



**UNIVERSITÉ DE STRASBOURG**



**ÉCOLE DOCTORALE Science de la Vie et de la Santé (ED 414)**  
**[EA 3072 Mitochondries, Stress Oxydant et Protection Musculaire]**

**THÈSE** présentée par :

**Michele DIANA**

Soutenue le : **24 mai 2016**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : **Sciences Médicales**

**EVALUATION PEROPERATOIRE DE LA PERFUSION VISCERALE A L'AIDE DE LA  
 FLUORESCENCE COUPLEE A LA REALITE AUGMENTEE**

**THÈSE dirigée par :**

**M Diemunsch Pierre**  
**M Geny Bernard**

PU-PH, CHU de Hautepierre, Université de Strasbourg  
 PU-PH, Nouvel Hôpital Civil, Université de Strasbourg

**RAPPORTEURS :**

**M Bretagnol Frédéric**  
**M Vibert Eric**

PU-PH, Hôpital Louis Mourier, Université Paris VII  
 PU-PH, Hôpital Paul Brousse, Université Paris XI

---

**AUTRES MEMBRES DU JURY :**

**M Boni Luigi**  
**M Gioux Sylvain**

PU-PH, université de Varese (Italie)  
 PU, I-Cube, Université de Strasbourg

## TABLE DES MATIERES

<b>ABSTRACT</b> .....	4
<b>RESUME EN FRANÇAIS</b> .....	5
<b>INTRODUCTION GENERALE (PARTIE EN FRANÇAIS)</b> .....	13
<b>1. LA CHIRURGIE DE PRECISION</b> .....	14
<b>1.1 L'ŒIL AUGMENTÉ I (VOIR PAR TRANSPARENCE): CHIRURGIE ASSISTÉE PAR LA RÉALITÉ AUGMENTÉE</b> .....	15
<b>1.2 L'ŒIL AUGMENTÉ II (VOIR LE MICROSCOPIQUE): CHIRURGIE ASSISTÉE PAR LA VISION MICROSCOPIQUE EN TEMPS REEL</b> .....	17
<b>1.3 L'ŒIL AUGMENTÉ III (VOIR L'INVISIBLE): CHIRURGIE ASSISTÉE PAR LA FLUORESCENCE</b> .....	18
<b>2. L'ANASTOMOSE DIGESTIVE</b> .....	19
<b>2.1 DÉFINITION</b> .....	19
<b>2.2 LE MÉCANISME DE GUÉRISON DES ANASTOMOSES DIGESTIVES</b> .....	20
<b>2.3 COMPLICTIONS ANASTOMOTIQUES</b> .....	21
<b>2.4 TECHNIQUES POUR L'ÉVALUATION PÉROPERATOIRE DE LA PERFUSION INTESTINALE</b> .....	22
<b>3. LA CHIRURGIE GUIDÉE PAR LA FLUORESCENCE : ÉTAT DE L'ART</b> .....	24
<b>3.1 DÉFINITION ET PRINCIPES DE BASE</b> .....	24
<b>3.2 FLUOROPHORES</b> .....	26
<b>3.2.1 AGENTS NON-CIBLES</b> .....	26
<b>3.2.2 AGENTS CIBLES</b> .....	28
<b>3.3 ASPECTS RÉGLEMENTAIRES</b> .....	29
<b>3.4 LES DISPOSITIFS ACTUELLEMENT DISPONIBLES POUR LA FIGS</b> .....	30
<b>3.5 LES APPLICATIONS CLINIQUES COURANTES DE LA FIGS</b> .....	36
3.5.1 DÉTECTION DE CELLULES CANCÉREUSES .....	36
3.5.2 CHOLANGIOGRAPHIE INTRAOPÉRATOIRE PAR IMAGERIE DE FLUORESCENCE .....	37
3.5.3 DÉTECTION DU GANGLION SENTINELLE .....	39
3.5.4 PERFUSION D'ORGANE ÉVALUÉE AVEC ANGIOGRAPHIE PAR FLUORESCENCE INFRAROUGE .....	40
<b>4. MARQUEURS DE LA PERFUSION ET DE L'ÉTAT ÉNERGÉTIQUE TISSULAIRE</b> .....	42
<b>4.1 LA CENTRALE ÉNERGÉTIQUE DE LA CELLULE : LA MITOCHONDRIE</b> .....	42
<b>4.1.1 LA STRUCTURE MITOCHONDRIALE</b> .....	43
<b>4.1.2 FONCTIONNEMENT DE LA MITOCHONDRIE</b> .....	44
4.1.3 LA PHOSPHORYLATION OXYDATIVE .....	44
<b>4.2 L'ISCHEMIE-HYPOXIE TISSULAIRE</b> .....	47
4.2.1 LE LACTATE .....	49
<b>TRAVAUX EXPÉRIMENTAUX (PARTIE EN ANGLAIS)</b> .....	51
<b>EXPERIMENTAL WORKS</b> .....	51
<b>BACKGROUND AND AIMS</b> .....	52
<b>MATERIALS AND METHODS</b> .....	57
<b>EQUIPMENT ENABLING FLER</b> .....	58
<b>NEAR INFRARED (NIR) OPTIMIZED LAPAROSCOPE</b> .....	58

ER-PERFUSION SOFTWARE.....	58
<b>ANALYTICS USED TO VALIDATE FLER .....</b>	<b>61</b>
<b>STATISTICS .....</b>	<b>67</b>
<b>ETHICS AND ANIMAL MODELS .....</b>	<b>68</b>
STUDY 1 METABOLISM-GUIDED BOWEL RESECTION: POTENTIAL ROLE AND ACCURACY OF INSTANT CAPILLARY LACTATES TO IDENTIFY THE OPTIMAL RESECTION SITE .....	69
STUDY 2 FUNCTIONAL CAPILLARY DENSITY FOR IN VIVO ESTIMATION OF INTESTINAL PERFUSION USING REAL-TIME CONFOCAL ENDOMICROSCOPY .....	71
STUDY 3 PROOF OF THE CONCEPT OF FLUORESCENCE-BASED ENHANCED REALITY .....	73
STUDY 4 PERFORMANCE OF FLER VS. CLINICAL JUDGMENT IN A LAPAROSCOPIC MODEL OF SIGMOID ISCHEMIA .....	75
STUDY 5 REAL-TIME NAVIGATION BY FLUORESCENCE-BASED ENHANCED REALITY FOR PRECISE ESTIMATION OF FUTURE ANASTOMOTIC SITE IN DIGESTIVE SURGERY .....	78
STUDY 6 INTRAOPERATIVE FLUORESCENCE-BASED ENHANCED REALITY LAPAROSCOPIC REAL-TIME IMAGING TO ASSESS BOWEL PERFUSION AT THE ANASTOMOTIC SITE IN AN EXPERIMENTAL MODEL. ....	80
STUDY 7: ABILITY TO REGISTER THE VIRTUAL PERFUSION CARTOGRAPHY IN MOVING ORGANS .....	82
<b>RESULTS .....</b>	<b>83</b>
<b>STUDY 1 .....</b>	<b>84</b>
<b>STUDY 2 .....</b>	<b>88</b>
<b>STUDY 3 .....</b>	<b>91</b>
<b>STUDY 4 .....</b>	<b>95</b>
<b>STUDY 5 .....</b>	<b>98</b>
<b>STUDY 6 .....</b>	<b>100</b>
<b>STUDY 7 .....</b>	<b>106</b>
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>107</b>
<b>CONCLUSIONS.....</b>	<b>124</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>126</b>
<b>COMMUNICATIONS.....</b>	<b>141</b>
<b>PUBLICATIONS .....</b>	<b>143</b>
<b>RINGRAZIAMENTI/REMERCIEMENTS/ACKNOWLEDGMENTS .....</b>	<b>145</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>148</b>

## ABSTRACT

Pre-anastomotic bowel perfusion is a key factor for a successful healing process. Clinical evaluation of bowel perfusion is based on subjective and variable parameters such as the colour of serosa surface and is not accurate at predicting anastomotic complications, irrespective of the surgeon's experience. For that reason, in the era of Precision Medicine, an objective and accurate method to quantify intestinal microcirculation, allowing to decrease the rate of anastomotic complications and easily directly ascribable to reduced perfusion, should be integrated in the surgical workflow.

Some techniques have been assessed for real-time evaluation of intestinal perfusion, including Doppler ultrasound and laser Doppler flowmetry (targeting blood flow) or pulse oximetry (targeting arterial oxygen saturation, SpO<sub>2</sub>); or Near-Infrared spectroscopy (NIRS) and visible light spectroscopy (VLS) (targeting haemoglobin's oxygen saturation, StO<sub>2</sub>). However, such techniques fail to reach wide clinical acceptance, being time-consuming or too much operator-dependent.

Routine techniques, such as air or fluid anastomotic leak tests, are not accurate to predict complications, being merely mechanical tests, with no insights in the physiology. Fluorescence videography analysis is being increasingly considered as a potential mean to cope with those limitations. Fluorescence videography is perfectly integrated to the surgical workflow being fast and easy to perform and operator-independent. Following the systemic administration of a fluorescent substance (mainly ICG, methylene blue or fluorescein), fluorescence videography can compute the units of fluorescence, when the area of interest is illuminated by a specific light source. Fluorescence intensity is proportional to the amount of dye diffused and is a marker of blood supply to the tissue. However, fluorescence intensity alone remains a subjective approach and an integrated computer-based analysis of the over-time evolution of the fluorescence signal is required to obtain quantitative data. We have developed a solution integrating computer-based analysis for intra-operative evaluation of the optimal resection site, based on the bowel perfusion as determined by the dynamic fluorescence intensity. The software can generate a "virtual perfusion cartography", based on the "fluorescence time-to-peak". The virtual perfusion cartography can be overlapped onto real-time laparoscopic images to obtain the Enhanced Reality effect. We have defined this approach FLuorescence-based Enhanced Reality (FLER). This thesis describes the stepwise development of the FLER concept.

## RESUME EN FRANÇAIS

### Positionnement de la recherche

L'évaluation peropératoire de la bonne perfusion des anastomoses du tractus gastro-intestinal est essentielle afin de réduire le risque de complications telles que les fuites ou les sténoses anastomotiques. La fuite anastomotique est la complication la plus sévère des résections colorectales, survenant dans 2 à 19 % des cas [1]. L'évaluation clinique du chirurgien ne permet qu'une faible exactitude prédictive pour les fuites anastomotiques [2]. Malgré le développement de nombreuses techniques d'évaluation peropératoire de la perfusion intestinale, l'usage de celles-ci par les chirurgiens est très faible, car la majorité de ces techniques sont onéreuses et chronophages [3]. Une récente étude a souligné le fort potentiel de l'analyse d'images de fluorescence afin d'évaluer la perfusion digestive [4]. Les images de fluorescence sont obtenues grâce à un endoscope utilisant la lumière dans le proche infrarouge capable de détecter un signal émis par un produit fluorescent injecté au patient. L'intensité de la fluorescence est proportionnelle à la quantité de produit fluorescent diffusé dans les tissus, ce qui en fait un marqueur indirect de la perfusion tissulaire [4]. Cette technique est rapide, facile d'utilisation et entièrement intégrée au flux opératoire. À ce jour, de nombreux auteurs ont pu réaliser avec succès l'évaluation de la perfusion intestinale basée sur la fluorescence au bloc opératoire, en utilisant les différents dispositifs conçus pour la chirurgie mini-invasive et disponibles sur le marché [5-9]. Plus précisément, l'étude multicentrique PILLAR II (Perfusion Assessment in Laparoscopic Left-Sided/Anterior Resection) a montré, sur un collectif de 147 patients, l'intérêt clinique de l'évaluation de la perfusion par fluorescence, produisant un changement de la stratégie opératoire dans 10% des cas [10]. Néanmoins, dans toutes ces études, la perfusion a été évaluée de façon statique et qualitative, seulement sur la base de l'intensité relative de la fluorescence, sans considérer la diffusion des fluorophores dans le temps. Un produit fluorescent peut, en effet, atteindre les limites d'une zone ischémique par capillarité avec le

temps et entraîner une surestimation de la zone perfusée. De plus, l'intensité de la fluorescence dépend grandement de la distance entre la source de lumière et la zone d'intérêt et nécessite l'utilisation d'une référence « standard » d'étalonnage (il s'agit d'un repère quadrillé qui renvoie un signal constant quand il est éclairé par une lumière proche infrarouge). Cet outil d'étalonnage doit être introduit dans l'abdomen du patient pendant la coelioscopie, ce qui peut être encombrant et prendre du temps [11].

