conjugated anti-CA19-9 antibody for surgical navigation. *World J Surg* 2008 ; 32 : 1057-66.
20. Elder JB, Liu CY, Apuzzo ML. Neurosurgery in the realm of 10(-9), Part 2: applications of nanotechnology to neurosurgery - present and future. *Neurosurgery* 2008 ; 62 : 269-84 (discussion 84-5).
21. Moore A, Marecos E, Bogdanov Jr. A, Weissleder R. Tumoral distribution of long-circulating dextran-coated iron oxide nanoparticles in a rodent model. *Radiology* 2000 ; 214 : 568-74.
22. Hunt MA, Bago AG, Neuwelt EA. Single-dose contrast agent for intraoperative MR imaging of intrinsic brain tumors by using ferumoxtran-10. *AJNR Am J Neuroradiol* 2005 ; 26 : 1084-8.
23. Veiseh O, Sun C, Gunn J, Kohler N, Gabikian P, Lee D, *et al.* Optical and MRI multifunctional nanoprobe for targeting gliomas. *Nano Lett* 2005 ; 5 : 1003-8.
24. Sun C, Veiseh O, Gunn J, Fang C, Hansen S, Lee D, *et al.* *In vivo* MRI detection of gliomas by chlorotoxin-conjugated superparamagnetic nanoprobe. *Small* 2008 ; 4 : 372-9.
25. Muldoon LL, Tratnyek PG, Jacobs PM, Doolittle ND, Christoforidis GA, Frank JA, *et al.* Imaging and nanomedicine for diagnosis and therapy in the central nervous system: report of the eleventh annual Blood-Brain Barrier Disruption Consortium meeting. *AJNR Am J Neuroradiol* 2006 ; 27 : 715-21.
26. Durr NJ, Larson T, Smith DK, Korgel BA, Sokolov K, Ben-Yakar A. Two-photon luminescence imaging of cancer cells using molecularly targeted gold nanorods. *Nano Lett* 2007 ; 7 : 941-5.
27. Stroh M, Zimmer JP, Duda DG, Levchenko TS, Cohen KS, Brown EB, *et al.* Quantum dots spectrally distinguish multiple species within the tumor milieu *in vivo*. *Nat Med* 2005 ; 11 : 678-82.
28. Jaiswal JK, Mattoussi H, Mauro JM, Simon SM. Long-term multiple color imaging of live cells using quantum dot bioconjugates. *Nat Biotechnol* 2003 ; 21 : 47-51.
29. Koenig A, Boutet J, Herve L, Berger M, Dinten JM, Da Silva A, *et al.* Fluorescence diffuse optical tomographic (fDOT) system for small animal studies. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2007 : 2626-9.
30. Koenig A, Herve L, Josserand V, Berger M, Boutet J, Da Silva A, *et al.* *In vivo* mice lung tumor follow-up with fluorescence diffuse optical tomography. *J Biomed Opt* 2008 ; 13 : 011008.

***Localisation du ganglion
axillaire au moyen de
quantum dots et étude de
biodistribution par
spectrofluorimétrie***

Chapitre II : Localisation du ganglion axillaire au moyen de quantum dots et étude de biodistribution par spectrofluorimétrie

I. Résumé

De nombreuses équipes ont utilisé les QDs pour la détection et la localisation des ganglions lymphatiques suite à une injection i.v. ou s.c. chez le rongeur (rats et souris) et le cochon. Cependant, aucune équipe n'a réalisé d'étude de biodistribution des QDs suite à leur administration s.c. pour cette application médicale. Ainsi, notre équipe est la première à avoir étudié la distribution tissulaire de QDs émettant dans le rouge suite à leur injection s.c. chez la souris, dans le but de localiser le ganglion axillaire (GA).

Vingt picomoles de QDs (CdSe/ZnS, cœur/coque) commerciaux, fonctionnalisés avec des groupements carboxyles et émettant à 655 nm ont été injectés en s.c. chez la souris nude dans la partie supérieure de la patte antérieure droite. Les animaux ont été sacrifiés à 5, 15, 30, 60 min et 24 h après administration des QDs.

La cinétique d'accumulation des QDs dans le GA homolatéral a été suivie *in vivo* par spectrofluorimétrie fibrée jusqu'à 24 h, suite à une incision de la peau au niveau du GA (méthode mini-invasive). Les QDs ont été détectés dès 5 min post-injection dans le GA avec un maximum d'émission de fluorescence mesuré à 60 min et une baisse de fluorescence observée ensuite à 24 h.

Ces résultats ont été corroborés *ex vivo* suite à l'extraction chimique des QDs présents dans le GA, dont la concentration a été évaluée par spectrométrie de fluorescence. En effet, les QDs ont été retrouvés dans le ganglion dès 5 min avec un maximum à 60 min correspondant à une concentration de 209 ± 75 pmol/g, soit 2,42 % DI. Les QDs ont également été dosés dans différents organes ainsi que le plasma, les urines et les fèces pendant toute la période d'expérimentation. Les résultats ont montré que les QDs n'étaient pas détectés dans ces autres organes, ainsi que dans le plasma et les excréments.

La réalisation de coupes congelées sur les organes prélevés avec observation au microscope de fluorescence ont confirmé ces résultats. En effet, seules les coupes de GA ont présenté de la fluorescence rouge, indiquant la présence de QDs. Ces coupes ont également

permis de localiser les QDs au sein du GA. Les QDs étaient présents dans tout le ganglion mais s'accumulaient de façon préférentielle dans la capsule et la medulla du ganglion.

Ainsi, il a été démontré que ces QDs permettaient la visualisation du GA homolatéral *in vivo* après injection s.c. d'une faible quantité de QDs (20 pmol) par spectrofluorimétrie fibrée. De plus, les QDs ont été rapidement captés par le ganglion (dès 5 min après injection) et y sont restés piégés pendant 24 h. Cette technique mini-invasive associée à l'extraction chimique et la microscopie de fluorescence des QDs ont permis de mettre en évidence l'accumulation rapide et sélective des QDs dans le GA.

II. “Quantum dots in axillary lymph node mapping: biodistribution study in healthy mice”

Robe A., Pic E., Lassalle H.P., Bezdetnaya L., Guillemin F., Marchal F.

BMC Cancer, 2008, 8: 111.

Research article

Open Access

Quantum dots in axillary lymph node mapping: Biodistribution study in healthy mice

Anne Robe, Emilie Pic, Henri-Pierre Lassalle, Lina Bezdetnaya, François Guillemin and Frédéric Marchal*

Address: CRAN, Nancy-University, CNRS, Centre Alexis Vautrin, Avenue de Bourgogne, 54511 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France

Email: Anne Robe - a.robe@nancy.fnclcc.fr; Emilie Pic - e.pic@nancy.fnclcc.fr; Henri-Pierre Lassalle - h.lassalle@nancy.fnclcc.fr; Lina Bezdetnaya - l.bolotine@nancy.fnclcc.fr; François Guillemin - f.guillemin@nancy.fnclcc.fr; Frédéric Marchal* - f.marchal@nancy.fnclcc.fr

* Corresponding author

Published: 22 April 2008

Received: 8 September 2007

BMC Cancer 2008, 8:111 doi:10.1186/1471-2407-8-111

Accepted: 22 April 2008

This article is available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/8/111>

© 2008 Robe et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: Breast cancer is the first cause of cancer death among women and its incidence doubled in the last two decades. Several approaches for the treatment of these cancers have been developed. The axillary lymph node dissection (ALND) leads to numerous morbidity complications and is now advantageously replaced by the dissection and the biopsy of the sentinel lymph node. Although this approach has strong advantages, it has its own limitations which are manipulation of radioactive products and possible anaphylactic reactions to the dye. As recently proposed, these limitations could in principle be by-passed if semiconductor nanoparticles (quantum dots or QDs) were used as fluorescent contrast agents for the *in vivo* imaging of SLN. QDs are fluorescent nanoparticles with unique optical properties like strong resistance to photobleaching, size dependent emission wavelength, large molar extinction coefficient, and good quantum yield.

Methods: CdSe/ZnS core/shell QDs emitting around 655 nm were used in our studies. 20 μ L of 1 μ M (20 pmol) QDs solution were injected subcutaneously in the anterior paw of healthy nude mice and the axillary lymph node (ALN) was identified visually after injection of a blue dye. *In vivo* fluorescence spectroscopy was performed on ALN before the mice were sacrificed at 5, 15, 30, 60 min and 24 h after QDs injection. ALN and all other organs were removed, cryosectioned and observed in fluorescence microscopy. The organs were then chemically made soluble to extract QDs. Plasmatic, urinary and fecal fluorescence levels were measured.

Results: QDs were detected in ALN as soon as 5 min and up to 24 h after the injection. The maximum amount of QDs in the ALN was detected 60 min after the injection and corresponds to 2.42% of the injected dose. Most of the injected QDs remained at the injection site. No QDs were detected in other tissues, plasma, urine and feces.

Conclusion: Effective and rapid (few minutes) detection of sentinel lymph node using fluorescent imaging of quantum dots was demonstrated. This work was done using very low doses of injected QDs and the detection was done using a minimally invasive method.

Background

Breast cancer is the first cause of cancer death with a 100% rising in incidence from 1980 to 2000 and 35% growth in mortality [1]. Axillary lymph node dissection (ALND) is the standard surgical treatment in breast cancer patients. It consists in whole lymphatic axillary chain removal with the aim to reveal presence of metastases by histology analyses. However, this procedure leads to numerous morbidity problems such as pain, lymphocel, restriction of arm motion, chronic lymphedema, paresthesia, and, as a consequence, deterioration of life quality. For these reasons, an alternative treatment consisting in the sentinel lymph node (SLN) biopsy has been met with enthusiasm by clinicians. The SLN is the first node in the lymphatic basin into which drains the primary tumour [2]. As a result, axillary lymph node status is the most important prognostic factor and a determinant in the choice of therapy [3]. SLN biopsy consists in ^{99m}Tc -radiolabeled sulfur colloid injection the day before surgery in peritumoral or periareolar area [4] followed by lymphoscintigraphy to identify radioactive lymph node(s). During the surgery, a blue dye is injected in the same way and SLN is thus identified as blue and hot lymph node, one of these criterions only is not sufficient for a successful SLN identification [5]. Despite the significant improvement of SLN biopsy over ALND, the problems related to potential radiation hazards along with an extra cost of the radioisotope, to allergic reactions after blue dye injection and the overall procedure duration are limiting factors for this technique [6]. The ideal method should be sensitive, accurate, rapid, non invasive, non radioactive, and potentially usable in a laparoscopic setting for gastrointestinal tumors [7]. None of the current methods fulfills all of these criteria. Lymphatic mapping with blue dye results in a high rate of false-positive nodes because the small dye particles can readily diffuse through the true SLN and traverse multiple nodes [8]. Additionally, blue dye has poor tissue contrast and is difficult to detect in deep, dark anatomical regions such as the abdomen. Although the use of radioisotope tracers has improved the detection rate and accuracy of SLN mapping, the high radioactivity of the primary injection site can interfere with intraoperative *in vivo* detection of nearby nodes [3]. Additionally, if radioisotopes are injected during surgery, the time period required for the tracer to migrate to the SLN may delay the operative procedure. Conversely, preoperative injection of the radiocolloid tracer often necessitates anywhere from 2 to 16 hours before surgery. This is difficult, if not impossible, to accomplish and is applicable only in endoscopically accessible regions of the colon and stomach [7].

Quantum dots (QDs) are fluorescent inorganic nanometer sized crystals with remarkable unique optical and electronic properties. They are composed of a fluorescent core of semiconductor heavy metals. In order to limit their

potentially toxic effects due to the release of Cd^{2+} or Se^{2-} ions in case of oxidation of the core (by ultraviolet (UV) light or oxygen) and to passivate the defects on its surface, this core is encapsulated in a shell of organic material, polymeric or lipid-based layers then coat the shell. They have a good quantum yield and absorption cross-section such that single QD fluorescence imaging is possible in cells. QDs have been already applied to visualize SLN in gastrointestinal tract [7], pleural space [9], lung area [10], oesophageal area [11], skin [12] and axilla [13] using infrared light. Recently, red and infra-red emitting QDs were imaged in inguinal and axillary lymph nodes in tumor bearing mice already 3 min after local injection [14]. Major difficulty in using QDs *in vivo* is their unknown potential toxicity. However, it has been demonstrated that the injection of 2.10^9 QDs/cell in *xenopus* embryos unaltered their phenotype and health [15] and that QDs triggered apoptosis via reactive oxygen species (ROS) production only when they are not coated with ZnS [16,17]. QDs toxicity study is ultimately related to the investigation of their biodistribution in pre-clinical models. Currently, only few detailed works on QDs biodistribution in rodents have been realized [18-20].

The primary objective of this work was to detect and quantify at different times after the injection the selective accumulation of carboxyl coated QDs in axillary draining lymph nodes. Secondly, we assessed the biodistribution of QDs in different tissues by fluorescence microscopy and chemical extraction procedures. The rationale for the choice of carboxyl coating was based on the observation that negative charge confine to QDs certain selectivity to reticuloendothelial system (RES) [21] along with the excellent retention in lymph nodes [22]. Red emitting 655 nm QDs were considered in this study because of their better fluorescence quantum yield compared to that of IR QDs (fluorescence quantum yield) allowing better quantification with regard to detection level of spectroscopic tools.

Methods

Animals

Eight to twelve weeks old female athymic Fox nude mice (Hsd: Athymic Nude-Foxn1nu) (Harlan, Gannat, France) weighing from 15 to 25 g were used in these experiments. Mice were kept in 12 h light/dark cycle and had access to food and water *ad libitum* until 24 h before the experimentation. Starvation was performed 24 h before manipulation because of possible food fluorescence interference at the emission wavelength of the QDs. Animal procedures were performed in compliance with institutional and national guidelines. Six groups of animals, each composed of 5 mice, were used for lymphotropism and biodistribution studies: one control group who received only phosphate buffer saline (PBS), and five experimental

groups injected with QDs. All experiments were performed under anesthetic using intraperitoneal injection of 0.01 mL/g of body weight of a solution containing 8 mg/mL ketamine (Ketalar®, Panpharma, Fougères, France) and 0.8 mg/mL xylazine (Rompun®, Bayer Pharma, Puteaux, France).

Quantum Dots and administration

Quantum Dots (QDs) with a maximum emission peaks at 655 nm were purchased from Quantum Dot Corporation (Qdot® 655 ITK™ carboxyl). These QDs are described by the manufacturer as CdSe/ZnS core/shell nanoparticles coated with a polymer having an excess of carboxylic acid groups. Their characteristics include : 16 nm diameter, 94% size monodispersity, extinction coefficient of 800.000 M⁻¹ cm⁻¹ at 638 nm, and a fluorescence quantum yield of 80% with a full width at half maximum of 28 nm. Twenty µL of a 1 µM (20 pmol) QDs solution was injected subcutaneously in the distal part of the right anterior paw, together with 20 µL of 1% patent V blue 2.5%® (Guerbet, Roissy CdG, France) as reference method. The paw was kneaded to allow migration of QDs and blue dye. Mice were sacrificed at 5, 15, 30, 60 min and 24 h after injection by cervical dislocation.

In vivo fluorescence spectroscopy

In situ quantification of fluorescence was carried out using laser-induced fluorescence (LIF) as described previously [23]. Two optical fibers were held in direct contact with the axillary lymph node (ALN). One fiber was coupled to a krypton laser (410 nm) to ensure excitation. The second fiber was coupled to a spectrograph (USB2000, Ocean Optics, Dunedin, FL, USA) and a CCD captor transferred to a PC for a fluorescence spectrum acquisition. The fluorescence of the rhodamine B (1 µM in water) was used for the calibration of the excitation light intensity. Fluorescence measurements were performed at three different sites: on the skin away from injection site (belly skin), on the LN through the skin and after skin removal *in vivo*. The measurements were performed at 5, 15, 30, 60 min and 24 h after QDs injection. Measurements in control group were performed at 24 h after PBS injection.

Fluorescence microscopy

After sacrifice, ALN, bladder, belly skin, spleen, kidney, heart, lung, brain, stomach, liver and intestine were removed and frozen at -80°C. Six micron frozen sections of all organs were prepared after embedding in Tissue Tek® (Sakura Finetek, Torrance, CA, USA). Fluorescence was observed under an upright epifluorescence microscope (AX-70 Provis, Olympus, Rungis, France) equipped with a 100 W mercury vapor lamp and a Peltier cooled CCD camera (DP50, Olympus). The filter set consisted of a 400–440 nm band pass excitation filter associated with a

570 nm dichroic mirror and a 590 nm long pass filter. Fluorescence images were recorded using × 40 enlargement.

Quantitative determination of QDs

Organs were removed at time points indicated above, weighed and made soluble in Solvable® (Perkin-Elmer, Courtaboeuf, France). Solvable® was added proportionally to organ weight (0.5 mL for a weight ≤ 50 mg, 1.0 mL for a weight ≤ 200 mg and 1.5 mL for a weight ≤ 300 mg). Organs were next incubated at 50°C until the samples become soluble. A sample of each organ, except ALN and bladder, was 40 times diluted in PBS and analyzed by spectrofluorometry (Xenius, SAFAS, Monaco). An excitation wavelength of 350 nm was used and the spectra were collected between 600 and 690 nm. In a parallel set of experiments, a calibration curve for each organ was established while adding a known concentration of QDs to tissue of interest and the fluorescence of the resulting mixture was measured. Blood samples were collected through cardiac puncture in heparinized and cooled tubes 5, 15, 30, 60 min and 24 h after QDs injection. Samples were centrifuged at 3000×g for 10 min at 4°C. Plasma was recovered, ten fold diluted and its fluorescence emission under 450 nm excitation was measured using a spectrofluorometer (PerkinElmer LS50B, Courtaboeuf, France). Urine and feces were collected daily during 2 days. Urine was 10 fold diluted, feces were made soluble by Solvable® at 50°C and the fluorescence of both samples was measured by spectrofluorometry (PerkinElmer LS50B, Courtaboeuf, France) using a 350 nm excitation wavelength.

Statistical analyses

The non-parametric test of Kruskal-Wallis was employed to establish statistical significance. Mann-Whitney's U test was subsequently used to compare two by two the groups for which Kruskal-Wallis test was significant. All analyses were performed on StatView® 5.0 software (Abacus concepts, Berkeley, CA, USA) and all results values were expressed by mean ± SEM (standard error of the mean), * for $P < 0.05$ and ** for $P < 0.01$ compared to the control group.

Results

Chemical extraction of QDs in axillary lymph node

Chemical extraction (Figure 1) of QDs in ALN revealed the presence of 40 ± 12 pmol/g tissue in the ALN already 5 min after injection with a maximum of 209 ± 75 pmol/g at 60 min after injection. Approximately a 4 fold fluorescence decrease was observed 24 h post-injection (47 ± 8 pmol/g) ($P = 0.0088$ for all groups). The percentage of migrated QDs (Table 1) has been derived from Figure 1 by calculating the ratio between the quantity of QDs in ALN and the quantity of QDs at the injection (20 pmol). The amount of QDs that migrated to the lymph node 60 min

Table 1: Percentage of QDs injected quantity detected in ALN by spectrofluorometry after chemical extraction.

5 min	15 min	30 min	60 min	24 h
0.47 ± 0.21% **	0.27 ± 0.10% **	1.00 ± 0.47% **	2.42 ± 0.57% **	1.24 ± 0.34% **

20 pmol were injected subcutaneously in the anterior paw of nude mice. After sacrifice at 5 min, 15 min, 30 min, 60 min and 24 h after injection, ALN was removed, solubilized and the fluorescence of the solution was measured and is expressed as a percentage of the injected dose. Values were expressed by mean ± SEM, values marked with asterisk were significantly different from control ($P < 0.01$). QDs: Quantum Dots; ALN: Axillary Lymph Node

after the injection corresponds to 2.42% of the total injected dose.

Fluorescence microscopy experiments

Figure 2 displays typical transmission and fluorescence images of lymph nodes frozen sections in control ALN 5 min post-injection. Compared to the background fluorescence, the QDs treated lymph nodes exhibited a distinct fluorescence in the trabecular and medullar sinuses (Figure 2, panel D). It should be noted that QDs fluorescence detected in other examined organs (brain, bladder, spleen, kidneys, heart, lungs, liver and intestine) was not different (data not shown) from the autofluorescence observed in a control lymph node (Figure 2, panel B).

QDs biodistribution in organs

Mice were injected with QDs, sacrificed 24 h after injection, all organs were removed and subjected to chemical extraction. Figure 3 exhibits typical fluorescence spectra of ALN, liver, lungs, spleen and kidneys. Except for the ALN, no fluorescence peak at 655 nm was detected in the samples. Similar results were found for all time points (5, 15, 30, 60 min and 24 h) and all other tested organs, namely brain, bladder, heart, intestine and skin (data not shown). In a parallel set of experiments we have computed the detection limit of the QDs concentration for each organ using the fluorescence calibration curve. The detection limit ranges from 0.72 pmol of QDs per g of tissue for the bladder to 4.2 pmol/g of tissue for the liver (Table 2). This suggests that the QDs signal in each organ is below the

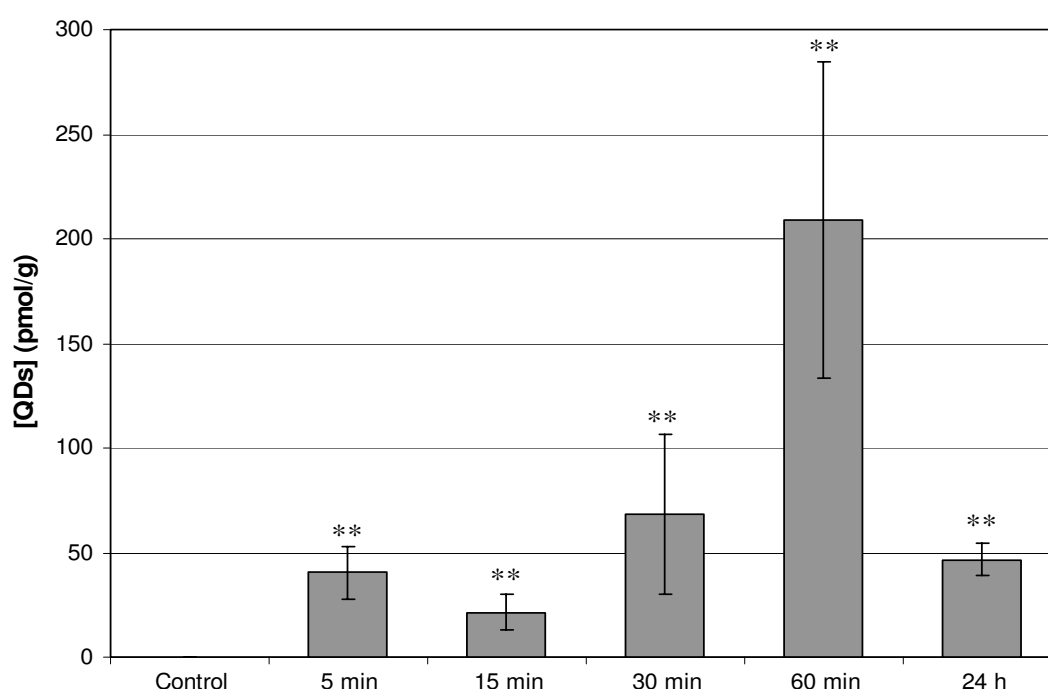


Figure 1

Concentration of QDs (pmol/g) detected in ALN. 20 pmol were injected subcutaneously in the distal part of the right anterior paw of nude mice. Mice were sacrificed at 5, 15, 30, 60 min and 24 h after injection. Concentration of QDs (pmol/g) was detected in ALN by spectrofluorometry after chemical extraction. Error bars represent SEM, values marked with asterisk were significantly different from control ($P < 0.01$). ALN: Axillary Lymph Node; QDs: Quantum Dots.

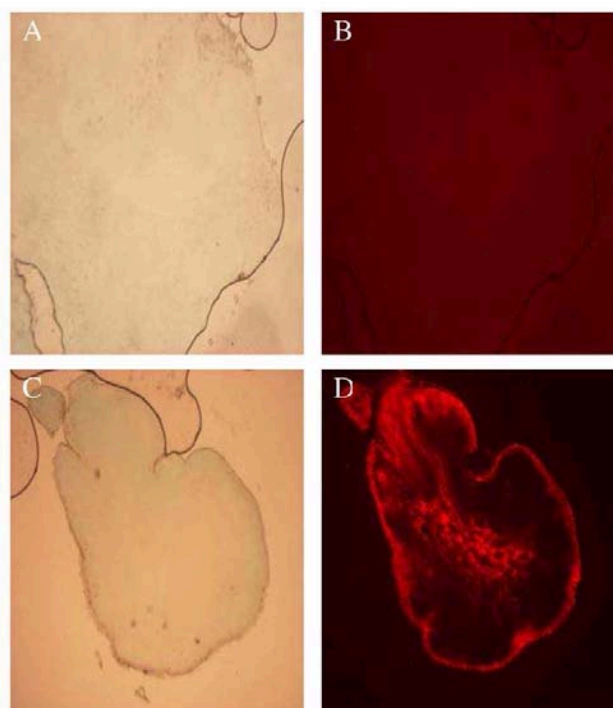


Figure 2
Transmission and fluorescence microscopy images of ALN frozen sections. Nude mice were injected with 20 pmol of QDs or PBS (control) in the distal part of the right anterior paw. Panels A, B: transmission and fluorescence images of ALN control; Panels C, D: transmission and fluorescence images of ALN 5 min after QDs injection (40 × enlargement). ALN: Axillary Lymph Node; QDs: Quantum Dots.

detection thresholds. Extraction of the QDs in the urine and feces was also performed at 48 h post-injection and no fluorescence was detected in the sample pointing out that QDs were not excreted from the body.

Kinetic of QDs accumulation in lymph nodes by LIF

The *in vivo* kinetics of the QD accumulation in the lymph nodes were studied using fluorescence measurements performed on the animal with a optical fiber spectrofluorometer. No significant fluorescence difference was found concerning the skin aside from the injection point after QDs administration, suggesting that QDs do not migrate into the skin. While QDs emission in the ALN was not

detected across the skin, a clear signal was evidenced after incision of the skin and measurement on the ALN (called ALN *in vivo*) (Figure 4) ($P = 0.0209$ for 5, 15, 30 min; $P = 0.0339$ for 60 min and $P = 0.0143$ for 24 h). A very strong fluorescence signal was observed as early as 5 min post-injection (1.79 ± 0.97). *In vivo* measured animals exhibited a persistent fluorescence till 60 min observation (3.78 ± 1.36). Except of 30 min time point, we observed a gradual increase in fluorescence till 60 min. This time point (30 min) is likely suffered from a complexity of optical measurements. A considerable fluorescence decrease was observed at 24 h post-injection (1.40 ± 0.46). Measurements performed at the injection site showed very high intensity peak (ca. 4000 a.u.) with no marked difference in intensity during observation time, till 24 h (data not shown). This suggested that the majority of the injected quantity remained at the injection site.

Discussion

In vivo biodistribution studies of QDs are sparse and deal mostly with intravenously (IV) injected QDs. The general consensus is that QDs distribution depends on their physicochemical properties and in particular, size and coating. Tracer particle size has an important effect on migration time in SLN mapping. Particles < 5 nm diffuse into blood, those between 5 to 10 nm can migrate through nodal tissue and result in false-positive results, and those > 1000 nm largely remain at the injection site. Consequently, we choose QDs with a diameter of 16 nm, since a size range between 15 and 20 nm is optimal to enable the QDs to travel through the lymph channels and be trapped by SLN [9,12]. Concerning coating, we choose carboxyl coated QDs. The carboxyl groups present the property to be negatively charged and therefore display rapid uptake in lymphatics and excellent retention in lymph nodes [12,21,24].

To our knowledge, a single biodistribution study was carried out after non-IV administration of QDs. Gopee *et al.* [19] investigated the distribution in healthy mice of 48 pmol intradermally (ID) injected QDs with a diameter of 37 nm and PEG coating. The authors did not find any QDs in lymph nodes until 12 h after injection, whereas we could detect them already 5 minutes following the injection (Figure 1). An early detection (3 min) of QDs traveling toward inguinal nodes was observed after intratumoral injection of red emitting QDs at concentrations similar to ours [14]. However this observation was not fol-

Table 2: Detection limit of QDs (pmol/g) in each organ after chemical extraction.

Tissue	ALN	Liver	Kidneys	Spleen	Lungs	Heart	Intestine	Brain	Bladder	Skin
Detection limit (pmol/g)	2.49	4.20	2.20	2.76	2.78	3.98	2.67	2.69	0.72	1.77

QDs: Quantum Dots; ALN: Axillary Lymph Node

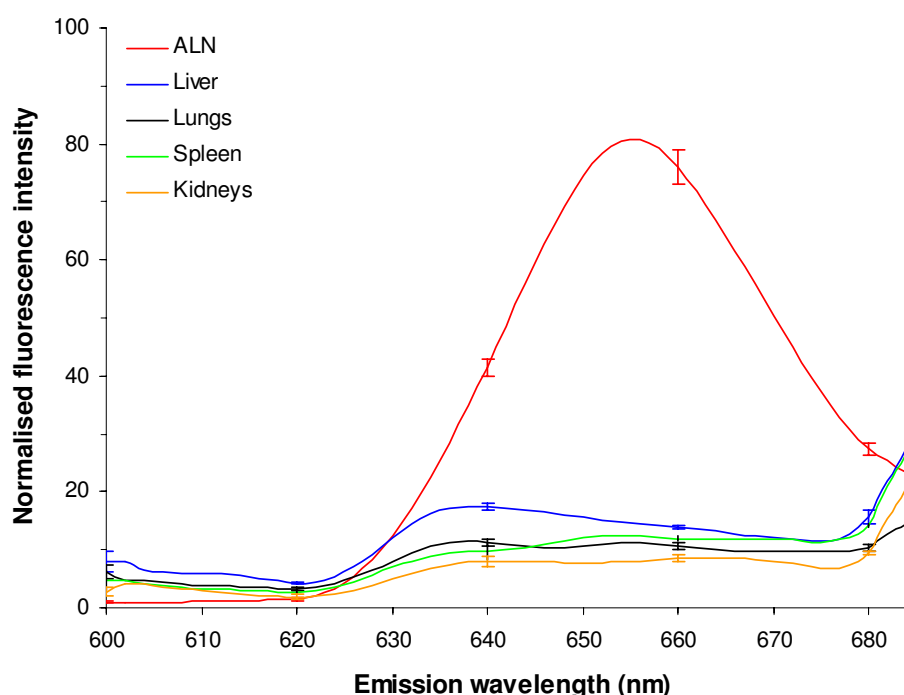


Figure 3

Normalised fluorescence emission spectra of organs extracts. ALN, spleen, kidneys, lungs, liver were chemically solubilised 24 h after subcutaneous injection of 20 pmol of QDs. Fluorescence spectra of the extracts were then recorded. Error bars represent SEM. ALN: Axillary Lymph Node; QDs: Quantum Dots.

lowed by biodistribution investigations. QDs Fluorescence increases with time to reach a maximum at 60 min after the injection. The calculated percentages of the injected dose (2.42% at 60 min and 1.24% at 24 h) (Table 1) were comparable with those of Kim *et al.* [13] and Gopee *et al.* [19] who found 2–4% and 1.07% respectively in the SLN. We observed a 4 fold decrease of QDs concentration in ALN from 60 min to 24 h post-injection (Figure 1). We also noted a strong fluorescence of QDs at the injection site. This observation is consistent with the study of Gopee and co-workers [19] who found 60% of cadmium retention at the injection site. We further undertook the study of the biodistribution of QDs in the organs. No fluorescence peak was observed after chemical extraction of Qdot® 655 ITK™ carboxyl in liver, kidneys, spleen, lungs, heart, intestine, brain, bladder, and skin (Figure 3). This points out that we are below the calculated concentration limit (Table 2), even if the latter is as low as around 2.5 pmol/g of tissue. The lower detection threshold observed for pigmented organs such as liver and heart was expected (Table 2) since the fluorescence detection method employed in our study is very sensitive to the absorption properties of the sample. In contrast to our results, the previous QDs biodistribution studies all evi-

denced the presence of QDs in the liver and also to a minor extent in spleen and kidneys [18,19]. The plausible explanation could be provided by the difference in the site of injection. Gopee *et al.* [19] injected QDs ID in the dorsal flank and found 24 h after injection 6.40% of the initial dose in liver and a small amount in kidneys (0.51%) and spleen (0.18%). We have administrated QDs subcutaneously in the paw. ID injection of QDs in the flank drains differently from the SC injected QDs [25] because of the anatomical differences in lymphatic network of the two regions. Likewise, when intradermal injection is performed on the back, direct lymphatic drainage to retroperitoneal and paravertebral nodes can occur before the injected product is distributed throughout the body [26]. When injection is performed in the paw, the first lymph node that receives direct lymphatic drainage is always in the axillary area. QDs are unlikely to be excreted from the body, neither by urine nor by feces in the time span of 48 h. This observation is in agreement with previous work [18] demonstrating the absence of QDs in urine and feces during ten days. These results are explained by the dramatic reduction of renal filtration for QDs with a hydrodynamic diameter higher than 3.5 nm and with negative charges [27]. Taken as a whole, the decline in QDs con-

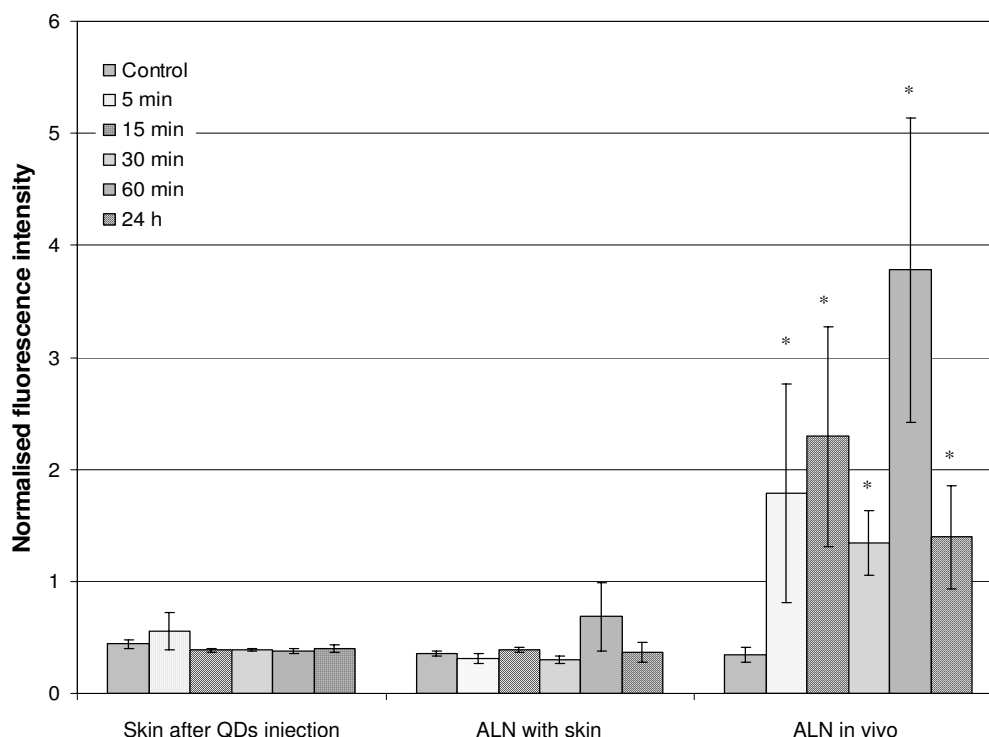


Figure 4
Normalised 655 nm fluorescence intensity detected by LIF with optical fiber spectrofluorometer. 20 pmol of QDs or PBS (control mice) were injected subcutaneously in the distal part of the anterior paw of a nude mice. Kinetics of LIF measurements were done on skin after QDs injection, ALN with skin and *in vivo* for control, 5 min, 15 min, 30 min, 60 min and 24 h. Error bars represent SEM, values marked with asterisk were significantly different from control (* for $P < 0.05$). QDs: Quantum Dots; LIF: Laser-Induced Fluorescence; ALN: Axillary Lymph Node.

centration 24 h post-injection could not be attributed to the elimination and/or migration of QDs to different organs. Assuming very strong retention in SLN, we hypothesize that QDs may diffuse in the second lymph node of the chain. This supposition is consistent with the fluorescence distribution pattern of QDs in SLN (Figure 2). Indeed QDs fluorescence is extended till medulla sinus, thus rendering possible the migration to the distal lymph node through the lymph channels. The interaction of QDs with serum should also be addressed. We did not perform studies on the interaction of carboxyl QDs with serum proteins, however, as it was shown recently anionic or cationic charged QDs were associated with an increase of the hydrodynamic diameter after incubation with serum [20]. Moreover, the intensity of fluorescence of QDs increases in the presence of BSA [28] or hemoglobin [29].

Spectrofluorometry using an optical fiber is a non-invasive procedure for the detection of fluorescent tracers. The results of our study demonstrate that despite the incapacity

to detect QDs directly through the skin, LIF measurements allow the detection of QDs in ALN after skin incision with a profile similar to chemical extraction (Figure 4). However, non-invasive measurements are frequently suffering from significant variations of measurements, related to light diffusion and scattering. Further, actually, our work is a preliminary step to use of NIR emitting QDs which we expect the detection of QDs through the skin without any incision. In the future, the non-invasive measurements could be achieved by modulating an excitation wavelength and using NIR emitting QDs. The excitation wavelength in our study was set to 410 nm. Using an excitation at larger wavelengths should result in less skin absorption and scattering, and should make deep tissue imaging possible. Detection of QDs with optical fiber spectroscopy opens perspectives for the utilization of this technique in operation theatre, since it can provide a rapid and reliable QDs detection immediately after SLN excision. A limitation to the clinical use of QDs for SLN mapping is their potential toxicity [30]. However, because most of the injected dose is eliminated

by removal of the injection site and nodal tissue, the eventual toxicity may be negligible. Furthermore, to avoid toxicity caused by biodegradation of QDs and exposition of core metal ions, QDs with non-heavy metal cores (such as indium) would be developed along with ameliorations of surface chemistry [31].