### **Objectif de la recherche**

Notre démarche était de développer et valider une nouvelle approche, visant à obtenir une mesure rapide, précise et quantitative de la perfusion digestive et pouvant être réalisée en temps réel. Pour y parvenir, le département de Recherche et Développement de l'IRCAD (Strasbourg, France) a développé un logiciel spécifique d'analyse d'images (VR RENDER-PERFUSION, IRCAD, France) permettant d'acquérir une cartographie virtuelle de la perfusion basée sur le délai d'obtention de la fluorescence maximale. Ce délai d'obtention de la fluorescence maximale est inversement corrélé au niveau de perfusion. La cartographie virtuelle peut être superposée en temps réel aux images de coelioscopie afin d'obtenir un effet de réalité augmentée (Fluorescence-based Enhanced Reality (FLER)). Cette analyse dynamique et quantitative assistée par ordinateur est indépendante de la distance entre l'endoscope et la zone d'intérêt : la cartographie virtuelle de la perfusion est créée en moyennant les signaux en une vidéo de 20-40 secondes à une vitesse de 5-25 images par seconde et en attribuant un code couleur basé sur le temps nécessaire pour atteindre l'intensité maximale de chaque pixel. Chaque pixel de la cartographie de la perfusion est une image dynamique (2D + temps de diffusion) représentant une moyenne de plusieurs images (de 100 à 200). Afin de valider expérimentalement le concept, nous avons utilisé des modèles animaux d'hypoperfusion digestive et analysé plusieurs paramètres, morphologiques et fonctionnels, en relation avec l'état métabolique et vasculaire de l'intestin. En particulier : 1) **lactates capillaires** mesurés par un système à bandelettes

(réponse en 45 secondes) au niveau de la séreuse intestinale aux zones d'intérêt identifiées par fluorescence ou par l'appréciation clinique ; 2) **activité de respiration mitochondriale** mesurée par une technique oxygraphique, sur des biopsies intestinales aux mêmes zones d'intérêt ; 3) **métabolites intestinaux** quantifiés par spectroscopie par résonance magnétique, sur les mêmes biopsies et 4) **endomicroscopie confocale par laser (CLE)** pour obtenir des images à échelle microscopique, haute résolution, en temps réel, de la muqueuse intestinale, dans différentes conditions de perfusion.

### **Etapes expérimentales**

#### **1) Evaluation des lactates capillaires comme marqueur de perfusion digestive dans un modèle d'ischémie intestinale par chirurgie ouverte : étude de faisabilité de la résection digestive guidée par le métabolisme.**

La première étape a consisté à valider les marqueurs de perfusion viscérale (lactates capillaires) avant de pouvoir les utiliser pour paramétrer le système à l'étude (FLER).

Matériels et méthodes : six cochons ont été inclus dans cette phase. Un segment ischémique d'environ 4 cm a été créé sur 6 anses digestives par animal (total de 36 anses) par clampage des vaisseaux mésentériques, pour une durée de 1 à 6 heures. Chaque heure, 5 échantillons de sang capillaire sont prélevés par ponction de la séreuse digestive pour mesurer les lactates, utilisant un lecteur portable (EDGE®, Apexbio, Taïwan, République populaire de Chine). Les prélèvements sont effectués suivant l'appréciation clinique au niveau des zones d'intérêt (ROIs) suivantes : centre de la zone ischémique (ROI1), limites de résection proximale et distale (ROI2a-2b) et zones vascularisées (ROI3a-3b). Chaque heure, au niveau des mêmes ROIs, des biopsies sont effectuées. Sur ces biopsies, la respiration mitochondriale est mesurée après 1, 3 et 5 heures d'ischémie et le métabolome intestinal est évalué sur tous les échantillons (total : n=180).

Résultats : le niveau de lactates capillaires était toujours significativement plus élevé au niveau de la ROI1 par rapport aux ROIs 3a-b à tous les temps. Après 1 heure d'ischémie, les lactates au niveau des marges identifiés par inspection clinique étaient statistiquement plus élevés que ceux des zones vascularisées ( $p=0.0095$ ). A partir de 2 heures d'ischémie, il n'existait plus de différence significative entre les lactates des zones 2a-b et 3a-b. La respiration mitochondriale suit une cinétique similaire à celle des lactates. Sept métabolites (lactate, glucose, aspartate, choline, créatine, taurine et tyrosine) ont présenté une évolution significativement différente entre les ROIs.

Conclusions : les lactates capillaires permettent d'estimer de manière précise le niveau de perfusion local [12].

## **2) Evaluation de l'endomicroscopie confocale comme marqueur morphologique de perfusion digestive complétée par une analyse automatisée de la densité des capillaires fonctionnels dans un modèle d'ischémie intestinale par chirurgie ouverte.**

Le but de cette étude était de fournir la preuve du concept suivant lequel la microscopie laser par confocale, utilisant le système Cellvizio® (Mauna Kea Technologies, Paris, France) permet d'analyser le statut morphologique de la perfusion intestinale et d'effectuer une analyse quantitative des capillaires sanguins fonctionnels.

Matériels et méthodes : quatre cochons ont été inclus dans cette étude. Un segment intestinal a été rendu ischémique sur une longueur d'environ 4 cm par clamage des vaisseaux mésentériques. La durée de l'ischémie était de 1 à 4 heures. Après injection de 5 ml de fluorescéine sodique (Fluocyne, SERB, Paris, France), la sonde d'imagerie du système Cellvizio® a été appliquée directement sur la muqueuse digestive à travers des incisions de pleine épaisseur au niveau des zones ischémiques et perfusées. Les séquences vidéo ont été enregistrées.



Résultats : l'évaluation par confocale a permis d'identifier des patterns spécifiques permettant de distinguer des zones selon le degré de perfusion. L'analyse numérique a montré une densité de capillaires fonctionnels significativement plus élevée dans les zones perfusées par rapport aux zones ischémiques : 1 heure ( $0,189 \pm 0,094$  vs.  $0,365 \pm 0,030$  ;  $p=0,0001$ ), 2 heures ( $0,252 \pm 0,056$  vs.  $0,389 \pm 0,024$  ;  $p<0,0001$ ), 3 heures ( $0,252 \pm 0,050$  vs.  $0,353 \pm 0,030$  ;  $p=0,0001$ ) et 4 heures d'ischémie ( $0,262 \pm 0,044$  vs.  $0,358 \pm 0,019$  ;  $p<0,0001$ ).

Conclusions : l'analyse par endomicroscopie confocale permet une discrimination en temps réel entre zones ischémiques et perfusées du point de vue morphologique et par la mesure quantitative des capillaires fonctionnels [13].

### **3) Démonstration du concept de fluorescence couplé à la réalité augmentée (FLER) pour mesurer la perfusion digestive dans le cadre de procédures mini-invasives**

Après avoir testé et calibré le logiciel VR-Perfusion ex vivo et après avoir validé les marqueurs de perfusion in vivo (lactates, respiration mitochondriale et métabolites tissulaires), dans les études pilotes, nous avons testé le système FLER en peropératoire selon une approche mini-invasive.

Matériels et méthodes : Six cochons ont été inclus dans cette étude. Une anse intestinale a été rendue ischémique sur une longueur d'environ 4 cm, par approche laparoscopique. Après avoir injecté le fluorophore (vert d'indocyanine, ICG), l'intestin a été illuminé avec une source de lumière proche infrarouge intégrée dans le laparoscope D-Light P (Karl Storz, Tuttlingen; Allemagne). Le signal de fluorescence de l'ICG a été analysé par le logiciel VR-Perfusion et une cartographie numérique de la perfusion a été générée. Cette cartographie a été superposée aux images peropératoires laparoscopiques, donnant lieu à l'effet FLER (fusion d'images réelles et synthétiques). Cinq ROIs ont été identifiés par FLER (ROI1, 2a-b, 3a-b, correspondant aux zones ischémiques, marginales et vascularisées). Après 1 heure, les lactates

capillaires ont été mesurés au niveau des ROIs et des biopsies intestinales ont été effectuées afin d'évaluer la respiration mitochondriale et de quantifier les métabolites.

Résultats : les lactates capillaires (mmol/l) aux ROIs identifiées par FLER sont  $3,98 \pm 1,91$  (ROI1) vs.  $1,05 \pm 0,46$  (ROI2a-b) ( $p=0,0001$ ) et  $0,74 \pm 0,34$  (ROI3a-b) ( $p=0,0001$ ). Il n'existe pas de différence entre 2a-b et 3a-b. La respiration mitochondriale maximale (pmolO<sub>2</sub>/seconde/mg) était de  $104,4 \pm 21,58$  (ROI 1) vs.  $191,1 \pm 14,48$  (2b,  $P = 0,03$ ) versus  $180,4 \pm 16,71$  (3a,  $P = 0,02$ ) versus  $199,2 \pm 25,21$  (3b,  $P = 0,02$ ). Les métabolites suivants : alanine, choline, éthanolamine, glucose, lactate, myoinositol, phosphocholine, sylloinositol, et valine, ont montré des valeurs de concentration statistiquement différentes entre zones ischémiques et zones perfusées.

Conclusions : La FLER est une technique de navigation peropératoire efficace pour détecter la perfusion digestive et distinguer les zones ischémiques des zones vascularisées [14].

#### **4) Comparaison de l'évaluation clinique de la perfusion digestive avec celle par FLER dans un modèle prolongé d'ischémie digestive par approche laparoscopique.**

Après avoir démontré la faisabilité de la FLER, le point crucial est de montrer : 1) la robustesse du système et 2) la supériorité de l'évaluation numérique par rapport à l'évaluation clinique, surtout en cas d'ischémie de longue durée, lorsque la couleur de la séreuse tourne de manière plus nette vers le bleuté et ainsi la capacité d'évaluation clinique augmente de manière exponentielle.

Matériels et méthodes : six cochons ont été inclus dans cette étude. Un segment ischémique a été créé sur 18 anses digestives (3 par animal). Après 2 (n=6), 4 (n=6) et 6 (n=6) heures d'ischémie, les anses digestives ont été évaluées par appréciation clinique et par FLER pour déterminer les ROIs (1 = ischémique, 2a et 2b = lignes de résection et 3a-3b = zones vascularisées). Les lactates capillaires ont été mesurés pour comparer l'évaluation clinique par rapport à la FLER.

Résultats : les lactates au niveau des lignes de résection (2a-2b) identifiées par la clinique étaient significativement plus élevés que ceux mesurés sur les lignes de résection identifiées par FLER, après 4 heures d'ischémie.