Conclusion

In this study we demonstrated that 655 nm emitting QDs with carboxyl coating allow the visualization of axillary draining lymph node (ALN) after subcutaneous injection of a very weak quantity of QDs (20 pmol). Unlike other tracers, QDs rapidly localize to and remain trapped in the SLN. A strong fluorescence signal is obtained within a few minutes lasting at least 24 h as measured with optical fiber spectrofluorometry, a minimally invasive technique allowing rapid pre-operative complete procedure. Fluorescence microscopy and chemical extraction confirmed highly selective QDs accumulation in the ALN corresponding to 2.42% of the injected dose at 60 min after the injection; the major part remaining at injection site. This rapid and selective accumulation of QDs in ALN together with the eventual non-invasive fluorescence detection offers an exciting opportunity to track lymphatic flow in real time and guide their nodal dissection after one simple intraoperative injection.

List of abbreviations

au: arbitrary unit; ALN: Axillary Lymph Node; ALND: Axillary Lymph Node Dissection; ICP-AES: Inductive Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy; ID: Intradermally; IR: Infra-Red; IV: Intravenously; LIF: Laser-Induced Fluorescence; MUA: Mercaptoundecanoic acid; NIR: Near-infrared; PBS: Phosphate Buffer Saline; QD: Quantum Dots; RES: Reticuloendothelial System; ROS: Reactive Oxygen Species; SC: Subcutaneously; SEM: Standard Error of the Mean; SLN: Sentinel Lymph Node; UV: Ultra-Violet.

Competing interests

The author(s) declares that they have no competing interests.

Authors' contributions

AR and EP carried out the experimental and mouse studies. AR and EP participated in the pathological studies and performed the statistical analysis. AR, LB, FG and FM participated in the design and coordination of the study. AR, HPL, LB and FM drafted the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The authors would like to thank Mr Benoit Dubertret for proofreading the manuscript.

We thank too A Leroux for advice on pathology, and MA D'Hallewin for critical reading of the manuscript. We acknowledge financial support from

Institut National du Cancer (INCA), Comité départemental (54, 55) de la Ligue Nationale de Lutte contre le Cancer, and the Ligue Nationale de Lutte contre le Cancer.

References

- Remontet L, Esteve J, Bouvier AM, Grosclaude P, Launoy G, Menegoz F, Exbrayat C, Tretare B, Carli PM, Guizard AV, Troussard X, Bercelli P, Colonna M, Halna JM, Hedelin G, Mace-Lesec'h J, Peng J, Buemi A, Velten M, Jougla E, Arveux P, Le Bodic L, Michel E, Sauvage M, Schwartz C, Faivre J: **Cancer incidence and mortality in France over the period 1978-2000.** *Rev Epidemiol Sante Publique* 2003, **51(1 Pt 1)**:3-30.
- Jakub JW, Pendas S, Reintgen DS: **Current status of sentinel lymph node mapping and biopsy: facts and controversies.** *Oncologist* 2003, **8(1)**:59-68.
- Marchal F, Rauch P, Morel O, Mayer JC, Olivier P, Leroux A, Verhaeghe JL, Guillemin F: **Results of preoperative lymphoscintigraphy for breast cancer are predictive of identification of axillary sentinel lymph nodes.** *World J Surg* 2006, **30(1)**:55-62.
- D'Eredita G, Giardina C, Guerrieri AM, Berardi T: **A further validation of subareolar injection technique for breast sentinel lymph node biopsy.** *Ann Surg Oncol* 2006, **13(5)**:701-707.
- Wilke LG, McCall LM, Posther KE, Whitworth PV, Reintgen DS, Leitch AM, Gabram SG, Lucci A, Cox CE, Hunt KK, Herndon JE 2nd, Giuliano AE: **Surgical complications associated with sentinel lymph node biopsy: results from a prospective international cooperative group trial.** *Ann Surg Oncol* 2006, **13(4)**:491-500.
- Sato K: **Current technical overviews of sentinel lymph node biopsy for breast cancer.** *Breast Cancer* 2007, **14(4)**:354-361.
- Soltesz EG, Kim S, Kim SW, Laurence RG, De Grand AM, Parungo CP, Cohn LH, Bawendi MG, Frangioni JV: **Sentinel lymph node mapping of the gastrointestinal tract by using invisible light.** *Ann Surg Oncol* 2006, **13(3)**:386-396.
- Kaleya RN, Heckman JT, Most M, Zager JS: **Lymphatic mapping and sentinel node biopsy: a surgical perspective.** *Semin Nucl Med* 2005, **35(2)**:129-134.
- Parungo CP, Colson YL, Kim SW, Kim S, Cohn LH, Bawendi MG, Frangioni JV: **Sentinel lymph node mapping of the pleural space.** *Chest* 2005, **127(5)**:1799-1804.
- Soltesz EG, Kim S, Laurence RG, DeGrand AM, Parungo CP, Dor DM, Cohn LH, Bawendi MG, Frangioni JV, Mihaljevic T: **Intraoperative sentinel lymph node mapping of the lung using near-infrared fluorescent quantum dots.** *Ann Thorac Surg* 2005, **79(1)**:269-77; discussion 269-77.
- Parungo CP, Ohnishi S, Kim SW, Kim S, Laurence RG, Soltesz EG, Chen FY, Colson YL, Cohn LH, Bawendi MG, Frangioni JV: **Intraoperative identification of esophageal sentinel lymph nodes with near-infrared fluorescence imaging.** *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005, **129(4)**:844-850.
- Tanaka E, Choi HS, Fujii H, Bawendi MG, Frangioni JV: **Image-guided oncologic surgery using invisible light: completed pre-clinical development for sentinel lymph node mapping.** *Ann Surg Oncol* 2006, **13(12)**:1671-1681.
- Kim S, Lim YT, Soltesz EG, De Grand AM, Lee J, Nakayama A, Parker JA, Mihaljevic T, Laurence RG, Dor DM, Cohn LH, Bawendi MG, Frangioni JV: **Near-infrared fluorescent type II quantum dots for sentinel lymph node mapping.** *Nat Biotechnol* 2004, **22(1)**:93-97.
- Ballou B, Ernst LA, Andreko S, Harper T, Fitzpatrick JA, Waggoner AS, Bruchez MP: **Sentinel Lymph Node Imaging Using Quantum Dots in Mouse Tumor Models.** *Bioconjug Chem* 2007.
- Dubertret B, Skourides P, Norris DJ, Noireaux V, Brivanlou AH, Libchaber A: **In vivo imaging of quantum dots encapsulated in phospholipid micelles.** *Science* 2002, **298(5599)**:1759-1762.
- Chan WH, Shiao NH, Lu PZ: **CdSe quantum dots induce apoptosis in human neuroblastoma cells via mitochondrial-dependent pathways and inhibition of survival signals.** *Toxicol Lett* 2006, **167(3)**:191-200.
- Cho SJ, Maysinger D, Jain M, Roder B, Hackbarth S, Winnik FM: **Long-term exposure to CdTe quantum dots causes functional impairments in live cells.** *Langmuir* 2007, **23(4)**:1974-1980.
- Fischer HC, Liu L, Pang KS, Chan WCW: **Pharmacokinetics of nanoscale quantum dots: in vivo distribution, sequestration, and clearance in the rat.** *Advanced Functional Materials* 2006, **16(10)**:1299-1305.

19. Gopee NV, Roberts DW, Webb P, Cozart CR, Siitonen PH, Warbritton AR, Yu WW, Colvin VL, Walker NJ, Howard PC: **Migration of Intradermally Injected Quantum Dots to Sentinel Organs in Mice.** *Toxicol Sci* 2007.
20. Choi HS, Liu W, Misra P, Tanaka E, Zimmer JP, Itty Ipe B, Bawendi MG, Frangioni JV: **Renal clearance of quantum dots.** *Nat Biotechnol* 2007, **25(10)**:1165-1170.
21. Gao X, Cui Y, Levenson RM, Chung LW, Nie S: **In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots.** *Nat Biotechnol* 2004, **22(8)**:969-976.
22. Frangioni JV, Kim SW, Ohnishi S, Kim S, Bawendi MG: **Sentinel Lymph Node Mapping With Type-II Quantum Dots.** *Methods Mol Biol* 2007, **374**:147-160.
23. Kamuhabwa AA, Cosserrat-Gerardin I, Didelon J, Notter D, Guillemin F, Roskams T, D'Hallewin MA, Baert L, de Witte PA: **Biodistribution of hypericin in orthotopic transitional cell carcinoma bladder tumors: implication for whole bladder wall photodynamic therapy.** *Int J Cancer* 2002, **97(2)**:253-260.
24. Hawley AE, Davis SS, Illum M: **Targeting of colloids to lymph nodes: influence of lymphatic physiology and colloidal characteristics.** *Advanced Drug Delivery Reviews* 1995, **17**:129-148.
25. Kersey TW, Van Eyk J, Lannin DR, Chua AN, Tafra L: **Comparison of intradermal and subcutaneous injections in lymphatic mapping.** *J Surg Res* 2001, **96(2)**:255-259.
26. Uren RF: **Lymphatic drainage of the skin.** *Ann Surg Oncol* 2004, **11(3 Suppl)**:179S-85S.
27. Frangioni JV: **In vivo near-infrared fluorescence imaging.** *Curr Opin Chem Biol* 2003, **7(5)**:626-634.
28. Yu Y, Lai Y, Zheng X, Wu J, Long Z, Liang C: **Synthesis of functionalized CdTe/CdS QDs for spectrofluorimetric detection of BSA.** *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2007, **68(5)**:1356-1361.
29. Hu DH, Wu HM, Liang JG, Han HY: **Study on the interaction between CdSe quantum dots and hemoglobin.** *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2007.
30. Lin S, Xie X, Patel MR, Yang YH, Li Z, Cao F, Gheysens O, Zhang Y, Gambhir SS, Rao JH, Wu JC: **Quantum dot imaging for embryonic stem cells.** *BMC Biotechnol* 2007, **7(1)**:67.
31. Michalet X, Pinaud FF, Bentolila LA, Tsay JM, Doose S, Li JJ, Sundaresan G, Wu AM, Gambhir SS, Weiss S: **Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics.** *Science* 2005, **307(5709)**:538-544.

Pre-publication history

The pre-publication history for this paper can be accessed here:

<http://www.biomedcentral.com/1471-2407/8/111/prepub>

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:
http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp



***Localisation des ganglions
régionaux au moyen de
quantum dots par imagerie de
fluorescence et étude de
biodistribution par
spectrométrie de masse***

Chapitre III : Localisation des ganglions régionaux au moyen de quantum dots par imagerie de fluorescence et étude de biodistribution par spectrométrie de masse

I. Résumé

Suite à l'étude de biodistribution réalisée au moyen de QDs émettant dans le rouge, il a été montré que ces QDs ne permettaient pas de détecter le GA à travers la peau des souris vivantes, une incision étant nécessaire pour recueillir le signal de fluorescence émis par les QDs. Ainsi, pour s'affranchir de cet inconvénient, des QDs émettant dans le proche PIR ont été utilisés pour permettre une détection plus profonde dans les tissus.

Ce travail avait pour objectif d'évaluer et de comparer la biodistribution de ces QDs par 2 techniques de détection chez la souris balb/c : *in vivo* par imagerie de fluorescence, technique non-invasive et *ex vivo* par ICP-MS, méthode de référence pour le dosage des éléments.

Les QDs utilisés émettant à 800 nm, étaient composés de CdTeSe/CdZnS, cœur/coque, encapsulés dans une micelle de PEG2000 dont 33 % étaient terminés avec des groupements carboxyles. Ces QDs ont été synthétisés par l'équipe du Dr. Dubertret, attachée au Laboratoire Photons et Matière (ESPCI, CNRS UPRA5, Paris, France). Vingt picomoles de QDs ont été injectées en s.c. dans la partie supérieure de la patte antérieure droite des souris, le signal de fluorescence au niveau des GA et des ganglions thoraciques latéraux (GTL) a été suivi *in vivo* par imagerie de fluorescence sur une période de 10 jours. Les animaux ont ensuite été sacrifiés et les différents organes ont été imagés *ex vivo* à 10 jours. Une étude de biodistribution a également été réalisée ; 9 cinétiques ont été étudiées allant de 5 min à 10 jours après administration des QDs. Les principaux organes, le sang, les urines et fèces ont été collectés et le dosage du Cd (composant majeur des QDs) par ICP-MS a été effectué.

Les QDs ont été détectés dans les GA et les GTL droits dès 5 min et jusqu'à 10 jours après injection, par imagerie de fluorescence et ICP-MS. La cinétique d'accumulation des QDs dans les 2 ganglions droits était similaire par les 2 techniques de détection, avec des coefficients de corrélation entre les 2 techniques de 0,89 ($p < 0,01$) et de 0,81 ($p < 0,01$) pour le GA et le GTL, respectivement. La dose maximale en QDs dans les ganglions droits a été

observée 4 h après injection et correspondait à 1,36 % DI pour le GA et 1,04 % DI pour le GTL. Cependant, il a été observé que dès 24 h après injection des QDs, les GA et les GTL étaient inflammatoires, jusqu'à atteindre 3 à 4 fois le poids des ganglions contrôles, témoignant d'une réaction immunitaire aiguë envers les QDs tels que préparés.

Les QDs ont aussi été retrouvés dans les organes et se sont accumulés préférentiellement dans le foie, la rate et les reins avec des doses de 15,4 % DI, 1,4 % DI et 1,1 % DI, respectivement, 10 jours post-injection. Les QDs ont également été détectés dans le sang à toutes les cinétiques mais n'ont pas été éliminés de l'organisme sur la période de l'étude.

Le profil d'accumulation des QDs dans ces 2 ganglions lymphatiques étant similaire par les 2 techniques de détection employées. L'imagerie de fluorescence, méthode non-invasive peut donc être utilisée pour suivre l'accumulation des QDs dans les ganglions régionaux, et ainsi, diminuer le nombre d'animaux à utiliser.

II. “Fluorescence imaging and whole-body biodistribution of near-infrared emitting quantum dots after subcutaneous injection for regional lymph node mapping in healthy mice.”

Pic E., Pons T., Bezdetnaya L., Leroux A., Guillemin F., Dubertret B., Marchal F.

Mol Imaging Biol. Article sous presse.

Fluorescence Imaging and Whole-Body Biodistribution of Near-Infrared Emitting Quantum Dots after Subcutaneous Injection for Regional Lymph Node Mapping in Mice.

Emilie Pic,¹ Thomas Pons,² Lina Bezdetnaya,¹ Agnès Leroux,³ François Guillemin,¹ Benoît Dubertret,² Frédéric Marchal¹

¹Centre de Recherche en Automatique de Nancy - Nancy-University - CNRS - Centre Alexis Vautrin, avenue de Bourgogne, 54511 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France

²Laboratoire Photons et Matière, CNRS UPRA0005, ESPCI, 10 rue Vauquelin, 75005 Paris, France

³Department of Pathology, Centre Alexis Vautrin, avenue de Bourgogne, 54511 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France

Correspondence to:

Frédéric Marchal

Centre Alexis Vautrin, avenue de Bourgogne, 54511 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France

e-mail: f.marchal@nancy.fnclcc.fr; tel +33 3 83 59 83 06; fax +33 3 83 59 83 79

Shortened title: NIR-QDs for lymph node mapping

Manuscript category and significance: The present “research article” addresses near-infrared emitting quantum dots detection by fluorescence imaging as a non-invasive and reliable method for identification of regional lymph nodes for their eventual use in breast tumour patients.

Abstract

Purpose: This study compares fluorescence imaging to mass spectroscopy (ICP-MS) for detection of quantum dots (QDs) in sentinel lymph node (LN) mapping of breast cancer.

Procedures: We study the accumulation of near-infrared emitting QDs into regional LNs and their whole-body biodistribution in mice after subcutaneous injection, using *in vivo* fluorescence imaging and *ex vivo* elemental analysis by ICP-MS.

Results: We show that the QDs accumulation in regional LNs is detectable by fluorescence imaging as early as 5 min post-delivery. Their concentration reaches a maximum at 4 h then decreases over a ten-day observation period. These data are confirmed by ICP-MS. The QDs uptake in other organs, assessed by ICP-MS, increases steadily over time, however its overall level remains rather low.

Conclusions: Fluorescence imaging can be used as a non-invasive alternative to ICP-MS to follow the QDs accumulation kinetics into regional LNs.

Key words: quantum dots, lymph nodes, near-infrared fluorescence imaging, mass spectroscopy, biodistribution

Introduction

Axillary lymph node (ALN) status is the most important prognostic factor in patients with breast cancer and a determinant predictor of recurrence and survival [1, 2]. Until recently, the standard surgical treatment in breast cancer was axillary lymph node dissection (ALND), which consists in whole lymphatic axillary chain removal, but lead to numerous postoperative morbidity, deteriorating the quality of life. For these reasons, sentinel lymph node biopsy (SLNB) has become the new standard method of staging breast cancer patients [3]. The sentinel lymph node (SLN) is the first regional step of lymphatic drainage and metastasis of the primary tumour [1, 4]. SLNB allows to identify sentinel ALN and involves the use of technetium sulfur colloid and isosulfan blue dye in the USA, and technetium-labelled albumin and patent blue dye in EU countries. The combined use of radiocolloid and blue dye increases recognition of the SLNs [2, 5]. The day before surgery, the radiocolloid is injected, many routes of injection being used (peritumoral, intratumoral, subcutaneous, intradermal or subareolar), followed by mammary and axillary lymphoscintigraphy between 30 min and 4 h post-administration. During the surgery, a mean volume of 3-4 mL of blue dye is delivered by the same way and SLNs are identified as blue and hot lymph nodes (LNs) [6, 7]. Despite the significant improvement of SLNB over ALDN, the problems related to an extra cost of the radioisotope, to allergic reactions and in a few cases anaphylactic shocks after radiocolloid or blue dye injection and the overall procedure duration are limiting factors for this technique [8-11]. Moreover, lymphatic mapping with blue dye results in a high rate of false-positive nodes because the small dye molecules can readily diffuse through the true SLN and traverse multiple nodes [12]. Additionally, blue dye has poor tissue contrast and is difficult to detect in deep, dark anatomical regions such as the abdomen. Although the use of radioisotope tracers has improved the detection rate and accuracy of SLN mapping, the high

radioactivity of the primary injection site can interfere with intraoperative *in vivo* detection of nearby nodes [1].

Near infrared (NIR) fluorescence imaging appears as a promising alternative for SLN mapping due to its flexibility, non-invasive procedure, high temporal resolution and low cost. In particular, semiconductor quantum dots (QDs) are promising candidates for NIR imaging probes for this application thanks to their unique optical and physical properties, namely optimal physical size, high fluorescent quantum yield, large molar extinction coefficient and particularly high resistance to photobleaching [13-15], that alleviates many of the common organic dye limitations. QDs are composed of a nanometer-scale fluorescent semiconductor core such as the most common CdSe or CdTe. These cores can be overcoated with a first inorganic shell (eg. ZnS) to improve their photoluminescence quantum yields and limit their potential toxicity due to the release of toxic core heavy metal ions [16, 17]. These core-shell QDs are solubilised in water by cap-exchange with appropriate surface ligands or encapsulation by amphiphilic block co-polymers or functionalized lipids [18-20]. Control over this surface chemistry is crucial as it will determine the fate of the QDs in a biological environment (cell, tissue, organism...).

NIR emitting QDs have already been applied to visualize SLN in gastrointestinal tract [21], pleural space [22], lung area [23], oesophageal area [24], skin [25], axilla [26-29] and bladder area [30] in rodents and pigs. The authors have performed fluorescence imaging of LNs for up to 4 h after QDs injection, however the long term QDs biodistribution was not investigated. Understanding and controlling the QDs biodistribution is of the utmost importance in biomedical applications as it will impact the imaging performance (rapidity, sensitivity, specificity) and the potential QDs toxicity. In particular, in the case of SLN detection, both the peritumoral injection site and the SLNs would be resected, and the toxicity would depend on the proportion of QDs leaking into the rest of the organism. In the present

paper, we study the QDs accumulation kinetics in regional LNs and the whole-body biodistribution of lipid-encapsulated QDs in mice for up to 10 days after subcutaneous (s.c.) injection of NIR carboxyl-functionalized lipid coated QDs. We use both NIR fluorescence, the modality which would be used *in fine* during the surgical act, and inductively coupled plasma-mass spectroscopy (ICP-MS), which provides quantitative measurements of QDs concentration [31-40]. We demonstrate that NIR imaging allows a fast and sensitive detection of regional LNs with QDs. We further evaluate the reliability of NIR imaging measurements by comparison with quantitative ICP-MS elemental analysis. The obtained results provide useful indications for optimization of the surgical procedure to allow efficient regional LNs detection.

Materials and Methods

Near-Infrared Emitting Quantum Dots Synthesis

CdTeSe/CdZnS core/shell QDs were synthesized following a recently published protocol [20]. Briefly, CdTeSe cores were synthesized by injection of trioctylphosphine (TOP)-Se and TOPTe in a three neck-flask containing Cd-tetradecylphosphonate, TOP and oleylamine at 280°C. The solution was then kept at 230°C, and additional TOPSe precursors were injected by dropwise injection. A CdZnS shell was grown over the CdTeSe cores by injection of TOP-S in a solution of trioctylamine, TOP, Cd-oleate and Zn-oleate. These CdTeSe/CdZnS QDs were characterized by absorbance and photoluminescence spectroscopy using a Cary-5E UV-vis spectrophotometer (Varian) and Fluoromax-3 fluorimeter (Jobin Yvon, Horiba). Transmission electron microscopy (TEM) images were acquired on a JEOL 2010 field electron gun microscope.

Quantum Dots Solubilization

CdTeSe/CdZnS nanocrystals were solubilised by encapsulation into functionalized amphiphilic phospholipid micelles, as described previously [19, 20, 41]. Typically, the core/shell QDs were washed with two cycles of precipitation in ethanol and resuspension in hexane, and finally resuspended in chloroform with a mixture of 66 % DPPE-PEG2000-Me (dipalmitoyl phosphatidylethanolaminepolyethylene glycol 2000-methyl ether) and 33 % DPPE-PEG2000-COOH (dipalmitoyl phosphatidylethanolaminepolyethylene glycol 2000-carboxylic acid) and deionized water. The chloroform was evaporated by heating at 80°C, yielding a lipid solution. These water-soluble QDs were then purified by ultracentrifugation following previously published protocols [19, 41] to remove excess lipids and small QDs aggregates. Stock QDs solutions were stored at 4°C before use. Dynamic light scattering measurements were performed on a CGS-3 goniometer system equipped with a HeNe laser illumination at 633 nm (Malvern) and an ALV 5000/EPP correlator (ALV). Electrophoresis was run in 2 % agarose gel in a tris-borate EDTA pH 8 buffer.

Animals

Ten to twelve weeks old female balb/c mice (Balb/cOlaHsd) (Harlan, Gannat, France) weighing from 18 to 22 g were used in these experiments. Mice were kept in 12 h light/dark cycle and had access to food and water *ad libitum*. The mice were acclimated for 2 weeks prior to use. Specific purified diet (TD.94045, Harlan Teklad, Madison, WI, USA) was used to reduce tissue autofluorescence in the NIR spectral region. The animals received care in accordance with established guidelines of FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations) and animal procedures were performed in compliance with institutional and national guidelines. All experiments were performed under anesthetic using intraperitoneal injection of 0.01 mL/g of body weight of a solution containing 9 mg/mL of

ketamine (Ketalar®, Panpharma, Fougères, France) and 0.9 mg/mL of xylazine (Rompun®, Bayer Pharma, Puteaux, France). Control mice were injected subcutaneously in the distal part of the right anterior paw with 20 μ L of phosphate buffer saline (PBS) and for experimental groups, 20 μ L of a 1 μ M QDs solution (20 pmol) were administrated by the same way. After product delivery, the right paw was kneaded to improve product migration.

Near-Infrared Fluorescence Imaging

In vivo optical imaging of QDs was performed using a Fluobeam® 700 (Fluoptics, Grenoble, France) NIR imaging system. This system is compact and portable and is composed of two principle parts (Fig. 1a). The first part is an electric panel box including a laser emitting at 690 nm and its power supply, an analogical/digital box and a power supply for light emitting diodes (LEDs). The second part is the optical head containing a highly sensitive CCD camera and white LEDs (Fig. 1a and 1b). From the electric box, the laser beam is guided by a fibre until the extremity of the optical head thus rending possible the divergence of the optical system and excitation of a broad field of about 6 cm in diameter to the distance of 15 cm from the extremity of optical head. A 750 nm longpass emission filter is used. The power density of laser irradiation on tissue was 3 mW/cm². For semi-quantitative *in vivo* fluorescence measurements, the optical head is supported by a hinged jib and was kept at the same place during the experimental period (Fig. 1b). The regions of interest (ROIs) were depilated using a commercially hair-removal cream before imaging. Three mice were injected subcutaneously with QDs and three control mice were injected with PBS. The CCD camera shows the specificity to adjust the fluorescence signal on the pixel which presents the strongest fluorescence intensity. Thus, the injection point of QDs was hidden allowing thereby a better ROIs visualization. *In vivo* fluorescence of ALNs and lateral thoracic LNs (LTLNs) was acquired at 5, 15, 30, 60 min; 4, 24, 48, 96 h and 10 days after s.c. QDs administration at a

camera exposure time of 10 ms for right LNs and 100 ms for left LNs. Ten days after delivery of QDs or PBS, mice were sacrificed and *ex vivo* fluorescence signals of organs (ALNs, LTLNs, spleen, kidneys, liver, lungs and brain) were measured after an exposure time of 100 ms. Semi-quantitative data can be obtained from the fluorescent images by drawing ROIs around the different organs to be quantified and background signal (autofluorescence of tissues) is subtracted from all images. *In vivo* or *ex vivo* fluorescent signals were expressed in arbitrary unit (AU) using the Image J 1.37 software. All images were acquired under the same conditions and were comparable from day to day and animal to animal. All data are represented as mean $\pm$ SD (Standard Deviation).

Inductively Coupled Plasma-Mass Spectroscopy (ICP-MS)

A Varian 820 MS instrument (Varian, Les Ulis, France) was used to performed ICP-MS analyses. All samples (organs, blood fractions and excretions) were completely dissolved with 70 % HNO₃ and heated at 90 °C until total mineralization. Each mineralised sample was solubilized in 25 mL of milli-q water (resistivity >18.2 MΩ) and analysed by ICP-MS at the Laboratoire Environnement-Hygiène of ASCAL (Forbach, France). The ICP-MS instrument was initialized, optimized and standardized using manufacturers recommendations. The limit of cadmium quantification was 50 ng/mL. Five samples of 1 mL QDs solutions at 20 nM (20 pmol) have been analysed in the same conditions, previously described, to correlate cadmium and QDs concentrations. Ten groups of animals (n = 3 per group) were used for the biodistribution study: one control group received PBS and 9 experimental groups were injected with QDs. Sacrifice of control group was performed 10 days after PBS injection and experimental groups were sacrificed at 5, 15, 30, 60 min; 4, 24, 48, 96 h and 10 days after QDs injection by cervical dislocation. ALNs, LTLNs, spleen, kidneys, liver, lungs, brain and injection point defined as the distal part of the right anterior paw were removed and their

weights were recorded. Blood samples were collected through cardiac puncture in heparinized tubes at the different times after QDs injection. Blood samples were centrifuged at 3000 g for 10 min to separate plasma and blood cells. Urine and feces were collected daily during 10 days. All removed samples were stored at -80°C prior to elemental analysis. All data are represented as mean $\pm$ SD.

Histology of Lymph Nodes Section

Two groups of animals ($n = 3$ per group) were used for histological study of ALNs and LTLNs. Animals were sacrificed 10 days after QDs or PBS injection by cervical dislocation. ALNs and LTLNs were removed for histological analysis. All tissues were fixed in 10 % formaldehyde, 5 μm sections of LNs were prepared, and haematoxylin and eosin (H&E) coloration was performed, and examined to visualize inflammatory changes.

Statistical Calculations

Means, SD, correlation coefficients and statistical significance of differences between group (Student's t-test) were determined using standard software (Microsoft Excel, Microsoft Corporation, Redmont, WA); p values < 0.05 were considered statistically significant.

Results

QDs Synthesis and Characterization

We synthesized NIR emitting QDs composed of CdTeSe cores surrounded by a CdZnS shell [20] with ~ 6 nm in core-shell diameter. Absorbance (Abs) and photoluminescence (PL) spectra of these QDs are shown in Fig. 2a, with an emission maximum at around 780 nm. The QDs were solubilised in water by encapsulation into phospholipid micelles functionalized with 66 % polyethylene-glycol (PEG) 2000 and 33 %

PEG2000-carboxylic acid (COOH), as shown by the schematic in Fig. 2b [19, 41]. The carboxylic acid groups confer a negative electric charge to the QDs surface, as indicated by migration under gel electrophoresis. Hydrodynamic diameters (HD) of the QDs micelles are typically ~22 nm, as indicated by dynamic light scattering (DLS). The QDs fluorescence quantum yield was typically ~20-30 % after solubilization, and was stable for several weeks in neutral (PBS, pH 7) or slightly basic (borate, pH 8) buffer, and at least several days in slightly acidic PBS (pH 6) buffer [20].

Near-Infrared Fluorescence Imaging

In vivo imaging. Twenty picomoles of QDs were injected subcutaneously in the distal part of the right anterior paw. Right ALN (RALN) and right lateral thoracic LN (RLTLN) are visualized as early as 5 min after injection and for the whole ten-day observation period, while only background signal was observed in control QDs-free mice (Fig. 3). Fig. 3 displays the NIR images taken at selected points: right flank (Fig. 3a), dorsal decubitus (Fig. 3b) and left flank (Fig. 3c) to visualize RALN, LTLN and left ALN (LALN), respectively. Detailed kinetics of fluorescence intensities are presented on Fig. 4. Intensity of fluorescence signals in RALN and RLTLN increases during the first 4 h post-injection, then gradually decreases for the rest of the observation period (Fig. 4). Fluorescence from the LALN is visualized 24 h after QDs delivery in two out of three mice but its signal is much weaker and cannot be quantified due to low signal-to-background ratio (Fig. 3c).

Ex vivo imaging. QDs were detected *ex vivo* in four resected LNs 10 days after s.c. administration (Fig. 5a). A strong *ex vivo* fluorescence intensity is observed in RALN and RLTLN compared to LALN and left LTLN (LLTLN) 10 days post QDs injection (Fig. 5b and 5c). Indeed, fluorescence signal in RALN is 260 fold greater compared to LALN (Fig. 5b and 5c) and 160 fold more elevated in RLTLN than that in LLTLN (Fig. 5b and 5c). No

difference in fluorescence signals were detected in other organs compared to control mice (data not shown).

Biodistribution Study by ICP-MS

We injected 20 pmol of QDs subcutaneously in the right anterior paw of mice and monitored accumulation kinetics between 5 min and 10 days after administration. Major organs, blood and excretions were collected at all experimental times and analysed by ICP-MS to determine cadmium concentration (Fig. 6). Percentage of injected doses (% ID) were then estimated using prior calibration of our QDs sample (20 nM QDs corresponded to $685 \pm 4 \mu\text{M}$ of cadmium) (Fig. 7).

The remaining cadmium at the site of injection, defined as the distal part of the right anterior paw is shown in Fig. 6a and 7a. Cadmium concentrations remain constant between 5 and 60 min corresponding to a loss of approximately 60 % ID from the injection site. Given the cadmium concentrations measured from the rest of the organs and the blood, this loss is due to QDs diffusion into the tissue in the immediate vicinity of the injection site corresponding to the whole right paw and the right shoulder. After 60 min, the cadmium concentration decreases steadily during the next 10 days. At the end of this observation period, the cadmium concentration reaches $33.41 \pm 2.14 \mu\text{g/g}$, corresponding to 14.63 ± 1.96 % ID (Fig. 6a and 7a).

QDs are readily detected in RALN and RLTLN as early as 5 min after their administration and the corresponding cadmium concentration increases. Maximum cadmium concentrations in RALN and RLTLN are observed at 4 h post-injection, ($337.8 \pm 50.3 \mu\text{g/g}$ and $283.6 \pm 8.1 \mu\text{g/g}$, corresponding to 1.36 ± 0.21 % ID and 0.94 ± 0.13 % ID, respectively) (Fig. 6a and 7b). Cadmium concentrations then progressively decrease for the rest of the ten-day observation period. However, the % ID remains constant in these nodes between 4 h and 10 days post-delivery (Fig. 7b). It is important to note that mass spectroscopy in term of

cadmium concentration (Fig. 6a) and NIR fluorescence profiles of QDs into RALN and RLTLN (Fig. 4) are strictly similar. Statistical analyses demonstrate a strong correlation between these two detection techniques with a correlation coefficient of 0.89 ($p < 0.01$) and 0.81 ($p < 0.01$) for RALN and RLTLN, respectively (Fig. 8).

In LALN and LLTLN, cadmium concentrations are much weaker and are detectable only after 4 h post-injection then gradually increase for up to 10 days (Fig. 6a).

Kidneys, spleen and liver display a progressive, time-dependent QDs accumulation during the whole observation period (Fig. 6b and 7b). Ten days after QDs injection, $2.91 \pm 0.22 \mu\text{g/g}$ ($1.06 \pm 0.09 \%$ ID), $9.82 \pm 1.84 \mu\text{g/g}$ ($1.40 \pm 0.24 \%$ ID) and $13.03 \pm 1.71 \mu\text{g/g}$ ($15.36 \pm 1.39 \%$ ID) were found in kidneys, spleen and liver, respectively. By contrast, brain and lungs show different QDs accumulation profile with much lower QDs concentrations (Fig. 6b).

In blood, cadmium is detected as early as 5 min after QDs administration and reaches a maximum at 4 h, corresponding to $8.78 \pm 2.46 \mu\text{g/mL}$ for plasma and $1.52 \pm 0.13 \mu\text{g/mL}$ for blood cells. Cadmium concentrations then progressively decreases with time to reach background levels at 10 days post-injection (Fig. 6c).

Urine and feces were collected daily but no QDs excretion was detected during 10 days (data not shown).

Morphology and Histology of Lymph Nodes

The weights of the RALN, RLTLN, LALN and LLTLN were measured at all time points (Fig. 9a). No changes were observed in the weight of RALN and RLTLN during the first 4 h post QDs administration ($3.20 \pm 0.98 \text{ mg}$ for RALN and $2.57 \pm 0.40 \text{ mg}$ for RLTLN, respectively at 4 h), and were not different from controls ($p > 0.05$). Right LNs weights started to significantly increase at 24 h post-injection ($p < 0.05$) (Fig. 9a). For example, 10

days after QDs injection, RALN and RLTLN weights were 8.59 ± 0.595 mg and 7.59 ± 2.20 mg, respectively (Fig. 9a).

H&E colorations of LNs sections have revealed the presence of inflammation sites (light areas) in the two right LNs 10 days after QDs delivery but not in left and control LNs (Fig. 9b). These signs of inflammation included numerous polynuclears, some histiocytes and vacuoles of digestion in studied areas (Fig. 9c).

Discussion

QDs show rapid uptake in RALN and RLTLN after s.c. injection in mice, consistently with previous reports [27, 28, 33, 42, 43]. Both right LNs are readily detected as early as 5 min post-injection, using a very short CCD exposure time (10 ms). RALN and RLTLN show similar QDs accumulation profiles assessed by *in vivo* fluorescence or ICP-MS (cadmium concentration) (Fig. 4 and 6a). Indeed, a very good correlation between these two detection techniques was highlighted by statistical analyses with a correlation coefficient of 0.89 and 0.81, for RALN and RLTLN, respectively (Fig. 8). We note however that stronger *in vivo* fluorescence signals were observed in RALN compared to RLTLN at all times whereas QDs concentrations measured by ICP-MS are equivalent in these two LNs (Fig. 4 and 6a). This could be explained by the fact that LTLNs are deeper in the tissue than ALNs, which are just under the skin. The appearance of deep structures is significantly blurred in *in vivo* fluorescence imaging and the signal detected from them is significantly attenuated as a function of structure depth [44, 45].

QDs accumulation in RALN at 24 h post-delivery corresponds to 1.22 % ID (Fig. 7b), as measured by ICP-MS, a result comparable with our previous study [43] in which accumulation of red emitting QDs in RALN was performed by fluorescence measurements (1.24 % ID at 24 h) and with Gopee's group [33] who found 1.07 % ID in LNs 24 h after QDs

administration. RLTLN, which is considered as the second LN in the mouse axillary chain also shows QDs accumulation as early as 5 min after their delivery and display % ID values similar to RALN from 24 h for up to 10 days (Fig. 7b). These results are in agreement with Kobayashi's and Hama's studies [27, 28] which have shown lymphatic communication between ALN and LTLN after s.c. injection in the anterior paw of mice with QDs and NIR dyes, respectively. Maximum % ID in RALN and RLTLN were detected 4 h after QDs injection and are followed by a plateau for the rest of the observation period (Fig. 7b). These results are consistent with the size of QDs (HD of 22 nm) since small particles (<10 nm) can rapidly pass the first LN without being retained, whereas larger particles (>100 nm) are trapped in the first LN, without possessing specific binding affinity to lymphatic vessels or LNs [46]. As a consequence, ideal lymph tracers that would both be efficiently retained and able to pass through the first LN must have a diameter comprised between 10 and 100 nm to fulfil both conditions. We observe that, although % ID in right LNs remains constant between 4 h and 10 days after QDs delivery, cadmium concentrations per gram of tissue decrease (Fig. 6a and 7b). These observations can be explained by the increase in weight and volume of RALN and RLTLN from 24 h post-injection, reaching 2.7 times the weight of control LNs after 10 days (Fig. 9a and 9b).

QDs are remarkable tools for biomedical purposes but they remain potentially toxic for living organisms. This toxicity is mainly due to the release of cadmium ions in biological environments, caused by deterioration and oxidation of QDs in the body [16, 17]. These heavy metal ions can also lead to the formation of reactive oxygen species that induce oxidative stress [47], particularly after a long term exposure to QDs. Many *in vitro* toxicity studies of QDs have been realized [48-50] but only a few *in vivo* works have been performed. In our study, 10 days after QDs injection no signs of toxicity have been observed in living mice. Indeed, body weight of mice was unchanged during the course of the study, no signs of

abnormal motivity behaviour were noticed and no signs of dehydration were registered. However, weight of removed right LNs had increased in QDs-injected animals compared to control PBS-injected animals (Fig. 9a). Histological sections of LNs have shown inflammation of RALN and RLTLN in injected mice, revealing acute local toxicity of QDs without however any inflammation signs in the LALN, LLTLN and control LNs (Fig. 9b and 9c). We attribute this difference to an effect of concentration, with QDs doses corresponding to about 300 μg of cadmium/g provoking immunity reactions in LNs, and smaller doses of about 30 μg of cadmium/g remaining without effects (Fig. 6a). This contrasts with results from previous studies using NIR dyes labelled with immunoglobulin G where no signs of inflammation were observed in LNs 7 days after injection [42]. Detailed assessment of QDs toxicity in other organs was not performed in our work, hence, potential toxicity of QDs in these organs has not been demonstrated. Very recently, some QDs toxicity has been reported in animals, showing for example pulmonary inflammation [51] or profound changes in mitochondria [36]. Several ways can be explored to limit QDs toxicity, such as avoiding the use of heavy metals or design of surface chemistries allowing their complete elimination from the body, but *in fine* the QDs toxicity will strongly depend on the QDs biodistribution and concentration in the major organs. Knowledge of this biodistribution is therefore crucial for estimating the potential QDs toxicity.