Conclusions : La FLER est capable d'identifier avec précision le niveau de perfusion digestive avec des performances supérieures par rapport à l'évaluation clinique [15].

### **5) Validation de la précision de la FLER vs. l'évaluation clinique dans un modèle laparoscopique d'ischémie du côlon sigmoïde, en utilisant l'endomicroscopie confocale pour identifier les changements morphologiques de la muqueuse aux endroits identifiés par FLER**

La FLER évalue le niveau de perfusion de l'intestin uniquement du côté de la séreuse. Par conséquent, il est intéressant de vérifier les modifications morphologiques au niveau de la muqueuse dans des conditions d'hypoperfusion.

Matériels et méthodes : six cochons ont été inclus dans cette étude. Un segment ischémique a été créé sur le côlon sigmoïde. Après 1 heure d'ischémie, les lignes de résection ont été évaluées par FLER et par appréciation clinique. Ensuite, après injection de fluorescéine, les ROIs identifiées (1 = ischémique, 2a et 2b = lignes de résection et 3a-3b = zones vascularisées) par FLER et par la clinique ont été évaluées par endomicroscopie confocale.

Résultats : l'analyse par confocale a mis en évidence des altérations précoces de la muqueuse intestinale permettant d'identifier la transition entre la zone ischémique et la zone perfusée. Cette transition avait été mieux identifiée par FLER que par l'évaluation clinique.

Conclusions : la FLER et l'endomicroscopie confocale sont plus précises que l'évaluation clinique pour déterminer la vascularisation de l'intestin [16].

## **6) Estimation de la précision de la FLER dans un modèle de résection digestive et d'anastomose avec survie où les anastomoses avaient été créées à différents niveaux de perfusion**

Cette étude visait à montrer le niveau de précision de l'analyse numérique de la perfusion sur des anastomoses digestives effectuées à 25 % vs. 75 % de perfusion. Les résultats biochimiques et histopathologiques ont montré que la FLER est précise et que la technique de navigation en temps réel doit être appliquée et validée chez l'homme [17].

## **7) Développement d'un système permettant la fusion de la cartographie de perfusion virtuelle sur les organes en mouvement.**

La précision de la FLER dépend d'un parfait alignement entre les images synthétiques et les images réelles. Les mouvements respiratoires, le péristaltisme et la manipulation chirurgicale peuvent altérer l'anatomie ponctuellement, et par conséquent, altérer la précision de la FLER. Nous avons développé un algorithme d'identification et un suivi d'image permettant une fusion automatique et un suivi de l'image synthétique lors des mouvements. Le résultat qui en découle est un enregistrement parfait en temps réel [18].

## **Conclusions**

Nous avons développé et validé un système innovant et précis d'évaluation de la perfusion digestive en temps réel sur le modèle animal. La précision du système a été évaluée en utilisant des marqueurs indirects fiables, tels que le dosage des lactates capillaires, le taux de respiration des mitochondries et l'empreinte métabolomique de l'ischémie. Un transfert clinique est imminent puisque le protocole clinique a été approuvé par la CPP le 30 octobre 2015.

# **INTRODUCTION GENERALE**

**(Partie en Français)**

## 1. La chirurgie de précision

Le concept émergent de « médecine de précision » repose sur l'utilisation des sciences informatiques : les ordinateurs, de plus en plus puissants et dotés d'intelligence artificielle, peuvent être instruits grâce à l'analyse d'une multitude de données-patients organisées et stockées numériquement (big data) et ainsi fournir des algorithmes de diagnostic et de traitement automatisés. Les données nécessaires à la médecine de précision sont issues de la génétique et de la biologie moléculaire, comme les « omics » (génomique, protéomique, métabolomique), mais aussi de l'imagerie médicale [19], permettant de concevoir des produits, des dispositifs et même des techniques, suivant une approche bio-informatique, assistée par ordinateur et allant au-delà de la médecine personnalisée.

La chirurgie moderne suit cette même transformation conceptuelle visant la « précision », à tout stade du processus décisionnel de la prise en charge du malade. Inspirée par le modèle de prévention de l'erreur et de la gestion des risques mis en œuvre dans le monde de l'aéronautique, la chirurgie moderne s'est aussi appropriée des outils bioniques, informatiques et robotiques, permettant de rehausser la sécurité, l'efficacité et la précision du geste chirurgical, voire de faciliter l'exécution du geste à travers une approche toujours moins invasive.

Aujourd'hui, les chirurgiens peuvent s'entraîner au simulateur avant toute intervention chirurgicale, à l'instar des pilotes d'avion, et planifier le geste chirurgical comme un plan de vol. Pendant l'intervention, le chirurgien, tout comme le pilote, est constamment assisté par l'ordinateur et par des systèmes de navigation sophistiqués. Il peut compter sur l'assistance des logiciels de traitement de l'image du patient pouvant ainsi guider la procédure chirurgicale [20]. Les sciences bioniques peuvent perfectionner les habilités humaines afin d'obtenir un « chirurgien augmenté et connecté » brisant les frontières entre le corps et l'environnement. Un nouveau concept de « cyber chirurgie » est en train de prendre forme, dont l'étape courante se construit sur l'intégration « chirurgien-machine », visant à l'augmentation des fonctions, l'œil et la main, les plus essentielles lors de l'exécution du geste chirurgical [21].

La main augmentée du chirurgien est représentée par le télémanipulateur robotique [22]. En 2016, le système da Vinci® (Intuitive Surgical, Inc., Sunnyvale, CA) représente la principale plateforme d'assistance robotique disponible sur le marché. Le chirurgien est assis à la console de commande et observe le champ opératoire à travers un viseur stéréoscopique 3D et augmenté de 10x. Les mouvements exécutés par l'opérateur manipulant l'interface haptique sont élaborés et reproduits en temps réel, permettant une manipulation précise des tissus avec suppression des tremblements physiologiques.

L'œil chirurgical augmenté renvoie au concept de chirurgie assistée par imagerie médicale [23]. L'imagerie médicale présente aujourd'hui une grande variété de technologies différentes (le scanner, la résonance magnétique, la tomographie à émission de positrons ou PET-scan, l'échographie et les techniques de visualisation optique), ayant atteint un degré remarquable de perfectionnement au cours des 10 dernières années et permettant ainsi d'obtenir des images toujours plus détaillées du corps humain [24].

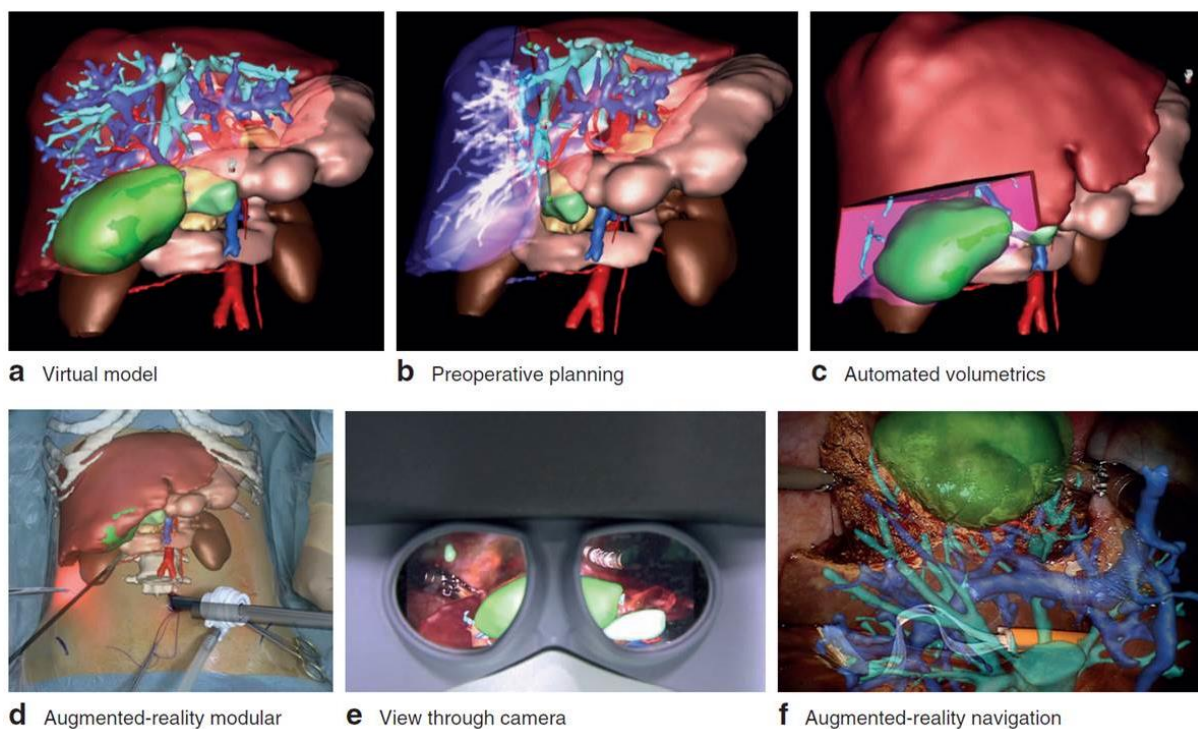
L'Institut Hospitalo-Universitaire de Strasbourg (IHU-Strasbourg), institut de chirurgie guidée par l'image, est un centre de recherche translationnelle entièrement dédié au développement de l'œil chirurgical augmenté, plus précisément autour de 3 axes d'optimisation de la navigation chirurgicale : vision par transparence, vision microscopique et vision de l'invisible.

### **1.1 L'œil augmenté I (voir par transparence) : chirurgie assistée par la Réalité Augmentée**

La Réalité Augmentée (RA) en chirurgie est une technique de navigation basée sur la synthèse en temps réel d'images issues directement du patient, capturées par la caméra lors d'une intervention chirurgicale et d'images virtuelles du même patient, reconstruites à partir de l'imagerie médicale [25], à l'aide de logiciels dédiés. En particulier, l'équipe du Professeur Luc Soler à l'IRCAD a conçu un logiciel (VR RENDER, IRCAD, France), permettant une reconstruction 3D de manière semi-automatique avec une précision submillimétrique. La modélisation du clone virtuel du patient à partir d'une imagerie médicale (Scanner ou

Résonance Magnétique) est l'outil de base permettant d'obtenir une RA. Le modèle virtuel 3D est la copie conforme du patient, permettant une navigation à l'intérieur du corps ainsi que l'identification des structures anatomiques et pathologiques [26, 27]. Sur ce modèle, le chirurgien peut « planifier l'intervention », repérer les plans de dissection, estimer la meilleure voie d'abord et même évaluer les effets de sa stratégie chirurgicale, par exemple en plaçant virtuellement des clips sur des vaisseaux sanguins ; le logiciel permet d'afficher l'étendue de la vascularisation.

La RA permet de voir des structures cachées (vaisseaux, ganglions, etc.) en « transparence virtuelle et modulable » durant l'opération (**Figure 1**).



*Figure 1 a) clone du patient obtenu par reconstruction 3D des images radiologiques (CT). B) le chirurgien peut effectuer sur le modèle virtuel du patient la planification opératoire et identifier la vascularisation du foie abritant la tumeur. C) Le logiciel calcule la volumétrie du foie restant et les marges de résection. D) Superposition du modèle virtuel sur le patient pour voir en transparence et positionner les accès chirurgicaux de manière stratégique. E) Vision à travers le viseur du robot du clone virtuel superposé à l'image réelle. F) Réalité Augmentée de la phase finale de résection [21].*



Le concept avait été validé pour la première fois à l'IRCAD par notre groupe de recherche. La RA avait permis d'identifier les structures vasculaires lors d'une surrénalectomie laparoscopique, de manière tout à fait efficace [28]. L'utilisation de la RA a été élargie à multiples indications tant en chirurgie laparoscopique que dans des techniques de radiologie interventionnelle grâce à l'habileté de la RA de « voir » à travers la peau la position des organes cibles [26, 29].