We investigated the elimination of our QDs from the body by feces and urine. During 10 days of observation, QDs were not cleared from the body neither by urine nor feces (data not shown), suggesting that QDs are sequestered *in vivo*. Many authors have found that QDs were eliminated, albeit not completely, via urine and feces after intravenous (i.v.) [31, 35, 36, 52-55] or intranasal [56] injection. Other studies were similar to our, and have shown that QDs were sequestered in different organs and not cleared [31, 32, 34, 43]. Recent studies

suggested that elimination by urine is strongly size dependent, with a maximum HD of about 5.5 nm for efficient clearance [53].

Increase in the blood cadmium concentration (plasma and blood cells) is detected as early as 5 min after QDs injection (Fig. 6c), which suggests that QDs can enter blood vessels immediately after s.c. injection. This penetration could be either due to passive diffusion caused by concentration gradient between the different compartments or by leaking from lymphatic vessels into the blood network, considering that blood and lymphatic systems are intimately connected at the LNs. Four hours after QDs administration, the cadmium concentration in blood starts to decrease due to progressive capture by various organs. This blood kinetics is different from that reported in other biodistribution studies, certainly due to differences in the QDs delivery mode. Most QDs biodistribution studies were performed after i.v. injection and show a rapid decrease of the blood QDs concentration (typically by a factor 3 or 4 at 24 h compared to 1 h post-injection) and a total QDs clearance from the blood after some days [34, 36, 37].

No *ex vivo* or *in vivo* fluorescence signals were observed in organs after 10 days post-injection compared to control organs. However the presence of QDs is revealed by ICP-MS in most organs after injection. We attribute this difference to the lack of sensitivity of NIR imaging that hinders detection of very low QDs concentrations in organs (0.04 to 13 $\mu\text{g/g}$ of cadmium corresponding to 0.01 to 3.4 pmol/g of QDs).

Liver is the organ of the reticuloendothelial system with the higher QDs concentrations after s.c. injection. These correspond to approximately 1.1, 10.3 and 15.4 % ID at 1h , 24 h and 10 days post-delivery, respectively (Fig. 7a). This accumulation is much lower than that observed after QDs i.v. injection [32, 34, 37, 53, 57]. For example, Fisher and al [32] have found 36 % ID in the liver 90 min after i.v. injection of QDs with a HD of 25 nm (lysine modified coating) and 100 % ID post-injection in rats of biggest QDs with an HD of

80 nm (lysine modified and bovine serum albumin coating) by inductively coupled plasma-atomic emission spectroscopy (ICP-AES) analysis. Similarly, Soo Choi and co-workers [53] have investigated the distribution of ^{64}Cu -radiolabelled QDs by micro positron emission tomography (microPET) and have shown that the fraction of small QDs (HD of 4.36 nm) in the liver at 4 h post-injection corresponded to 4 % ID, but that this quantity increased to 28 % ID with larger QDs (HD of 8.65 nm). Such differences in QDs uptake in the liver can be explained by several factors including injection route and QDs size and surface chemistry. In particular, the uptake of our QDs by the liver may be slowed down by the presence of PEG on its surface, as was observed in other studies [54, 55].

Overall, these results provide useful guidelines for use of QDs for SLN mapping by NIR fluorescence imaging. Efficient detection of regional LNs is achieved only a few minutes after s.c. injection.

Even though the QDs concentration in the LNs still increases for up to 4 h post-injection, resection of the tumoral injection site and the SLN should ideally be performed during the first 15-30 min after injection to minimize QDs leakage into the organism. At these early times, QDs concentrations in the major organs remain very low, more than a hundred times lower than at the injection site or in the regional LNs. Since the SLN were readily detected in our configuration with only 10 ms of CCD exposure time, we can expect that the QDs injected dose can be significantly reduced, so that the QDs dose left in the body after the surgical act could be reduced well below toxicity concentrations. Investigations in this direction are in progress in our laboratory.

Conclusion

In conclusion, we have demonstrated that QDs-based NIR fluorescence imaging can be used to very efficiently localize regional draining LNs *in vivo* as early as 5 min after s.c.

injection in mice. Moreover, unlike other tracers QDs remain trapped in these LNs during several days. Indeed, in SLNB, it is recommended to inject radiocolloid the day before surgery to allow its migration to SLN followed by administration of physiologic dye in per-operative 5 to 10 min before SLN mapping. This short delay for physiological dye is related to its small size and as a matter of fact it diffuses in all lymphatic system. Thus, rapid accumulation of QDs in regional LNs detected by non-invasive NIR fluorescence imaging system offers an exciting opportunity to track lymphatic flow in real time and guide their nodal dissection after a single QDs injection and allows a rapid per-operative complete procedure.

This optical technique can also provide information about the kinetics of QDs accumulation in specific regional LNs in the same animal, but fails to compare the relative QDs concentration between different LNs or to detect low QDs concentrations in organs. We determined the whole-body QDs biodistribution by ICP-MS for 10 days after injection, and provide guidelines for the use of QDs for non-invasive fluorescence detection of superficial LNs in a clinical setting.

Acknowledgements

This work was supported by the Institut National du Cancer (INCa), the Comités départementaux (54, 57) of the Ligue Contre le Cancer, the Ligue Nationale Contre le Cancer and the Région Lorraine.

Abbreviations

% ID	=	Percentage of injected dose
Abs	=	Absorbance
ALN	=	Axillary lymph node
ALND	=	Axillary lymph node dissection
AU	=	Arbitrary unit

DLS	=	Dynamic light scattering
DPPE	=	Dipalmitoyl phosphatidylethanolamine
H&E	=	Haematoxylin & eosin
HD	=	Hydrodynamic diameter
ICP-AES	=	Inductively coupled plasma-atomic emission spectroscopy
ICP-MS	=	Inductively coupled plasma-mass spectroscopy
i.v.	=	Intravenous
LALN	=	Left axillary lymph node
LED	=	Light emitting diode
LLTLN	=	Left lateral thoracic lymph node
LN	=	Lymph node
LTLN	=	Lateral thoracic lymph node
Me	=	Methyl ether
microPET	=	Micro positron emission tomography
NIR	=	Near infrared
PBS	=	Phosphate buffer saline
PEG	=	Polyethyleneglycol
PL	=	Photoluminescence
QD	=	Quantum dot
RALN	=	Right axillary lymph node
RLTLN	=	Right lateral thoracic lymph node
ROI	=	Region of interest
s.c.	=	Subcutaneous
SD	=	Standard deviation
SLN	=	Sentinel lymph node
SLNB	=	Sentinel lymph node biopsy
TEM	=	Transmission electron microscopy
TOP	=	Triethylphosphine

References

1. Marchal, F.; Rauch, P.; Morel, O. et al. Results of preoperative lymphoscintigraphy for breast cancer are predictive of identification of axillary sentinel lymph nodes. *World J. Surg.* 30: 55-62, 2006.
2. Rovera, F.; Frattini, F.; Marelli, M. et al. Axillary sentinel lymph node biopsy: An overview. *Int. J. Surg.*, 2008. Epub ahead of print
3. Ferrari, A.; Rovera, F.; Dionigi, P. et al. Sentinel lymph node biopsy as the new standard of care in the surgical treatment for breast cancer. *Expert Rev. Anticancer Ther.* 6: 1503-1515, 2006.
4. Noguchi, M. Sentinel lymph node biopsy and breast cancer. *Br. J. Surg.* 89: 21-34, 2002.

5. Wilke, L.G.; McCall, L.M.; Posther, K.E. et al. Surgical complications associated with sentinel lymph node biopsy: results from a prospective international cooperative group trial. *Ann. Surg. Oncol.* 13: 491-500, 2006.
6. Sato, K. Current technical overviews of sentinel lymph node biopsy for breast cancer. *Breast Cancer* 14: 354-361, 2007.
7. Sato, K.; Shigenaga, R.; Ueda, S.; Shigekawa, T.; Krag, D.N. Sentinel lymph node biopsy for breast cancer. *J. Surg. Oncol.* 96: 322-329, 2007.
8. Montgomery, L.L.; Thorne, A.C.; Van Zee, K.J. et al. Isosulfan blue dye reactions during sentinel lymph node mapping for breast cancer. *Anesth. Analg.* 95: 385-388, 2002.
9. Scherer, K.; Studer, W.; Figueiredo, V.; Bircher, A.J. Anaphylaxis to isosulfan blue and cross-reactivity to patent blue V: case report and review of the nomenclature of vital blue dyes. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 96: 497-500, 2006.
10. Mujtaba, B.; Adenaike, M.; Yaganti, V.; Mujtaba, N.; Jain, D. Anaphylactic reaction to Tc-99m sestamibi (Cardiolite) during pharmacologic myocardial perfusion imaging. *J. Nucl. Cardiol.* 14: 256-258, 2007.
11. Chicken, D.W.; Mansouri, R.; Ell, P.J.; Keshtgar, M.R. Allergy to technetium-labelled nanocolloidal albumin for sentinel node identification. *Ann. R. Coll. Surg. Engl.* 89: W12-13, 2007.
12. Kaleya, R.N.; Heckman, J.T.; Most, M.; Zager, J.S. Lymphatic mapping and sentinel node biopsy: a surgical perspective. *Semin. Nucl. Med.* 35: 129-134, 2005.
13. Murray, C.B.; Norris, D.G.; Bawendi, M.G. Synthesis and characterization of nearly monodisperse CdE (E = S, Se, Te) semiconductor nanocrystallites. *J. Am. Chem. Soc.* 115: 8706-8715, 1993.
14. Alivisatos, A.P. Semiconductor clusters, nanocrystals, and quantum dots. *Science* 271: 933-937, 1996.
15. Bruchez, M., Jr.; Moronne, M.; Gin, P.; Weiss, S.; Alivisatos, A.P. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. *Science* 281: 2013-2016, 1998.
16. Ipe, B.I.; Lehnig, M.; Niemeyer, C.M. On the generation of free radical species from quantum dots. *Small* 1: 706-709, 2005.
17. Derfus, A.; Chan, W.C.W.; Bhatia, S. Probing the cytotoxicity of CdSe quantum dots with surface modification. *Nano Lett.* 4: 11-18, 2004.
18. Yu, W.W.; Chang, E.; Drezek, R.; Colvin, V.L. Water-soluble quantum dots for biomedical applications. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 348: 781-786, 2006.

19. Carion, O.; Mahler, B.; Pons, T.; Dubertret, B. Synthesis, encapsulation, purification and coupling of single quantum dots in phospholipid micelles for their use in cellular and in vivo imaging. *Nat. Protoc.* 2: 2383-2390, 2007.
20. Pons, T.; Lequeux, N.; Mahler, B. et al. Synthesis of Near-Infrared-Emitting, Water-Soluble CdTeSe/CdZnS Core/Shell Quantum Dots. *Chem. Mater.*, 2009. Article in press
21. Soltesz, E.G.; Kim, S.; Kim, S.W. et al. Sentinel lymph node mapping of the gastrointestinal tract by using invisible light. *Ann. Surg. Oncol.* 13: 386-396, 2006.
22. Parungo, C.P.; Colson, Y.L.; Kim, S.W. et al. Sentinel lymph node mapping of the pleural space. *Chest* 127: 1799-1804, 2005.
23. Soltesz, E.G.; Kim, S.; Laurence, R.G. et al. Intraoperative sentinel lymph node mapping of the lung using near-infrared fluorescent quantum dots. *Ann. Thorac. Surg.* 79: 269-277, 2005.
24. Parungo, C.P.; Ohnishi, S.; Kim, S.W. et al. Intraoperative identification of esophageal sentinel lymph nodes with near-infrared fluorescence imaging. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 129: 844-850, 2005.
25. Tanaka, E.; Choi, H.S.; Fujii, H.; Bawendi, M.G.; Frangioni, J.V. Image-guided oncologic surgery using invisible light: completed pre-clinical development for sentinel lymph node mapping. *Ann. Surg. Oncol.* 13: 1671-1681, 2006.
26. Kim, S.; Lim, Y.T.; Soltesz, E.G. et al. Near-infrared fluorescent type II quantum dots for sentinel lymph node mapping. *Nat. Biotechnol.* 22: 93-97, 2004.
27. Kobayashi, H.; Hama, Y.; Koyama, Y. et al. Simultaneous Multicolor Imaging of Five Different Lymphatic Basins Using Quantum Dots. *Nano Lett.* 7: 1711-1716, 2007.
28. Hama, Y.; Koyama, Y.; Urano, Y.; Choyke, P.L.; Kobayashi, H. Simultaneous two-color spectral fluorescence lymphangiography with near infrared quantum dots to map two lymphatic flows from the breast and the upper extremity. *Breast Cancer Res. Treat.* 103: 23-28, 2007.
29. Ballou, B.; Ernst, L.A.; Andreko, S. et al. Sentinel Lymph Node Imaging Using Quantum Dots in Mouse Tumor Models. *Bioconjug. Chem.* 18: 389-396, 2007.
30. Knapp, D.W.; Adams, L.G.; Degrand, A.M. et al. Sentinel lymph node mapping of invasive urinary bladder cancer in animal models using invisible light. *Eur. Urol.* 52: 1700-1708, 2007.
31. Chen, Z.; Chen, H.; Meng, H. et al. Bio-distribution and metabolic paths of silica coated CdSeS quantum dots. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 230: 364-371, 2008.

32. Fischer, H.; Liu, L.; Pang, K.; Chan, W. Pharmacokinetics of Nanoscale Quantum Dots: In Vivo Distribution, Sequestration, and Clearance in the Rat. *Adv. Funct. Mater.* 16: 1299-1305, 2006.
33. Gopee, N.V.; Roberts, D.W.; Webb, P. et al. Migration of intradermally injected quantum dots to sentinel organs in mice. *Toxicol. Sci.* 98: 249-257, 2007.
34. Yang, R.S.; Chang, L.W.; Wu, J.P. et al. Persistent Tissue Kinetics and Redistribution of Nanoparticles, Quantum Dot 705, in Mice: ICP-MS Quantitative Assessment. *Environ. Health Perspect.* 115: 1339-1343, 2007.
35. Duconge, F.; Pons, T.; Pestourie, C. et al. Fluorine-18-Labeled Phospholipid Quantum Dot Micelles for in Vivo Multimodal Imaging from Whole Body to Cellular Scales. *Bioconjug. Chem.* 19: 1921-1926, 2008.
36. Lin, P.; Chen, J.W.; Chang, L.W. et al. Computational and ultrastructural toxicology of a nanoparticle, Quantum Dot 705, in mice. *Environ. Sci. Technol.* 42: 6264-6270, 2008.
37. Geys, J.; Nemmar, A.; Verbeken, E. et al. Acute toxicity and prothrombotic effects of quantum dots: impact of surface charge. *Environ. Health Perspect.* 116: 1607-1613, 2008.
38. Daou, T.J.; Li, L.; Reiss, P.; Josserand, V.; Texier, I. Effect of Poly(ethylene glycol) Length on the in Vivo Behavior of Coated Quantum Dots. *Langmuir*, 2009. Epub ahead of print
39. Kostarelos, K. Tumor Targeting of Functionalized Quantum Dot-Liposome Hybrids by Intravenous Administration. *Mol. Pharma.*, 2009. Epub ahead of print
40. Pic, E.; Bezdetnaya, L.; Guillemin, F.; Marchal, F. Quantification techniques and biodistribution of semiconductor quantum dots. *Anticancer Agents Med. Chem.* 9: 295-303, 2009.
41. Dubertret, B.; Skourides, P.; Norris, D.J. et al. In vivo imaging of quantum dots encapsulated in phospholipid micelles. *Science* 298: 1759-1762, 2002.
42. Hama, Y.; Koyama, Y.; Urano, Y.; Choyke, P.L.; Kobayashi, H. Two-color lymphatic mapping using Ig-conjugated near infrared optical probes. *J. Invest. Dermatol.* 127: 2351-2356, 2007.
43. Robe, A.; Pic, E.; Lassalle, H.P. et al. Quantum dots in axillary lymph node mapping: biodistribution study in healthy mice. *BMC Cancer* 8: 111, 2008.
44. Ntziachristos, V.; Bremer, C.; Weissleder, R. Fluorescence imaging with near-infrared light: new technological advances that enable in vivo molecular imaging. *Eur. Radiol.* 13: 195-208, 2003.
45. Ntziachristos, V.; Ripoll, J.; Wang, L.V.; Weissleder, R. Looking and listening to light: the evolution of whole-body photonic imaging. *Nat. Biotechnol.* 23: 313-320, 2005.
46. Tanis, P.J.; Nieweg, O.E.; Valdes Olmos, R.A.; Kroon, B.B. Anatomy and physiology of lymphatic drainage of the breast from the perspective of sentinel node biopsy. *J. Am. Coll. Surg.* 192: 399-409, 2001.

47. Maysinger, D.; Behrendt, M.; Lalancette-Hebert, M.; Kriz, J. Real-time imaging of astrocyte response to quantum dots: in vivo screening model system for biocompatibility of nanoparticles. *Nano Lett.* 7: 2513-2520, 2007.
48. Clift, M.J.; Rothen-Rutishauser, B.; Brown, D.M. et al. The impact of different nanoparticle surface chemistry and size on uptake and toxicity in a murine macrophage cell line. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 232: 418-427, 2008.
49. Wang, L.; Nagesha, D.K.; Selvarasah, S.; Dokmeci, M.R.; Carrier, R.L. Toxicity of CdSe Nanoparticles in Caco-2 Cell Cultures. *J. Nanobiotechnology* 6: 11, 2008.
50. Stern, S.T.; Zolnik, B.S.; McLeland, C.B. et al. Induction of autophagy in porcine kidney cells by quantum dots: a common cellular response to nanomaterials? *Toxicol. Sci.* 106: 140-152, 2008.
51. Jacobsen, N.R.; Moller, P.; Jensen, K.A. et al. Lung inflammation and genotoxicity following pulmonary exposure to nanoparticles in ApoE^{-/-} mice. *Part. Fibre. Toxicol.* 6: 2, 2009.
52. Diagaradjane, P.; Orenstein-Cardona, J.M.; E Colon-Casasnovas, N. et al. Imaging Epidermal Growth Factor Receptor Expression In vivo: Pharmacokinetic and Biodistribution Characterization of a Bioconjugated Quantum Dot Nanoprobe. *Clin. Cancer Res.* 14: 731-741, 2008.
53. Soo Choi, H.; Liu, W.; Misra, P. et al. Renal clearance of quantum dots. *Nat. Biotechnol.* 25: 1165-1170, 2007.
54. Schipper, M.L.; Cheng, Z.; Lee, S.W. et al. microPET-based biodistribution of quantum dots in living mice. *J. Nucl. Med.* 48: 1511-1518, 2007.
55. Schipper, M.L.; Iyer, G.; Koh, A.L. et al. Particle size, surface coating, and PEGylation influence the biodistribution of quantum dots in living mice. *Small* 5: 126-134, 2009.
56. Gao, X.; Chen, J.; Chen, J. et al. Quantum dots bearing lectin-functionalized nanoparticles as a platform for in vivo brain imaging. *Bioconjug. Chem.* 19: 2189-2195, 2008.
57. Chen, K.; Li, Z.B.; Wang, H.; Cai, W.; Chen, X. Dual-modality optical and positron emission tomography imaging of vascular endothelial growth factor receptor on tumor vasculature using quantum dots. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 35: 2235-2244, 2008.

Figures

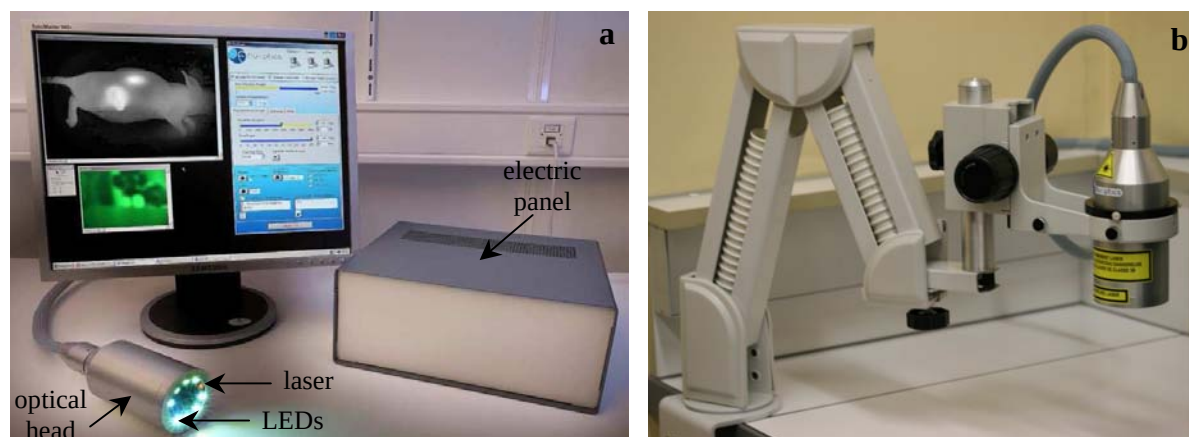


Fig. 1. Photographs of portable and compact Fluobeam® 700 system. a) Composition of Fluobeam® 700 system. b) Image of optical head supported by a hinged jib to carry out semi-quantitative fluorescence imaging *in vivo*.

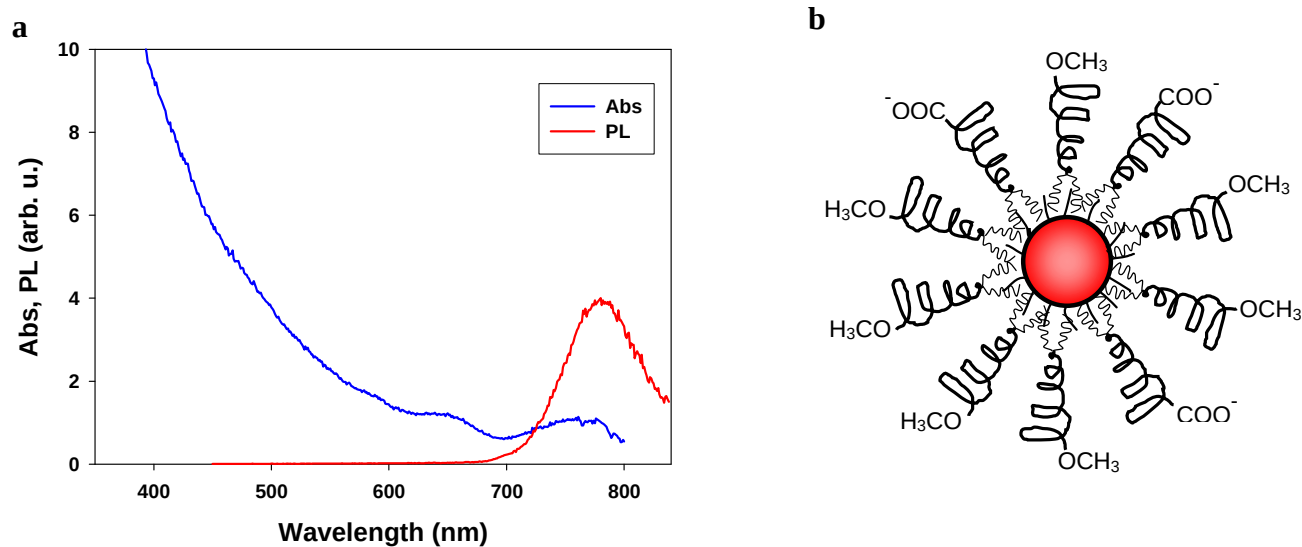


Fig. 2. a) Absorbance (Abs) and photoluminescence (PL) emission spectra of CdTeSe/CdZnS QDs. b) Schematics representing a CdTeSe/CdZnS QDs encapsulated in a mixed PEG:PEG-COOH phospholipid micelle (drawing is not to scale; only a few phospholipids were represented for clarity).

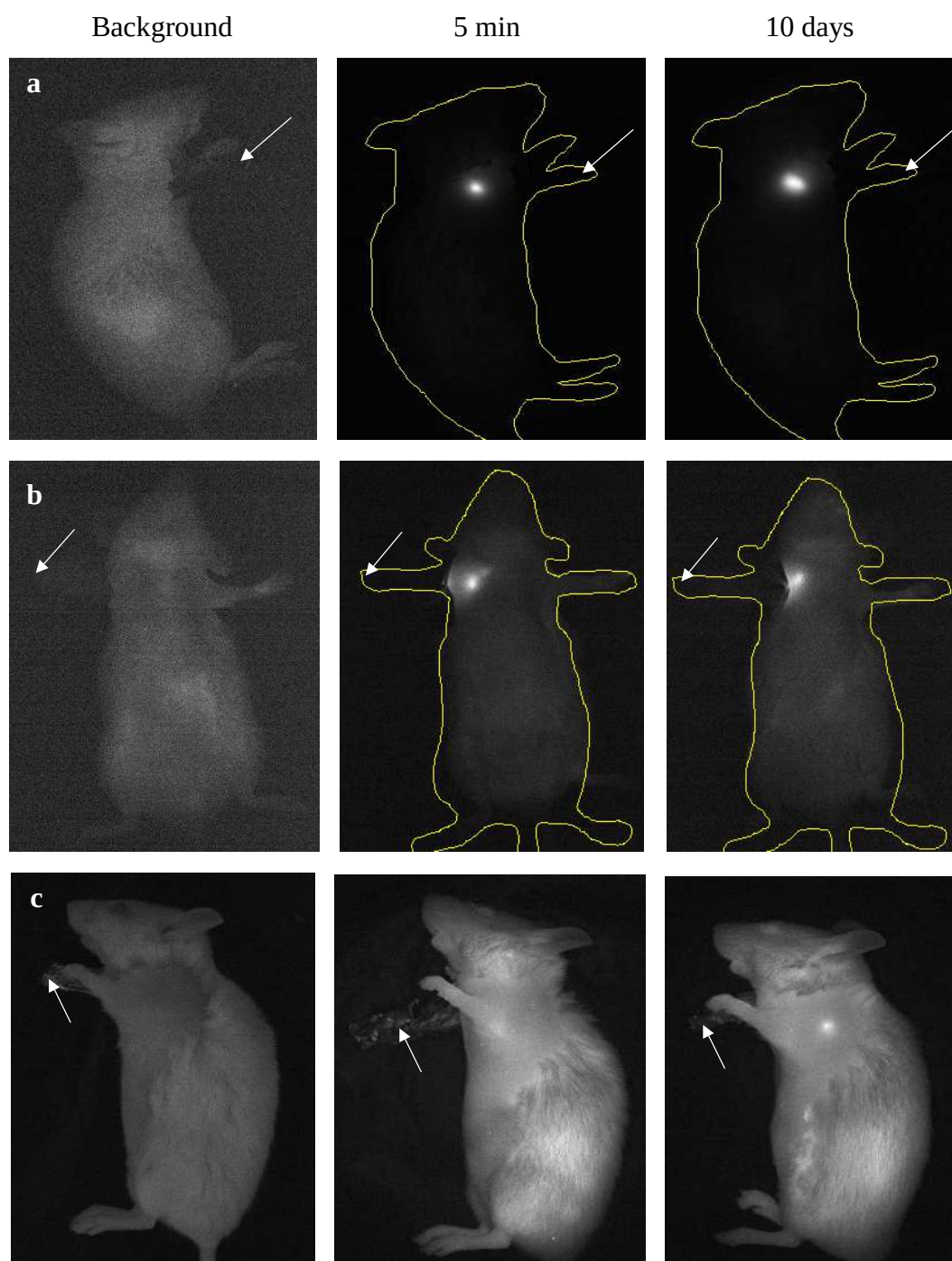


Fig. 3. *In vivo* fluorescence imaging of mice after s.c. injection of 20 pmol of QDs. **a)** Images of the right flank (visualization of RALN). **b)** Images on dorsal decubitus (observation of RLTLN). **c)** Images of left flank (visualization of LALN). Right column corresponds to background signal, middle and left columns to images at 5 min and 10 days post-injection, respectively. For a and b images, the exposure time is 10 ms, and for c images, the exposure time is 100 ms. The white narrow indicates the injection point.

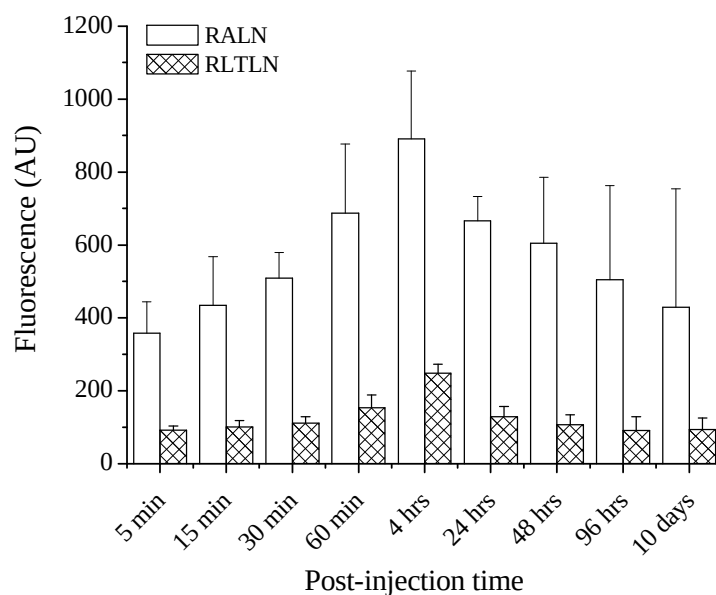


Fig. 4. *In vivo* fluorescence signals of QDs in RALN and RLTLN after s.c. injection of 20 pmol in mice functions of time. For fluorescence analyses of images, the exposure time is 10 ms. The data were mean $\pm$ SD (n = 3).

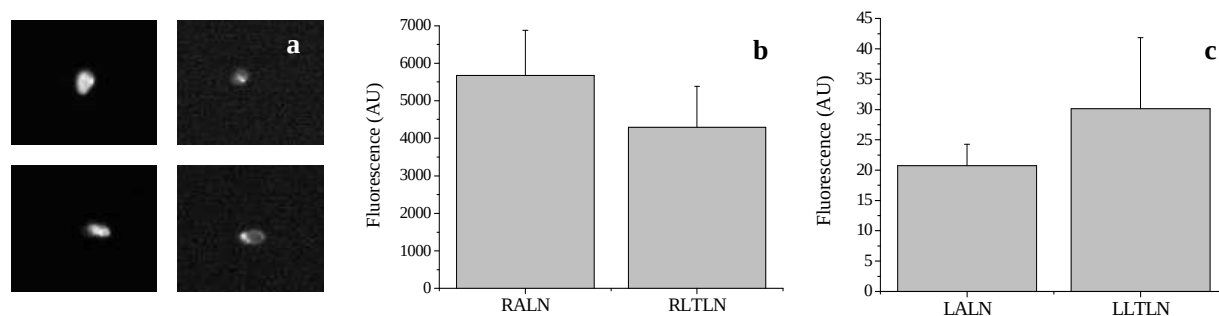


Fig. 5. *Ex vivo* fluorescence signals of four removed LNs. Mice were subcutaneously injected with 20 pmol of QDs and sacrificed at 10 days. **a)** Fluorescence images of LNs: RALN (upper left), RLTLN (lower left), LALN (upper right) and LLTLN (lower right). **b)** Relative fluorescence signal of right LNs (RALN and RLTLN) and **c)** left LNs (LALN and LLTLN). For fluorescence measurements, the exposure time is 100 ms. The data were mean $\pm$ SD (n = 3).

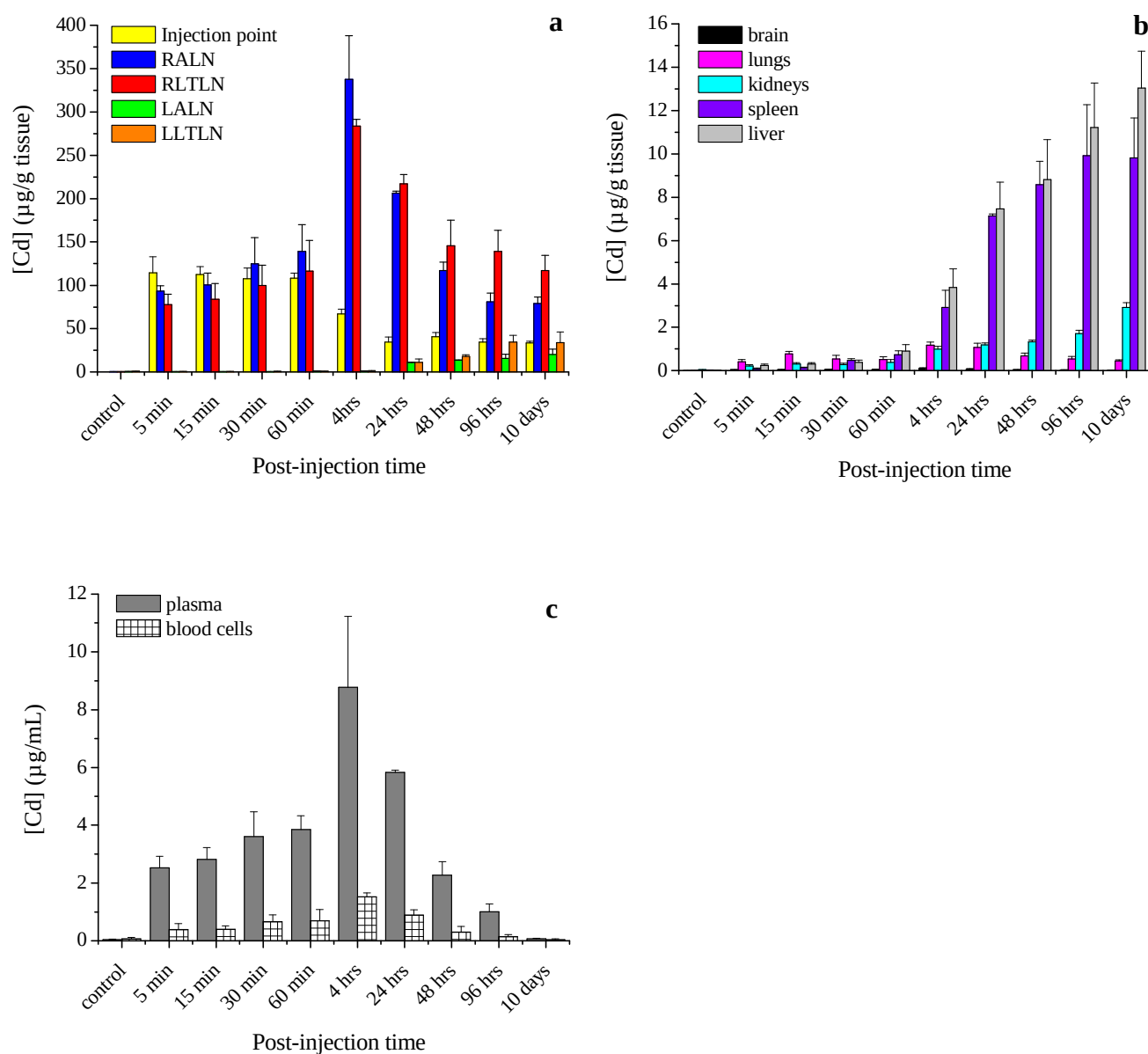


Fig. 6. Tissue kinetics of cadmium concentrations in mice after s.c. administration. Mice were injected with 20 pmol of QDs or PBS (control). Serial sacrifices were carried out at 5, 15, 30, 60 min at 4, 24, 48, 96 hrs and at 10 days after dosing. Several organs were isolated to determine cadmium concentrations by ICP-MS: **a**) injection point, RALN, RLTLN, LALN and LLTLN; **b**) brain, lungs, kidneys, spleen and liver and **c**) plasma and blood cells. The data were mean $\pm$ SD ($n = 3$ per group).

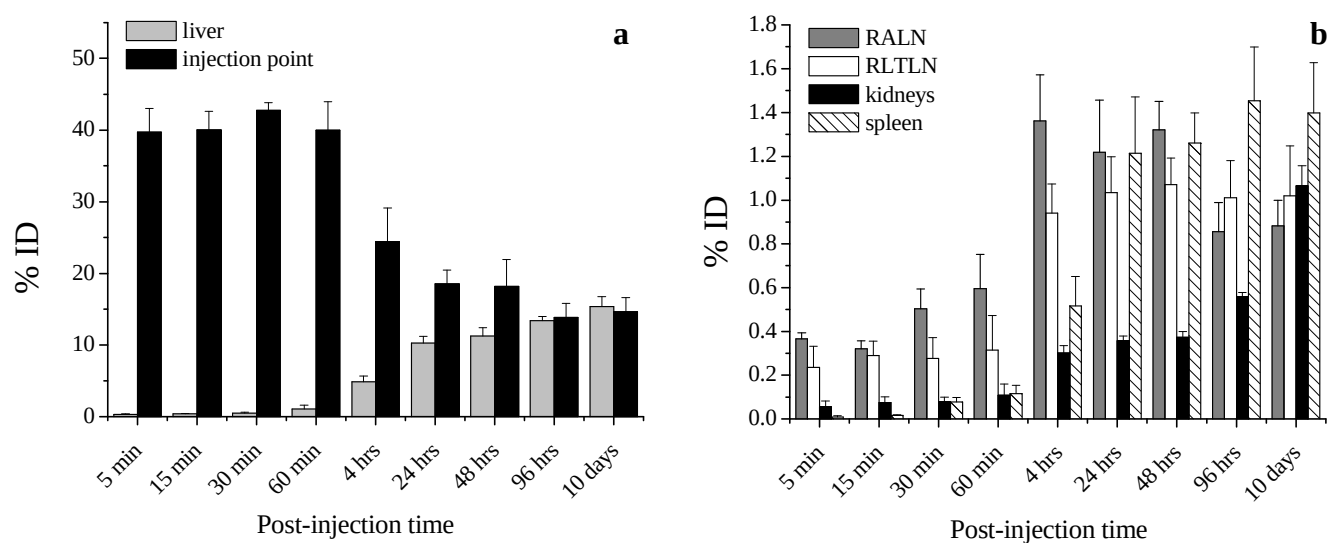


Fig. 7. Percentage of injected dose (% ID) in organs which most accumulate QDs. Mice were injected subcutaneously with 20 pmol of QDs. Serial sacrifices were carried out at 5, 15, 30, 60 min at 4, 24, 48, 96 hrs and at 10 days and cadmium were measured. Several organs are represented: **a**) liver and injection point; **b**) RALN, RLTLN, kidneys and spleen. The data were mean $\pm$ SD ($n = 3$ per group).