La limitation majeure de la RA en chirurgie digestive avec les technologies actuelles reste la capacité de déformer en temps réel le modèle virtuel, pour qu'il puisse être toujours en phase (enregistré) avec les images réelles, lors des mouvements respiratoires et lors de la manipulation chirurgicale. Cette problématique du recalage non-rigide et basé sur les données des propriétés biomécaniques des tissus est l'un des axes principaux de recherche de l'IRCAD-IHU.

## **1.2 L'œil augmenté II (voir le microscopique) : chirurgie assistée par la vision microscopique en temps réel**

La possibilité d'effectuer un examen microscopique en peropératoire en temps réel représente une avancée majeure, surtout dans la chirurgie oncologique, pour pouvoir déterminer avec rapidité la précision des marges de résection. Bien qu'encore en phase d'étude, l'endomicroscopie laser confocale (CLE) constitue une technologie d'augmentation de la vision du chirurgien et possède un potentiel énorme. Le système Cellvizio® est une modalité d'imagerie microscopique laser à haute résolution « confocale », dotée d'une capacité à sélectionner la profondeur du point focal. Ceci permet une meilleure visualisation comparée à la microscopie standard, du moment que les images sont reconstruites en 3D à travers un algorithme *ad hoc* permettant l'évaluation de surfaces irrégulières avec des points focaux différents. De surcroît, il permet une évaluation en temps réel et une cinématographie de l'analyse par balayages successifs. La sonde laser du Cellvizio® est conçue pour être introduite dans les endoscopes flexibles. La CLE pourrait devenir un outil indispensable d'aide à la

décision peropératoire, surtout en combinaison avec des logiciels permettant un « diagnostic pathologique automatisé ».

### **1.3 L'œil augmenté III (voir l'invisible) : Chirurgie assistée par la fluorescence**

Le concept de chirurgie guidée par la fluorescence (Fluorescence Imaging Guided Surgery = FIGS) est un artifice supplémentaire pour améliorer les performances et la sécurité du geste opératoire. Grâce au développement de laparoscopes/endoscopes avec des sources de lumière émettant des fréquences infrarouges, il est possible de visualiser des structures anatomiques (vaisseaux, uretères, voies biliaires, etc.) par le biais de l'intensité lumineuse de substances (fluorescéine, bleu de méthylène, vert d'indocyanine) qui sont injectées au patient. Les applications possibles faisant l'objet d'études à l'IRCAD-IHU sont multiples. Par rapport à d'autres méthodes, la fluorescence présente des avantages particuliers, faisant de cette dernière une modalité de choix pour la navigation chirurgicale. L'analyse du signal de fluorescence permet non seulement une visualisation anatomique mais aussi une analyse des processus fonctionnels, tels que la perfusion d'organe. Dans cette thèse, nous avons utilisé une approche combinée, faisant levier sur les différentes techniques de visualisation présentées, pour évaluer la perfusion digestive de manière précise et quantitative, afin de pouvoir guider le chirurgien pendant la résection intestinale et la reconstruction (anastomose) suivante et de réduire ainsi le risque de complications anastomotiques [30].

## 2. L'anastomose digestive

### 2.1 Définition

Le terme « anastomose » désigne la connexion entre deux organes ou structures ou espaces. L'anastomose digestive chirurgicale est la connexion entre deux segments du tractus gastro-intestinal qui est réalisé soit pour rétablir la continuité après ablation d'un segment intermédiaire abritant, par exemple, une tumeur, soit pour réaliser des courts-circuits du passage des aliments, afin d'induire une réduction de l'absorption des nutriments et une perte de poids et une amélioration du profil métabolique (chirurgie de l'obésité : bypass gastrique).

La paroi intestinale du côlon se compose de quatre couches, dénommées respectivement de l'intérieur vers l'extérieur : muqueuse, sous-muqueuse, musculuse et séreuse. Chaque fois qu'une résection est effectuée, toutes ces couches sont coupées et une anastomose peut être réalisée, en utilisant plusieurs techniques. De nombreuses techniques ont été développées pour réaliser des anastomoses digestives : la suture manuelle, la suture par agrafeuse mécanique avec agrafes métalliques, l'anastomose par compression, l'anastomose avec colles biologiques et bien d'autres [31, 32]. La suture manuelle et la suture par agrafes sont les 2 techniques les plus répandues dans la pratique quotidienne.

La **Figure 2** montre une anastomose colorectale réalisée après ablation du côlon sigmoïde pour traiter une maladie diverticulaire, par technique mini-invasive, en utilisant l'agrafeuse mécanique.

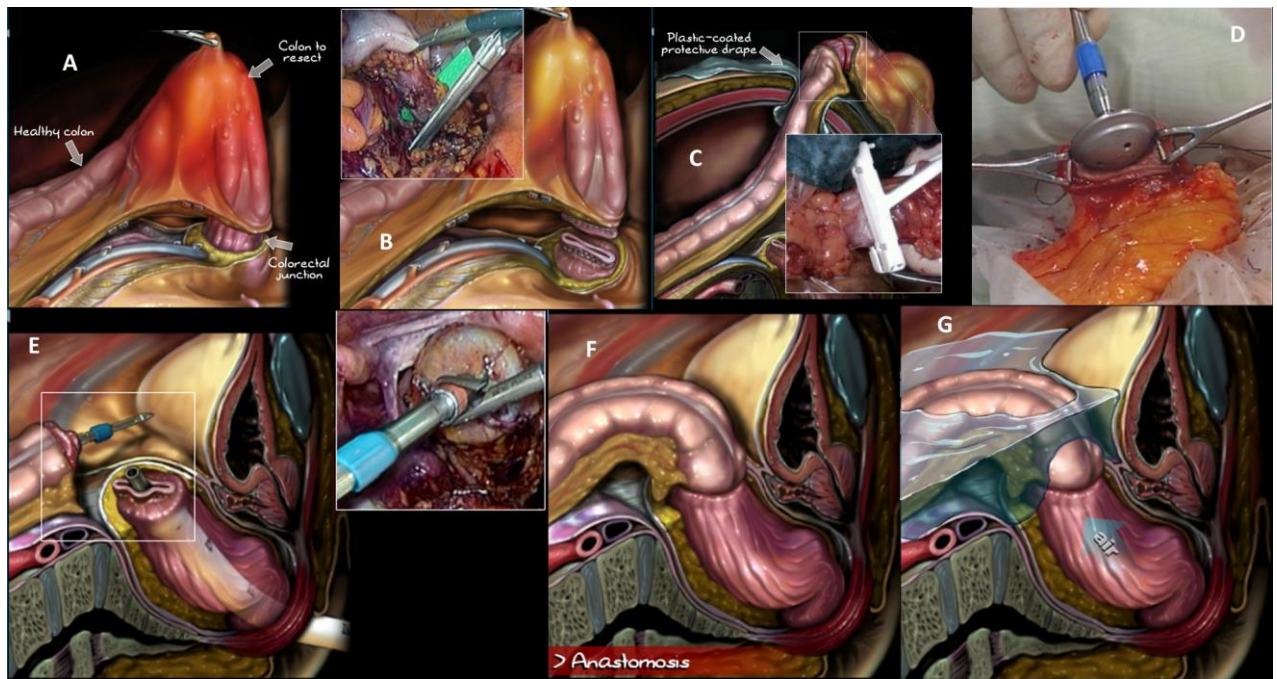


Figure 2 A) le côlon sigmoïde est exposé après avoir abordé l'artère mésentérique inférieure. B) le moignon distal est réséqué à l'aide d'une agrafeuse mécanique linéaire. C) le moignon est extériorisé et la partie malade est réséquée au site proximal. D) l'enclume de l'agrafeuse linéaire est introduit dans la partie proximale. D) le côlon est réintroduit dans la cavité abdominale et F) l'anastomose avec l'agrafeuse circulaire, introduite dans le rectum, est réalisée. G) Test de fuite à l'air.

## 2.2 Le mécanisme de guérison des anastomoses digestives

Le processus de guérison « normale » de l'anastomose digestive n'a pas été complètement éclairci et plusieurs questions restent ouvertes dans la compréhension physiopathologique [33]. Par simplification, la guérison d'une anastomose a été comparée à celle du tissu cutané et suivant les mêmes phases de réparation [34], contrôlées par une cascade de cytokines et de facteurs de croissance : hémostase (I), inflammation (II), prolifération (III) et remodelage (IV). De manière extrêmement schématique, la phase I est surtout une réponse hémostatique, avec formation d'une matrice de fibrine et fibronectine, ayant pour rôle d'assurer l'étanchéité des extrémités jointes de l'intestin (moignons anastomotiques). Ensuite, la phase II est caractérisée par l'infiltration du site anastomotique par les cellules de l'inflammation au niveau de la sous-muqueuse avec destruction du collagène préexistant de la part de protéinases (comme les métalloprotéinases matricielles, MMP). A partir du 3e jour, la matrice provisoire est convertie

graduellement en tissu de granulation, contenant des néo-vaisseaux, des fibroblastes et des macrophages. La synthèse de collagène atteint son pic vers le 7<sup>e</sup> jour. Pour que ce processus, en réalité très complexe et nécessitant beaucoup de ressources énergétiques, soit réalisé correctement, il est nécessaire que le site anastomotique soit suffisamment bien perfusé.

### 2.3 Complications anastomotiques

Suite à une altération du processus de guérison, les anastomoses digestives peuvent être compliquées par des sténoses, à savoir une réduction de la lumière du tube digestif, et/ou par des lâchages. Le lâchage de l'anastomose est l'une des complications postopératoires la plus délétère en termes de morbidité et mortalité [35].

Il est important de signaler que la définition de lâchage anastomotique en littérature a longtemps été l'objet de discussion et il n'existe pas de véritable consensus terminologique : en 2001, Bruce et coll. avaient trouvé un total de 56 définitions différentes de lâchage anastomotique après chirurgie digestive [36]. Les définitions de lâchage peuvent être basées sur des paramètres à la fois radiologiques et/ou cliniques et/ou biologiques. Une standardisation de la terminologie sur la base de critères purement interventionnels, à savoir sur les traitements dont ont bénéficié les patients présentant un lâchage, semble un bon moyen pour stratifier les complications, ce qui permettra de disposer d'un langage commun pour identifier les facteurs de risque [37]. De manière générale, le lâchage d'une anastomose est une désunion, un défaut de l'intégrité de l'anastomose, permettant une communication intraluminaire et extraluminaire des compartiments.

La fréquence du lâchage anastomotique varie en fonction du site considéré et se situe entre 1 et 24 % [37-40] pour les anastomoses colorectales pouvant atteindre jusqu'à 35 % en cas d'anastomose œsogastrique après œsophagectomie [41]. Nous nous concentrerons particulièrement sur les anastomoses grêles et colorectales, mais les mêmes principes s'appliquent aux anastomoses des voies digestives supérieures. Un grand nombre de facteurs

de risque à l'origine des lâchages anastomotiques ont été évoqués : un mauvais état nutritionnel [42], l'immunosuppression, la chimiothérapie préopératoire [43, 44], la consommation de tabac, l'obésité [42] et la technique chirurgicale également [31].

Plusieurs auteurs ont montré que l'anastomose par agrafage mécanique guérit par première intention avec une réponse inflammatoire minime, voire inexistante, par rapport à l'anastomose manuelle [45, 46]. Concernant le taux de lâchage et de sténose, les connaissances actuelles sont insuffisantes pour affirmer la supériorité d'une technique par rapport à l'autre [47]. Néanmoins, une étude toute récente [42], menée sur un grand nombre de patients, a identifié l'anastomose par agrafage mécanique comme un facteur de risque.

En effet, si on considère les facteurs énumérés, on peut retrouver un élément commun ayant un rôle fondamental dans le processus de guérison de l'anastomose : la perfusion des moignons impliqués dans la construction de l'anastomose [30]. Il est donc impératif que la perfusion digestive soit correctement évaluée au cours de l'acte chirurgical.

#### 2.4 Techniques pour l'évaluation peropératoire de la perfusion intestinale

L'évaluation clinique de la part du chirurgien de la microperfusion et de la viabilité intestinale n'est pas fiable [3] et, étant donnée l'importance d'une estimation précise de ce paramètre en temps réel durant l'intervention chirurgicale, un grand nombre de techniques ont été développé. Dans un éditorial de 2011, Urbanivicius a commenté sur 14 techniques développées afin de quantifier le flux sanguin intestinal ou l'oxygénation et ainsi d'évaluer la viabilité intestinale en peropératoire [3]. Néanmoins, la plupart de ces techniques ne sont utilisées que comme outils de recherche et/ou sont relativement coûteuses et/ou longues, voire dépendent de l'opérateur. Le Tableau 1 présente une sélection des techniques les plus pertinentes pour l'usage clinique, parmi celle existantes.

**Tableau 1 Sélection de techniques pour la mesure peropératoire de la perfusion et viabilité intestinale (adapté de Urbanivicius)**

Technique	Mesure	Pros	Cons
Laser Doppler Flowmetry	Flux sanguin et SpO <sub>2</sub>	Précision acceptable	Long Contact avec le tissu Flux pulsatile indispensable Opérateur dépendante
Near infra-Red Spectroscopy	StO <sub>2</sub>	Pas de flux pulsatile nécessaire Peut imager des grands échantillons	Long Contact avec le tissu
Visible Light Spectroscopy	StO <sub>2</sub>	Pas de flux pulsatile nécessaire Pas de contact avec le tissu	Petits échantillons
Fluorescence Videography	Unité de fluorescence	Pas de contact avec le tissu Peut images des grands échantillons Rapide Facile	Injection de produits fluorescents <ul style="list-style-type: none"> <li>• Fluorescéine</li> <li>• Indocyanine Green</li> <li>• Etc...</li> </ul>

De toute évidence, la vidéographie par fluorescence, avec injection d'agents de contraste fluorescents est la technique qui présente les caractéristiques les plus adaptées à un usage en temps réel en salle d'opération pour évaluer la perfusion. Cette technique est rapide et facile à mettre en œuvre. Le matériel n'est pas encombrant et les résultats sont précis et obtenus en temps réel.

Dans le chapitre suivant, un état de l'art sur la chirurgie guidée par la fluorescence est brièvement présenté, avec une attention particulière portant sur les applications cliniques en chirurgie digestive, dans lesquelles se spécialise l'IRCAD-IHU de Strasbourg et en particulier la perfusion viscérale, qui est le sujet principal de cette thèse.

### 3. LA CHIRURGIE GUIDÉE PAR LA FLUORESCENCE: état de l'art

#### 3.1 Définition et principes de base

Le terme **chirurgie guidée par la fluorescence (FIGS)** désigne une technique d'imagerie médicale en temps réel, ayant pour but de guider le chirurgien au cours de l'acte opératoire [48], en exploitant le phénomène optique. De manière simplifiée, la fluorescence est caractérisée par une émission lumineuse de la part d'une molécule (le fluorophore) après avoir été excitée par absorption d'un photon d'énergie. En d'autres termes, le fluorophore (agent de contraste fluorescent) absorbe l'énergie lumineuse (excitation) et passe dans un état électroniquement excité. Le fluorophore passe ensuite à l'état initial par l'émission d'un photon. Cette émission de lumière après excitation peut être de la même longueur d'onde que celle de l'excitation, plus petite ou plus grande. La magnitude du déplacement du signal d'émission dans le spectre est corrélée à la capacité de détection de la fluorescence. Bien que le phénomène concerne tout le spectre électromagnétique, pour la FIGS, nous nous référons à la fluorescence dans le spectre du visible (spectre optique) dans des longueurs d'onde proche infrarouge (Near-Infrared). Le schéma de base de la FIGS inclut l'utilisation de **(Figure 3)** :

- 1) Un agent de contraste fluorescent, administré au patient
- 2) Une source de lumière laser
- 3) Une caméra dotée d'un filtre



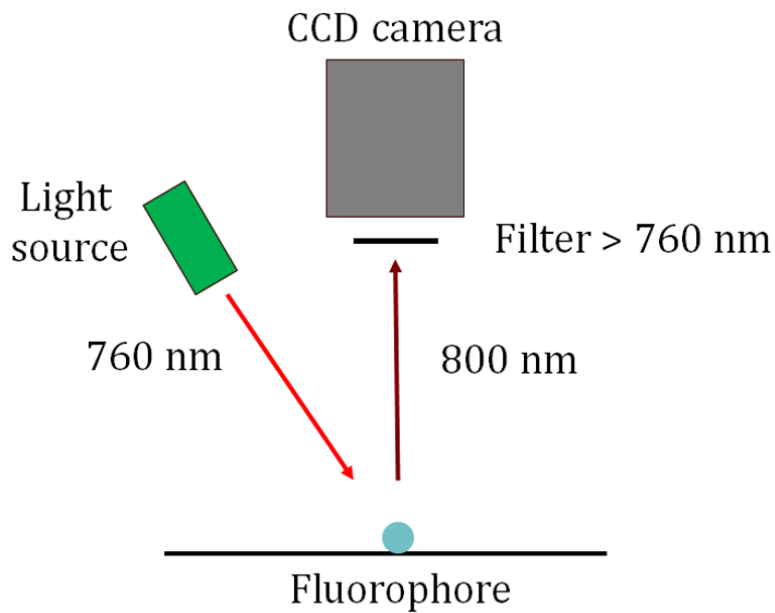


Figure 3. Schéma de base pour obtenir la FIGS

La fluorescence du fluorophore permet la mise en évidence des structures anatomiques invisibles à l'œil nu, voire des processus métaboliques, tels que la perfusion d'organe.

Le signal fluorescent peut être visualisé directement dans le champ opératoire, en cas de chirurgie ouverte ou peut être capturé par une caméra spécifique et affiché sur un écran, lors de procédures mini-invasives.

À l'heure actuelle, la FIGS est le système de navigation le mieux adapté aux besoins de la chirurgie [49] sous réserve que :

- 1) l'information visuelle soit fournie en temps réel ;
- 2) les dispositifs d'imagerie présentent un encombrement minime ;
- 3) le « workflow » chirurgical soit respecté ;
- 4) les coûts soient réduits.

**Tableau 2. Propriétés des différents systèmes d'imagerie**

Technique	Resolution	Penetration	Time	Cost	Agents
MRI	10-100 $\mu$	unlimited	min-hr	€€€	Paramagnetic chelates...
CT	50 $\mu$	unlimited	sec-min	€€	Iodinated molecules
US	50 $\mu$	cm	sec-min	€€	Microbubbles
PET	1-2mm	unlimited	min-hr	€€€	<sup>18</sup> F-labelled compounds...
SPECT	1-2mm	unlimited	min-hr	€€	<sup>99</sup> Tc-labelled compounds...
<b>FLUO</b>	<b>2-3mm</b>	<b>&lt;1cm</b>	<b>msec</b>	<b>€</b>	<b>Fluorochromes, Photoproteins</b>

Adapté de Nguyen et coll. [49].

### 3.2 Fluorophores

Il existe une grande variété de fluorophores, déjà disponibles ou en voie de développement, pouvant être caractérisés par les spectres d'excitation et d'émission et pouvant être globalement classifiés en non-ciblés et ciblés [49]. Dans la pratique courante, les fluorophores non-ciblés sont les plus communs. Seul un nombre limité d'études cliniques ont été menées en utilisant des agents ciblés ; ci-après, la liste des fluorophores les plus importants.

En règle générale, le choix du fluorophore doit tenir compte des facteurs suivants : 1) dosage, 2) temps entre l'administration et la visualisation, 3) pharmacodynamique et 4) voie d'administration (systémique vs. locale).

#### 3.2.1 Agents non-ciblés

**Vert d'indocyanine (IndoCyanine Green = ICG)** : fluorophore non-ciblé le plus utilisé. L'ICG a été utilisé depuis les années 1950 et il est approuvé pour : 1) la mesure de la fonction hépatique, 2) la mesure de la fonction cardiaque et 3) pour l'angiographie oculaire. En France, l'utilisation de l'ICG pour faire de l'imagerie est, encore en 2016, considérée comme hors

AMM (autorisation de mise sur le marché), ce qui peut se traduire par « OFF-LABEL » en anglais. La longueur d'onde d'émission de l'ICG est de 820 nm [50] (**Figure 4**). Il s'agit d'une molécule très sûre, avec un risque d'effet secondaire correspondant à environ 1/60 000 injections et les réactions sont rarement sévères [51]. Les propriétés pharmacodynamiques de l'ICG sont bien connues (<http://www.drugs.com/pro/indocyanine-green.html>) : l'ICG est extrait de la circulation sanguine par le foie à travers un mécanisme énergie-dépendant principalement, mais pas exclusivement, par les transporteurs OATP (organic anion-transporting polypeptide) B1 et B3 et il est très rapidement excrété dans la bile par les transporteurs Multidrug Resistance-associated Proteins MDR3, MRP3 et MRP2, sans excrétion dans les urines.

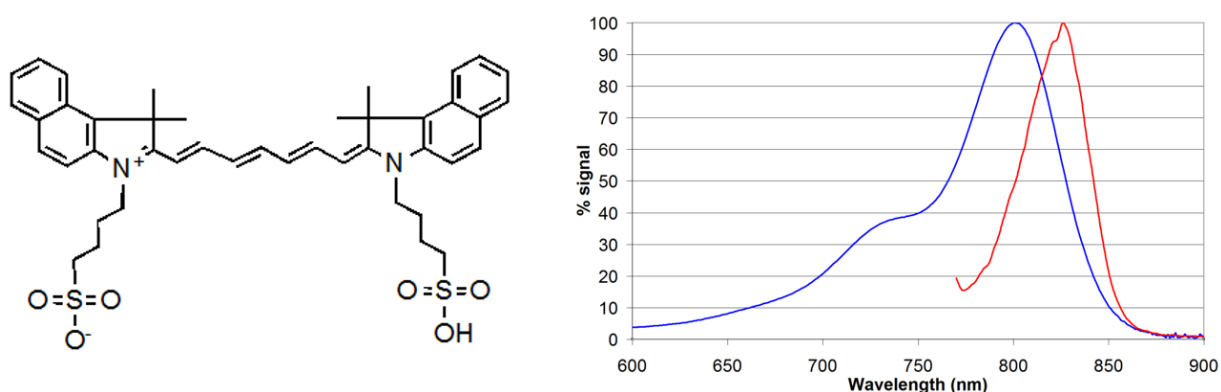


Figure 4. Formule, spectre d'excitation et émission du vert d'indocyanine et systèmes de transporteurs : le vert d'indocyanine est une tricarbocyanine soluble dans l'eau avec un pic spectral d'absorption à 800 nm.