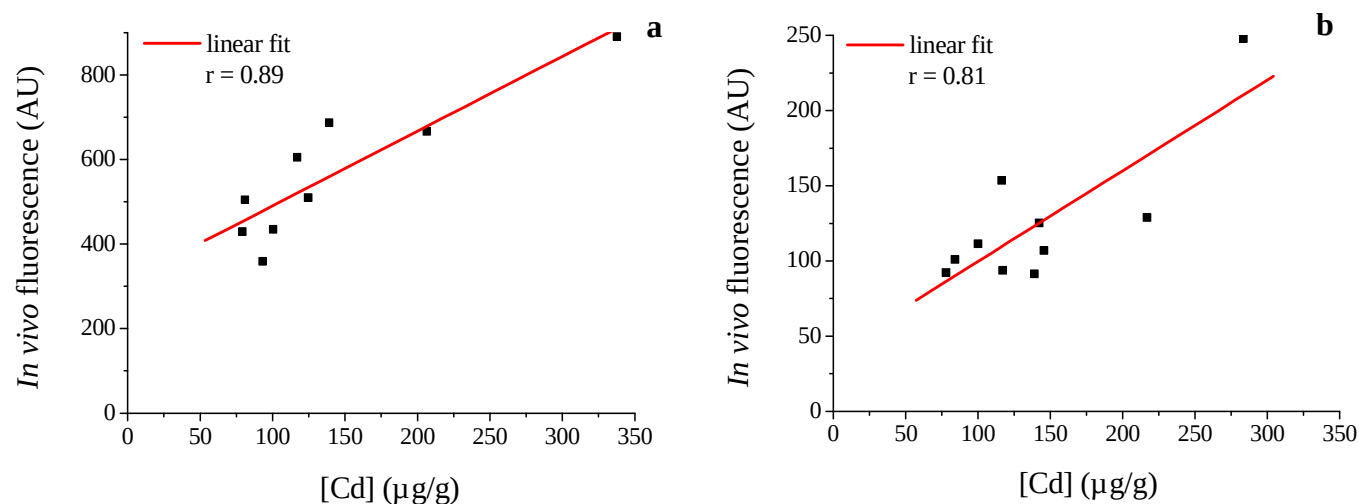


Fig. 8. Linear regression analyses and correlation coefficient values between cadmium concentrations measured by ICP-MS and *in vivo* fluorescence signals assessed by Fluobeam® 700 system, a) for RALN, and b) RLTLN.

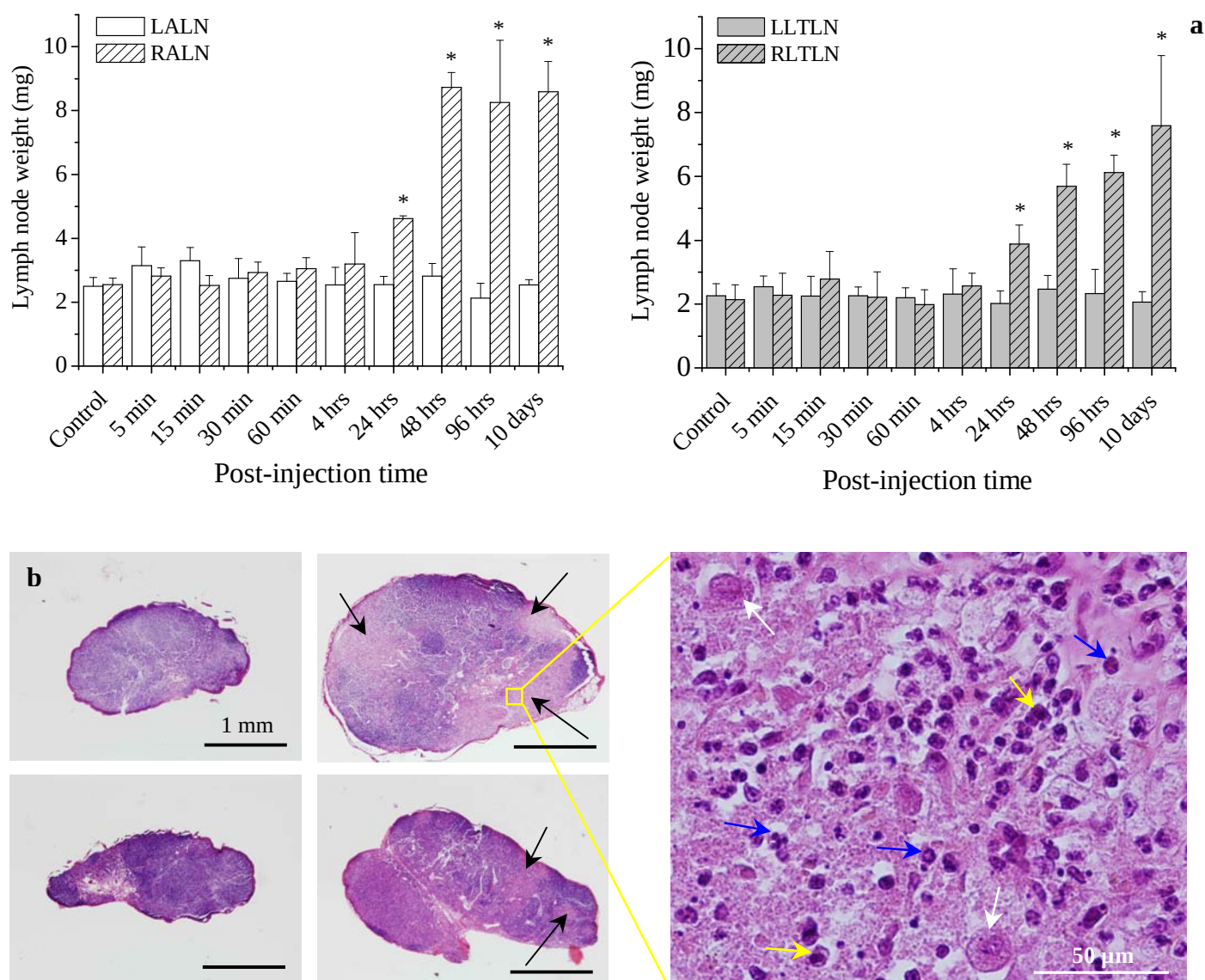


Fig. 9. Weight and histology of LNs after s.c. PBS (control) or QDs injection (20 pmol). **a)** Weight evolution of LNs functions of time after PBS or QDs delivery: right panel corresponds to ALNs and left panel to LTLNs. The data were mean $\pm$ SD ($n = 3$ per group) and values marked with asterisk were significantly different from control ($p < 0.05$). **b)** Histology of LNs sections 10 days after product injection: control RALN (upper left); control RLTLN (lower left); RALN injected with QDs (upper right) and RLTLN injected with QDs (lower right). The black arrows indicate inflammation areas (light site). Magnification is x25 and black scale correspond to 1 mm. **c)** Zoom of an inflammation area from RALN, 10 days after QDs injection. Many polynuclears have been visualised but only some have been indicated with blue narrows. In the field of view, histiocytes (yellow narrows) and also vacuoles of digestion (white narrows) were observed. Magnification is x400 and white scale correspond to 50 μ m.

***Détection du ganglion
sentinelle axillaire au moyen
de quantum dots par
imagerie de fluorescence sur
modèle murin de cancer
du sein***

Chapitre IV : Détection du ganglion sentinelle axillaire au moyen de quantum dots par imagerie de fluorescence sur modèle murin de cancer du sein

I. Matériel et méthodes

I.1. Quantum dots

Les QDs ont été fournis par l'équipe du Dr. Dubertret, rattachée au Laboratoire Photons et Matière (ESPCI, CNRS UPRA5, Paris, France) ^[194]. Les QDs étaient composés d'un cœur en alliage de tellure et sélénium de cadmium (CdTeSe), recouverts d'une coque de sulfure de zinc et de cadmium (CdZnS), encapsulés dans une micelle de phospholipides PEG2000 dont 33 % étaient terminés avec des groupements carboxyles. Ils étaient biocompatibles, stables en milieux biologiques et émettaient à 780 nm. Les solutions stocks de QDs ont été conservées à 4°C.

I.2. Culture cellulaire

La lignée cellulaire 4T1 (CRL-2539, ATCC) provenant d'adénocarcinomes mammaires de souris balb/cfC3H a été utilisée et cultivée dans du milieu *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 (Gibco, Cergy Pontoise, France) complété avec 9 % de sérum de veau fœtal inactivé (PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Germany), 1 % de pénicilline (10.000 UI)-streptomycine (10.000 µg/ml) et 1 % de glutamine à 200 mM (Gibco, Cergy Pontoise, France). Les cellules ont été cultivées en monocouche et gardées dans un incubateur saturé en humidité contenant 5 % de CO₂ et à une température de 37°C. Les cellules ont été repiquées à 80 % de confluence 2 fois par semaine pour leur assurer une croissance exponentielle.

I.3. Animaux

Des souris balb/c femelles (Balb/cOlaHsd) âgées de 8 à 10 semaines (Harlan, Gannat, France) et pesant entre 18 et 22 g ont été utilisées. Elles ont été gardées dans un cycle jour/nuits de 12 h et ont eu accès à la nourriture et à l'eau *ad libitum*. Avant toute expérimentation, les souris bénéficiaient de 2 semaines d'acclimatation. Des croquettes

spéciales purifiées (TD.94045, Harlan Teklad, Madison, WI, USA) ont été utilisées afin de diminuer l'auto fluorescence des tissus, et notamment celle du système digestif. Les animaux ont été manipulés en accord avec les instructions nationales vis-à-vis de l'expérimentation animale. Toutes les expériences d'imagerie ont eu lieu sous anesthésie générale après injection intrapéritonéale de 0,01 mL/g de souris d'une solution contenant 9 mg/mL de kétamine (Ketalar[®], Panpharma, Fougères, France) et 0,9 mg/mL de xylazine (Rompun[®], Bayer Pharma, Puteaux, France).

I.4. Induction tumorale : modèle syngénique orthotopique murin et suivi de la croissance tumorale

Les souris (n = 56) ont été greffées sous anesthésie gazeuse au moyen du système Univentor 400[®] (Genestil, Royaucourt, France) dédié au petit animal utilisant de l'isoflurane (Forene[®], Abbott, Paris, France). Quarante microlitres d'eau glucosée 5 % (Glucose Proamp[®] 5%, Aguettant, Lyon, France) contenant 10⁶ cellules 4T1 ont été injectées en s.c. au niveau des mamelles thoraciques droites des souris.

Le suivi de la croissance tumorale a été réalisé sur 10 souris, le volume tumoral étant mesuré tous les 2 ou 3 jours. La formule utilisée pour calculer le volume tumoral était celle du volume d'une ellipsoïde.

I.5. Imagerie de fluorescence proche infrarouge

L'imagerie optique des QDs a été effectuée au moyen du système d'imagerie de fluorescence Fluobeam[®] (Fluoptics, Grenoble, France) couplé à une caméra CCD hautement sensible dans le domaine spectral du PIR. Pour l'imagerie, un laser à 690 nm a été utilisé comme source d'excitation et un filtre d'émission passe haut à 750 nm a été employé.

Les souris ont été imagées lorsque leur tumeur atteignait un volume de 1000 mm³ (volume éthique). Les souris témoins ont reçu 20 µL de tampon phosphate salin (TPS) par injection s.c. dans la partie supérieure de la patte antérieure droite. Vingt microlitres d'une solution de QDs à 1 µM (20 pmol), dilués dans du TPS ont été injectés pour les groupes expérimentaux via la même voie d'administration que les témoins. Après injection, la patte a

été massée afin d'améliorer la migration du produit. Les souris ont été sacrifiées par dislocation cervicale sous anesthésie.

La région axillaire des souris a été dépilée avec une crème dépilatoire commerciale pour limiter l'autofluorescence des poils des animaux dans cette zone d'intérêt. La caméra CCD utilisée présente la particularité d'ajuster le signal de fluorescence sur le pixel le plus intense, c'est pourquoi la zone d'injection a été masquée pour permettre une meilleure visualisation de la région d'intérêt (ROI).

La fluorescence *in vivo* du ganglion sentinelle axillaire droit (GAD) a été acquise avant injection (correspondant à la somme de l'autofluorescence des tissus et du bruit de fond de l'appareil) ainsi qu'à 5, 15, 30, 60 min et 4 h après administration s.c. des QDs chez les souris porteuses de tumeurs 4T1 (n = 46) ainsi que sur des souris saines (n = 8), servant de contrôle quant à l'accumulation des QDs dans les GAD sains. Quatre heures après administration des QDs, les souris ont été sacrifiées, le GAD a été prélevé et la fluorescence *ex vivo* a été mesurée. Le temps d'exposition de la caméra CCD était de 10 ms pour chaque cliché.

Les signaux de fluorescence *in vivo* ou *ex vivo* ont été exprimés en unité arbitraire (UA) et traités au moyen du logiciel Image J version 1.37. Les signaux de fluorescence des ROIs ont été calculés en dessinant une ellipse autour des différents organes étudiés et le bruit de fond (autofluorescence des tissus et bruit de l'appareil) a été soustrait systématiquement de toutes les images. Toutes les données sont exprimées comme la moyenne $\pm$ l'écart standard à la moyenne (ESM).

I.6. Détection histologique des métastases ganglionnaires

Vingt-six GAD issus de souris porteuses de tumeurs 4T1 (10 utilisées pour le suivi de la croissance tumorale et 16 ayant été imagées avec le Fluobeam®) ont été mis en cassette et inclus en paraffine. Des coupes de 5 μ m ont été réalisées puis colorées par HES. Les lames HES ont ensuite été lues par le Dr. Leroux, médecin anatomopathologiste du Centre Alexis Vautrin.

I.7. Détection des métastases ganglionnaires par *reverse transcription-polymerase chain reaction*

I. 7. 1. Extraction des acides ribonucléiques totaux

Des cellules 4T1 ont été utilisées comme témoin positif, des GAD sains comme témoin négatif et 30 GAD provenant de souris porteuses de tumeurs 4T1 ont été analysés.

Les acides ribonucléiques (ARN) totaux ont été extraits selon la méthode de Chomczynski et Sacchi, à l'aide du réactif TRIzol[®] (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France), solution de phénol et d'isothiocyanate de guanidine ^[195]. Le TRIzol[®] maintient l'intégrité des ARN lors de la dissociation des différents composants cellulaires.

Pour extraire les ARN sur cellules en monocouche, un rinçage au TPS a été réalisé, 1 mL de TRIzol[®] a été ajouté et laissé en contact à température ambiante pendant 1 min. Pour les extractions d'ARN sur ganglions, 500 µL de TRIzol[®] et 3 billes métalliques RNase DNase free ont été ajoutés puis les ganglions ont été lysés au moyen d'un vibro-broyeur TissueLyser (Qiagen, Courtabœuf, France) pendant 3 min à une fréquence de 30 vibration/s. Cinq cents microlitres de TRIzol[®] ont été de nouveau incorporés et laissés à température ambiante pendant 1 min. Les cellules ainsi que les broyats de ganglions ont ensuite été récupérés dans un tube RNase DNase free. Une centrifugation à 12000 g pendant 10 min à 4°C a permis de séparer les débris cellulaires du surnageant, dans lequel étaient dissouts les protéines, les acides désoxyribonucléiques (ADN) et les ARN.

Après transfert du surnageant dans un nouveau tube, 200 µL de chloroforme ont été ajoutés. Le mélange surnageant/chloroforme a été agité vigoureusement environ 15 s puis centrifugé à 12000 g pendant 15 min à 4°C. Deux phases ont été observées, les ARN extraits se retrouvant dans la phase aqueuse (surnageant). Cette dernière a été transférée dans un nouveau tube et 500 µL d'isopropanol ont été ajoutés pour précipiter les ARN. Le mélange a été laissé en contact 10 min à température ambiante puis centrifugé à 12000 g pendant 10 min à 4°C. Les ARN totaux précipités formaient ainsi un culot.

Le culot a été réhydraté par addition de 1 mL d'éthanol à 75 % puis centrifugé à 7500 g pendant 5 min à 4°C. L'éthanol a ensuite été éliminé par aspiration puis les tubes

ouverts ont été placés dans un bain sec (Fisher Bioblock Scientific, Illkiich, France) à 37°C jusqu'à évaporation totale de l'éthanol. Le culot a ensuite été resuspendu dans 50 µL d'eau stérile RNase DNase free. Les ARN totaux ont été conservés à -80°C.

I. 7. 2. Dosage et qualité des acides ribonucléiques totaux

Une dilution au 1/100^{ème} de chaque échantillon dans de l'eau RNase DNase free a été préparée pour une mesure d'absorbance avec un spectromètre BioPhotometer (Eppendorf, Le Pecq, France) à 260 nm, permettant de déterminer la concentration en ARN totaux.

Cette même dilution a également permis d'évaluer la qualité des ARN extraits en mesurant l'absorbance à 280 nm (absorbance des protéines et des phénols) et en calculant le ratio de l'absorbance à 260 nm sur celle à 280nm ($R = A_{260nm}/A_{280nm}$). La préparation était considérée de bonne qualité si le ratio était inférieur à 2.

I. 7. 3. Transcription inverse (*reverse transcription*)

La réaction de *reverse transcription* (RT) a permis de synthétiser un ADN complémentaire (ADNc) simple brin à partir d'un ARN messager (ARNm).

Un microgramme d'ARN totaux a été déposé dans un tube à PCR de 500 µL et complété avec de l'eau RNase DNase free pour atteindre un volume final de 11 µL. Le mélange réactionnel nécessaire à la RT a alors été ajouté dans chaque tube, soit 4 µL de Mix 5X Biorad, 1 µL d'Iscrip RT BioRad (Iscrip cDNA synthesis kit, BioRad, Ivry-sur-Seine, France) et 4 µL d'eau RNase DNase free. Les tubes ont ensuite été incubés dans un thermocycleur Matercycler gradient (Eppendorf, Le Pecq, France), 5 min à 25°C puis 30 min à 42°C, correspondant à la phase de synthèse des ADNc, et pour finir 5 min à 70°C, représentant la phase de dénaturation de l'enzyme Iscrip. Les ADNc ont été conservés à -80°C.

I. 7. 4. Amplification en chaîne de l'ADN (*polymerase chain reaction*)

A partir des ADNc totaux, la *polymerase chain reaction* (PCR) permet d'amplifier sélectivement des gènes cibles, grâce à l'utilisation d'amorces spécifiques de ces gènes d'intérêt. L'expression de chaque gène d'intérêt est évaluée de manière semi-quantitative par rapport à l'expression d'un gène de référence. L'expression du gène codant pour la

cytokératine 19 (CK19) murine a été étudiée. La cytokératine 19 est présente dans la plupart des tissus épithéliaux et ainsi dans les cellules tumorales 4T1 mais est absente des ganglions lymphatique sains ^[196]. Le gène codant pour la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) humaine a été utilisé comme gène de référence car il est présent dans les cellules normale et tumorales et son amorce reconnaît aussi l'ADNc codant pour la GAPDH murine Tableau VII. Ces 2 gènes ont été amplifiés simultanément.

Tableau VII. Description des amorces utilisées pour la PCR.

Gène cible	Amorce (5' – 3')		Référence	Fournisseur
CK19	<i>sens</i>	TGA TCG TCT CGC CTC CTA CT	[197]	Eurogentec
	<i>anti-sens</i>	CAA GGC GTG TTC TGT CTC AA		
GADPH	<i>sens</i>	TGG GGA AGG TGA AGG TCG GA	[198]	
	<i>anti-sens</i>	GAA GGG GTC ATT GAT GGC AA		

Pour chaque tube, l'ensemble des réactifs (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) nécessaire à l'amplification des 2 gènes est décrit dans le Tableau VIII.

Tableau VIII. Composition du mélange pour l'amplification des gènes codant pour la CK19 et la GAPDH.

Réactif de PCR	Volume (µL)
ADNc	2
Tampon de PCR 10X	2
MgCl ₂ 50 mM	0,6
dNTP 2,5 mM	1,6
Amorce sens 5 µM	2
Amorce anti-sens 5 µM	2
Taq DNA polymerase	0,2
H ₂ O (RNase DNase free)	qsp 20

Après avoir été homogénéisés et centrifugés, les tubes ont été placés dans le thermocycleur permettant d'alterner les phases de dénaturation, d'appariement et de synthèse (Tableau IX).

Tableau IX. Cycles d'amplification du gène codant pour la CK19. ^[197]

Etape	Température (°C)	Durée	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	95	15 min	1
Amplification	Dénaturation	94	30 s
	Appariement	52	40 s
	Synthèse	72	60 s
Dégradation de la Taq polymérase	72	10 min	1
Terminaison	4	infinie	

I. 7. 5. Analyse des produits d'amplification

Après PCR, les échantillons ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose. Un gel d'agarose à 2 % (m/v) a été préparé par dissolution d'agarose (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) dans du tampon tris-borate-EDTA (TBE) 0,5X, contenant du bromure d'éthidium (BET) à la concentration de 10 $\mu\text{g/mL}$. Le gel a été mis à polymériser dans un support adapté, d'abord à température ambiante pendant 15 min, puis à 4°C. Deux microlitres de solution BlueJuiceTM (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) ont été ajoutés aux produits de PCR, puis 10 μL d'ADNc ont été déposés dans les puits pour migration. Un marqueur de taille (DNA Molecular Weight Marker VIII, Roche, Neuilly sur Seine), allant de 19 à 1114 paires de bases (pb) a également été déposé sur chaque gel, la CK19 formant un produit d'amplification à 262 pb et la GAPDH à 220 pb. La migration électrophorétique des produits de PCR a été réalisée dans un tampon TBE 1X pendant 2,5 h à 100 V.

Après migration, les bandes d'ADN ont été visualisées par transillumination UV au moyen du système Gel Doc EQ (BioRad, Ivry-sur-Seine, France) grâce à la fluorescence du BET qui s'intercale dans l'ADNc. La PCR ainsi que l'analyse des produits d'amplification ont été réalisées en triplicat pour chaque GAD. L'analyse des gels a été réalisée avec le logiciel ImageJ 1.37. Pour chaque échantillon, le rapport d'expression relative (RER) a été calculé, représentant l'intensité de fluorescence de la bande du gène cible (CK19) sur l'intensité de fluorescence de la bande du gène de référence (GAPDH). Les RER ont été normalisés par rapport à celui du témoin positif (cellules 4T1 cultivées en monocouche) considéré comme égal à 1.

I.8. Analyses statistiques

Les moyennes, ESM, ainsi que les tests statistiques (t-test de Student) ont été calculés au moyen du logiciel Excel (Microsoft Excel, Microsoft Corporation, Redmont, WA) ; une valeur de $p < 0,05$ était considérée comme significative.

II. Résultats et Discussion

II.1. Suivi de la croissance tumorale

Le suivi de la croissance tumorale est montré en Figure 16. La tumeur était palpable environ 7 jours après induction des cellules tumorales. Le volume tumoral éthique (1000 mm^3) était atteint entre 18 et 21 jours post-injection des cellules tumorales.

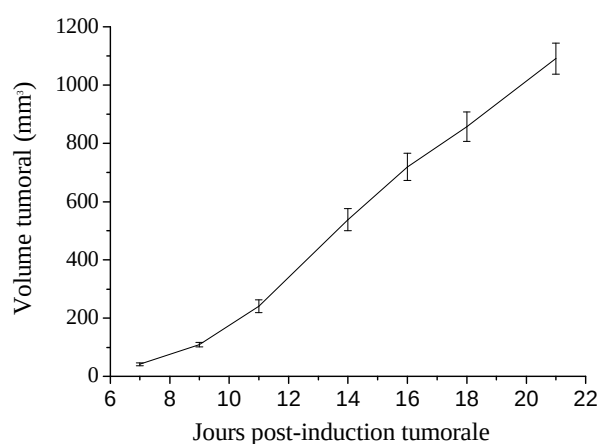


Figure 16. Suivi du volume tumoral suite à l'injection s.c. de 10^6 cellules 4T1 chez la souris balb/c au niveau des mamelles thoraciques droites ($n = 10$). Les résultats sont donnés comme la moyenne $\pm$ ESM.

II.2. Imagerie de fluorescence

Vingt picomoles de QDs ont été administrées en s.c. dans la patte antérieure droite de 46 souris porteuses de tumeurs 4T1 et chez 8 souris saines servant de contrôle quant à l'accumulation des QDs dans le GAD.

Tous les GAD contrôles ($n = 8$) ont été localisés *in vivo* chez les souris dès 5 min après injection des QDs (Figure 17A). Sur 46 souris porteuse de tumeurs 4T1, 44 GAD (96 %) ont

été visualisés *in vivo* dès 5 min (Figure 17B), un GAD (2 %) a été détecté uniquement 4 h post-administration des QDs et un autre (2 %) n'a pas été repéré sur la période de 4 h.

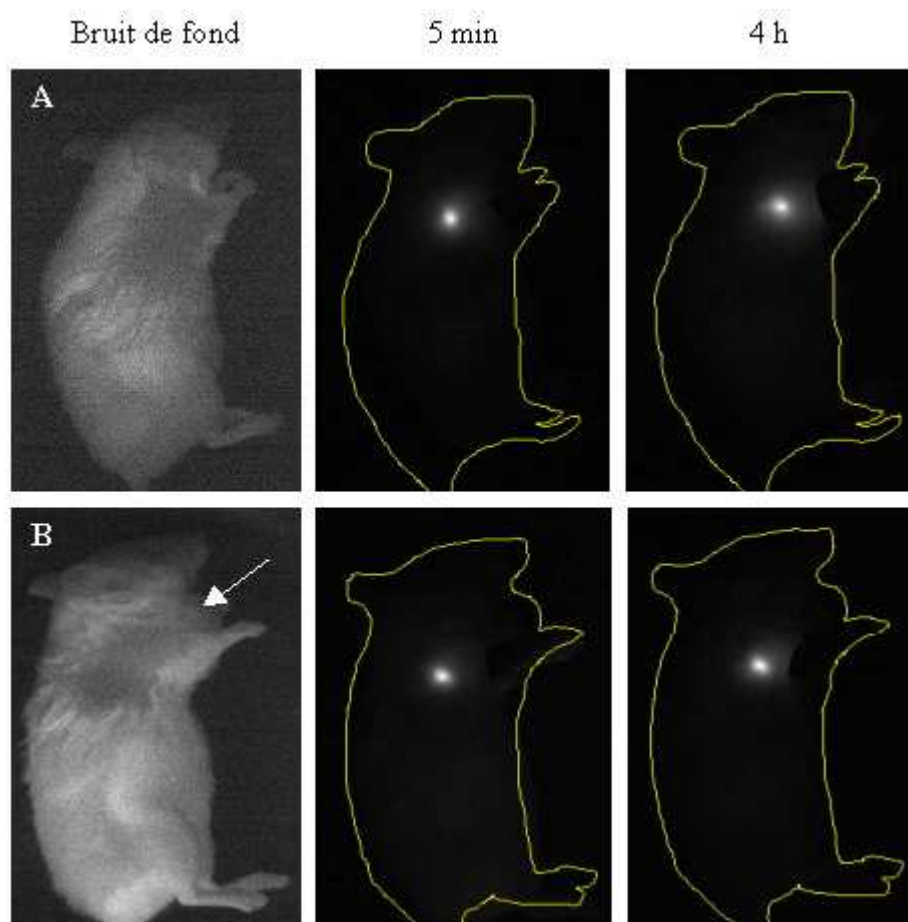


Figure 17. Imagerie de fluorescence *in vivo* du GAD suite à l'injection s.c. de 20 pmol de QDs. A) Image de fluorescence d'une souris saine, B) Image de fluorescence d'une souris porteuse d'une tumeur 4T1. La colonne gauche correspond au bruit de fond, celle du milieu à une cinétique de 5 min et celle de droite à une cinétique de 4 h post-administration des QDs. La flèche blanche indique la tumeur mammaire. Le temps d'exposition était de 10 ms.

Le suivi de fluorescence *in vivo* des GAD est montré en Figure 18. Un test de Student a été réalisé et aucune différence significative n'a été démontrée entre la fluorescence des GAD des souris saines et porteuses de tumeurs, et ceci pour tous les temps étudiés.

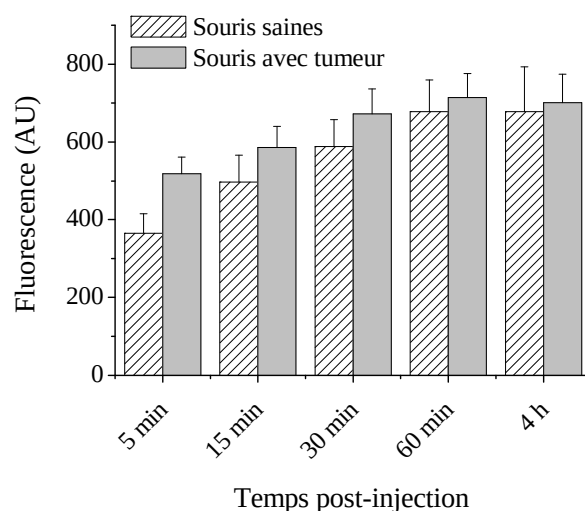


Figure 18. Suivi de fluorescence *in vivo* du GAD entre 5 min et 4 h après injection s.c. de 20 pmol de QDs chez des souris saines ($n = 8$) et porteuses de tumeurs 4T1 ($n = 45$). Le temps d'exposition était de 10 ms. Les données sont présentées comme la moyenne $\pm$ ESM.

La fluorescence *ex vivo* des GAD a également été mesurée 4 h après administration des QDs, suite au sacrifice des animaux. Tous les GAD ont été visualisés *ex vivo* chez les souris saines ($n = 8$), les 45 GAD repérés *in vivo* (entre 5 min et 4 h), l'ont également été *ex vivo*. Le GAD non détecté *in vivo*, n'a pas été visualisé *ex vivo*. Ce résultat peut être expliqué du fait que ce ganglion était palpable et présentait un poids de 42 mg étant 19 fois supérieur au poids des GAD contrôles qui était en moyenne de $2,2 \pm 0,2$ mg (données non montrées). Ainsi, ce ganglion était complètement envahi par les cellules tumorales, les canaux lymphatiques totalement obstrués, ce qui empêchait les QDs de migrer vers ce GAD. Ce cas représentait un faux négatif.

Les moyennes d'intensités de fluorescence des GAD *ex vivo* des souris saines et porteuses de tumeurs sont données en Figure 19, aucune différence significative (test de Student) n'a été observée entre ces 2 groupes.

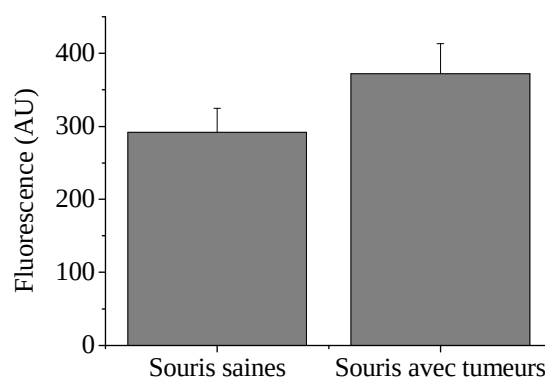


Figure 19. Fluorescence *ex vivo* du GAD 4 h après injection s.c. de 20 pmol de QDs chez des souris saines (n = 8) et porteuses de tumeurs 4T1 (n = 45). Le temps d'exposition était de 10 ms. Les données sont présentées comme la moyenne $\pm$ ESM.

II.3. Evaluation des métastases ganglionnaires

II.3.1. Coupes histologiques

Vingt six GAD issus de souris porteuses de tumeurs 4T1 (10 utilisées pour le suivi de croissance tumorale et 16 ayant été imagées avec le Fluobeam® 700) ont été inclus en paraffine, coupés et colorés par HES. Les lames HES ont été lues par le Dr. Leroux, médecin anatomopathologiste du Centre Alexis Vautrin.

Sept GAD sur 26 ont présenté un envahissement ganglionnaire soit une incidence de 27 %. Parmi ces 7 GAD métastatiques, des taux d'envahissement ganglionnaire allant de quelques amas de cellules tumorales représentant environ 1 % du volume tumoral à 80 % ont été observés (Figure 20).

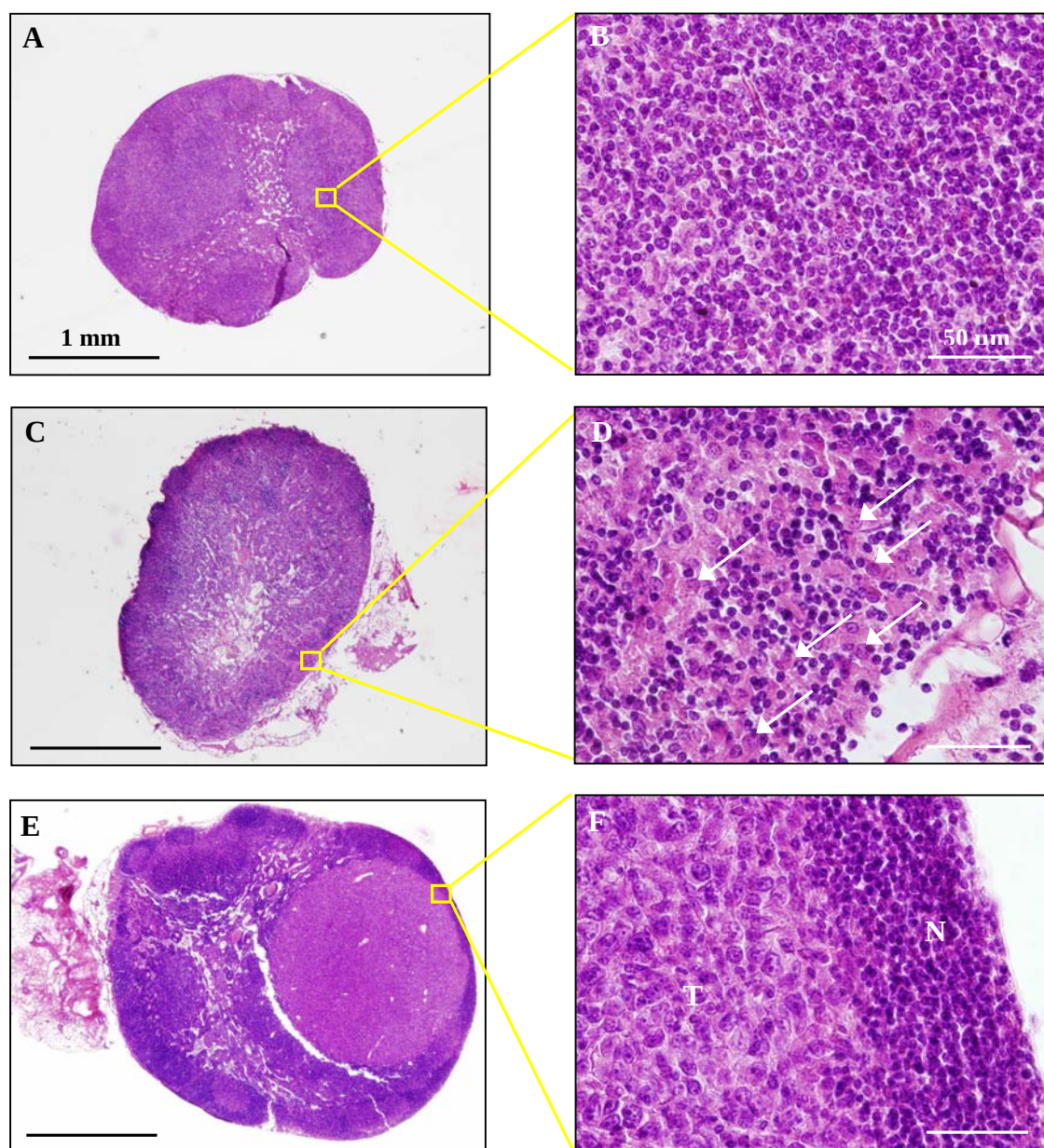


Figure 20. Photographies de coupes HES de GAD provenant de souris porteuses de tumeurs 4T1. Les images correspondent à un GAD : A) et B) indemne d'envahissement ganglionnaire, C) et D) présentant quelques cellules tumorales au milieu de cellules saines , et E) et F) présentant 40 % d'envahissement tumoral. Pour les images A), C) et E), le grossissement est de x25 et la barre d'échelle noire correspond à 1 mm. Les image B), D) et F) présentent un grossissement x400 et la barre d'échelle blanche correspond à 50 μ m. Les flèches blanches indiquent des cellules 4T1 au sein de cellules saines, N = tissu normal et T = tissu tumoral.

II.3.2. RT-PCR

Suite à la RT-PCR et à la migration des produits d'amplification de PCR contenant l'ADNc sur gel d'agarose 2 %, 20 GAD sur 30 ont présenté une bande correspondant à un

produit d'amplification de 262 pb, identifié comme l'ADN de la CK19 au moyen du marqueur de taille (Figure 21). Ainsi, 66 % des GAD analysés présentaient des métastases.

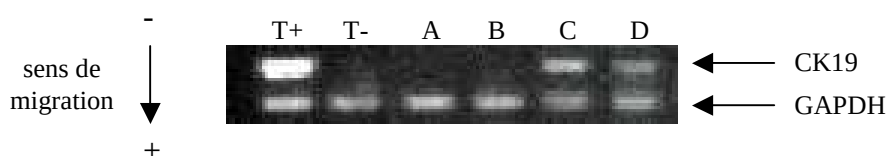


Figure 21. Détection des métastases ganglionnaires par RT-PCR : expression des gènes codant pour la CK19, gène exprimé dans les cellules tumorales 4T1 et du gène codant pour la GAPDH présent dans les cellules 4T1 et saines. Les échantillons A et B correspondent à des GAD indemne d'envahissement métastatique et les échantillons C et D à des GAD présentant des métastases. T+ : témoin positif (cellules 4T1) ; T- : témoin négatif (GAD sain).

Des RER variant de 0,02 à 0,48 ont été calculés par rapport au témoin positif (RER = 1) pour les GAD métastasés, indiquant différents taux d'envahissement ganglionnaire. Le RER à 0,48 correspondait au GAD palpable et complètement envahi par les cellules tumorales. Bien que ce ganglion était totalement métastasé, le RER calculé n'était pas égal à 1. Ce résultat peut être expliqué car le témoin positif était uniquement composé de cellules 4T1 cultivées en monocouche, toutes ces cellules contenant de la CK19. Cependant, le ganglion complètement envahi, outre des cellules 4T1, contenait des cellules saines provenant du ganglion d'origine ainsi que des cellules endothéliales représentatives des vaisseaux sanguins qui n'expriment pas la CK19^[152]. Ainsi, avec cette technique de RT-PCR semi-quantitative, les RER calculés n'ont pu être corrélés à un taux précis d'envahissement métastatique.

II.4. Comparaison des deux techniques de détection des métastases ganglionnaires

Suite à des coupes histologiques colorées par HES et leur lecture par un médecin spécialisé, 7 GAD sur 26 ont été observés positifs à un envahissement métastatique soit 27 % alors que 66 % des GAD soit 20/30, analysés par RT-PCR ont présenté des métastases. Ces résultats sont en accord avec d'autres études menées sur la détection des métastases dans les ganglions lymphatiques drainant les tumeurs 4T1. Aslakson et *al.* ont étudié la dissémination tumorale après injection de 10^5 cellules 4T1 au niveau de la 4^{ème} mamelle de souris balb/c par

essais clonogéniques ^[199]. Ils ont montré un envahissement de 21 % des ganglions drainant la tumeur primaire (12/58 animaux). L'équipe de Pulsaki a conduit 2 études sur la détection de métastases ganglionnaires par essais clonogéniques, suite à l'inoculation s.c. de cellules 4T1 dans une mamelle abdominale également chez des souris balb/c ^[200, 201]. Les auteurs ont trouvé des taux d'envahissement dans les ganglions lymphatiques de 78 et 86 %, 3 semaines après injection de 5.10^3 et 7.10^3 cellules 4T1, respectivement.

La différence entre les taux d'envahissement ganglionnaire évalués par les 2 techniques de détection utilisées dans notre étude s'explique du fait que la RT-PCR permet de détecter de très faibles quantités de cellules cancéreuses (une cellule tumorale sur un million) et présente également une meilleure sensibilité que la lecture de lames HES ^[94]. Cependant cette technique présente un inconvénient majeur qui est la perte de matériel biologique. En effet, pour être sûr que le ganglion est indemne ou non d'envahissement métastatique, il doit être complètement analysé pour ne pas passer à côté d'éventuelles micrométastases. De plus, la RT-PCR utilisée dans cette étude est semi-quantitative et ne permet pas de donner un taux d'envahissement ganglionnaire précis et donc de différencier les macrométastases des micrométastases. L'optimisation d'une RT-PCR quantitative (qRT-PCR) serait intéressante pour définir précisément le taux d'envahissement ganglionnaire et ainsi différencier les différents types de métastases.

III. Conclusion

L'imagerie de fluorescence, technique non-invasive, a permis de détecter 96 % des GAD superficiels dans les 5 min après injection s.c. de QDs dans la patte de souris porteuses de tumeurs mammaires, et 98 % dans les 4 h, avec des taux d'envahissement ganglionnaire évalués par coupes HES allant de quelques amas de cellules tumorales à 80 % d'envahissement métastatique.

Seul un GAD n'a pu être repéré car complètement métastasé et représentait ainsi un cas de faux négatif. Ainsi, les QDs semblent de bons candidats pour remplacer les produits standards utilisés dans la technique du GS du fait qu'ils migrent très rapidement dans le GAD dans la majorité des cas, et y restent piégés pendant plusieurs heures voire plusieurs jours ^[202].

La technique de RT-PCR (semi-quantitative) utilisée pour détecter les métastases ganglionnaires est beaucoup plus sensible que la lecture de lames HES mais une RT-PCR

quantitative devra être optimisée pour déterminer des taux précis d'envahissement ganglionnaire.

Synthèse générale et perspectives

Chapitre V : Synthèse générale et perspectives

Le statut ganglionnaire a la valeur pronostique la plus importante avec la taille de la tumeur chez les patients atteints d'un cancer du sein, le taux de survie étant corrélé au nombre de ganglions envahis. La technique de référence utilisée pour le diagnostic des métastases ganglionnaires et le traitement des cancers du sein opérables est le curage axillaire. Toutefois cette chirurgie est grevée d'une morbidité importante, le curage étant par ailleurs négatif dans près de 80 % des cas pour les tumeurs de moins de 3 cm. La technique du GS s'est développée à la fin des années 90 avec 2 objectifs : déterminer le statut ganglionnaire et diminuer la morbidité du geste axillaire. Cette technique consiste à repérer et prélever le premier relais ganglionnaire drainant la tumeur primaire, potentiellement métastatique, et de déterminer son statut histopathologique. Ces GS sont repérés par injection d'un produit radioactif et d'un colorant bleu. Cependant, ces 2 marqueurs présentent des effets secondaires suite à leur administration. Ainsi, notre stratégie a été de tester sur modèle pré-clinique murin de nouveaux traceurs fluorescents, les QDs, pour cette application.

La première étude, réalisée chez la souris saine, a porté sur la détection et la quantification à différents temps après injection de QDs émettant dans le rouge, composés en partie de Cd et s'accumulant sélectivement dans le GA. En parallèle, une étude de biodistribution a été conduite.

Les QDs ont été repérés *in vivo* dans le GA dès 5 min après injection s.c. d'une faible quantité de QDs (20 pmol) par spectrofluorimétrie fibrée et y sont restés piégés jusqu'à 24 h. Cette technique associée à l'extraction chimique et la microscopie de fluorescence des QDs ont permis de mettre en évidence l'accumulation rapide et sélective des QDs dans le GA. En effet, l'étude de biodistribution effectuée *ex vivo* dans les organes, le sang et les excréments suite à l'extraction chimique des QDs puis quantifiés par spectrométrie de fluorescence a montré que les QDs n'étaient pas détectés dans les autres prélèvements biologiques étudiés.

Cependant, les QDs utilisés émettaient dans le rouge et ne permettaient pas de détecter la fluorescence émise par les QDs piégés dans le GA, situé à un millimètre sous la peau (ganglion superficiel). La réalisation d'une incision cutanée a ainsi été nécessaire à leur visualisation *in vivo*, la technique de détection se révélant alors mini-invasive. De plus, la spectrofluorimétrie fibrée permet uniquement la réalisation de mesures locales de

fluorescence sur le GA, la fluorescence émise par la totalité des QDs présents dans le GA ne pouvant être évaluée.

Ainsi, dans un second travail, la localisation de 2 ganglions régionaux a été étudiée *in vivo* suite à l'administration de QDs émettant à 780 nm et visualisés par un système d'imagerie de fluorescence corps entier dédié au petit animal. Simultanément, une étude de biodistribution a été menée *ex vivo* sur une période de 10 jours après injection des QDs. Le Cd contenu dans les QDs a été mesuré par spectrométrie de masse ICP-MS, suite à la digestion et la minéralisation des organes, des prélèvements sanguins et des excréments collectés.

Les QDs ont été détectés *in vivo* par imagerie de fluorescence et *ex vivo* par ICP-MS dans les 2 ganglions régionaux, correspondant aux GA et GTL, dès 5 min après injection et y sont restés piégés jusqu'à 10 jours. La dose maximale en QDs dans les ganglions a été observée 4 h après injection et correspondait à 1,36 % DI pour le GA et 1,04 % DI pour le GTL. Les QDs ont également été retrouvés dans les organes où ils se sont accumulés préférentiellement dans le foie, la rate et les reins, ainsi que dans le sang mais n'ont pas été éliminés de l'organisme sur la période de 10 jours. De plus, dès 24 h après injection des QDs, une inflammation aigüe des GA et des GTL a été rapportée. La cinétique d'accumulation des QDs dans les 2 ganglions était similaire par les 2 techniques de détection. Ainsi, l'imagerie de fluorescence, méthode non-invasive, peut être utilisée pour localiser les ganglions régionaux superficiels chez la souris, mais aussi pour suivre l'accumulation de ces nanoparticules dans les ganglions régionaux, et ainsi, diminuer le nombre d'animaux à utiliser.

Les 2 études précédemment citées ont été réalisées *in vivo* chez la souris saine. Ainsi, pour se rapprocher de la clinique humaine, une troisième étude employant un modèle murin syngénique orthotopique de cancer du sein a été menée, portant sur la cartographie du GA, défini comme le GS, suite à l'induction de tumeurs au niveau des mamelles thoraciques chez la souris. Le GA a été visualisé *in vivo* chez des souris porteuses de tumeurs mammaires par imagerie de fluorescence sur une période de 4 h, suite à l'administration de QDs émettant à 780 nm (mêmes nanoparticules que pour l'étude précédente). Les métastases ganglionnaires ont été détectées soit par lecture de coupes de GA colorées par HES, représentant une méthode histologique, soit par une technique de biologie moléculaire : la RT-PCR.

Chez 96 % des animaux imagés, le GA sentinelle a été observé *in vivo*, le seul n'ayant pas capté les QDs était palpable et complètement envahi. L'incidence des métastases ganglionnaires analysée par coupes histologiques était de 27 % contre 66 % par RT-PCR.

Ainsi, la technique de RT-PCR présentait une meilleure sensibilité quant à la détection des métastases et surtout des micrométastases, non-visualisables sur coupes HES, expliquant cette différence au niveau des résultats obtenus.

Le Cd, métal lourd présent dans tous les QDs utilisés jusqu'à maintenant au Laboratoire est connu pour être toxique. Suite à son absorption digestive chez l'homme via l'alimentation, il se distribue dans tous les organes et notamment le foie et les reins et présente une demi vie biologique dans l'organisme de 10 à 30 ans. Ce métal ne peut donc pas être utilisé en clinique. Ainsi, l'équipe du Dr. Benoît Dubertret du Laboratoire Photons et Matière (ESPCI, CNRS UPRA5, Paris, France) avec qui nous collaborons, vient récemment de mettre au point la synthèse de QDs sans Cd composés de $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$ (cœur/coque) émettant à 800 nm et stables en milieu biologique. Une étude sur souris saines portant sur l'inflammation des GA et GTL, suite à l'injection de une à 5 fois la dose administrée (20-100 pmol) pour l'étude menée avec les QDs émettant à 780 nm et comprenant du Cd, est en cours au Laboratoire. Les prochaines études menées au Centre le seront avec ces nouveaux QDs.

Concernant la localisation des GS sur modèle de cancer du sein murin, il est indispensable, avant de commencer toute nouvelle étude, de mettre au point une technique de détection permettant une quantification absolue des métastases ganglionnaires. Notre choix s'est porté sur la RT-PCR quantitative ou qRT-PCR, avec comme gène cible toujours celui de la CK19. Une fois la technique de détection des métastases optimisée et validée pour le gène de la CK19, la technique du GS sera réalisée au moyen de QDs sur souris porteuses de tumeurs mammaires et les GS seront localisés *in vivo* par imagerie de fluorescence. Toutes les études conduites jusqu'ici ont été menées suite à l'injection s.c. des QDs dans la partie supérieure de la patte antérieure des souris. Pour se rapprocher toujours plus de la clinique, les QDs seront administrés en s.c. au niveau de la tumeur (péri-tumoral). Par la suite, la performance du test sera évaluée après calcul de la sensibilité, de la spécificité et des valeurs prédictives, puis comparée à celle de la technique de référence.

Afin d'améliorer les performances du système d'imagerie de fluorescence Fluobeam® utilisé dans nos études, en terme de limite de détection des QDs dans les tissus et pour éviter de travailler à l'obscurité, une collaboration vient de se créer avec la société Fluoptics de Grenoble qui a développé et commercialisé ce système d'imagerie. Un nouveau système d'imagerie de fluorescence est en cours de développement, avec une longueur d'excitation à

800 nm, permettant la manipulation de l'appareil à la lumière ainsi que sous les scialytiques présents aux blocs opératoires, dont les spectres lumineux sont généralement compris entre 400 et 700 nm. En parallèle, de nouveaux QDs seront synthétisés avec une longueur d'onde d'émission à 900 nm pour augmenter la profondeur de pénétration de la lumière dans les tissus biologiques.

Une sonde portable de détection et de mesure de fluorescence est également en cours de développement au Laboratoire permettant de détecter *in vivo* des QDs émettant dans le PIR de manière locale et ponctuelle. Le principe de cette sonde se rapproche de celui de la sonde de détection de radioactivité utilisée dans la technique du GS standard. Le développement de l'instrument, présentant le choix des différents composants utilisés et son principe de fonctionnement, ainsi qu'une approche expérimentale sont détaillés en Annexe I.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- [1] Morimoto T., Nagao T., Okazaki K., et al., *Current status of breast cancer screening in the world*, **Breast Cancer**. 2009; 16(1): 2-9.
- [2] Ferlay J., Autier P., Boniol M., et al., *Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006*, **Ann Oncol**. 2007; 18(3): 581-92.
- [3] Belot A., Grosclaude P., Bossard N., et al., *Cancer incidence and mortality in France over the period 1980-2005*, **Rev Epidemiol Sante Publique**. 2008; 56(3): 159-75.
- [4] Guerin S., Doyon F., Hill C., *[The frequency of cancer in France in 2006, mortality trends since 1950, incidence trends since 1980 and analysis of the discrepancies between these trends]*, **Bull Cancer**. 2009; 96(1): 51-7.
- [5] Jemal A., Siegel R., Ward E., et al., *Cancer statistics, 2008*, **CA Cancer J Clin**. 2008; 58(2): 71-96.
- [6] Nkondjock A., Ghadirian P., *[Risk factors and risk reduction of breast cancer]*, **Med Sci (Paris)**. 2005; 21(2): 175-80.
- [7] Key T. J., Verkasalo P. K., Banks E., *Epidemiology of breast cancer*, **Lancet Oncol**. 2001; 2(3): 133-40.
- [8] Yoney A., Kucuk A., Unsal M., *Male breast cancer: A retrospective analysis*, **Cancer Radiother**. 2009; 13(2): 103-7.
- [9] Kelsey J. L., Berkowitz G. S., *Breast cancer epidemiology*, **Cancer Res**. 1988; 48(20): 5615-23.
- [10] Hill C., Doyon F., *[Frequency of cancer in France]*, **Bull Cancer**. 2003; 90(3): 207-13.
- [11] Singletary S. E., *Rating the risk factors for breast cancer*, **Ann Surg**. 2003; 237(4): 474-82.
- [12] Ford D., Easton D. F., Stratton M., et al., *Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium*, **Am J Hum Genet**. 1998; 62(3): 676-89.
- [13] Wooster R., Weber B. L., *Breast and ovarian cancer*, **N Engl J Med**. 2003; 348(23): 2339-47.
- [14] Berliner J. L., Fay A. M., *Risk assessment and genetic counseling for hereditary breast and ovarian cancer: recommendations of the National Society of Genetic Counselors*, **J Genet Couns**. 2007; 16(3): 241-60.
- [15] Bonadona V., Lasset C., *[Inherited predisposition to breast cancer: after the BRCA1 and BRCA2 genes, what next?]*, **Bull Cancer**. 2003; 90(7): 587-94.
- [16] Easton D. F., Ford D., Bishop D. T., *Breast and ovarian cancer incidence in BRCA1-mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium*, **Am J Hum Genet**. 1995; 56(1): 265-71.
- [17] Pharoah P. D., Day N. E., Duffy S., et al., *Family history and the risk of breast cancer: a systematic review and meta-analysis*, **Int J Cancer**. 1997; 71(5): 800-9.
- [18] Irigaray P., Newby J. A., Clapp R., et al., *Lifestyle-related factors and environmental agents causing cancer: an overview*, **Biomed Pharmacother**. 2007; 61(10): 640-58.
- [19] Seitz H. K., Becker P., *Alcohol metabolism and cancer risk*, **Alcohol Res Health**. 2007; 30(1): 38-41, 44-7.
- [20] Nagata C., Mizoue T., Tanaka K., et al., *Tobacco smoking and breast cancer risk: an evaluation based on a systematic review of epidemiological evidence among the Japanese population*, **Jpn J Clin Oncol**. 2006; 36(6): 387-94.
- [21] Slattery M. L., Curtin K., Giuliano A. R., et al., *Active and passive smoking, IL6, ESR1, and breast cancer risk*, **Breast Cancer Res Treat**. 2008; 109(1): 101-11.

- [22] Renehan A. G., Roberts D. L., Dive C., *Obesity and cancer: pathophysiological and biological mechanisms*, **Arch Physiol Biochem**. 2008; 114(1): 71-83.
- [23] Montazeri A., Sadighi J., Farzadi F., et al., *Weight, height, body mass index and risk of breast cancer in postmenopausal women: a case-control study*, **BMC Cancer**. 2008; 8(278).
- [24] Thiebaut A. C., Kipnis V., Chang S. C., et al., *Dietary fat and postmenopausal invasive breast cancer in the National Institutes of Health-AARP Diet and Health Study cohort*, **J Natl Cancer Inst**. 2007; 99(6): 451-62.
- [25] Sieri S., Krogh V., Ferrari P., et al., *Dietary fat and breast cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition*, **Am J Clin Nutr**. 2008; 88(5): 1304-12.
- [26] Leung A. W., Mak J., Cheung P. S., et al., *Evidence for a programming effect of early menarche on the rise of breast cancer incidence in Hong Kong*, **Cancer Detect Prev**. 2008; 32(2): 156-61.
- [27] La Vecchia C., Altieri A., Franceschi S., et al., *Oral contraceptives and cancer: an update*, **Drug Saf**. 2001; 24(10): 741-54.
- [28] Espié M., Gorins A., *Le sein normal et ses explorations*. In *Le sein - Du Normal au pathologique : état de l'art*, 3 ème ed.; ESKA, Ed. 2007; pp 38-53.
- [29] <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Breast.svg>
- [30] Olivier J. B., Verhaeghe J. L., Butarelli M., et al., *[Functional anatomy of the lymphatic drainage of the breast: contribution of sentinel lymph node biopsy]*, **Ann Chir**. 2006; 131(10): 608-15.
- [31] Tanis P. J., Nieweg O. E., Valdes Olmos R. A., et al., *Anatomy and physiology of lymphatic drainage of the breast from the perspective of sentinel node biopsy*, **J Am Coll Surg**. 2001; 192(3): 399-409.
- [32] Rouvière H., *Anatomie des lymphatiques de l'homme*. In Masson, Ed. Paris, 1932.
- [33] Hidden G., *Remarques sur le drainage lymphatique de la glande mammaire humaine*, **Bull Assoc Anat**. 1973; 57(159): 879-86.
- [34] Caplan I., *Révision anatomique de système lymphatique de la glande mammaire (à propos de 200 cas)*, **Bull Assoc Anat**. 1975; 59(164): 121-37.
- [35] <http://bio.m2osw.com/gcartable/cardiologie/glanglionlymphimag.jpg>
- [36] Keskek M., Balas S., Gokoz A., et al., *Re-evaluation of axillary skip metastases in the era of sentinel lymph node biopsy in breast cancer*, **Surg Today**. 2006; 36(12): 1047-52.
- [37] Morton D. L., Wen D. R., Wong J. H., et al., *Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma*, **Arch Surg**. 1992; 127(4): 392-9.
- [38] Uren R. F., *Cancer surgery joins the dots*, **Nat Biotechnol**. 2004; 22(1): 38-9.
- [39] Gould E. A., Winship T., Philbin P. H., et al., *Observations on a "sentinel node" in cancer of the parotid*, **Cancer**. 1960; 13(77-8).
- [40] Cabanas R. M., *An approach for the treatment of penile carcinoma*, **Cancer**. 1977; 39(2): 456-66.
- [41] Krag D. N., Weaver D. L., Alex J. C., et al., *Surgical resection and radiolocalization of the sentinel lymph node in breast cancer using a gamma probe*, **Surg Oncol**. 1993; 2(6): 335-9; discussion 340.
- [42] Giuliano A. E., Kirgan D. M., Guenther J. M., et al., *Lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for breast cancer*, **Ann Surg**. 1994; 220(3): 391-8; discussion 398-401.
- [43] Zurrida S., Morabito A., Galimberti V., et al., *Importance of the level of axillary involvement in relation to traditional variables in the prognosis of breast cancer*, **Int J Oncol**. 1999; 15(3): 475-80.

- [44] Sakorafas G. H., Peros G., Cataliotti L., *Sequelae following axillary lymph node dissection for breast cancer*, **Expert Rev Anticancer Ther.** 2006; 6(11): 1629-38.
- [45] Ververs J. M., Roumen R. M., Vingerhoets A. J., et al., *Risk, severity and predictors of physical and psychological morbidity after axillary lymph node dissection for breast cancer*, **Eur J Cancer.** 2001; 37(8): 991-9.
- [46] Sakorafas G. H., Peros G., Cataliotti L., et al., *Lymphedema following axillary lymph node dissection for breast cancer*, **Surg Oncol.** 2006; 15(3): 153-65.
- [47] Roses D. F., Brooks A. D., Harris M. N., et al., *Complications of level I and II axillary dissection in the treatment of carcinoma of the breast*, **Ann Surg.** 1999; 230(2): 194-201.
- [48] Warmuth M. A., Bowen G., Prosnitz L. R., et al., *Complications of axillary lymph node dissection for carcinoma of the breast: a report based on a patient survey*, **Cancer.** 1998; 83(7): 1362-8.
- [49] Paredes J. P., Puente J. L., Potel J., *Variations in sensitivity after sectioning the intercostobrachial nerve*, **Am J Surg.** 1990; 160(5): 525-8.
- [50] Sato K., *Current technical overviews of sentinel lymph node biopsy for breast cancer*, **Breast Cancer.** 2007; 14(4): 354-61.
- [51] Minigh J., *Sentinel lymph node mapping of the breast*, **Radiol Technol.** 2008; 79(3): 243-57.
- [52] Namer M., Gligorav J., Luporsi E., et al., *Breast cancer clinical practice recommendations from Saint-Paul-de-Vence: excerpts concerning targeted therapies*, **Target Oncol.** 2006; 1(4): 228-38.
- [53] Houvenaeghel G., Buttarelli M., Rossi I., et al., *[What is new about sentinel lymph node biopsy in breast cancer?]*, **Bull Cancer.** 2004; 91 Suppl 4(S216-20).
- [54] Marchal F., Rauch P., Morel O., et al., *Results of preoperative lymphoscintigraphy for breast cancer are predictive of identification of axillary sentinel lymph nodes*, **World J Surg.** 2006; 30(1): 55-62.
- [55] Noguchi M., *Sentinel lymph node biopsy and breast cancer*, **Br J Surg.** 2002; 89(1): 21-34.
- [56] Hindie E., Groheux D., Espie M., et al., *[Sentinel node biopsy in breast cancer.]*, **Bull Cancer.** 2009; 96(6): 713-25.
- [57] Maublant J., Cachin F., Mesta D., et al., *[The detection of sentinel lymph node in nuclear medicine]*, **Bull Cancer.** 2002; 89(7-8): 671-80.
- [58] Schneebaum S., Stadler J., Cohen M., et al., *Gamma probe-guided sentinel node biopsy--optimal timing for injection*, **Eur J Surg Oncol.** 1998; 24(6): 515-9.
- [59] Mudun A., Sanli Y., Ozmen V., et al., *Comparison of different injection sites of radionuclide for sentinel lymph node detection in breast cancer: single institution experience*, **Clin Nucl Med.** 2008; 33(4): 262-7.
- [60] Shimazu K., Tamaki Y., Taguchi T., et al., *Comparison between periareolar and peritumoral injection of radiotracer for sentinel lymph node biopsy in patients with breast cancer*, **Surgery.** 2002; 131(3): 277-86.
- [61] Coelho-Oliveira A., Gutfilen B., Chagas C. R., et al., *Identification of sentinel node in breast cancer: comparison between peritumoral and periareolar injection of the radiopharmaceutical contrast medium*, **J Exp Clin Cancer Res.** 2004; 23(4): 567-72.
- [62] Uren R. F., Howman-Giles R. B., Chung D., et al., *Role of lymphoscintigraphy for selective sentinel lymphadenectomy*, **Cancer Treat Res.** 2005; 127(15-38).

- [63] Heuts E. M., van der Ent F. W., van der Pol H. A., et al., *Additional tracer injection to improve the technical success rate of lymphoscintigraphy for sentinel node biopsy in breast cancer*, **Ann Surg Oncol**. 2009; 16(5): 1156-63.
- [64] Borgstein P. J., Pijpers R., Comans E. F., et al., *Sentinel lymph node biopsy in breast cancer: guidelines and pitfalls of lymphoscintigraphy and gamma probe detection*, **J Am Coll Surg**. 1998; 186(3): 275-83.
- [65] Liu L. C., Lang J. E., Jenkins T., et al., *Is it necessary to harvest additional lymph nodes after resection of the most radioactive sentinel lymph node in breast cancer?*, **J Am Coll Surg**. 2008; 207(6): 853-8.
- [66] Cox C. E., Pendas S., Cox J. M., et al., *Guidelines for sentinel node biopsy and lymphatic mapping of patients with breast cancer*, **Ann Surg**. 1998; 227(5): 645-51; discussion 651-3.
- [67] Cox C. E., Bass S. S., Reintgen D. S., *Techniques for lymphatic mapping in breast carcinoma*, **Surg Oncol Clin N Am**. 1999; 8(3): 447-68, viii.
- [68] Schwartz G. F., Giuliano A. E., Veronesi U., *Proceedings of the consensus conference on the role of sentinel lymph node biopsy in carcinoma of the breast April 19 to 22, 2001, Philadelphia, Pennsylvania*, **Hum Pathol**. 2002; 33(6): 579-89.
- [69] Roumen R. M., Geuskens L. M., Valkenburg J. G., *In search of the true sentinel node by different injection techniques in breast cancer patients*, **Eur J Surg Oncol**. 1999; 25(4): 347-51.
- [70] Mignotte H., Treilleux I., Chassagne-Clement C., et al., *[Interest of periareolar injection for colorimetric detection of sentinel node in breast cancer]*, **Bull Cancer**. 2000; 87(7-8): 600-3.
- [71] Pelosi E., Baiocco C., Ala A., et al., *Lymphatic mapping in early stage breast cancer: comparison between periareolar and subdermal injection*, **Nucl Med Commun**. 2003; 24(5): 519-23.
- [72] Bass S. S., Cox C. E., Salud C. J., et al., *The effects of postinjection massage on the sensitivity of lymphatic mapping in breast cancer*, **J Am Coll Surg**. 2001; 192(1): 9-16.
- [73] Haynes G., Garske D., Case D., et al., *Effect of massage technique on sentinel lymph node mapping for cancer of the breast*, **Am Surg**. 2003; 69(6): 520-2.
- [74] Nos C., Freneaux P., Louis-Sylvestre C., et al., *Macroscopic quality control improves the reliability of blue dye-only sentinel lymph node biopsy in breast cancer*, **Ann Surg Oncol**. 2003; 10(5): 525-30.
- [75] Travagli J. P., Atallah D., Mathieu M. C., et al., *Sentinel lymphadenectomy without systematic axillary dissection in breast cancer patients: predictors of non-sentinel lymph node metastasis*, **Eur J Surg Oncol**. 2003; 29(4): 403-6.
- [76] McMasters K. M., Reintgen D. S., Ross M. I., et al., *Sentinel lymph node biopsy for melanoma: how many radioactive nodes should be removed?*, **Ann Surg Oncol**. 2001; 8(3): 192-7.
- [77] Salmon R. J., Marcollet A., Doridot V., et al., *[Sentinel node identification in breast cancer: logistic aspects]*, **Bull Cancer**. 2003; 90(12): 1049-54.
- [78] Rodier J. F., *[Detection of the sentinel node by the surgeon]*, **Bull Cancer**. 2002; 89(10): 840-4.
- [79] McMasters K. M., Wong S. L., Martin R. C., 2nd, et al., *Dermal injection of radioactive colloid is superior to peritumoral injection for breast cancer sentinel lymph node biopsy: results of a multiinstitutional study*, **Ann Surg**. 2001; 233(5): 676-87.
- [80] D'Eredita G., Giardina C., Guerrieri A. M., et al., *A further validation of subareolar injection technique for breast sentinel lymph node biopsy*, **Ann Surg Oncol**. 2006; 13(5): 701-7.

- [81] Law M., Chow L. W., Kwong A., et al., *Sentinel lymph node technique for breast cancer: radiation safety issues*, **Semin Oncol.** 2004; 31(3): 298-303.
- [82] Burton D. A., Cashman J. N., *Allergic reaction to nanocolloid during lymphoscintigraphy for sentinel lymph node biopsy*, **Br J Anaesth.** 2003; 90(1): 105.
- [83] Chicken D. W., Mansouri R., Ell P. J., et al., *Allergy to technetium-labelled nanocolloidal albumin for sentinel node identification*, **Ann R Coll Surg Engl.** 2007; 89(2): W12-3.
- [84] Momeni R., Ariyan S., *Pulse oximetry declines due to intradermal isosulfan blue dye: a controlled prospective study*, **Ann Surg Oncol.** 2004; 11(4): 434-7.
- [85] Govaert G. A., Oostenbroek R. J., Plaisier P. W., *Prolonged skin staining after intradermal use of patent blue in sentinel lymph node biopsy for breast cancer*, **Eur J Surg Oncol.** 2005; 31(4): 373-5.
- [86] Jeudy G., Louvier N., Rapennes T., et al., *[Immediate patent blue-induced hypersensitivity during sentinel node detection: The value of cutaneous tests]*, **Ann Dermatol Venereol.** 2008; 135(6-7): 461-5.
- [87] Beenen E., de Roy van Zuidewijn D. B., *Patients blue on patent blue: an adverse reaction during four sentinel node procedures*, **Surg Oncol.** 2005; 14(4): 151-4.
- [88] Daley M. D., Norman P. H., Leak J. A., et al., *Adverse events associated with the intraoperative injection of isosulfan blue*, **J Clin Anesth.** 2004; 16(5): 332-41.
- [89] Bleicher R. J., Kloth D. D., Robinson D., et al., *Inflammatory cutaneous adverse effects of methylene blue dye injection for lymphatic mapping/sentinel lymphadenectomy*, **J Surg Oncol.** 2009; 99(6): 356-60.
- [90] Mathieu M. C., *[Histopathological analysis of sentinel lymph node in breast cancer. The experience of Institut Gustave-Roussy]*, **Ann Pathol.** 2003; 23(6): 508-17.
- [91] Kane J. M., 3rd, Edge S. B., Winston J. S., et al., *Intraoperative pathologic evaluation of a breast cancer sentinel lymph node biopsy as a determinant for synchronous axillary lymph node dissection*, **Ann Surg Oncol.** 2001; 8(4): 361-7.
- [92] Cserni G., Amendoeira I., Apostolikas N., et al., *Pathological work-up of sentinel lymph nodes in breast cancer. Review of current data to be considered for the formulation of guidelines*, **Eur J Cancer.** 2003; 39(12): 1654-67.
- [93] Motomura K., Nagumo S., Komoike Y., et al., *Intraoperative imprint cytology for the diagnosis of sentinel node metastases in breast cancer*, **Breast Cancer.** 2007; 14(4): 350-3.
- [94] Lyman G. H., *Guidelines of the National Comprehensive Cancer Network on the use of myeloid growth factors with cancer chemotherapy: a review of the evidence*, **J Natl Compr Canc Netw.** 2005; 3(4): 557-71.
- [95] Van Diest P. J., Torrenga H., Borgstein P. J., et al., *Reliability of intraoperative frozen section and imprint cytological investigation of sentinel lymph nodes in breast cancer*, **Histopathology.** 1999; 35(1): 14-8.
- [96] Zurrida S., Mazzarol G., Galimberti V., et al., *The problem of the accuracy of intraoperative examination of axillary sentinel nodes in breast cancer*, **Ann Surg Oncol.** 2001; 8(10): 817-20.
- [97] Chao C., Wong S. L., Ackermann D., et al., *Utility of intraoperative frozen section analysis of sentinel lymph nodes in breast cancer*, **Am J Surg.** 2001; 182(6): 609-15.
- [98] Barranger E., Antoine M., Grahek D., et al., *Intraoperative imprint cytology of sentinel nodes in breast cancer*, **J Surg Oncol.** 2004; 86(3): 128-33.
- [99] Menes T. S., Tartter P. I., Mizrachi H., et al., *Touch preparation or frozen section for intraoperative detection of sentinel lymph node metastases from breast cancer*, **Ann Surg Oncol.** 2003; 10(10): 1166-70.

- [100] Treseler P., *Pathologic examination of the sentinel lymph node: what is the best method?*, **Breast J.** 2006; 12(5 Suppl 2): S143-51.
- [101] Yeh I. T., Mies C., *Application of immunohistochemistry to breast lesions*, **Arch Pathol Lab Med.** 2008; 132(3): 349-58.
- [102] Tavassoli F. A., Devilee P., *Pathology and Genetics of Tumors of the Breast and Female Genital Organs*. IARCPress: 2003.
- [103] Singletary S. E., Allred C., Ashley P., et al., *Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer*, **J Clin Oncol.** 2002; 20(17): 3628-36.
- [104] Singletary S. E., Greene F. L., *Revision of breast cancer staging: the 6th edition of the TNM Classification*, **Semin Surg Oncol.** 2003; 21(1): 53-9.
- [105] Elston C. W., Ellis I. O., *Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up*, **Histopathology.** 1991; 19(5): 403-10.
- [106] Bloom H. J., Richardson W. W., *Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years*, **Br J Cancer.** 1957; 11(3): 359-77.
- [107] Barginear M. F., Bradley T., Shapira I., et al., *Implications of applied research for prognosis and therapy of breast cancer*, **Crit Rev Oncol Hematol.** 2008; 65(3): 223-34.
- [108] Rusiecki J. A., Holford T. R., Zahm S. H., et al., *Breast cancer risk factors according to joint estrogen receptor and progesterone receptor status*, **Cancer Detect Prev.** 2005; 29(5): 419-26.
- [109] Slamon D. J., Leyland-Jones B., Shak S., et al., *Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2*, **N Engl J Med.** 2001; 344(11): 783-92.
- [110] Pritchard K. I., Shepherd L. E., O'Malley F. P., et al., *HER2 and responsiveness of breast cancer to adjuvant chemotherapy*, **N Engl J Med.** 2006; 354(20): 2103-11.
- [111] Konecny G. E., Thomssen C., Luck H. J., et al., *Her-2/neu gene amplification and response to paclitaxel in patients with metastatic breast cancer*, **J Natl Cancer Inst.** 2004; 96(15): 1141-51.
- [112] Murray C. B., Norris D. G., Bawendi M. G., *Synthesis and characterization of nearly monodisperse CdE (E = S, Se, Te) semiconductor nanocrystallites*, **J Am Chem Soc.** 1993; 115(19): 8706-15.
- [113] Dubertret B., *[A new fluorescent marker for in vivo imaging]*, **Med Sci (Paris).** 2003; 19(5): 532-4.
- [114] Alivisatos A. P., *Semiconductor clusters, nanocrystals, and quantum dots*, **Science.** 1996; 271(5121): 933-37.
- [115] Smith A. M., Gao X., Nie S., *Quantum dot nanocrystals for in vivo molecular and cellular imaging*, **Photochem Photobiol.** 2004; 80(3): 377-85.
- [116] Bruchez M., Jr., Moronne M., Gin P., et al., *Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels*, **Science.** 1998; 281(5385): 2013-6.
- [117] Kobayashi H., Hama Y., Koyama Y., et al., *Simultaneous Multicolor Imaging of Five Different Lymphatic Basins Using Quantum Dots*, **Nano Lett.** 2007; 7(6): 1711-6.
- [118] Soo Choi H., Liu W., Misra P., et al., *Renal clearance of quantum dots*, **Nat Biotechnol.** 2007; 25(10): 1165-70.
- [119] Fu A., Gu W., Larabell C., et al., *Semiconductor nanocrystals for biological imaging*, **Curr Opin Neurobiol.** 2005; 15(5): 568-75.

- [120] Spinicelli P., Buil S., Quelin X., et al., *Bright and grey states in CdSe-CdS nanocrystals exhibiting strongly reduced blinking*, **Phys Rev Lett.** 2009; 102(13): 136801.
- [121] Spinicelli P., Mahler B., Buil S., et al., *Non-blinking semiconductor colloidal quantum dots for biology, optoelectronics and quantum optics*, **Chemphyschem.** 2009; 10(6): 879-82.
- [122] Pic E., Bezdetnaya L., Guillemin F., et al., *Quantification techniques and biodistribution of semiconductor quantum dots*, **Anticancer Agents Med Chem.** 2009; 9(3): 295-303.
- [123] Ipe B. I., Lehnig M., Niemeyer C. M., *On the generation of free radical species from quantum dots*, **Small.** 2005; 1(7): 706-9.
- [124] Jamieson T., Bakhshi R., Petrova D., et al., *Biological applications of quantum dots*, **Biomaterials.** 2007; 28(31): 4717-32.
- [125] Dubertret B., Skourides P., Norris D. J., et al., *In vivo imaging of quantum dots encapsulated in phospholipid micelles*, **Science.** 2002; 298(5599): 1759-62.
- [126] Wu X., Liu H., Liu J., et al., *Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots*, **Nat Biotechnol.** 2003; 21(1): 41-6.
- [127] Jaiswal J. K., Mattoussi H., Mauro J. M., et al., *Long-term multiple color imaging of live cells using quantum dot bioconjugates*, **Nat Biotechnol.** 2003; 21(1): 47-51.
- [128] Yu W. W., *Semiconductor quantum dots: synthesis and water-solubilization for biomedical applications*, **Expert Opin Biol Ther.** 2008; 8(10): 1571-81.
- [129] Jacobsen N. R., Moller P., Jensen K. A., et al., *Lung inflammation and genotoxicity following pulmonary exposure to nanoparticles in ApoE^{-/-} mice*, **Part Fibre Toxicol.** 2009; 6(2).
- [130] Jackson H., Muhammad O., Daneshvar H., et al., *Quantum dots are phagocytized by macrophages and colocalize with experimental gliomas*, **Neurosurgery.** 2007; 60(3): 524-9; discussion 529-30.
- [131] Chen H., Wang Y., Xu J., et al., *Non-invasive near infrared fluorescence imaging of CdHgTe quantum dots in mouse model*, **J Fluoresc.** 2008; 18(5): 801-11.
- [132] Robe A., Pic E., Lassalle H. P., et al., *Quantum dots in axillary lymph node mapping: biodistribution study in healthy mice*, **BMC Cancer.** 2008; 8(111).
- [133] Chen Z., Chen H., Meng H., et al., *Bio-distribution and metabolic paths of silica coated CdSeS quantum dots*, **Toxicol Appl Pharmacol.** 2008; 230(3): 364-71.
- [134] Frangioni J. V., Kim S. W., Ohnishi S., et al., *Sentinel Lymph Node Mapping With Type-II Quantum Dots*, **Methods Mol Biol.** 2007; 374(147-60).
- [135] Lee H. A., Imran M., Monteiro-Riviere N. A., et al., *Biodistribution of quantum dot nanoparticles in perfused skin: evidence of coating dependency and periodicity in arterial extraction*, **Nano Lett.** 2007; 7(9): 2865-70.
- [136] Fischer H., Liu L., Pang K., et al., *Pharmacokinetics of Nanoscale Quantum Dots In Vivo Distribution, Sequestration, and Clearance in the Rat*, **Adv Funct Mater.** 2006; 16(10): 1299-305.
- [137] So M. K., Xu C., Loening A. M., et al., *Self-illuminating quantum dot conjugates for in vivo imaging*, **Nat Biotechnol.** 2006; 24(3): 339-43.
- [138] Smith B. R., Cheng Z., De A., et al., *Real-Time Intravital Imaging of RGD-Quantum Dot Binding to Luminal Endothelium in Mouse Tumor Neovasculature*, **Nano Lett.** 2008; 8(9): 2599-606.