**Bleu de méthylène (MB)** : le MB présente des propriétés de fluorescence bien inférieures à celles de l'ICG, exprimant un plus bas rendement quantique (rapport entre le nombre de photo-électrons libérés dans l'effet photo-électrique interne et le nombre de photons incidents). La longueur d'émission du MB est de 680 nm. Le MB est en partie excrété dans les urines, et pour cette raison, il peut être utile dans la visualisation des uretères [52]. Il est actuellement à l'étude

pour une application intraluminale dans le tractus gastro-intestinal pour évaluer l'intégrité et la perfusion [53].

**Fluorescéine sodique (SF)** : approuvée par la FDA et l'EMA pour applications en ophtalmologie (angiographie et angioscopie de la rétine et de l'iris), elle est utilisée en recherche comme produit de contraste fluorescent dans de multiples applications [54]. La SF est le fluorophore indispensable pour obtenir des images avec l'endomicroscopie laser confocale (CLE). Sa longueur d'émission est de 520 nm.

**Acide 5 aminolévulinique (5-ALA)** : il s'agit d'un fluorophore bio-activé, c.-à-d. qu'une réaction enzymatique *in vivo* rend le substrat fluorescent. Le 5-ALA est surtout utilisé pour la FIGS en neurochirurgie, en particulier dans l'ablation guidée des gliomes malins. De plus, le 5-ALA a été utilisé avec succès dans la détection des cancers de la vessie (90 %) [55] et tout dernièrement dans la détection des cancers du côlon et du rectum [56]. Le mécanisme d'accumulation sélective dans les tumeurs n'est pas connu. Sa longueur d'émission est de 635 nm.

### 3.2.2 Agents ciblés

Les agents ciblés sont construits de manière à pouvoir se conjuguer à des sites (ligands) spécifiques permettant la visualisation univoque d'un tissu/structure cible, où tel ligand est hyper-exprimé.

Les agents ciblés développés actuellement ont pour but de visualiser des cellules cancéreuses pour permettre : 1) de détecter la tumeur en stade très précoce et 2) de vérifier que la tumeur ait été réséquée de manière complète.

Parmi les agents fluorescents ciblés développés, on peut dénombrer les cibles suivantes : Anti-CA19-9 [57], Anti-CEA [58], Anti-EPCAM [59], Anti-PSMA [60], Anti-EGFR [61].

Les nanoparticules peuvent offrir une opportunité intéressante dans le développement d'agents ciblés, grâce à la modularité de leur composition. Toutefois, une barrière réglementaire importante se dresse vers ce type d'approche, compte tenu des temps extrêmement longs pour obtenir l'autorisation à la translation clinique de ces agents [62].

### 3.3 Aspects réglementaires

La réglementation constitue un obstacle important au développement de la FIGS. Les 3 molécules non-ciblées principales (ICG, MB et fluorescéine) ne sont pas encore autorisées pour faire de l'imagerie chirurgicale. Le cas de l'ICG est un peu particulier. La firme *Intuitive Surgical* a intégré dans son système d'assistance chirurgicale robotique (da Vinci ®) un système d'imagerie par fluorescence (le « Firefly », développé par Novadaq). Le dispositif Firefly est présenté en qualité de kit, comprenant l'usage de l'ICG et un document nécessaire à l'approbation du dispositif, dénommé 510k, a été rempli en 2011 et approuvé par la FDA, même si l'ICG tout seul n'est pas approuvé. Probablement, la présentation sous forme de kit, comprenant ces fluorophores déjà utilisés dans d'autres applications, sera la voie privilégiée qui sera suivie par d'autres producteurs de dispositifs d'imagerie.

En France, l'ICG est autorisé pour mesurer la fonction hépatique et cardiaque et pour des applications en ophtalmologie, sous une forme chimique différente, l'infracyanine (Laboratoires SERB).

Les firmes pharmaceutiques produisant les agents de contraste ne sont probablement pas encore disposées à se lancer dans le marché de la FIGS. Cela pourrait s'expliquer par les considérations suivantes :

- L'absence d'un marché bien défini pour la FIGS ;
- Les coûts et les difficultés administratives pour obtenir l'approbation par les organismes compétents (FDA aux Etats-Unis et la Haute Autorité de Santé en France), tandis que les chirurgiens continuent à utiliser les agents « off-label ».

- Les coûts et la longueur des procédures pour conduire une nouvelle entité chimique vers la pratique clinique (minimum 5 ans) [48].

Néanmoins, l'intérêt grandissant autour de la FIGS et le nombre croissant d'essais cliniques en cours pourraient jouer un rôle de levier sur la réglementation permettant une mise en place plus rapide de la FIGS, lorsqu'une quantité suffisante de données sur les critères d'efficacité et de sûreté sera obtenue.

### **3.4 Les dispositifs actuellement disponibles pour la FIGS**

L'imagerie optique par fluorescence profite de la pénétration en profondeur dans les tissus de photons de lumière dans le spectre du proche infrarouge. Cela permet de fournir une imagerie rapide et relativement peu coûteuse des agents de contraste endogènes et/ou exogènes qui émettent une fluorescence comprise entre 700 et 900 nm. La limite de pénétration avec les technologies actuelles est limitée à environ 1 cm [63]. Le système d'imagerie par fluorescence typique a été décrit en détails dans diverses publications [64-66]. En résumé, il est constitué d'une source de lumière (source à large bande filtrée, diode électroluminescente [LED], ou diode laser) excitant un fluorophore. La lumière émise par ce fluorophore est ensuite capturée par une caméra à couplage de charge (CCD), avec un filtre pour couper la lumière d'excitation. Les différents paramètres du design du dispositif (champ de vision, source de lumière, longueur d'onde, etc.), auront tous un impact sur les performances et, en particulier, sur le ratio signal/bruit [48]. Par exemple, un champ de vision réglable constitue le prérequis fondamental pour une navigation chirurgicale efficace et peut être accompli en utilisant le zoom ou des lentilles de grossissement fixes. En général, le champ de vision doit être d'au moins 10 cm et de préférence 20 cm de diamètre pour la plupart des applications chirurgicales. Il faut noter que la puissance de la source de lumière doit être progressivement plus élevée au fur et à mesure que la taille du champ de vision s'élargit. De plus, le grossissement visant à atteindre un champ de vision minimum réduit la résolution finale, si la caméra CCD présente un nombre fini de

pixels. Parmi les différentes technologies susceptibles d'exciter les fluorophores dans le proche infrarouge, on peut énumérer : 1) les sources à bande large filtrée, 2) les LED et 3) les diodes laser [48].

Un nombre croissant d'entreprises ou de groupes de recherche académique développent aujourd'hui des systèmes pour la FIGS (ci-après, liste non-exhaustive des acteurs principaux, autant de systèmes adaptés à la chirurgie conventionnelle « ouverte », que destinés à la chirurgie mini-invasive). Les différents systèmes se différencient par rapport à plusieurs caractéristiques, notamment : 1) le type de source d'excitation (laser, LED), 2) le système de détection du signal, 3) la longueur d'onde d'exercice, 4) la distance de travail optimale, 5) la possibilité de superposer les images en lumière blanche à l'imagerie par fluorescence infrarouge, afin d'obtenir une sorte de réalité augmentée. Le Tableau 2 décrit les caractéristiques principales des systèmes d'imagerie pour la FIGS qui sont plus importants aujourd'hui. Par la suite, les différents systèmes sont décrits avec une sélection d'images peropératoires, permettant d'en apprécier les caractéristiques.

**Tableau 3. Synopsis des principaux systèmes d'imagerie par fluorescence disponibles ou en cours de développement**

Entreprise ou groupe de recherche	Système	Source d'excitation	Longueur d'onde (nm)	Détection du signal	Vision en superposition (Lumière blanche et proche infrarouge)	Chirurgie Mini-invasive (cœlioscopie)	Disponible dans le commerce
Hamamatsu	PhotoDynamic Eye (PDE)	LED	805	CCD à 8 bit	No	No	Oui
Mizuho Medical	HyperEye	LED	760	CCD avec filtre interne	Oui	No	Oui
Fluoptics	Fluobeam	Laser	680 or 780	CCD à 12 bit	No	No	Oui
Novadaq Technologies	SPY Pinpoint Firefly	Laser	806	CCD vidéo à 8 bit	Oui (Pinpoint et Firefly)	Oui (Pinpoint et Firefly)	Oui
Karl Storz	D-Light P	Laser	800	Filtre interne	No	Oui	Oui
Quest Medical Imaging	Artemis	Laser	400 à 1000	CCD avec prisme interne	Oui	Oui	Oui
Frangioni J (FLARE Foundation)	FLARE	LED	745-779	3 caméras CCD à 12 bit	Oui	No	Oui
Gioux S (Beth Israel Deaconesses Medical Center)	FLUOSTIC	Diode Laser	740	CCD à 10 bit	Oui	Oui	No
Nziachristos V (Institute for Biological & Medicinal Imaging)	SurgOptix	Laser	750	3 caméras CCD à 12 bit	Oui	Oui	No

**Hamamatsu Photonics** est un fabricant japonais produisant le **Photodynamic Eye (PDE)** [67], un appareil optimisé pour la FIGS, portable, en échelle de gris, approuvé pour la chirurgie plastique, l'oncologie, la perfusion périphérique et la chirurgie viscérale : **Figure 5**

<http://www.hamamatsu.com/jp/en/C9830.html>

**Mizuho Medical Co** est un autre fabricant japonais, ayant développé le **HyperEye Medical system (HEMS)**. Le système est équipé d'un bras articulé, permettant de le positionner de manière stable au-dessus du champ opératoire. Il fournit des images en couleurs RGB. Le système HEMS a déjà été utilisé dans plusieurs applications cliniques, comme la détection du ganglion sentinelle et la perfusion d'organe: **Figure 6**

<http://www.mizuhomedical.co.jp/hypereye/>



**Fluoptics** est une société française localisée à Grenoble. Fluoptics a produit un fluorophore expérimental (Angiostamp®) permettant de visualiser l'angiogenèse et par conséquent qui permet de mieux visualiser certaines tumeurs hyper-vascularisées. D'un point de vue hardware, Fluoptics offre un dispositif manuel, fournissant des images en échelle de gris, adapté pour la FIGS « ouverte » ; le **Fluobeam®** [68] (**Figure 7**) est aussi utilisé pour plusieurs indications allant de la chirurgie plastique pour l'évaluation de la perfusion des lambeaux à la chirurgie oncologique et hépatobiliaire [69]. Un prototype adapté à la chirurgie mini-invasive est actuellement en cours de développement (Fluostick®) [70].

*Figure 7. Fluobeam® (FLUOPTICS) :*

[http://www.fluoptics.com/fluoptics\\_Fluorescence\\_Imaging\\_System.php](http://www.fluoptics.com/fluoptics_Fluorescence_Imaging_System.php)

**Novadaq Technologies Inc.** est une société canadienne, spécialisée dans le domaine de la FIGS, avec la production et la vente du système **SPY imaging system**, bénéficiant d'une approbation par la FDA 510(k) pour 7 spécialités chirurgicales « open » (bypass coronaire, chirurgie cardiovasculaire, plastique, reconstructive, microchirurgie, transplantation d'organes et chirurgie digestive). Par ailleurs, Novadaq produit un système endoscopique mini-invasif, le **Pinpoint**, développé en partenariat avec le Maimonides Medical Center, NY, (Dr. D. Sherwinter) et évalué dans plusieurs procédures laparoscopiques, comme la chirurgie colorectale [71] et les cholécystectomies (voire applications cliniques). De surcroît, en 2009, Novadaq a aussi développé, le **Firefly Fluorescence Imaging System**, en partenariat avec Intuitive Surgical. Le Firefly est le système de FIGS intégré dans le robot chirurgical da Vinci®, approuvé par la FDA en février 2011 (**Figure 8**).