- [139] Lei Y., Tang H., Yao L., et al., *Applications of mesenchymal stem cells labeled with Tat peptide conjugated quantum dots to cell tracking in mouse body*, **Bioconjug Chem.** 2008; 19(2): 421-7.
- [140] Cai W., Shin D. W., Chen K., et al., *Peptide-labeled near-infrared quantum dots for imaging tumor vasculature in living subjects*, **Nano Lett.** 2006; 6(4): 669-76.
- [141] Oostendorp M., Douma K., Hackeng T. M., et al., *Quantitative molecular magnetic resonance imaging of tumor angiogenesis using cNGR-labeled paramagnetic quantum dots*, **Cancer Res.** 2008; 68(18): 7676-83.
- [142] Cai W., Chen K., Li Z. B., et al., *Dual-Function Probe for PET and Near-Infrared Fluorescence Imaging of Tumor Vasculature*, **J Nucl Med.** 2007; 48(11): 1862-1870.
- [143] Gao X., Cui Y., Levenson R. M., et al., *In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots*, **Nat Biotechnol.** 2004; 22(8): 969-76.
- [144] Tada H., Higuchi H., Wanatabe T. M., et al., *In vivo real-time tracking of single quantum dots conjugated with monoclonal anti-HER2 antibody in tumors of mice*, **Cancer Res.** 2007; 67(3): 1138-44.
- [145] Duconge F., Pons T., Pestourie C., et al., *Fluorine-18-Labeled Phospholipid Quantum Dot Micelles for in Vivo Multimodal Imaging from Whole Body to Cellular Scales*, **Bioconjug Chem.** 2008; 19(9): 1921-6.
- [146] Schipper M. L., Cheng Z., Lee S. W., et al., *microPET-based biodistribution of quantum dots in living mice*, **J Nucl Med.** 2007; 48(9): 1511-8.
- [147] Choi H. S., Ipe B. I., Misra P., et al., *Tissue- and Organ-Selective Biodistribution of NIR Fluorescent Quantum Dots*, **Nano Lett.** 2009; 9(6): 2354-9.
- [148] Kostarelos K., *Tumor Targeting of Functionalized Quantum Dot- Liposome Hybrids by Intravenous Administration*, **Mol Pharm.** 2009.
- [149] Cormode D. P., Skajaa T., van Schooneveld M. M., et al., *Nanocrystal Core High-Density Lipoproteins: A Multimodality Contrast Agent Platform*, **Nano Lett.** 2008; 8(11): 3715-3723.
- [150] Koole R., van Schooneveld M. M., Hilhorst J., et al., *Paramagnetic lipid-coated silica nanoparticles with a fluorescent quantum dot core: a new contrast agent platform for multimodality imaging*, **Bioconjug Chem.** 2008; 19(12): 2471-9.
- [151] Mulder W. J., Strijkers G. J., Briley-Saboe K. C., et al., *Molecular imaging of macrophages in atherosclerotic plaques using bimodal PEG-micelles*, **Magn Reson Med.** 2007; 58(6): 1164-70.
- [152] Bruns O. T., Ittrich H., Peldschus K., et al., *Real-time magnetic resonance imaging and quantification of lipoprotein metabolism in vivo using nanocrystals*, **Nat Nanotechnol.** 2009; 4(3): 193-201.
- [153] Weissleder R., Ntziachristos V., *Shedding light onto live molecular targets*, **Nat Med.** 2003; 9(1): 123-8.
- [154] Mahmood U., Weissleder R., *Near-infrared optical imaging of proteases in cancer*, **Mol Cancer Ther.** 2003; 2(5): 489-96.
- [155] Mahmood U., Tung C. H., Bogdanov A., Jr., et al., *Near-infrared optical imaging of protease activity for tumor detection*, **Radiology.** 1999; 213(3): 866-70.
- [156] Nakayama A., del Monte F., Hajjar R. J., et al., *Functional near-infrared fluorescence imaging for cardiac surgery and targeted gene therapy*, **Mol Imaging.** 2002; 1(4): 365-77.
- [157] De Grand A. M., Frangioni J. V., *An operational near-infrared fluorescence imaging system prototype for large animal surgery*, **Technol Cancer Res Treat.** 2003; 2(6): 553-62.
- [158] Kim S., Lim Y. T., Soltesz E. G., et al., *Near-infrared fluorescent type II quantum dots for sentinel lymph node mapping*, **Nat Biotechnol.** 2004; 22(1): 93-7.

- [159] Parungo C. P., Colson Y. L., Kim S. W., et al., *Sentinel lymph node mapping of the pleural space*, **Chest**. 2005; 127(5): 1799-804.
- [160] Parungo C. P., Ohnishi S., Kim S. W., et al., *Intraoperative identification of esophageal sentinel lymph nodes with near-infrared fluorescence imaging*, **J Thorac Cardiovasc Surg**. 2005; 129(4): 844-50.
- [161] Parungo C. P., Soybel D. I., Colson Y. L., et al., *Lymphatic drainage of the peritoneal space: a pattern dependent on bowel lymphatics*, **Ann Surg Oncol**. 2007; 14(2): 286-98.
- [162] Soltesz E. G., Kim S., Kim S. W., et al., *Sentinel lymph node mapping of the gastrointestinal tract by using invisible light*, **Ann Surg Oncol**. 2006; 13(3): 386-96.
- [163] Soltesz E. G., Kim S., Laurence R. G., et al., *Intraoperative sentinel lymph node mapping of the lung using near-infrared fluorescent quantum dots*, **Ann Thorac Surg**. 2005; 79(1): 269-77; discussion 269-77.
- [164] Knapp D. W., Adams L. G., Degrand A. M., et al., *Sentinel lymph node mapping of invasive urinary bladder cancer in animal models using invisible light*, **Eur Urol**. 2007; 52(6): 1700-8.
- [165] Kim S. W., Zimmer J. P., Ohnishi S., et al., *Engineering InAs(x)P(1-x)/InP/ZnSe III-V alloyed core/shell quantum dots for the near-infrared*, **J Am Chem Soc**. 2005; 127(30): 10526-32.
- [166] Tanaka E., Ohnishi S., Laurence R. G., et al., *Real-time intraoperative ureteral guidance using invisible near-infrared fluorescence*, **J Urol**. 2007; 178(5): 2197-202.
- [167] Ntziachristos V., Bremer C., Weissleder R., *Fluorescence imaging with near-infrared light: new technological advances that enable in vivo molecular imaging*, **Eur Radiol**. 2003; 13(1): 195-208.
- [168] Morgan N. Y., English S., Chen W., et al., *Real time in vivo non-invasive optical imaging using near-infrared fluorescent quantum dots*, **Acad Radiol**. 2005; 12(3): 313-23.
- [169] Diagaradjane P., Orenstein-Cardona J. M., E Colon-Casasnovas N., et al., *Imaging Epidermal Growth Factor Receptor Expression In vivo: Pharmacokinetic and Biodistribution Characterization of a Bioconjugated Quantum Dot Nanoprobe*, **Clin Cancer Res**. 2008; 14(3): 731-41.
- [170] Gao X., Chen J., Chen J., et al., *Quantum dots bearing lectin-functionalized nanoparticles as a platform for in vivo brain imaging*, **Bioconjug Chem**. 2008; 19(11): 2189-95.
- [171] Papagiannaros A., Levchenko T., Hartner W., et al., *Quantum dots encapsulated in phospholipid micelles for imaging and quantification of tumors in the near-infrared region*, **Nanomedicine**. 2009; 5(2): 216-24.
- [172] Daou T. J., Li L., Reiss P., et al., *Effect of Poly(ethylene glycol) Length on the in Vivo Behavior of Coated Quantum Dots*, **Langmuir**. 2009; 25(5): 3040-4.
- [173] McVeigh E. R., *Emerging imaging techniques*, **Circ Res**. 2006; 98(7): 879-86.
- [174] Kherlopian A. R., Song T., Duan Q., et al., *A review of imaging techniques for systems biology*, **BMC Syst Biol**. 2008; 2(74).
- [175] Chen K., Li Z. B., Wang H., et al., *Dual-modality optical and positron emission tomography imaging of vascular endothelial growth factor receptor on tumor vasculature using quantum dots*, **Eur J Nucl Med Mol Imaging**. 2008; 35(12): 2235-44.
- [176] Manabe N., Hoshino A., Liang Y. Q., et al., *Quantum dot as a drug tracer in vivo*, **IEEE Trans Nanobioscience**. 2006; 5(4): 263-7.
- [177] Yang R. S., Chang L. W., Wu J. P., et al., *Persistent Tissue Kinetics and Redistribution of Nanoparticles, Quantum Dot 705, in Mice: ICP-MS Quantitative Assessment*, **Environ Health Perspect**. 2007; 115(9): 1339-43.

- [178] Fischer H. C., Liu L., Pang K. S., et al., *Preliminary results: Exploring the interactions of quantum dots whole blood components* **Proc of SPIE** 2005; 5969(1-6).
- [179] Fischer H. C., Fournier-Bidoz S., Pang K. S., et al., *Quantitative detection of engineered nanoparticles in tissues and organs: an investigation of efficacy and linear dynamic using ICP-AES*, **Nanobiotechnol.** 2007; 3(46-54).
- [180] Gopee N. V., Roberts D. W., Webb P., et al., *Migration of intradermally injected quantum dots to sentinel organs in mice*, **Toxicol Sci.** 2007; 98(1): 249-57.
- [181] Inoue Y., Izawa K., Yoshikawa K., et al., *In vivo fluorescence imaging of the reticuloendothelial system using quantum dots in combination with bioluminescent tumour monitoring*, **Eur J Nucl Med Mol Imaging.** 2007; 34(12): 2048-56.
- [182] Kim J., Kim K. S., Jiang G., et al., *In vivo real-time bioimaging of hyaluronic acid derivatives using quantum dots*, **Biopolymers.** 2008; 89(12): 1144-53.
- [183] Ballou B., Lagerholm B. C., Ernst L. A., et al., *Noninvasive imaging of quantum dots in mice*, **Bioconjug Chem.** 2004; 15(1): 79-86.
- [184] Schipper M. L., Iyer G., Koh A. L., et al., *Particle size, surface coating, and PEGylation influence the biodistribution of quantum dots in living mice*, **Small.** 2009; 5(1): 126-34.
- [185] Karabanovas V., Zakarevicius E., Sukackaite A., et al., *Examination of the stability of hydrophobic (CdSe)ZnS quantum dots in the digestive tract of rats*, **Photochem Photobiol Sci.** 2008; 7(6): 725-9.
- [186] Woodward J. D., Kennel S. J., Mirzadeh S., et al., *In vivo SPECT/CT imaging and biodistribution using radioactive Cd125mTe/ZnS nanoparticles*, **Nanotechnology.** 2007; 18(17): 1-5.
- [187] Kennel S. J., Woodward J. D., Rondinone A. J., et al., *The fate of MAb-targeted Cd(125m)Te/ZnS nanoparticles in vivo*, **Nucl Med Biol.** 2008; 35(4): 501-14.
- [188] Lin P., Chen J. W., Chang L. W., et al., *Computational and ultrastructural toxicology of a nanoparticle, Quantum Dot 705, in mice*, **Environ Sci Technol.** 2008; 42(16): 6264-70.
- [189] Lin C. H., Chang L. W., Chang H., et al., *The chemical fate of the Cd/Se/Te-based quantum dot 705 in the biological system: toxicity implications*, **Nanotechnology.** 2009; 20(21): 215101.
- [190] Geys J., Nemmar A., Verbeken E., et al., *Acute toxicity and prothrombotic effects of quantum dots: impact of surface charge*, **Environ Health Perspect.** 2008; 116(12): 1607-13.
- [191] Tanaka E., Choi H. S., Fujii H., et al., *Image-guided oncologic surgery using invisible light: completed pre-clinical development for sentinel lymph node mapping*, **Ann Surg Oncol.** 2006; 13(12): 1671-81.
- [192] Hama Y., Koyama Y., Urano Y., et al., *Simultaneous two-color spectral fluorescence lymphangiography with near infrared quantum dots to map two lymphatic flows from the breast and the upper extremity*, **Breast Cancer Res Treat.** 2007; 103(1): 23-8.
- [193] Ballou B., Ernst L. A., Andreko S., et al., *Sentinel Lymph Node Imaging Using Quantum Dots in Mouse Tumor Models*, **Bioconjug Chem.** 2007; 18(2): 389-96.
- [194] Pons T., Lequeux N., Mahler B., et al., *Synthesis of Near-Infrared-Emitting, Water-Soluble CdTeSe/CdZnS Core/Shell Quantum Dots*, **Chem Mater.** 2009; 21(8): 1418-1424.
- [195] Chomczynski P., Sacchi N., *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*, **Anal Biochem.** 1987; 162(1): 156-9.

- [196] Moll R., Franke W. W., Schiller D. L., et al., *The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells*, **Cell**. 1982; 31(1): 11-24.
- [197] Dreau D., Karaa A., Culberson C., et al., *Bosentan inhibits tumor vascularization and bone metastasis in an immunocompetent skin-fold chamber model of breast carcinoma cell metastasis*, **Clin Exp Metastasis**. 2006; 23(1): 41-53.
- [198] Cserni G., *Overinterpretation of the role of cytokeratin 19 RT-PCR of sentinel nodes in breast carcinoma*, **Surgery**. 2003; 133(1): 124.
- [199] Aslakson C. J., Miller F. R., *Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor*, **Cancer Res**. 1992; 52(6): 1399-405.
- [200] Pulaski B. A., Ostrand-Rosenberg S., *Reduction of established spontaneous mammary carcinoma metastases following immunotherapy with major histocompatibility complex class II and B7.1 cell-based tumor vaccines*, **Cancer Res**. 1998; 58(7): 1486-93.
- [201] Pulaski B. A., Terman D. S., Khan S., et al., *Cooperativity of Staphylococcal aureus enterotoxin B superantigen, major histocompatibility complex class II, and CD80 for immunotherapy of advanced spontaneous metastases in a clinically relevant postoperative mouse breast cancer model*, **Cancer Res**. 2000; 60(10): 2710-5.
- [202] Pic E., Pons T., Bezdetnaya L., et al., *Fluorescence Imaging and Whole-Body Biodistribution of Near-Infrared Emitting Quantum Dots after Subcutaneous Injection for Regional Lymph Node Mapping in Mice*, **Mol Imaging Biol**. 2009. Article sous presse.

Annexes

Annexes

I. Développement d'un instrument portable de mesure et de localisation des quantum dots

L'étude a porté sur le développement d'un instrument devant répondre à 5 questions essentielles en terme de sensibilité, fiabilité, robustesse, maniabilité et coût.

L'instrument est équipé de plusieurs composants opto-mécaniques construits spécifiquement pour cette application (SD-Medical, Heillecourt, France) dont certains seront exhaustivement présentés. La Figure A présente l'instrument portable, contenant la majorité des modules décrits ci-après, à l'exception des organes externes : stylo optique et pédale de commande.



Figure A. Photographie de l'instrument portable.

A. Synoptique et principe de fonctionnement

Le principe de fonctionnement consiste, avant de mettre en marche l'instrument, à connecter la pédale de commande et les fibres du stylo optique (excitation/réception) au boîtier central. A l'allumage (voir schéma synoptique Figure B), le microcontrôleur, la source laser d'excitation, le capteur *Channel Photomultiplier* (CPM) et l'écran afficheur sont activés. Le shutter placé devant la source d'excitation est en position fermée. L'utilisateur, après avoir placé l'extrémité proximale du stylo sur le tissu à analyser, commande l'ouverture du shutter à l'aide de la pédale.

Le faisceau laser (diode laser ; $\lambda_{\text{ex}} = 658 \text{ nm}$) accède alors au milieu à exciter contenant les QDs. Une partie de la lumière de fluorescence émise par les QDs est captée par les fibres de réception du stylo optique. La lumière émise accède, via un connecteur, à un module de focalisation orienté en direction de la surface sensible du capteur CPM. Le signal est alors acquis et traité par le microcontrôleur.

Les 2 faisceaux de fibres (excitation et réception) sont séparés à l'entrée du boîtier, les rendant particulièrement vulnérables. Ainsi, un module mécanique non décrit dans ce document a été étudié pour les protéger.

Un haut-parleur génère des sons allant des graves (faible intensité du signal) aux aigus (forte intensité du signal) selon le débit de photons accédant au CPM. Dans un même temps, l'afficheur présente une barre graphique qui augmente ou diminue selon les intensités de fluorescence reçues.

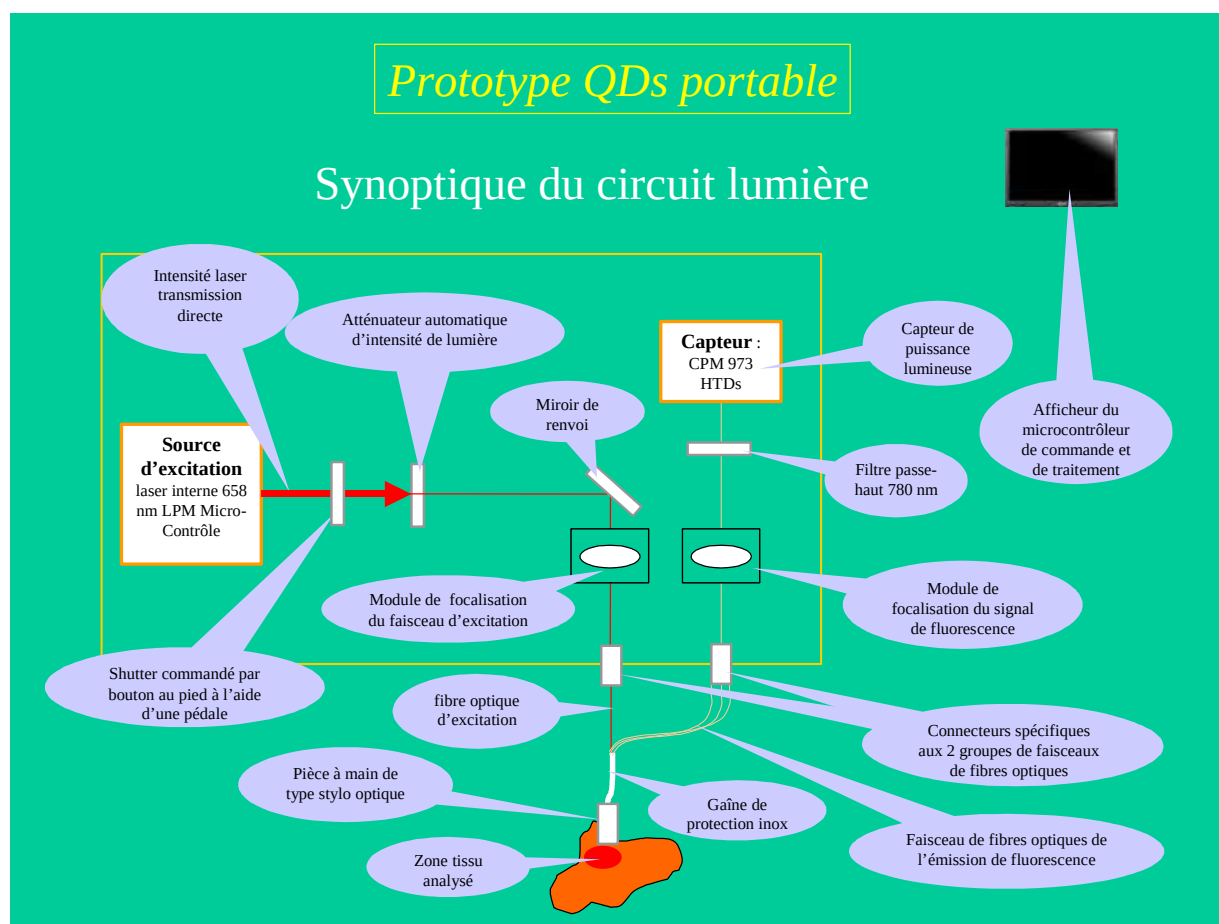


Figure B. Schéma représentant le parcours optique du circuit lumière d'excitation et d'émission (QDs) ainsi que l'emplacement des divers composants de l'instrument.

B. Source d'excitation lumineuse

Une diode laser LPM658-65SE (Micro-contrôle, Evry, France) de faible coût, émettant à une puissance continue et particulièrement stable de 65 mW, à la longueur d'onde nominale de 658 nm, a été choisie. Son profil d'émission de forme gaussien, présente une bande passante au 1/3 de sa hauteur de $\pm 22,5$ nm centrée autour du pic d'émission.

Les intensités de fluorescence émises sont plus importantes quand la profondeur de localisation des QDs dans les tissus est faible. Pour empêcher de capter des intensités de lumière trop faibles ou saturantes, un montage opto-mécanique automatisé a été conçu. L'intensité de lumière recueillie au niveau du capteur est analysée en continu par le microcontrôleur. Par une communication feed-back entre le capteur et le microcontrôleur, ce dernier assure le contrôle du module électro-opto-mécanique placé en sortie du faisceau laser d'excitation. Le module est constitué d'un disque rotatif sur lequel sont disposées 4 ouvertures : l'une vide laissant passer la puissance maximale du laser, les 3 autres étant équipées d'atténuateurs au $1/10^{\text{ème}}$, $1/100^{\text{ème}}$ et $1/1000^{\text{ème}}$. Le disque est actionné par un moteur pas à pas piloté par le microcontrôleur et positionné selon l'intensité lue par le capteur.

C. Capteur de mesure d'intensité

La recherche d'un capteur robuste et fiable a conduit à privilégier les composants constitués de photodétecteurs de nouvelle génération. La société HTDS (Hi-Tech Detection Systems, Massy, France), issue du groupe Perkin-Elmer, commercialise un capteur développé autour de la technologie des photomultiplicateurs qui présente des performances augmentées en terme de sensibilité : le CPM973. La technologie originale mise en œuvre dans ce modèle de capteur (Figure C) permet d'amplifier considérablement le signal reçu par une photocathode. Il convertit un très faible niveau de lumière frappant la photocathode semi-transparente, placée à la surface de la fenêtre d'entrée, en photoélectrons. Lorsque les photoélectrons traversent la zone de séparation entre la photocathode et l'anode, ils sont guidés et accélérés pour entrer dans un canal incurvé en forme de S (Figure C).

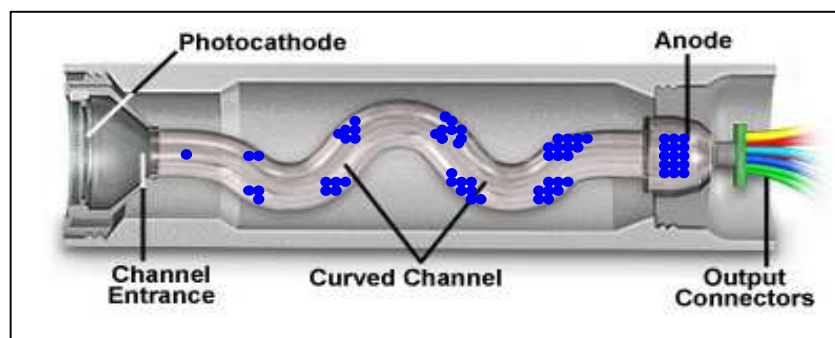


Figure C. Schéma présentant la partie capteur d'un module CPM Perkin-Elmer.

La forme particulière de ce conduit permet aux photoélectrons de frapper ses parois en tous points. A chacun de ces contacts avec la paroi du conduit, un second (ou plusieurs) électron(s) identique(s) au premier est(sont) émis. Ce conduit peut être considéré comme une dynode continue car le matériau déposé sur ses parois participe à cet effet. Lorsqu'un photoélectron percute la photocathode à l'entrée du CPM, il lui arrache un électron par effet photoélectrique. Sous l'effet du champ électrique généré par l'alimentation, cet électron est accéléré et entre en collision avec les parois du conduit du CPM. Lors de cette collision, l'énergie est telle qu'un ou plusieurs électrons identiques sont générés. Chaque électron ricoche plusieurs fois sur la paroi, de façon qu'à la sortie du CPM, une amplification de l'énergie de l'ordre de 10^8 soit obtenue. Le temps de réponse du CPM est en moyenne de 3 ns pour un gain typique de 10^6 avec un courant d'obscurité de l'ordre de 60 pA qui varie en fonction du gain et des longueurs d'ondes étudiées. L'alimentation en 2 points seulement (+ et -) du Channeltron, se différencie du photomultiplicateur à dynodes discrètes malgré des tensions identiquement importantes.

En résumé :

Les photomultiplicateurs sont des capteurs optiques de technologies différentes des photodiodes. C'est la recherche d'un très bas niveau en détection qui nous a poussé à nous orienter vers ce type de technologie, ainsi que la dimension de la surface sensible (diamètre 5 mm) qui est confortable pour notre alignement optique.

Comparée aux photomultiplicateurs à base de dynodes qui génèrent un niveau de bruit à chaque dynode, le CPM n'ayant qu'une seule différence de potentiel entre l'anode et la photocathode, son rapport signal sur bruit est plus grand.

Chaque électron émis par la photocathode se multiplie en plusieurs électrons à chaque collision avec les parois du Channeltron. Cette multiplication est proportionnelle au gain appliqué au module CPM (haute tension).

D. Stylo optique

Afin de permettre au clinicien d'effectuer une recherche *in situ* du GS sur un patient avant exérèse, il était nécessaire d'étudier un outil à main aisément maniable et ergonomique. Un stylo optique relié à l'une de ses extrémités au module de traitement du signal par un faisceau de fibres optiques d'excitation et de réception des intensités de lumière a été construit (SD-Medical, Heillecourt, France et SEDI, Courcouronnes, France) (Figure D). Avec un diamètre de 14 mm et une longueur de 145 mm, ses dimensions sont proches d'un stylo classique du commerce destiné à l'écriture (Figure D).



Figure D. Vue intégrale du stylo optique.

L'extrémité proximale de cet instrument comporte une fenêtre de protection de fabrication spéciale, traitée anti-reflet sur les 2 faces (Optique Maris Delfour, Bondoufle, France), derrière laquelle sont distribuées 8 fibres optiques dont une fibre d'excitation centrale et 7 fibres de réception périphériques (Figure E).

Le faisceau d'excitation est transmis par l'intermédiaire d'une fibre optique silice/silice, d'ouverture numérique 0,22 et de diamètre 600 μm (SEDI, Courcouronnes, France) puis est collimaté au diamètre de 3,8 mm à sa sortie à l'aide d'une lentille KPX010-AR14 (Micro-contrôle, Evry, France) générant ainsi une surface d'excitation de 11,34 mm^2 (Figure E). Le rendement optique étant de 70 %, la puissance d'excitation laser est équivalente à 45,5 mW pour cette surface, ce qui représente une irradiance maximale dans le rouge de $45,5 \times 100 / 11,34 = 400 \text{ mW/cm}^2$.

Les 7 fibres optiques de réception ont les mêmes caractéristiques et dimensions que la fibre d'excitation, sont positionnées autour de cette dernière et centrées à 3 mm de l'axe formé par le positionnement radial de chacune d'entre-elles (Figure E).



Figure E. Vue de la partie proximale du stylo optique. On distingue les 7 entrées de réception de lumière placées autour d'un disque interne (noir sur la photo) par lequel est transmise la lumière collimatée d'excitation.

Le faisceau de 8 fibres optiques reliées au stylo est équipé d'une gaine de protection inox sur une longueur d'environ 2 mètres. A l'extrémité distale de ce faisceau, les 8 fibres sont séparées en 2 parties :

- la fibre d'excitation, également montée dans un second connecteur SMA905,
- les 7 fibres de réception, reliées entre-elles par un connecteur mâle SMA905 (SEDI, Courcouronnes, France).

Un module opto-mécanique, sur lequel est monté le faisceau des 7 fibres de réception, focalise la lumière vers la partie sensible du capteur CPM. Un second module devant lequel est montée la fibre d'excitation focalise la lumière provenant de la diode laser à l'aide d'une lentille KPX046 (Micro-contrôle, Evry, France) sur l'extrémité de la fibre.

E. Approches expérimentales

Contexte

o La sensibilité des capteurs de type photomultiplicateurs est diminuée lorsque la lumière progresse vers le PIR. Toutefois, le CPM973 a été choisi, permettant d'effectuer des mesures jusqu'à 900 nm. Sa courbe de sensibilité, qui présente une efficacité quantique

maximale d'environ 10 % à 500 nm, diminue progressivement pour atteindre environ 2 % à 780 nm. Pour autant, les expériences réalisées avec des QDs émettant à cette longueur d'onde ont montré, en considérant les propriétés optiques des milieux traversés (μ_s , μ_a et g), que cette faible sensibilité du capteur n'entachait pas la qualité de l'information à cette longueur d'onde d'émission.

- o Comme nous tentons de le démontrer ci-après, la précision, voire la perte d'information sur la localisation des QDs est liée en premier lieu à la distance, par perte mémorielle de la direction initiale d'émission des photons. Le capteur reçoit des photons émis par la source d'émission mais distribués dans toutes les directions de l'espace. Ce capteur mesurera bien une intensité lumineuse provenant de cette source, mais l'observateur sera dans l'incapacité de connaître précisément d'où elle provient. En d'autres termes, à partir de cette distance, l'intensité de lumière reçue par le capteur ne portera pas l'information de localisation de l'émetteur.

- o Or, dans un milieu diffusant, plus la distance entre capteur et émetteur augmente, plus les intensités de lumière d'excitation reçue par la cible et d'émission provenant de la cible diminuent, du fait de la distribution spatiale des photons dans ce milieu. De ce fait, le nombre de photons émis par unité de volume et de surface se raréfie en fonction de l'augmentation de volume de milieu à traverser. L'absorption de la lumière (excitatrice et émise), dans un milieu qui est aussi absorbant, augmente proportionnellement à la distance émetteur-récepteur. Ces variations d'intensité sont informatives et permettent de définir le point où la distance est minimale par rapport à la source d'émission (dans notre cas, les QDs). La précision de la localisation restant en relation avec le pouvoir discriminant du capteur. Définir la zone d'intervention en effectuant la mesure comparative de l'intensité de lumière émise lors de la progression du stylo sur le tissu est envisageable pour le clinicien. Il est toutefois nécessaire de considérer que cette localisation est approximative du fait de l'inhomogénéité du milieu concerné.

L'étude expérimentale a été réalisée avec des fantômes de tissus, mimant les propriétés photophysiques dans le PIR des tissus humains qui seront rencontrés par le clinicien appliquant la technique du GS, ainsi que sur une souris.

Mesures réalisées sur fantômes

Matériel et Méthodes

Ces fantômes de diamètre 20 mm et d'épaisseur 2,5 mm chacun, étaient constitués de gélatine (10 %), d'intralipides (1 %) et d'hémoglobine bovine (170 μM) présentant un coefficient de diffusion $\mu_s = 9,69 \text{ mm}^{-1}$, un coefficient d'absorption $\mu_a = 0,056 \text{ mm}^{-1}$ et une anisotropie $g = 0,968$ à 800 nm [De Grand A.M. et al., *J Biomed Opt.* 2006; 11(1): 1-10].

Dans l'un de ces fantômes de 2,5 mm d'épaisseur a été intégré une concentration de 30 nM de QDs émettant à 780 nm, désigné « bolus ».

Des couches successives de fantômes, placées entre le stylo optique et le milieu contenant le bolus de QDs (Figure F) permettent de progresser par pas d'épaisseur de 2,5 mm, de 0 à 20 mm. Des mêmes couches de fantômes ont également permis de progresser par pas de 2,5 mm et ont été placées successivement sous le milieu contenant le bolus de QDs, allant de 2,5 à 20 mm.

Le but de cette étude a été d'observer d'une part, la variation et la qualité du signal obtenu en fonction de l'épaisseur formée entre le stylo optique et le bolus de QDs et d'autre part, l'influence de la diffusion de lumière sous la couche des QDs sur le même signal. L'ensemble reposait sur un matériau de couleur noire en carton légèrement réfléchissant.

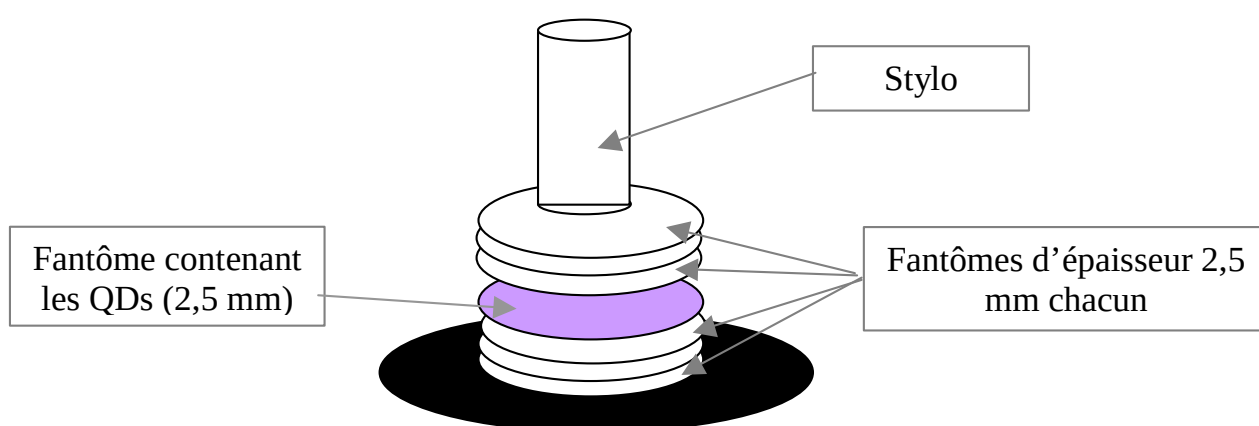


Figure F. Représentation schématique du montage constitué du fantôme contenant le bolus de QDs (30 nM), pris en sandwich entre des fantômes de 2,5 mm d'épaisseur chacun, répartis au-dessus et en-dessous de ce « bolus ». La base de couleur noire représente le support.

Les mesures ont été réalisées jusqu'à des épaisseurs de 20 mm entre le stylo optique et le bolus de QDs ainsi qu'entre le bolus de QDs et la base. La moyenne de 3 mesures a été retenue pour une analyse.

Résultats

La cinétique générale de décroissance du signal en fonction de l'épaisseur de fantôme (exemple en Figure G) était exponentielle dans une plage d'épaisseur comprise entre 5 et 15 mm entre le stylo et le bolus de QDs (3 mesures par échantillon). Au delà de 15 mm, la variabilité des mesures inter-échantillons n'était plus exploitable dans l'appréciation de la profondeur du milieu, du fait de l'importance du bruit. De plus, pour des épaisseurs comprises entre 0 et 2,5 mm, le capteur saturait.

Toutes les courbes exponentielles obtenues selon l'épaisseur comprises entre le bolus de QDs et la base, en fonction de l'épaisseur de fantôme au dessus du bolus de QDs, bien que légèrement différentes, étaient monoexponentielles et données avec un R^2 supérieur à 0,99 (Figure G).

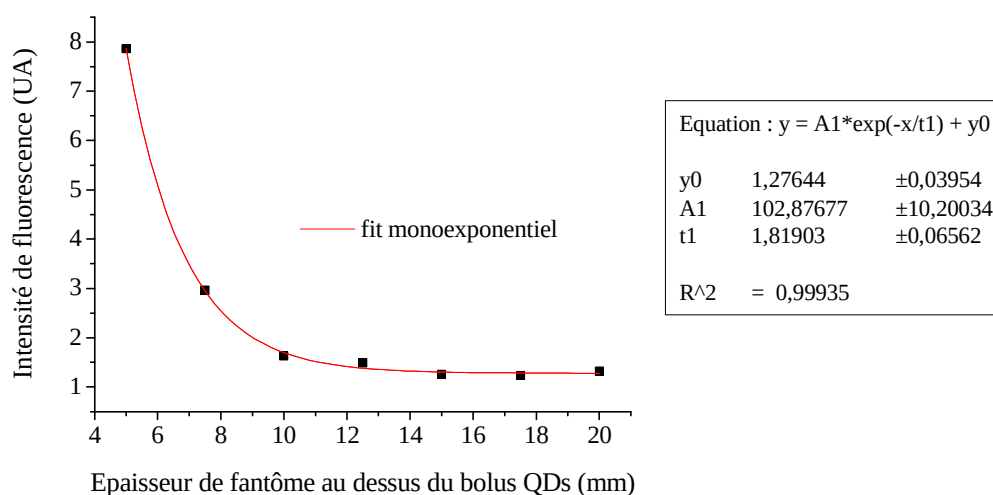


Figure G. Intensité de fluorescence des QDs en fonction de l'épaisseur de fantôme entre le stylo optique et le bolus de QDs (30 nM) pour une épaisseur de fantôme entre le bolus de QDs et la base de 2,5 mm, recueillie avec l'instrument portable. Les carrés noirs représentent les points expérimentaux, la courbe rouge correspond à une régression monoexponentielle.

Une seconde analyse a été proposée. Elle consistait à calculer les coefficients de variation des écarts vrais (symbole C), obtenus par soustraction de la valeur théorique

d'intensité calculée à l'aide du modèle exponentiel, pour chaque épaisseur de milieu comprise entre le stylo optique et le bolus de QDs (symbole A), à la valeur obtenue par la mesure (symbole B), puis divisé par la valeur théorique (symbole A) en fonction de l'épaisseur comprise entre le bolus de QDs et la base noire. Ce qui donnait l'équation pour chaque valeur obtenue : $C = (A-B)/A$.

Les écarts types des coefficients de variation des écarts vrais (Figure H) (symbole C) ont été calculés en fonction des différentes épaisseurs de fantôme comprises entre le bolus de QDs et la base noire pour chaque épaisseur de milieu comprise entre le stylo optique et le bolus de QDs. Les résultats ont montré que la moyenne de ses variations, par rapport aux valeurs d'intensités lues, était d'autant plus grande que l'épaisseur de fantôme entre le bolus de QDs et la base était importante (Figure H).

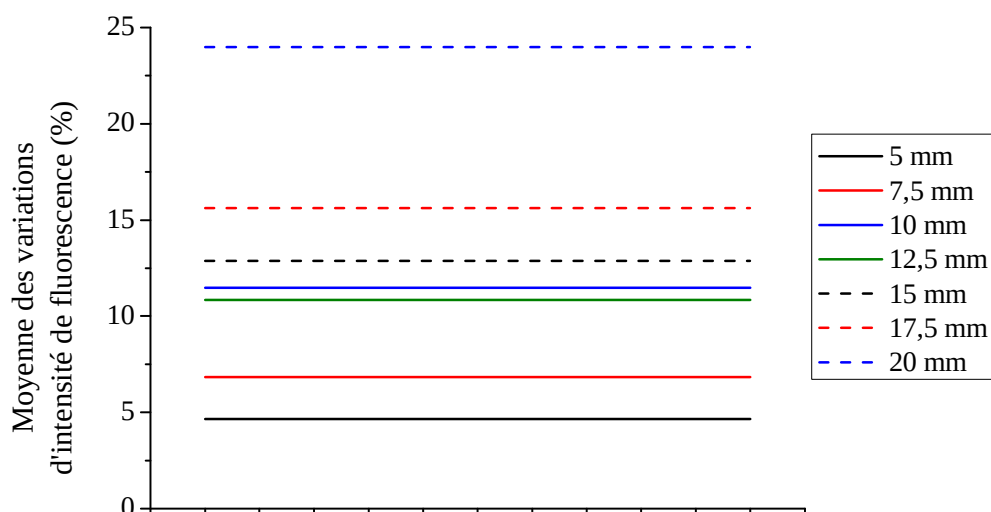


Figure H. Moyenne des variations d'intensité de fluorescence mesurées en fonction de l'épaisseur comprise entre le bolus de QDs et la base (légende à droite).

Mesures effectuées sur une souris

Une expérience a été réalisée avec l'instrument sur une souris SKH-1 (sans poil) après injection s.c. de 20 μ L d'une solution à 1 μ M de QDs (20 pmol) émettant à 780 nm dans la patte antérieure gauche pour détection du ganglion axillaire. Les mesures ont été réalisées au niveau de 3 sites sur la souris et répétées 3 fois (Figure I) :

- o Site 1 : ganglion axillaire gauche dont la distance stylo optique-ganglion axillaire gauche était inférieure à 1 mm.

- o Site 2 : ganglion axillaire droit qui correspond à une distance stylo optique-ganglion axillaire gauche à travers le corps de la souris de 16 mm.
- o Site 3 : patte postérieure gauche, à une distance de 4 cm du ganglion axillaire gauche (zone loin du point d'injection).

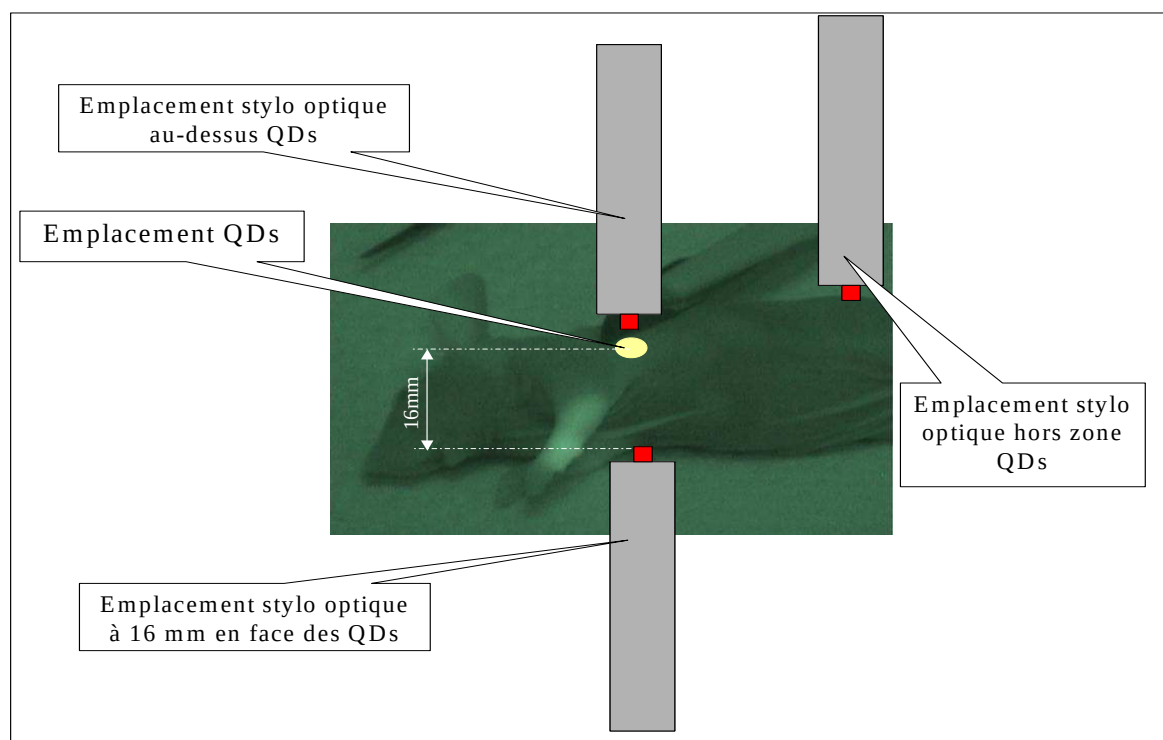


Figure I. Présentation des différentes positions du stylo optique pour les mesures de fluorescence sur une souris suite à l'injection de 20 pmol de QDs dans la patte antérieure gauche.

Les résultats donnés en pourcentage de l'intensité maximale (de saturation du capteur) sont présentés dans le tableau ci-après.

Tableau. Intensités de fluorescence mesurées avec l'instrument sur une souris SKH-1

Désignation de la mesure	Moyenne des intensités mesurées
<u>Site 1</u> : ganglion axillaire gauche	54 %
<u>Site 2</u> : ganglion axillaire droit	25 %
<u>Site 3</u> : patte postérieure gauche	12 %

L'intensité de fluorescence émise au niveau du site 3 de la souris (12 %) correspondait à l'autofluorescence des tissus.

Discussion

Les résultats obtenus paraissent optimistes dans des limites de profondeurs interfaces entre la surface du tissu et le bolus de QDs. L'étude sur le Fluobeam® a été privilégiée du fait de sa capacité à présenter des images de fluorescence sur la localisation des QDs, alors que le stylo optique portable, destiné en finalité au clinicien, devra encore connaître des développements avant sa mise en fonction.

Un travail complémentaire orienté vers des analyses sur fantômes et sur modèle animal sera réalisé pour affiner la précision, vérifier la reproductibilité des mesures ainsi que pour valider l'utilisation du stylo optique portable.

Perspectives

Si les chimistes synthétisent des QDs émettant plus vers l'infra-rouge, il sera nécessaire de remplacer le capteur CPM (limité à 900 nm), par une photodiode à avalanche dont la sensibilité spectrale couvre une bande allant jusqu'à des longueurs d'onde supérieures à 1000 nm, avec une efficacité quantique de près de 15 %.

II. Influence of incubation time and sensitizer localization on meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin(mTHPC)-induced photoinactivation of cells.

Sasnouski S., **Pic E.**, Dumas D., Zorin V., D'Hallewin M.A., Guillemin F., Bezdetnaya L.

Radiat Res, 2007, 168(2): 209-17.

Influence of Incubation Time and Sensitizer Localization on Meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin (mTHPC)-Induced Photoinactivation of Cells

Siarhei Sasnouski,^{a,b} Emilie Pic,^a Dominique Dumas,^c Vladimir Zorin,^b Marie-Ange D'Hallewin,^a François Guillemin^a and Lina Bezdetnaya^{a,1}

^a CRAN UMR 7039 CNRS – INPL – UHP, Centre Alexis Vautrin, 54511 Vandœuvre-Les-Nancy cedex, France; ^b Laboratory of Biophysics and Biotechnology, Physics Faculty, Belorussian State University, Minsk, 220080 Belarus, and ^c LEMTA, Equipe Mécanique et Ingénierie Cellulaire et Tissulaire-Service Imagerie Cellulaire, IFR 111; and UMR CNRS 7563 CNRS-INPL-UHP, Faculté de Médecine, 54505 Vandœuvre-les-Nancy, France

Sasnouski, S., Pic, E., Dumas, D., Zorin, V., D'Hallewin, M.-A., Guillemin, F. and Bezdetnaya, L. Influence of Incubation Time and Sensitizer Localization on Meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin (mTHPC)-Induced Photoinactivation of Cells. *Radiat. Res.* 168, 209–217 (2007).

The present study addresses the impact of different aggregation states of meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin (mTHPC) on the photoinactivation of cells. Measurements of the photophysical properties of mTHPC in MCF-7 cells showed progressive sensitizer aggregation with increasing incubation time. Reconstructed absorption spectra of intracellular mTHPC showed a significant decrease in the molar extinction coefficient and broadening of the Soret band at 24 h incubation compared to 3 h. Intracellular photobleaching of mTHPC slowed down, and the profile changed from mono- to bi-exponential upon incubation. Fluorescence lifetime imaging (FLIM) measurements revealed a substantial decrease in the lifetime of mTHPC fluorescence at 24 h compared to 3 h. In addition, the intracellular localization of mTHPC as observed by fluorescence microscopy changed from a diffuse homogeneous fluorescence pattern at short incubation times to a punctiform pattern at 24 h. The efficiency of photodynamic therapy (PDT) assessed by a clonogenic assay was three times greater at 24 h. However, when the survival curves were replotted as a function of the number of absorbed photons, the efficiency was 1.8 times greater at 3 h than at 24 h. The loss of photosensitizing efficiency at higher mTHPC concentrations was attributed to self-quenching of the triplet states of the sensitizers. © 2007 by Radiation Research Society

INTRODUCTION

Photodynamic therapy (PDT) combines a photosensitizing drug and light to cause damage to pathologically proliferating tissues, including tumors. Photosensitizer activa-

tion by visible light results primarily in singlet-oxygen mediated photodamage (1, 2).

Foscan[®] or meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin (mTHPC) is a second-generation photosensitizer (3) and is one of the most effective sensitizers studied to date (1). It mediates cell photodamage principally through singlet oxygen formation (4), and its tumoricidal effect appears to be very sensitive to oxygenation (5, 6). Fluorescence microscopy studies in monoculture cells showed intense fluorescence in the perinuclear region (7) with a significant accumulation of mTHPC in the endoplasmic reticulum (ER) and Golgi apparatus (8). mTHPC has been granted approval in Europe for palliative treatment of patients with advanced head and neck cancers, and it is considered to be a valuable therapeutic option for superficial tumors of the upper aero-digestive tract (9, 10).

One of the parameters that influences the photophysical behavior of sensitizers is their aggregation state. Aggregated photosensitizers generally have much lower fluorescence and triplet-state quantum yields, resulting in a reduced quantum yield of singlet oxygen (11, 12) and a decrease in photosensitizing efficiency (13–15). Both monomer and aggregated forms of photosensitizers can be present in cells. Time-resolved fluorescence spectroscopy demonstrated that there is a considerable amount of aggregated porphyrin species in biomembranes (16). Furthermore, porphyrin monomers tend to aggregate in large clusters after prolonged incubation in cells (17). Similar to porphyrins, the incubation time also influences the aggregation state of chlorin-type compounds. mTHPC has been reported to exist in several aggregated forms after 24 h incubation in tumor cells (18). Fluorescence lifetime imaging (FLIM) measurements in cells demonstrated a decrease in the lifetime of mTHPC fluorescence from 7.5 ns to 5.5 ns with incubation times from 1 to 6 h, respectively. This was interpreted as an enhanced formation of aggregates during incubation.

In this work we studied the impact of different aggregation states of mTHPC on cell photoinactivation. Different

¹ Address for correspondence: CRAN UMR 7039 CNRS – INPL – UHP, Avenue de Bourgogne, 54511 Vandœuvre-Les-Nancy cedex, France, Centre Alexis Vautrin; e-mail: l.bolotine@nancy.fnclcc.fr.

aggregation states were obtained by varying the incubation times of MCF-7 cells with mTHPC. The phototoxicity of mTHPC at different incubation times was computed as a function of the number of absorbed photons. For this purpose, we used the parameters of the intracellular absorption of mTHPC, photobleaching kinetics of mTHPC in cells, and intracellular concentration of photosensitizer.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and Photosensitizer

The photosensitizer mTHPC was kindly provided by Biolitec AG (Jena, Germany). Stock solution was made by dissolving the powder in 100% ethanol at a concentration of 3 mM and keeping it at 4°C in the dark. It was diluted further in RPMI 1640 medium (Gibco, Cergy Pontoise, France) supplemented with 2% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) (PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Germany). The final photosensitizer concentration was 1.5 μM or 7.5 μM . Phosphate-buffered saline (PBS, without CaCl_2 and MgCl_2 ; pH 7.4) was obtained from Invitrogen. Hepes and crystal violet were purchased from Sigma (France).

Cell Culture

Cells of the human breast adenocarcinoma cell line MCF-7 were grown in phenol red-free RPMI 1640 medium (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) supplemented with 9% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) (PAN Biotech GmbH), 1% penicillin (10 000 IU)-streptomycin (10,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$), and 1% glutamine (200 mM) (Invitrogen). Cells were kept as monolayers in a humidified incubator (5% CO_2 in air at 37°C). Cell cultures were reseeded every week to ensure exponential growth.

Photodynamic Treatment

Cells (10^4 cells/ml) were seeded in 50-mm petri dishes containing 4 ml of RPMI 1640 medium with 9% FCS. After 4 days, cells were washed twice with PBS and incubated with fresh medium containing 2% FCS with 1.5 μM mTHPC for 3 or 24 h. Cells were washed three more times with PBS, resuspended in fresh cell medium, and then irradiated with a 650-nm diode laser (F-System, Coherent, Saclay) at a fixed fluence rate of 2.12 mW/cm².

Fluorescence Photobleaching Experiments

Cells were preincubated in medium containing 2% FCS with 1.5 μM mTHPC for 3 or 24 h. After photosensitization, the mTHPC fluorescence intensity were recorded on a SAFAS Xenuis spectrofluorometer using microplate reader (SAFAS, Monaco). Excitation wavelength was set at 420 nm. No photobleaching effects due to the spectrofluorometer excitation source were observed. Cells were irradiated with a 650-nm laser diode (F-System, Coherent, Saclay) at a fixed fluence rate of 2.12 mW/cm². The data were corrected for background by subtracting the fluorescence of control (drug-free) cells. The fluorescence intensity at 650 nm was recorded after each irradiation, and the photobleaching curves were constructed from these points. Data were fitted using a modified Levenberg-Marquardt non-linear fitting algorithm in the Origin 7.5 program.

Cell Viability Assay

Cell viability was assessed by a clonogenic assay. Logarithmically growing MCF-7 cells were collected from the monolayer with trypsin immediately after PDT and seeded in triplicate into six-well plates at a density of 500 cells per well. Nine days after treatment, the medium was removed and colonies were fixed with 70% ethanol and stained with 1% crystal violet (Pointet Girard, Cuchy) for 5 min. Excess crystal violet was carefully washed off, and colonies composed of more than 50 cells were

counted with a robotized image analysis system (Techlab). Each experiment was done at least three times. Cell survival was calculated by comparing treated samples to nonirradiated cultures (drug, no light). The plating efficiency of untreated control cells (no light, no drug) was 289 ± 8 colonies/500 cells. Cells treated with drug only had a plating efficiency of 266 ± 11 colonies/500 cells, thus yielding $92 \pm 4\%$ survival.

Extraction of Intracellular mTHPC

Cells were incubated with 7.5 or 1.5 μM of mTHPC for 3 or 24 h. After incubation, cells were washed with cold PBS, trypsinized, washed in PBS, resuspended in RPMI 1640 medium, and centrifuged twice at 1500 rpm for 5 min. Cells were again resuspended in RPMI 1640 medium and their concentration was determined using Thoma cells. Two milliliters of cell suspension was then centrifuged at 1500 rpm for 5 min and mTHPC was extracted as described recently (19). The supernatant was poured out and 3 ml of methanol was added to the pellet. The resulting samples were sonicated for 10 min using Bransonic B-1200 E3 ultrasonic cleaner (Roucaire, France) and centrifuged at 3500 rpm for 5 min. After centrifugation, 1 ml of supernatant from each sample was added to 2 ml of methanol, and the resulting mixture was introduced into a 10 $\times$ 10-mm quartz cuvette. Emission spectra were determined using a Perkin-Elmer LS 50B luminescence spectrometer. Spectra were collected between 600 and 700 nm (excitation wavelength 422 nm; photomultiplier voltage 650 V). The fluorescence intensity at 650 nm from the cells lysates was measured, and the mTHPC concentration was further calculated using a previously established calibration curve based on the molar extinction coefficient of mTHPC in methanol of $\epsilon_{650} = 29.600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (20).

Absorption Spectra of mTHPC

Cells were incubated with 7.5 μM of mTHPC for 3 and 24 h. The suspensions of intact cells were obtained as described above. Three milliliters of mTHPC-loaded cells were introduced into a 10 $\times$ 10-mm quartz cuvette, and the absorption spectra were recorded using a PerkinElmer Lambda 35 spectrophotometer equipped with an integrating sphere RSA-PE-20 (Labsphere). For calculating true absorbances, we applied the method proposed by Merzlyak and Naqvi (21), which consists of the estimation of the true absorbance from a pair of absorption spectra, obtained by positioning the sample at two different distances from the outer entrance of the sphere. The apparent absorption spectra of mTHPC in cells were measured at two distances, $d_1 = 7$ mm and $d_2 = 2$ mm, and for further calculations of true absorbances we used the following equation:

$$D_{\text{abs}}(\lambda) = D_{\text{ext}}(\lambda, d_1) - L(d_1, d_2) \times \{D_{\text{ext}}(\lambda, d_1) - D_{\text{ext}}(\lambda, d_2)\}, \quad (1)$$

where $D_{\text{abs}}(\lambda)$ is the true absorbance; $D_{\text{ext}}(\lambda, d_1)$ and $D_{\text{ext}}(\lambda, d_2)$ are the apparent absorbances measured at d_1 and d_2 , respectively; $L(d_1, d_2)$ is the proportionality factor, defined as

$$L(d_1, d_2) = \frac{D_{\text{ext}}(\lambda_0, d_1)}{[D_{\text{ext}}(\lambda_0, d_1) - D_{\text{ext}}(\lambda_0, d_2)]}, \quad (2)$$

where λ_0 is the wavelength at which mTHPC does not absorb light.

Considering that the last absorption band of mTHPC peaks at 650 nm, we chose a λ_0 of 800 nm in our measurements. $D_{\text{ext}}(\lambda_0, d_1)$ and $D_{\text{ext}}(\lambda_0, d_2)$ are the apparent absorbances measured at λ_0 . As an example, Fig. 1 displays apparent absorption spectra of mTHPC at d_1 and d_2 together with the reconstructed true absorption spectrum of mTHPC in cells. It is important to note that in a parallel set of experiments we demonstrated the linearity between mTHPC apparent absorption at 650 nm and cell content in the range $(3\text{--}25) \times 10^4$ cells/ml (data not shown). According to Merzlyak and Naqvi (21), this linearity allows us to safely assume that the reconstructed absorption spectrum is a good approximation of the true absorption spectrum. Reference spectra of mTHPC in methanol were measured on a PerkinElmer Lambda 35 spectrophotometer without an integrating sphere.

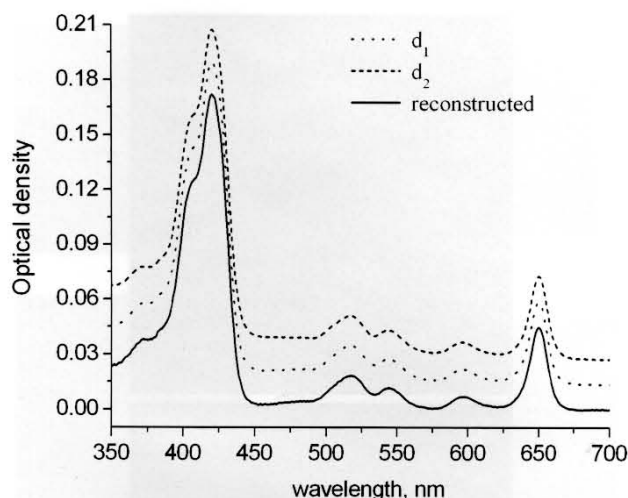


FIG. 1. mTHPC extinction spectra for MCF-7 cells suspensions measured at distances of $d_1 = 2$ mm (dotted line) and $d_2 = 7$ mm (dashed line) between the integrating sphere and cuvette. The reconstructed absorption spectrum (solid line) was obtained using Eq. (1). Cells were incubated with mTHPC at an extracellular concentration of $7.5 \mu\text{M}$ at 37°C . For the measurements of extinction spectra, cell content was 5.6×10^5 cells/ml.

Laser Confocal Scanning Microscopy (LCSM)

MCF-7 cells (1×10^4 cells/ml) were plated into eight-well chambers Slideflask (Nunc), incubated in the dark at 37°C with $1.5 \mu\text{M}$ mTHPC for 3 and 24 h, rinsed in the medium, and immediately examined with a confocal laser scanning microscope (SP-2 AOBs LCSM, Leica Microsystems, Germany). An optimal pinhole size of $60.64 \mu\text{m}$ was used to exclude fluorescence light emitted from out-of-focus plane. An oil immersion objective ($63\times$) was used to capture each image of 512×512 pixels. mTHPC was excited with a helium/neon laser at 633 nm, and mTHPC fluorescence was detected in the range 640–660 nm using an acousto-optical beamsplitter (AOBS).

Fluorescence Lifetime Imaging Measurements

Cells (1×10^4 cells/ml) were inoculated into Labtek dishes and 4 days later were incubated with $7.5 \mu\text{M}$ mTHPC for 3 or 24 h at 37°C . After incubation, the cells were washed twice with RPMI 1640 medium. For FLIM, we used two-photon excitation with a mode-locked Ti:sapphire laser (MIRA 900F, Coherent) pumped with an 8 W argon-ion laser (Verdi, Coherent), which delivers a pulse width from 120 fs with a repetition rate of 76 MHz. Using a cavity dumper, the repetition rate was reduced to 2.76 MHz. The power of the excitation light in the focus was 5 mW. The detection was performed in a non-descanted mode (NDD-PMT). Time-correlated single photon counting was used for lifetime imaging. SPC-730 TCSPC photon counting module (Becker & Hickl) was interfaced to the scan controller of the Leica SP2 CLSM laser scanning microscope (Leica Microsystems) equipped with an AOBs. The PMT was built in the microscope attached to the non-descanted port, without discrimination for the different emission wavelengths of the different probes. Images at a 0.195-nm (x, y) pixel size were obtained for each case in 128×128 matrices at magnification $63\times$ (numerical aperture = 1.32). The decay analysis was performed using the SPCImage Version 2.8.3 software (Becker & Hickl). Every pixel of the fluorescence lifetime image was achieved by software binning of 3×3 pixels of the image. The instrument response function was measured on erythrosin (full width half maximum equal to 220 ± 15 ps) and used for deconvolution.

Calculation of Absorbed Dose of mTHPC in MCF-7 Cells

The number of absorbed photons was computed according to refs. (22, 23). The molecular absorption rate (AR) of mTHPC in photons per molecule per second (photons/molecule s^{-1}), is expressed as

$$\text{AR} = I_0 \times \sigma, \quad (3)$$

where σ is the molecular absorption cross section ($\text{cm}^2/\text{molecule}$) and I_0 is the incident light intensity (photons/ $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$).

Considering that σ is related to ε as $\sigma = 3.82 \times 10^{-21} \times \varepsilon$ (24), Eq. (3) becomes

$$\text{AR} = 3.82 \times 10^{-21} I_0 \times \varepsilon, \quad (4)$$

where ε is the molar extinction coefficient of the photosensitizer ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$). The intensity of incident light, I_0 , does not change significantly during its transmission through cells in the monolayer and can be considered as constant. Since a linear correlation between the intracellular concentration of mTHPC and its fluorescence intensity was established (data not shown), the intracellular fluorescence of mTHPC measured in photobleaching experiments could be used as a measure of mTHPC content. The average number of photons absorbed by a single mTHPC-loaded cell after irradiation time t can be expressed as

$$D_{\text{abs}}(\text{photons/cell}) = \text{AR} \times N_0 \times F_{\text{mono/bi}}(t), \quad (5)$$

where N_0 is initial number of mTHPC molecules in a single cell, defined as

$$N_0 = C \times N_A, \quad (6)$$

where C is average number of sensitizer moles per cell and N_A is Avogadro's number; function $F_{\text{mono/bi}}(t)$ is the mono- and bi-exponential sensitizer photobleaching and is defined as

$$F_{\text{mono}}(t) = \frac{[1 - \exp(-k_1 t)]}{k_1}$$

$$F_{\text{bi}}(t) = \frac{A_1 [1 - \exp(-k_1 t)]}{k_1} + \frac{A_2 [1 - \exp(-k_2 t)]}{k_2}, \quad (7)$$

where k_1 and k_2 are the photobleaching rate constants for mono- and bi-exponential decays, respectively; $A_1 = 0.2$ and $A_2 = 0.8$ are fractions of sensitizer fluorescence that photobleach with k_1 and k_2 constants, respectively. Therefore, Eq. (5) becomes

$$D_{\text{abs}}(\text{photons/cell}) = 3.82 \times 10^{-21} I_0 \times \varepsilon \times C \times N_A \times F_{\text{mono/bi}}(t). \quad (8)$$

RESULTS

Intracellular Absorption Properties of mTHPC

Figure 2 shows the intracellular extinction spectra of mTHPC in methanol and after 3 and 24 h incubation of MCF-7 cells with $7.5 \mu\text{M}$ mTHPC. The molar extinction coefficients were calculated from Lambert-Beer's law using optical densities from reconstructed absorption spectra (as in Fig. 1) and intracellular mTHPC concentration after chemical extraction in cells incubated with $7.5 \mu\text{M}$ mTHPC. The intracellular concentrations of mTHPC for each incubation time are given in Table 1. Compared to the reference spectrum of mTHPC in methanol, all intracellular mTHPC spectra were red shifted (Fig. 2). Moreover, the mTHPC spectrum at 24 h after incubation was characterized by a decreased extinction and a broadening in the Soret band.

The molar extinction coefficients in the Soret band and for 650 nm at all experimental conditions are summarized

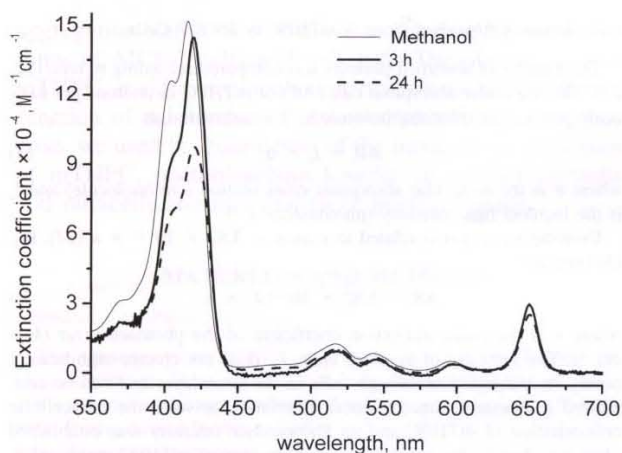


FIG. 2. Reconstructed mTHPC absorption spectra for MCF-7 cell suspensions after 3 h (solid line) and 24 h (dashed line) incubation. The reference spectrum of mTHPC in methanol is also shown for comparison (dotted line). Cells were incubated with mTHPC at an extracellular concentration of 7.5 μM at 37°C.

in Table 1. The molar extinction coefficient mTHPC after 24 h incubation was about 1.5 times lower compared to 3 h incubation. Changes in the spectral band at 650 nm were much less pronounced; however, ϵ_{650} was lower (by 17%) at 24 h compared to 3 h. The spectral characteristics of mTHPC observed after 24 h incubation could be taken as a crude indication of aggregation.

Intracellular Localization and Fluorescence Lifetime Imaging of mTHPC

After 3 h incubation, mTHPC had a diffuse and relatively homogeneous localization pattern (Fig. 3A). After 24 h incubation, we observed a punctuate bright fluorescence pattern of mTHPC in the perinuclear region (Fig. 3B). Figure 4 shows mTHPC (7.5 μM) FLIM images in MCF-7 cells after 3 and 24 h of incubation together with the corresponding histograms of the fluorescence lifetime distribution of mTHPC as a function of the number of photons detected for the field of view (FOV). The different colors on the left images correspond to various lifetimes as shown in the his-

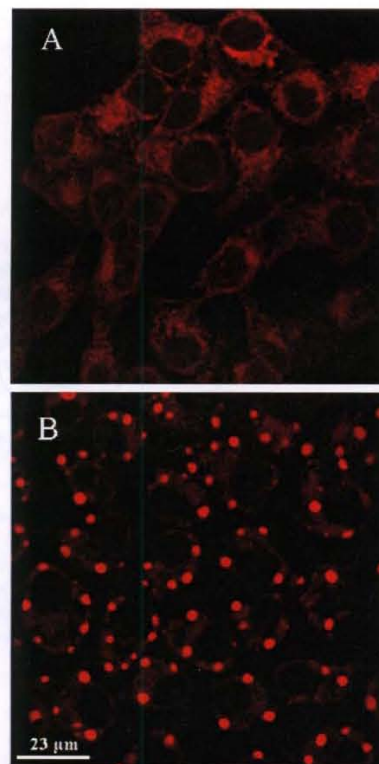


FIG. 3. Confocal fluorescence images of mTHPC in MCF-7 cells after 3 h (panel A) and 24 h (panel B) incubation. Cells were incubated with mTHPC at an extracellular concentration of 1.5 μM at 37°C.

tograms at the right. The average lifetime for the given FOV decreased from 8.5 ns after 3 h to 2.5 ns after 24 h incubation time.

The detailed fluorescence decay analysis demonstrated a mono-exponential decay for 3 h incubation and a bi-exponential decay for 24 h incubation with a χ^2 in the range of 1 to 1.5 (Table 2). The lifetime at 3 h appeared to be 8.7 ns (Table 2). Due to the heterogeneous localization pattern of mTHPC at 24 h after incubation, FLIM measurements were made at two distinct localization sites: in regions with a diffuse fluorescence and in the bright spots.

TABLE 1
Parameters of the Photobleaching Rate Constants (k), Molar Extinction Coefficients (ϵ), and Intracellular Concentrations (C) of mTHPC in MCF-7 Cells after Different Incubation Times

Parameter	k , s^{-1}	ϵ , $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$	C , moles/cell ^a	C , moles/cell ^b
3 h	$(6.4 \pm 0.4) \times 10^{-3}$	$\epsilon_{650} = 30,000 \pm 1000$ $\epsilon_{419} = 144,700 \pm 4800$	$(1.6 \pm 0.4) \times 10^{-17}$	$(8.6 \pm 3.3) \times 10^{-16}$
24 h	$k_1 = (78 \pm 34) \times 10^{-3}$ $k_2 = (0.6 \pm 0.2) \times 10^{-3}$	$\epsilon_{650} = 25,500 \pm 900$ $\epsilon_{420} = 97,700 \pm 3800$	$(2.4 \pm 0.4) \times 10^{-16}$	$(3.3 \pm 0.8) \times 10^{-15}$

Notes. For determination of photobleaching rate constants, mTHPC was incubated at 37°C at an extracellular concentration of 1.5 μM . For determination of molar extinction coefficients, mTHPC was incubated at 37°C at an extracellular concentration of 7.5 μM . Average values from at least five different experiments $\pm$ SD are shown.

^a Extracellular sensitizer concentration 1.5 μM .

^b Extracellular sensitizer concentration 7.5 μM .

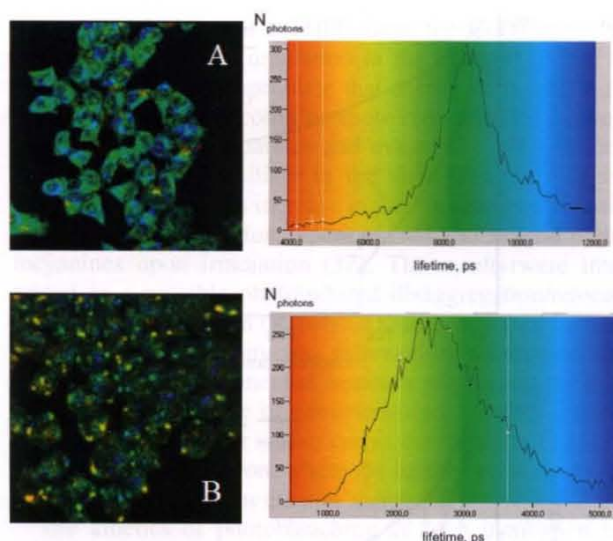


FIG. 4. FLIM images of mTHPC in MCF-7 cells after 3 h (panel A) and 24 h (panel B) incubation (left frame). Histograms of the lifetime distribution of mTHPC fluorescence as a function of the number of photons detected for the field of view (right frame). The different colors on the images correspond to various lifetimes as shown in histograms. Cells were incubated with mTHPC at an extracellular concentration of $7.5 \mu\text{M}$ at 37°C .

The mTHPC lifetimes τ_1 and τ_2 in diffuse regions were about 1 ns and 4 ns with a predominant more rapid component (63%). Even shorter lifetimes were detected in the fluorescent spots, 0.3 ns and 2 ns, respectively, with a comparable contribution of both components (Table 2). Since the value of 0.3 ns is very close to the resolution limit of the system (0.25 ns), it was discarded in the further analysis.

Photobleaching of mTHPC

After 3 h incubation, we observed an increase in mTHPC fluorescence during the first 30 s of irradiation followed by a mono-exponential decrease (Fig. 5) characterized by a rate constant of $6.4 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ (Table 1). Photobleaching of mTHPC after 24 h incubation was best fitted by a bi-exponential decay (Fig. 5, Table 1) with a very rapid first rate constant ($78 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) and a slow second one ($0.6 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$).

Yields of mTHPC-Induced Cell Photoinactivation at Different Incubation Times

MCF-7 cells were incubated with $1.5 \mu\text{M}$ mTHPC for 3 or 24 h and irradiated with different light fluences, and their survival was further assessed by a colony-forming assay. Figure 6 shows the fractions of live cells as a function of either irradiation time (Fig. 6A) or of the number of photons absorbed (Fig. 6B). Considerably greater cell photoinactivation was observed after 24 h incubation at all fluences applied (Fig. 6A). The photocytotoxicity data were

TABLE 2
Lifetimes (τ) and Corresponding Pre-exponential Factors (I) of mTHPC Fluorescence in MCF-7 Cells for Different Incubation Times Measured Using FLIM

Parameter	τ_1 , ns	I_1 , %	τ_2 , ns	I_2 , %
3 h	0.10 ± 0.003	35	8.69 ± 0.41	65
24 h Diffuse	1.03 ± 0.37	63	3.92 ± 0.54	37
Spots	0.31 ± 0.22	55	1.97 ± 0.35	45

Notes. Cells were incubated with mTHPC at an extracellular concentration of $7.5 \mu\text{M}$ at 37°C . Average values from at least three different experiments $\pm$ SD are shown.

replotted, with the abscissa giving the numbers of absorbed photons, calculated according to Eq. (8). The photophysical parameters such as extinction coefficient ϵ , intracellular concentrations C , and photobleaching rate constants k , k_1 and k_2 for both incubation times were taken from Tables 1 and 2. The replotted curves (Fig. 6B) demonstrated results completely different from those depicted in Fig. 6A. Three hours of incubation yielded much better photoinactivation than 24 h. Photoinactivation yield was estimated by fitting of these plots (Fig. 6B), according to the single-hit multi-target survival model (25). In this model, the dependence of the cell surviving fraction on absorbed dose is presented as

$$N = N_0[1 - (1 - \exp^{-D/D_0})^n], \quad (9)$$

where N is the number of live cells after irradiation, N_0 is the initial number of live cells, D_0 is the light dose required to reduce the surviving fraction by $1/e$ (LD_{63}) on the linear portion of the curve, D is the absorbed light dose, and n is the parameter that determines the threshold dose (width of the shoulder on the survival curve). Assuming that the efficiency of PDT is $1/D_0$, we find that this parameter is twice as high at 3 h compared to 24 h. In other words, after 3 h incubation, mTHPC inactivates 1.8 times more cells compared to 24 h upon absorption of the same number of photons.

DISCUSSION

Hydrophobic sensitizers form dimers and higher micelle-like aggregates in aqueous media, and their physical and chemical properties differ noticeably from those of the monomeric sensitizer (26). Generally, monomeric forms of a photosensitizer have a higher photodynamic efficacy compared to aggregates (14, 15, 27).