*Figure 8. PINPOINT & FIREFLY (NOVADAQ, Ontario, Canada) :*

<http://novadaq.com/products/pinpoint-endoscopic-fluorescence-imaging>

<http://novadaq.com/products/firefly-system-robotic-surgery>

À droite, vision peropératoire avec le système Pinpoint de l'évaluation de la perfusion d'une anastomose colorectale [71]. L'image en haut montre la perfusion en proche infrarouge et l'image en bas montre la fusion des images en proche infrarouge (en vert) et en lumière blanche.

Le ***Beth Israel Deaconess Hospital*** (Boston, Harvard Medical School) a développé dans le *Center for Molecular Imaging* (CMI) les dispositifs dénommés **FLARE™** (Figure 9) et **mini-FLARE™** pour la chirurgie guidée par l'imagerie fluorescente dans le proche infrarouge. Le CMI a développé simultanément une molécule fluorescente, le ZW800 (**zwitterion fluorophores**). Le leader du laboratoire, Dr. John Frangioni, a soumis 14 brevets sur les systèmes d'imagerie et 1 sur l'agent de contraste. Le Professeur Sylvain Gioux, membre de ce jury de thèse, a travaillé pendant 10 ans au CMI aux côtés du Dr. Frangioni et depuis septembre 2015, il a rejoint le laboratoire I-Cube de Strasbourg [72].

**Figure 9. Système FLARE™ (Fluorescence Assistance for Resection and Exploration) [72].** *En haut : disposition du FLARE™. Au milieu : détection du ganglion sentinelle au niveau axillaire, chez une femme atteinte d'un cancer du sein, suivant l'injection péri-tumorale de l'ICG. Les images en lumière blanche et en fluorescence NIR (proche infrarouge) à 800 nm peuvent être combinées (color-NIR Merge) afin d'obtenir une vision augmentée. En bas : angiographie par fluorescence d'un lambeau. L'artère dominante du lambeau (cercle en pointillés) est identifiée lors de l'angiographie dynamique après injection de l'ICG et les images en lumière blanche sont fusionnées à celles par fluorescence NIR [48].*

***Karl Storz Endoskope*** est un groupe industriel allemand, spécialisé dans la fabrication de systèmes médico-chirurgicaux optiques, tant rigides que flexibles. Dans le portfolio de Storz, depuis quelques années, figure le **D-LIGHT P** conçu pour la FIGS (Figure 10).

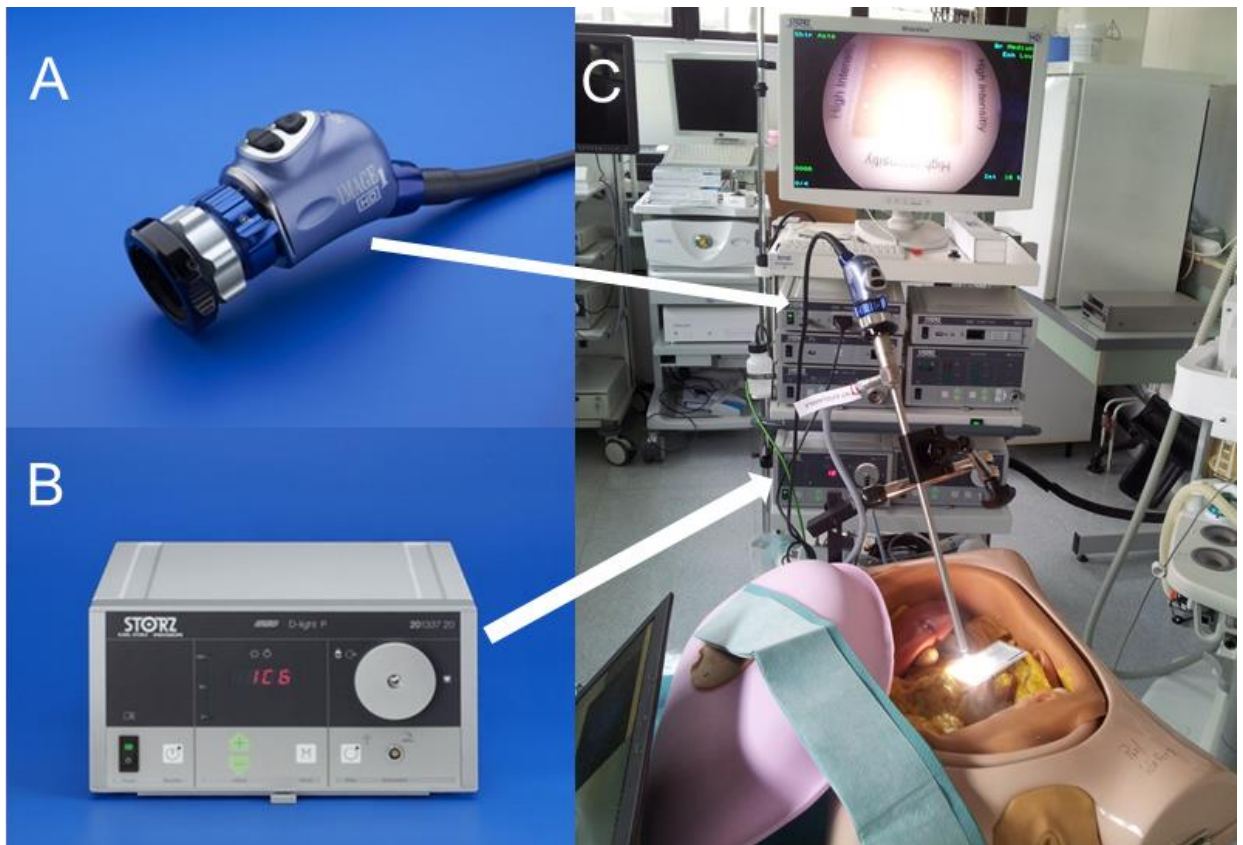


Figure 10. Système D-Light P (Karl Storz, Tuttlingen, Allemagne). A) tête de la caméra, B) source de lumière pouvant émettre dans le proche infrarouge, C) vue d'ensemble du système lors d'un test sur mannequin.

**SurgOptix Inc.** est une société allemande fondée par le Dr. Vassili Ntziachristos, directeur de l'IBMI (Institute for Biological & Medicinal Imaging) au Helmholtz Zentrum de Munich. SurgOptix a développé un système de caméra multispectrale : le SurgOptix T3-platform. Le système intègre dans sa caméra 3 CCDs capables de détecter de multiples longueurs d'onde dans le spectre du visible et dans le proche infrarouge (**Figure 11**). SurgOptix a un partenariat avec *Li-Cor*, une compagnie biotech ayant développé le fluorophore **IRDye® 800CW**, en cours d'investigation clinique.

Figure 11. Images en lumière blanche et en fluorescence d'implants de tumeurs dans la cavité abdominale avec le SurgOptix.

Source : <http://biotechbinge.com/biotechnology/2012/11/surgoptix-changes-the-way-we-view-cancer/>

**Quest Medical Imaging** : entreprise basée aux Pays Bas qui a développé un système capable d'afficher en temps réel des images en couleur et en fluorescence proche infrarouge. Une particularité importante : le système ArteMIS, renommé d'après le site Internet <http://www.quest-mi.com/> en Spectrum (**Figure 12**), pour la chirurgie tant ouverte que mini-invasive, présente la possibilité de détecter une gamme large de longueurs d'ondes allant de 400 à 1000 nm.

Figure 12. SPECTRUM (Quest Medical Imaging) Source : <http://www.quest-mi.com/>

### **3.5 Les applications cliniques courantes de la FIGS**

Les applications cliniques plus communes à ce jour, en chirurgie digestive, sont les suivantes :

1) la cholangiographie peropératoire lors d'une cholécystectomie, 2) la navigation peropératoire pour repérer le ganglion sentinelle, 3) l'évaluation en temps réel de la perfusion d'organe.

La détection ciblée de tissu tumoral, demeure encore au stade pratiquement expérimental, avec très peu de cas cliniques, opérés à ce jour avec cette technique dans le monde. Néanmoins, l'identification en temps réel des cellules cancéreuses par le biais d'agents de contraste fluorescents ciblant les antigènes exprimés par les tumeurs est sûrement l'application la plus révolutionnaire de la FIGS.

#### **3.5.1 Détection de cellules cancéreuses**

La possibilité de visualiser la tumeur de manière univoque permettant une chirurgie radicale est le Saint Graal de la chirurgie oncologique. La FIGS, par administration de fluorophores conjugués à des anticorps spécifiques pour la tumeur pourrait permettre un diagnostic rapide et précis de l'étendue tumorale et de la radicalité de l'excision. Dans le contexte de la chirurgie de précision, le développement d'anticorps fluorescents spécifiques pour le tissu tumoral a fait

d'importants progrès ces dernières années, avec de multiples preuves du concept sur modèle animal publiées concernant l'identification de résidus tumoraux et de ganglions métastatiques [58, 73-77].

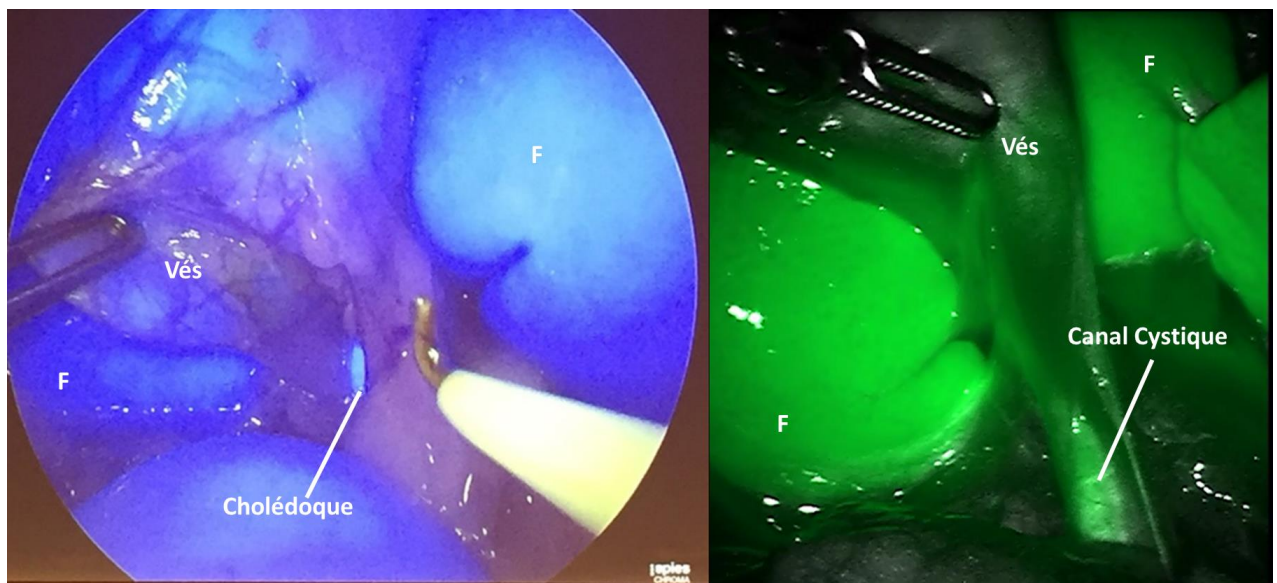
Il existe un nombre grandissant de molécules ciblées pour visualiser les cellules cancéreuses, permettre un diagnostic précoce du cancer et en optimiser la résection [57-61]. En 2011, le premier cas de FIGS utilisant des fluorophores spécifiques au tissu tumoral a été publié dans la revue Nature [77]. Les chirurgiens avaient pu ôter de manière très précise 34 implants intrapéritonéaux d'un cancer ovarien, qui étaient complètement invisibles à l'œil nu (**Voir Figure 10**). Cette première démonstration impressionnante laisse entrevoir le potentiel de l'utilisation des fluorophores ciblés vers les tissus tumoraux. Une telle visualisation augmentée et exclusive permet d'intervenir de manière efficace sur l'histoire naturelle de la pathologie tumorale, tant en phase de diagnostic qu'en phase de traitement pour assurer une ablation radicale.