An increase in the incubation time of MCF-7 cells with mTHPC leads to an enhanced accumulation of aggregated species, as can be deduced from this study. Besides a bathochromic shift of the Soret band maximum after 24 h incubation (420 nm) compared to that in methanol solution (415 nm), we observed a considerable reduction of the molar extinction coefficient of the Soret band at 24 h compared to 3 h (Fig. 2, Table 1). The increase of the half-height bandwidth of the Soret band at 24 h incubation (2040 cm^{-1})

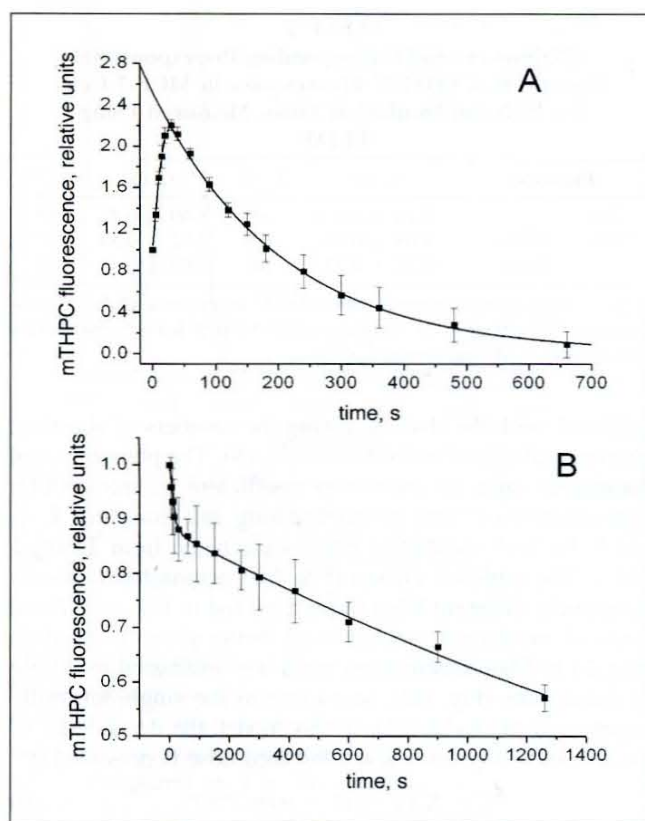


FIG. 5. Photobleaching kinetics of mTHPC in MCF-7 cell monolayers after 3 h (panel A) and 24 h (panel B) incubation. Cells were incubated with mTHPC at an extracellular concentration $1.5 \mu\text{M}$ at 37°C . mTHPC fluorescence was monitored at $\lambda_{\text{em}} = 650 \text{ nm}$ ($\lambda_{\text{ex}} 420 \text{ nm}$). Photobleaching parameters are given in Table 2. Average values from three different experiments $\pm$ SD are shown.

relative to that at 3 h (1740 cm^{-1}) can be considered as another sign of aggregation.

Another parameter that is very sensitive to molecular aggregation state is fluorescence lifetime (24). There are several reports on the use of FLIM technique to study the aggregation state of sensitizers (28–31). The influence of the intracellular concentration and aggregation state of AlPcS_2 on its fluorescence lifetime demonstrated a reduction in fluorescence lifetime at higher concentrations and was attributed to the quenching of monomer fluorescence by non-fluorescent aggregates (28). Likewise, the *in vitro* decrease of the fluorescence lifetime of mTHPC during incubation was attributed to formation of aggregates (29). We performed FLIM measurements of mTHPC in MCF-7 cells after 3 and 24 h incubation. For 24 h incubation, the lifetimes were calculated separately in the regions with diffuse localization and in the regions of high fluorescence intensity (Fig. 3). Our results demonstrate that the fluorescence intensity in the latter regions is considerably higher compared to the diffuse regions (207.6 compared to 61.9 relative units). The lifetime of mTHPC at 3 h incubation appeared to be 8.7 ns (Table 2) and is consistent with that of

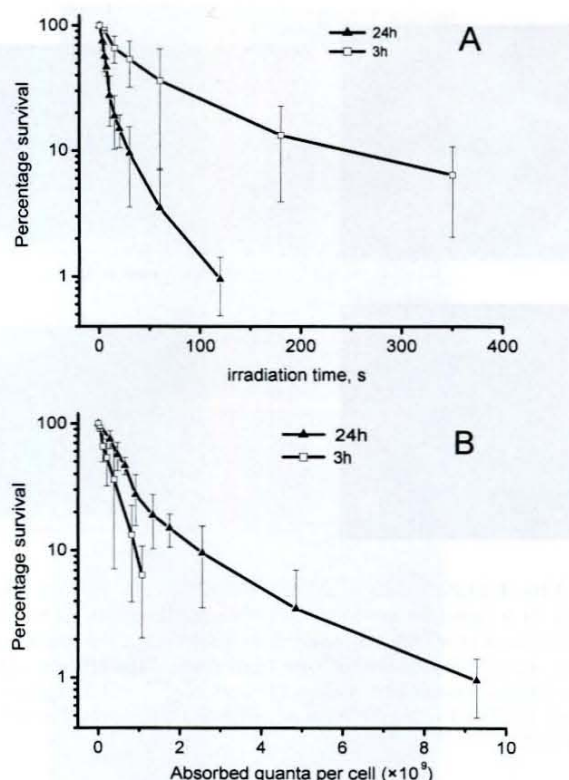


FIG. 6. Survival curves for MCF-7 cells after at 3 h and 24 h incubation (clonogenic assay) after mTHPC-PDT treatment as a function of irradiation time (panel A) and the number of absorbed photons per cell by intracellular sensitizer (panel B). The number of absorbed quanta per cell was obtained using Eq. (8). Cells were incubated with mTHPC at an extracellular concentration of $1.5 \mu\text{M}$ at 37°C . Average values from 5–10 different experiments $\pm$ SD are shown.

mTHPC monomers in ethanol (10 ns) (32). In general, fluorescence decays at 24 h are considerably faster compared to 3 h, and thus the lifetimes after prolonged incubation are much shorter (Table 2). The shorter lifetimes at 24 h could be the result of sensitizer self-quenching due to its high concentration and aggregation, or they could be attributed to interactions with cellular components and specific intracellular medium properties. The changes in the aggregation of mTHPC as suggested by FLIM confirm the absorption spectroscopy data and are indicative of increased aggregation with increasing incubation time (Table 1).

mTHPC has been reported to be a moderately photolabile compound (33). Its photodegradation and photoproduct formation are dependent on oxygen (34). Photobleaching of mTHPC is sensitive to aggregation state, with a preferential photobleaching of the monomeric forms (35). We noticed an initial increase in sensitizer fluorescence intensity at 3 h incubation that is probably related to the initial localization pattern of mTHPC (Fig. 5A). As we have shown previously, the primary sites of mTHPC localization and photodamage in MCF-7 cells at 3 h incubation are the ER and Golgi apparatus (8, 36). Extending the incubation time to 24 h

results in a leakage of mTHPC from the Golgi apparatus with an enhanced accumulation in the ER (19). Based on this observation, we speculate that energy delivered in the course of irradiation could promote redistribution between the ER and Golgi apparatus and eventually result in location of the photosensitizer in the sites favoring a higher fluorescence yield. An increase in the fluorescence intensity was observed earlier for hypericin (15) and several phthalocyanines upon irradiation (37). The results were interpreted as a possible photoinduced disaggregation/relocation of sensitizers. In the present study, the initial increase in fluorescence intensity was followed by a decrease, best fitted by a mono-exponential equation, suggesting the presence of only one type of photosensitizer species, presumably monomeric. This is also consistent with the FLIM results after 3 h incubation, where the lifetimes obtained were comparable to those in ethanol solution.

The kinetics of photobleaching at 24 h incubation became bi-exponential with a very rapid first phase (Fig. 5B, Table 2). The photobleaching rate constant of the second phase at 24 h was an order of magnitude lower than the constant at 3 h, suggesting the formation of sensitizer aggregated species upon prolonged incubation (Table 2).

As has been demonstrated for deuteroporphyrin, an increase in intracellular photosensitizer concentration may lead to sensitizer self-association with the resulting self-quenching of the triplet state (38). Such self-quenching conditions can be achieved *in vitro* at a local sensitizer concentration of the order of 1 mM (38). The triplet excited-state molecules are photoinactivated through two major pathways: the reaction of triplet with either another triplet or a ground state dye molecule and the reaction between a triplet dye molecule and an oxygen molecule (39). These two mechanisms are called D-D (dye-to-dye) and D-O (dye-to-oxygen), respectively (40). Simulations with fluorescein in solution showed that in the absence of D-D reactions, when the dye content is much lower than the oxygen concentration, the probability of a reaction between dye molecules is very low and photobleaching is a single-exponential process (41). Therefore, we postulate that at 3 h the mono-exponential kinetics of photobleaching is consistent with a predominantly D-O mechanism (Fig. 5). It was reported earlier that an increase in the intracellular content of the sensitizer results in a change in the photobleaching mechanism from singlet oxygen-mediated to triplet-mediated (23). With regard to the considerable increase in the mTHPC concentration in the course of prolonged incubation, the probability of D-D reactions increases, resulting in a more complicated photobleaching profile at 24 h. This proposal is supported by the fact that in self-associated photosensitizer clusters, the availability of oxygen is limited (42). A complex photobleaching behavior of mTHPC could also be anticipated based on the FLIM data after 24 h incubation (Table 2), where several lifetime components were registered as a function of intracellular localization.

The observed photodynamic efficacy of mTHPC

($1/LD_{63}$) at 24 h incubation is about three times greater than at 3 h (Fig. 6A). It should be noted that this is not proportional to the increase in the intracellular content of the sensitizer, which is about 15 times greater (Table 1). However, to compare the real yields of photoinactivation at different incubation times, and thus different intracellular concentrations, aggregated states, and intracellular localizations, the number of absorbed photons per sensitizer molecule should be taken into account. After calculation of the photodynamic efficacy ($PE = 1/D_0$), based on the absorbed light dose, the EP_{3h} appeared to be about 1.8 times greater than the EP_{24h} . These results indicate that the aggregated species of mTHPC have lower photodynamic activity compared to monomers. In other words, an increase in the intracellular content of the photosensitizer can lead to the formation of a photodynamically inactive sensitizer fraction. This has been shown for other sensitizers such as hypericin, where prolonged incubation with murine keratinocytes was shown to decrease its cytotoxicity (15). This was explained by a sensitizer intracellular aggregation that was seen as substantial decrease in its fluorescence quantum yield.

We obtained D_0 values of 4.3×10^8 and 7.9×10^8 absorbed quanta per cell for 3 and 24 h incubation, respectively (Fig. 6B). These values are comparable to those reported for Photofrin (23, 43). For instance, in MLL cells, the D_0 was 2.4×10^8 and appeared to be independent of extracellular Photofrin concentration within the range of 1–25 μM (23), suggesting the absence of a change in the sensitizer microenvironment and/or aggregation state.

We have shown *in vitro* that, per absorbed photon, the efficacy of PDT is greater for short drug–light intervals. The drug–light interval of 96 h used in clinical trials was historically chosen to obtain the highest tumor to normal tissue ratio of intratumoral photosensitizer content. However, as was shown recently in rodents and in humans, a reduced drug–light interval resulted in greater therapeutic efficacy, probably through a combination of indirect damage, induced by vascular events resulting in tumor hypoxia, and direct tumor destruction (44, 45). Our *in vitro* model could be a good approximation of the clinical situation since the extracellular concentration of mTHPC used in our study (1.5 μM) is very close to that in human plasma during the first 24 h (46). Second, human plasma and vascular endothelium show a relatively constant concentration of mTHPC for the first 12 h with a very slow decrease over the next days (46, 47), thus making our 24-h incubation condition approximate the behavior of mTHPC in the human vascular compartment.

An important contribution of our study is that even at much lower concentrations, the illumination can achieve better results since the photosensitizer is mostly monomeric. It is therefore reasonable to presume that shorter drug–light interval, resulting in a lower intracellular mTHPC content, might prove more effective. Furthermore, with the low intracellular photosensitizer concentration, ox-

xygen consumption might also be reduced, thus further enhancing the effect (5, 48).

In conclusion, it was found that the photophysical properties of mTHPC depend greatly on the duration of incubation of the cells. This effect can be explained on the basis of different sensitizer localization patterns and concentrations in cells. The higher intracellular content of the sensitizer and the appearance of highly fluorescent regions at 24 h are accompanied by a substantial decrease of absorbance in the Soret band, bi-exponential kinetics of photobleaching, and reduced fluorescence lifetimes compared to 3 h. Owing to self-quenching of sensitizer triplet states and aggregation due to its high intracellular concentration, the efficacy of PDT calculated as a function of the number of absorbed photons is 1.8 times higher for 3 h incubation compared to 24 h.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Alexis Vautrin Cancer Center research funds, French Ligue Nationale contre le Cancer. We also thank the Ministry of Foreign Affairs of France for awarding fellowship to SS and Biolitec AG (Jena, Germany) for providing us with the mTHPC. We acknowledge the excellent technical assistance of A. François and E. Werkmeister.

Received: November 14, 2006; accepted: February 19, 2007

REFERENCES

1. T. J. Dougherty, C. J. Gomer, B. W. Henderson, G. Jori, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan and Q. Peng, Photodynamic therapy. *J. Natl. Cancer Inst.* **90**, 889–905 (1998).
2. Q. Peng and J. M. Nesland, Effects of photodynamic therapy on tumor stroma. *Ultrastruct. Pathol.* **28**, 333–340 (2004).
3. R. Bonnett, R. D. White, U. J. Winfield and M. C. Berenbaum, Hydroxyphenyls of the meso-tetra(hydroxyphenyl)porphyrin series as tumour photosensitizers. *Biochem. J.* **261**, 277–280 (1989).
4. V. O. Melnikova, L. N. Bezdetnaya, A. Y. Potapenko and F. Guillemin, Photodynamic properties of meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin in human tumor cells. *Radiat. Res.* **152**, 428–435 (1999).
5. S. Coutier, L. N. Bezdetnaya, T. H. Foster, R. M. Parache and F. Guillemin, Effect of irradiation fluence rate on the efficacy of photodynamic therapy and tumor oxygenation in meta-tetra (hydroxyphenyl) chlorin (mTHPC)-sensitized HT29 xenografts in nude mice. *Radiat. Res.* **158**, 339–345 (2002).
6. S. Coutier, S. Mitra, L. N. Bezdetnaya, R. M. Parache, I. Georgakoudi, T. H. Foster and F. Guillemin, Effects of fluence rate on cell survival and photobleaching in meta-tetra-(hydroxyphenyl)chlorin-photosensitized Colo 26 multicell tumor spheroids. *Photochem. Photobiol.* **73**, 297–303 (2001).
7. T. H. Foster, B. D. Pearson, S. Mitra and C. E. Bigelow, Fluorescence anisotropy imaging reveals localization of meso-tetrahydroxyphenyl chlorin in the nuclear envelope. *Photochem. Photobiol.* **81**, 1544–1547 (2005).
8. M. H. Teiten, S. Marchal, M. A. D'Hallewin, F. Guillemin and L. Bezdetnaya, Primary photodamage sites and mitochondrial events after Foscan photosensitization of MCF-7 human breast cancer cells. *Photochem. Photobiol.* **78**, 9–14 (2003).
9. L. B. Lovat, N. F. Jamieson, M. R. Novelli, C. A. Mosse, C. Selvasakar, G. D. Mackenzie, S. M. Thorpe and S. G. Bown, Photodynamic therapy with m-tetrahydroxyphenyl chlorin for high-grade dysplasia and early cancer in Barrett's columnar lined esophagus. *Gastrointest. Endosc.* **62**, 617–623 (2005).
10. C. Hopper, A. Kubler, H. Lewis, I. B. Tran and G. Putman, mTHPC-mediated photodynamic therapy for early oral squamous cell carcinoma. *Int. J. Cancer* **111**, 138–146 (2004).
11. R. W. Redmond, E. J. Land and T. G. Truscott, Aggregation effects on the photophysical properties of porphyrins in relation to mechanisms involved in photodynamic therapy. *Adv. Exp. Med. Biol.* **193**, 293–302 (1985).
12. C. Tanielian, C. Schweitzer, R. Mechin and C. Wolff, Quantum yield of singlet oxygen production by monomeric and aggregated forms of hematoporphyrin derivative. *Free Radic. Biol. Med.* **30**, 208–212 (2001).
13. M. Ambroz, A. J. MacRobert, J. Morgan, G. Rumbles, M. S. Foley and D. Phillips, Time-resolved fluorescence spectroscopy and intracellular imaging of disulphonated aluminium phthalocyanine. *J. Photochem. Photobiol. B* **22**, 105–117 (1994).
14. D. J. Ball, S. R. Wood, D. I. Vernon, J. Griffiths, T. M. Dubbelman and S. B. Brown, The characterisation of three substituted zinc phthalocyanines of differing charge for use in photodynamic therapy. A comparative study of their aggregation and photosensitising ability in relation to mTHPC and polyhaematoporphyrin. *J. Photochem. Photobiol. B* **45**, 28–35 (1998).
15. T. Theodossiou, M. D. Spiro, J. Jacobson, J. S. Hotherhall and A. J. MacRobert, Evidence for intracellular aggregation of hypericin and the impact on its photocytotoxicity in PAM 212 murine keratinocytes. *Photochem. Photobiol.* **80**, 438–443 (2004).
16. F. Ricchelli, Photophysical properties of porphyrins in biological membranes. *J. Photochem. Photobiol. B* **29**, 109–118 (1995).
17. V. V. Borovkov, M. Anikin, K. Wasa and Y. Y. Sakata, Structurally controlled porphyrin-aggregation process in phospholipid membranes. *Photochem. Photobiol.* **63**, 477–482 (1996).
18. M. F. Grahn, A. McGuinness, R. Benzie, R. Boyle, M. L. de Jode, M. G. Dilkes, B. Abbas and N. S. Williams, Intracellular uptake, absorption spectrum and stability of the bacteriochlorin photosensitizer 5,10,15,20-tetrakis (m-hydroxyphenyl)bacteriochlorin (mTHPBC). Comparison with 5,10,15,20-tetrakis(m-hydroxyphenyl)chlorin (mTHPC). *J. Photochem. Photobiol. B* **37**, 261–266 (1997).
19. S. Marchal, A. François, D. Dumas, F. Guillemin and L. Bezdetnaya, Relationship between subcellular localisation of Foscan® and caspase activation in photosensitized MCF-7 cells. *Br. J. Cancer* **96**, 944–951 (2007).
20. R. Bonnett, B. D. Djelal and N. Angelina, Physical and chemical studies related to the development of m-THPC (FOSCAN®) for the photodynamic therapy (PDT) of tumours. *J. Porphyrins Phthalocyanines* **5**, 652–661 (2001).
21. M. N. Merzlyak and K. R. Naqvi, On recording the true absorption spectrum and the scattering spectrum of a turbid sample: application to cell suspensions of the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *J. Photochem. Photobiol. B* **58**, 123–129 (2000).
22. T. Theodossiou and A. J. MacRobert, Comparison of the photodynamic effect of exogenous photoporphyrin and protoporphyrin IX on PAM 212 murine keratinocytes. *Photochem. Photobiol.* **76**, 530–537 (2002).
23. J. S. Dysart and M. S. Patterson, Characterization of Photofrin photobleaching for singlet oxygen dose estimation during photodynamic therapy of MLL cells in vitro. *Phys. Med. Biol.* **50**, 2597–2616 (2005).
24. J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Kluwer, New York, 1999.
25. J. F. Fowler, Differences in survival curve shapes for formal multi-target and multi-hit models. *Phys. Med. Biol.* **9**, 177–188 (1964).
26. S. B. Brown, M. Shillcock and P. Jones, Equilibrium and kinetic studies of the aggregation of porphyrins in aqueous solution. *Biochem. J.* **153**, 279–285 (1976).
27. L. Ma, J. Moan and K. Berg, Evaluation of a new photosensitizer, meso-tetra-hydroxyphenyl-chlorin, for use in photodynamic therapy: A comparison of its photobiological properties with those of two other photosensitizers. *Int. J. Cancer* **57**, 883–888 (1994).
28. J. P. Connelly, S. W. Botchway, D. P. L. Kunz, A. W. Parker and

- A. J. MacRobert, Time-resolved fluorescence imaging of photosensitizer distributions in mammalian cells using a picosecond laser line-scanning microscope. *J. Photochem. Photobiol. A* **142**, 169–175 (2001).
29. M. Kress, T. Meier, R. Steiner, F. Dolp, R. Erdmann, U. Ortmann and A. Ruck, Time-resolved microspectrofluorometry and fluorescence lifetime imaging of photosensitizers using picosecond pulsed diode lasers in laser scanning microscopes. *J. Biomed. Opt.* **8**, 26–32 (2003).
 30. A. D. Scully, R. B. Ostler, A. J. MacRobert, A. W. Parker, C. de Lara, P. O'Neill and D. Phillips, Laser line-scanning confocal fluorescence imaging of the photodynamic action of aluminum and zinc phthalocyanines in V79-4 Chinese hamster fibroblasts. *Photochem. Photobiol.* **68**, 199–204 (1998).
 31. A. D. Scully, R. B. Ostler, D. Phillips, P. O'Neill, A. W. Parker and A. J. MacRobert, Application of fluorescence lifetime imaging microscopy to the investigation of intracellular PDT mechanisms. *Bioimaging* **5**, 9–18 (1997).
 32. L. Howe, A. Sucheta, O. Einarsdottir and J. Z. Zhang, Time-resolved studies of the excited-state dynamics of meso-tetra(hydroxyphenyl)chlorin in solution. *Photochem. Photobiol.* **69**, 617–623 (1999).
 33. R. Bonnett, B. D. Djelal, P. A. Hamilton, G. Martinez and F. Wierrani, Photobleaching of 5,10,15,20-tetrakis(m-hydroxyphenyl)porphyrin (m-THPP) and the corresponding chlorin (m-THPC) and bacteriochlorin (m-THPBC). A comparative study. *J. Photochem. Photobiol. B* **53**, 136–143 (1999).
 34. C. Hadjur, N. Lange, J. Rebstein, P. Monnier, H. van den Bergh and G. Wagnières, Spectroscopic studies of photobleaching and photoproduct formation of meta(tetrahydroxyphenyl) chlorin (m-THPC) used in photodynamic therapy. The production of singlet oxygen by m-THPC. *J. Photochem. Photobiol. B* **45**, 170–178 (1998).
 35. I. Belitchenko, V. Melnikova, L. Bezdetnaya, H. Rezzoug, J. L. Merlin, A. Potapenko and F. Guillemin, Characterization of photodegradation of meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin (mTHPC) in solution: Biological consequences in human tumor cells. *Photochem. Photobiol.* **67**, 584–590 (1998).
 36. M. H. Teiten, L. Bezdetnaya, P. Morliere, R. Santus and F. Guillemin, Endoplasmic reticulum and Golgi apparatus are the preferential sites of Foscan localisation in cultured tumour cells. *Br. J. Cancer* **88**, 146–152 (2003).
 37. A. Ruck, G. Beck, R. Bachor, N. Akgun, M. H. Gschwend and R. Steiner, Dynamic fluorescence changes during photodynamic therapy *in vivo* and *in vitro* of hydrophilic Al(III) phthalocyanine tetrasulphonate and lipophilic Zn(II) phthalocyanine administered in liposomes. *J. Photochem. Photobiol. B* **36**, 127–133 (1996).
 38. B. M. Aveline, R. M. Sattler and R. W. Redmond, Environmental effects on cellular photosensitization: Correlation of phototoxicity mechanism with transient absorption spectroscopy measurements. *Photochem. Photobiol.* **68**, 51–62 (1998).
 39. L. Lindqvist, A flash photolysis study of fluorescein. *Arkiv Kemi.* **16**, 79–138 (1960).
 40. Y. Usui, K. Itoh and M. Koizumi, Switch-over of the mechanism of the primary processes in the photo-oxidation of xanthene dyes as revealed by the oxygen consumption experiments. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **38**, 1015–1022 (1965).
 41. L. Song, E. J. Hennink, I. T. Young and H. J. Tanke, Photobleaching kinetics of fluorescein in quantitative fluorescence microscopy. *Biophys. J.* **68**, 2588–2600 (1995).
 42. R. Rotomskis, S. Bagdonas and G. Streckyte, Spectroscopic studies of photobleaching and photoproduct formation of porphyrins used in tumour therapy. *J. Photochem. Photobiol. B* **33**, 61–67 (1996).
 43. T. G. Gantchev, I. J. Urumov and J. E. Van Lier, On the relationship between rate of uptake of Photofrin and cellular responses to photodynamic treatment *in vitro*. *Cancer Biochem. Biophys.* **14**, 23–34 (1994).
 44. E. Maugain, S. Sasnouski, V. Zorin, J. L. Merlin, F. Guillemin and L. Bezdetnaya, Foscan-based photodynamic treatment *in vivo*: Correlation between efficacy and Foscan accumulation in tumor, plasma and leukocytes. *Oncol. Rep.* **12**, 639–645 (2004).
 45. M. Triesscheijn, M. Ruevekamp, N. Antonini, H. Neering, F. A. Stewart and P. Baas, Optimizing meso-tetra-hydroxyphenyl-chlorin-mediated photodynamic therapy for basal cell carcinoma. *Photochem. Photobiol.* **82**, 1686–1690 (2006).
 46. M. Triesscheijn, M. Ruevekamp, R. Out, T. J. C. Van Berkel, J. Schellens, P. Baas and F. A. Stewart, The pharmacokinetic behavior of the photosensitizer meso-tetra-hydroxyphenyl-chlorin in mice and men. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **60**, 113–122 (2007).
 47. S. Andrejevic Blant, P. Grosjean, J-P. Ballini, G. Wagnières, H. van den Bergh, Ch. Fontollet and Ph. Monnier, Localization of tetra(m-hydroxyphenyl)chlorin (Foscan) in human healthy tissues and squamous cell carcinomas of the upper aero-digestive tract, the esophagus and the bronchi: A fluorescence microscopy study. *J. Photochem. Photobiol. B* **61**, 1–9 (2001).
 48. B. W. Henderson, T. M. Busch, L. A. Vaughan, N. P. Frawley, D. Babich, T. A. Sosa, J. D. Zollo, A. S. Dee, M. T. Cooper and A. R. Oseroff, Photofrin photodynamic therapy can significantly deplete or preserve oxygenation in human basal cell carcinomas during treatment, depending on fluence rate. *Cancer Res.* **60**, 525–529 (2000).

III. Production scientifique

Publications

Pic E., Pons T., Bezdetnaya L., Leroux A., Guillemain F., Dubertret B., Marchal F. *Fluorescence Imaging and Whole-body Biodistribution of Near-Infrared Emitting Quantum Dots after Subcutaneous Injection for Regional Lymph Node Mapping in Healthy Mice*. **Mol Imaging Biol**, 2009. Sous presse.

Pic E., Bezdetnaya L., Guillemain F., Marchal F. *Quantification Techniques and Biodistribution of Semiconductor Quantum Dots*. **Anticancer Agent Med Chem**, 2009, 9(3): 295-303.

Marchal F., **Pic E.**, Pons T., Dubertret B., Bolotine L., Guillemain F. *Quantum dots en chirurgie oncologique : un rôle d'avenir pour le marquage des berges d'exérèse ?* **Bull Cancer**, 2008, 95(12): 1149-1153.

Robé A., **Pic E.**, Lassalle H.P., Bezdetnaya L., Guillemain F., Marchal F. *Quantum dots in axillary lymph node mapping: biodistribution study in healthy mice*. **BMC Cancer**, 2008, 22(8): 111-119.

Sasnouski S., **Pic E.**, Dumas D., Zorin V., D'Hallewin M.A., Guillemain F., Bezdetnaya L. *Influence of incubation time and sensitizer localization on meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin (mTHPC)-induced photoinactivation of cells*. **Radiat Res**, 2007, 168(2): 209-17.

Communications orales* et par poster**

Pic E.*, Pons T., Clausse V., Bezdetnaya L., Guillemain F., Dubertret B., Marchal F. *Localisation des ganglions lymphatiques au moyen de Quantum Dots par imagerie de fluorescence et étude de biodistribution par spectrométrie de masse chez la souris*. **Colloque OptDiag 2009**. Paris, 13-15 mai 2009.

Pic E.**, Pons T., Clausse V., Bezdetnaya L., Guillemain F., Dubertret B., Marchal F. *Localisation des ganglions lymphatiques au moyen de Quantum Dots par imagerie de fluorescence et étude de biodistribution par spectrométrie de masse chez la souris*. **Oncotrans 2009 : 1^{er} Colloque Inter-régional Grand-Est de Recherche Translationnelle en Oncologie**. Nancy, 19-20 mars 2009.

Pic E.**, Robé A., Lassalle H.P., Bezdetnaya L., Guillemain F., Marchal F. *Quantum dots in axillary lymph node mapping: biodistribution study in healthy mice*. **7th International Symposium on Photodynamic Therapy in Clinical Practice**. Brixen, Italie, 7-11 octobre 2008.

Pic E.*, Robé A., Lassalle H.P., Bezdetnaya L., Guillemain F., Marchal F. *Application des Quantum Dots dans la cartographie des ganglions axillaires dans un modèle pré-clinique : étude de biodistribution*. **Colloque Nanohybrides V**. Porquerolles, 16-19 juin 2008.

Robé A., **Pic E.****, Bolotine L., Guillemin F., Marchal F. *Quantum dots et ganglion sentinelle : étude de biodistribution*. **Eurocancer XXVIIème forum de cancérologie**. Paris, 26-28 juin 2007.

Ce poster a remporté le prix de chirurgie lors de cet événement.

Robé A., **Pic E.****, Bolotine L., Guillemin F., Marchal F. *Quantum dots et ganglion sentinelle : étude de biodistribution*. **Colloque OptDiag 2007**. Paris, 15-16 mai 2007.

IV. Résumés sélectionnés de communications scientifiques

Pic E.**, Robé A., Lassalle H.P., Bezdetnaya L., Guillemin F., Marchal F. *Quantum dots in axillary lymph node mapping: biodistribution study in healthy mice*. **7th International Symposium on Photodynamic Therapy in Clinical Practice**. Brixen, Italie, 7-11 octobre 2008.

Background: Breast cancer is the first cause of cancer death among women and its incidence doubled in the last two decades. Several approaches for the treatment of these cancers have been developed. The axillary lymph node dissection (ALND) leads to numerous morbidity complications and is now advantageously replaced by the dissection and the biopsy of the sentinel lymph node. Although this approach has strong advantages, it has its own limitations which are manipulation of radioactive products and possible anaphylactic reactions to the dye. As recently proposed, these limitations could in principle be by-passed if semiconductor nanoparticles (quantum dots or QDs) were used as fluorescent contrast agents for the *in vivo* imaging of SLN. QDs are fluorescent nanoparticles with unique optical properties like strong resistance to photobleaching, size dependent emission wavelength, large molar extinction coefficient, and good quantum yield.

Methods: CdSe/ZnS core/shell QDs emitting around 655 nm were used in our studies. 20 μ L of 1 μ M (20 pmol) QDs solution were injected subcutaneously in the anterior paw of healthy nude mice and the axillary lymph node (ALN) was identified visually after injection of a blue dye. *In vivo* fluorescence spectroscopy was performed on ALN before the mice were sacrificed at 5, 15, 30, 60 min and 24 h after QDs injection. ALN and all other organs were removed, cryosectioned and observed in fluorescence microscopy. The organs were then chemically made soluble to extract QDs. Plasmatic, urinary and fecal fluorescence levels were measured.

Results: QDs were detected in ALN as soon as 5 min and up to 24 h after the injection. The maximum amount of QDs in the ALN was detected 60 min after the injection and corresponds to 2.42% of the injected dose. Most of the injected QDs remained at the injection site. No QDs were detected in other tissues, plasma, urine and feces.

Conclusion: Effective and rapid (few minutes) detection of sentinel lymph node using fluorescent imaging of quantum dots was demonstrated. This work was done using very low doses of injected QDs and the detection was done using a minimally invasive method.

Pic E.*, Pons T., Clausse V., Bezdetnaya L., Guillemin F., Dubertret B., Marchal F. *Localisation des ganglions lymphatiques au moyen de Quantum Dots par imagerie de fluorescence et étude de biodistribution par spectrométrie de masse chez la souris. Colloque OptDiag 2009*. Paris, 13-15 mai 2009.

Introduction : Le diagnostic des métastases ganglionnaires dans le cancer du sein est réalisé par la technique du ganglion sentinelle (GS), consistant à repérer et prélever le premier relais ganglionnaire axillaire potentiellement métastatique. Ces GS sont repérés par injection d'un produit radioactif et d'un colorant bleu. Cependant, quelques inconvénients existent : chocs allergiques ou anaphylactiques dus au bleu ou au radiocolloïde. De nouveaux marqueurs sont ainsi proposés pour cette application, les Quantum Dots (QDs) : nanocristaux de semi-conducteurs fluorescents. L'objectif de ce travail est de déterminer et comparer la biodistribution des QDs chez la souris balb/c par 2 techniques de détection : *in vivo* par imagerie de fluorescence (IF) et *ex vivo* par spectrométrie de masse (ICP-MS), technique de référence.

Matériel et Méthodes : Les QDs utilisés émettant à 800 nm, sont composés de CdTeSe/CdZnS cœur/coque, encapsulés dans une micelle PEG2000 dont 33 % sont terminés avec des groupements COOH. Vingt picomoles de QDs sont injectées en sous-cutané dans la patte antérieure droite des souris, les ganglions axillaires et thoraciques latéraux sont suivis *in vivo* par IF pendant 10 jours. Les animaux sont ensuite sacrifiés et les organes sont imagés *ex vivo* par IF. Une étude de biodistribution est également effectuée ; 9 cinétiques sont étudiées allant de 5 min à 10 jours après administration des QDs. Les principaux organes et excréments ont été collectés et analysés par ICP-MS pour le dosage du cadmium.

Résultats: Les QDs sont détectés dans les ganglions axillaires et thoraciques latéraux droits dès 5 min et jusqu'à 10 jours après injection, par IF et ICP-MS. La cinétique d'accumulation des QDs dans ces ganglions est similaire par les 2 techniques de détection. La dose maximale en QDs dans ces 2 ganglions est observée 4 h après injection et correspond à 1,36 % et 1,04 % de la dose injectée (% ID) pour les ganglions axillaires et thoraciques latéraux, respectivement. Les QDs sont aussi présents dans les organes et s'accumulent en particulier dans le foie, la rate et les reins avec des doses de 15,4 % ID, 1,4 % ID et 1,1 % ID, respectivement, 10 jours post-injection. Les QDs sont également détectés dans le sang à toutes les cinétiques mais ne sont pas éliminés de l'organisme.

Conclusion : Les QDs sont rapidement captés par 2 ganglions régionaux. La cinétique d'accumulation des QDs dans ces ganglions est similaire par IF et ICP-MS. L'IF peut donc

être utilisée pour suivre l'accumulation des QDs dans ces ganglions, et ainsi, diminuer le nombre d'animaux à utiliser.

Titre : Localisation des ganglions sentinelles au moyen de quantum dots. Application au cancer du sein

Résumé

Le statut ganglionnaire a la valeur pronostique la plus importante chez les patientes atteintes d'un cancer du sein, le taux de survie étant corrélé au nombre de ganglions envahis. Dans le traitement des cancers du sein opérables d'une taille inférieure à 3 cm, la technique du ganglion sentinelle (GS) remplace le curage ganglionnaire de stadification. Toutefois, cette technique nécessite l'emploi simultané de radioisotopes et de colorants physiologiques présentant divers effets secondaires. Ainsi, notre stratégie a été de tester, sur modèle pré-clinique de nouveaux traceurs fluorescents, les Quantum Dots (QDs), pour la technique du GS.

Une étude sur la détection *in vivo* du ganglion axillaire (GA) par spectrofluorimétrie fibrée après injection sous-cutanée (s.c.) de QDs émettant dans le rouge a été réalisée et leur quantification *ex vivo* a été effectuée par spectrofluorimétrie jusqu'à 24 h. Ce travail a montré l'accumulation rapide et sélective des QDs dans le GA chez la souris. Une étude sur la localisation *in vivo* de 2 ganglions régionaux par imagerie de fluorescence a été réalisée suite à l'administration s.c. de QDs émettant dans le proche infrarouge (PIR) ainsi qu'une étude de biodistribution *ex vivo* par spectrométrie de masse (ICP-MS). Les résultats obtenus ont montré que l'imagerie de fluorescence pouvait être utilisée après injection de QDs pour localiser et suivre leur accumulation dans les ganglions superficiels chez la souris saine. Pour se rapprocher de la clinique, le repérage *in vivo* du GS axillaire a été investi sur modèle tumoral murin de cancer du sein par imagerie de fluorescence après administration s.c. de QDs émettant dans le PIR. Deux techniques de détection des métastases ganglionnaires ont été utilisées puis comparées : l'histologie conventionnelle et la RT-PCR. Tous les GS axillaires ont été détectés *in vivo* par imagerie, sauf un GS qui était complètement envahi par les cellules tumorales et la meilleure incidence de métastases ganglionnaire a été observée avec la RT-PCR.

Ainsi, les QDs pourraient être utilisés comme substitut des marqueurs actuellement employés dans la technique du GS pour les cancers du sein.

Mots clés : cancer du sein, ganglion sentinelle, quantum dot, imagerie de fluorescence, proche infrarouge

Title: Sentinel lymph node mapping with quantum dots. Breast cancer application.

Abstract

Lymph node (LN) status is the most important prognostic factor in breast cancer patients and a determinant predictor of recurrence and survival. In the treatment of operable breast cancers with a size inferior of 3 cm, the sentinel lymph node biopsy (SLNB) substitutes the axillary LN dissection. However, this technique requires the simultaneous use of a radiocolloid and a physiologic dye, which present several secondary effects. Thus, our strategy was to test in preclinical model the new fluorescent markers, Quantum Dots (QDs) for SLNB.

A study on *in vivo* axillary LN (ALN) mapping by light induced fluorescence was performed after subcutaneous (s.c.) injection of red-emitting QDs and their *ex vivo* quantification was realized by spectrofluorimetry for up to 24 h. We showed a fast and selective accumulation of QDs in ALN in healthy mice. An *in vivo* study on localization of 2 regional LNs by fluorescence imaging was carried out after the s.c. administration of near-infrared (NIR) emitting QDs along with *ex vivo* biodistribution study by mass spectroscopy (ICP-MS). Obtained results shown that fluorescence imaging can be used after QDs injection to map and follow their accumulation in superficial LNs in healthy mice. To approach the human clinic in a best possible way, sentinel ALN mapping was investigated after s.c. delivery of NIR emitting QDs in murine breast cancer model by fluorescence imaging. Two techniques for LN metastasis detection were used and compared: conventional histology and RT-PCR. All sentinel ALNs were located *in vivo* by imaging except one ALNs which was completely invaded by cancer cells and best incidence of LN metastasis was registered by RT-PCR (60 %).

Thus, QDs could be used as a substitute for the markers currently employed in SLNB in breast cancers.

Key words: breast cancer, sentinel lymph node, quantum dot, fluorescence imaging, near-infrared