### **3.5.2 Cholangiographie peropératoire par imagerie de fluorescence**

Une application bien plus simple à mettre en œuvre de la FIGS est la cholangiographie peropératoire, qui permet de réduire le risque de plaies de la voie biliaire (PVB) lors de la cholécystectomie. En effet, le taux de lésions iatrogènes de la voie biliaire est d'environ 0,15-0,6 % [78].

La cholécystectomie étant l'une des interventions chirurgicales les plus pratiquées, avec environ 700 000 interventions par an aux Etats-Unis et environ 50 000 en France, il est facile de calculer que malgré leur faible incidence, les PVB représentent un problème majeur de santé publique. L'étiologie la plus fréquente des PVB est une mauvaise interprétation de l'anatomie due à des variantes anatomiques ou à un état inflammatoire important [79-81], car en présence de cholécystite le taux de PVB augmente de 20 fois [82]. La cholangiographie peropératoire par rayons X [83-85] est une technique fréquemment utilisée et très efficace pour localiser les voies biliaires et/ou pour évaluer la présence de lésions. Néanmoins, cette technique présente

plusieurs limites : 1) il s'agit d'une procédure qui est relativement longue, durant laquelle le canal cystique est cathétérisé pour pouvoir injecter du contraste radio-opaque dans la voie biliaire, 2) il est nécessaire de mobiliser des ressources humaines supplémentaires, 3) le patient et l'équipe sont exposés à des radiations ionisantes, 4) l'image radiologique obtenue est en 2D et ne peut pas être superposée au champ opératoire [86]. À ce jour, la cholangiographie par fluorescence par injection de vert d'indocyanine (**Figure 13**) a été évaluée dans un nombre important d'essais cliniques et s'est avérée être un moyen efficace et sûr pour la visualisation de l'anatomie biliaire [87-90], avec des résultats prometteurs tels qu'ils ont été mis en évidence par une revue systématique de la littérature publiée récemment [91].



*Figure 13. Images peropératoires de cholangiographie par fluorescence avec 2 systèmes différents d'acquisition (D-Light P, Karl Storz, à gauche et Firefly, Intuitive Surgical, à droite). F= Foie, Vés= Vésicule biliaire.*

L'un des inconvénients les plus importants de la cholangiographie par fluorescence après injection systémique de vert d'indocyanine est lié à la forte captation par le foie, et ceci donne un signal de fond très intense dû à l'accumulation intrahépatique de l'ICG. Cette accumulation peut parfois interférer avec la visualisation optimale du canal cystique.

Afin de réduire le bruit de fond de forte fluorescence venant du foie, il est possible d'injecter l'ICG 24 heures avant l'intervention, comme démontré par Verbeek [92] : cet intervalle permet l'évacuation de l'ICG du foie, tandis qu'une quantité suffisante d'ICG sera encore présente

dans l'arbre biliaire qui sera alors la seule structure illuminée. Néanmoins, un tel intervalle pose des problèmes du point de vue économique et logistique, car cela demande d'hospitaliser le patient à l'avance pour administrer le produit de contraste. Un bon compromis serait probablement d'injecter le produit de contraste entre 6 et 10 heures avant l'intervention en cas de chirurgie programmée. Toutefois, cette attitude ne pourrait pas s'appliquer à des cas d'urgences (cholécystite), qui sont justement les cas où le guidage par fluorescence est le plus indiqué. Pour ces situations, nous avons proposé d'administrer l'ICG par voie locale, directement dans la vésicule biliaire. Cette technique de cholécysto-cholangiographie a montré des résultats vraiment prometteurs dans le modèle expérimental, avec des images très claires des voies biliaires [93].

### **3.5.3 Détection du ganglion sentinelle**

Le ganglion sentinelle (SLN) est le premier ganglion à recevoir le drainage lymphatique d'une tumeur. Un ganglion sentinelle sans métastases suggère aussi l'absence de métastases dans les ganglions situés en aval. L'identification et l'analyse du SLN revêtent une importance cruciale dans le processus décisionnel chirurgical, surtout dans les procédures mini-invasives avec conservation d'organes [94]. La détection du SLN par FIGS, par injection péri-tumorale d'ICG, est une technique relativement récente, déjà appliquée dans une variété de tumeurs, surtout le sein et le mélanome [48]. Il s'agit d'un procédé bien établi dans le monde asiatique, en cas de cancer de l'estomac en phase précoce [95]. Une méta-analyse récente a démontré que la FIGS est une technique valide pour la mise en évidence de métastases ganglionnaires [96]. Une marge d'amélioration de la technique de navigation peut être envisagée, étant donné que l'ICG est une molécule trop petite, ayant tendance à diffuser très rapidement à de multiples ganglions. Par conséquent, l'ICG peut clairement délimiter le « bassin » lymphatique [97, 98], mais c'est moins le cas pour le ganglion sentinelle. En effet, Miyashiro et coll. du Japan Clinical Oncology Group (JCOG) [99] ont mis en évidence un trop grand nombre de faux négatifs avec l'ICG. Il

est par conséquent important de produire des molécules fluorescentes présentant moins de dispersion et plus de rétention dans les ganglions [100]. Nous avons développé un modèle animal de métastases ganglionnaires avec navigation par FIGS, pouvant être utile à l'analyse et au criblage de potentielles nouvelles molécules dans cette application spécifique [101].

### 3.5.4 Perfusion d'organe évaluée avec l'angiographie par fluorescence infrarouge

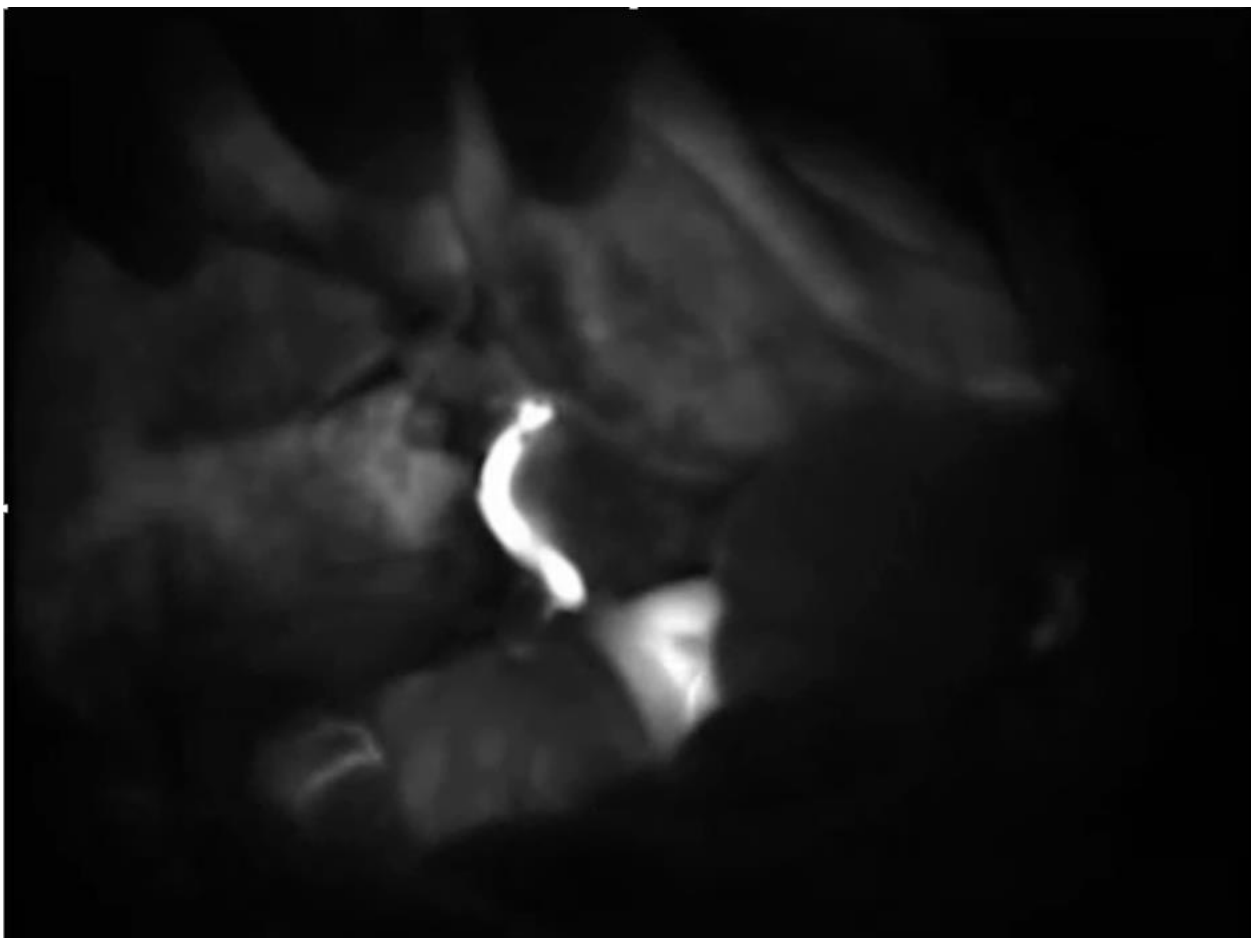
L'injection par voie systémique (intraveineuse) d'un fluorophore permet, en vertu de la distribution généralisée dans l'organisme, d'évaluer la présence de circulation sanguine (de perfusion) et, dans une certaine mesure, du degré d'oxygénation.

L'analyse de perfusion, utilisant l'angiographie par fluorescence, a été utilisée dans plusieurs domaines chirurgicaux, allant de la chirurgie plastique/reconstructive, avec évaluation de la perfusion des lambeaux musculo-cutanés [102], à la transplantologie, surtout rénale et hépatique [103], pour évaluer la bonne vascularisation des greffons. Plusieurs groupes ont publié leur expérience avec l'angiographie post-transplantation rénale [104-106]. Le groupe du Professeur Luigi Boni (membre de ce jury de thèse) a montré l'intérêt de l'imagerie par fluorescence à l'aide de vert d'indocyanine dans un cas très complexe de reconstruction d'un anévrisme de l'artère rénale avec auto-retransplantation [107]. L'angiographie par fluorescence avait permis de mettre en évidence une perfusion correcte du rein du patient après correction *ex vivo* de l'anévrisme de l'artère et réimplantation (**Figure 14**).

Figure 14. Image peropératoire du rein transplanté (A) et visualisation de la vascularisation du parenchyme rénal par angiographie de fluorescence après injection de vert d'indocyanine (B). Source : Tozzi M, Boni L et coll. [107].

De même, plusieurs auteurs ont utilisé l'angiographie par fluorescence avec injection d'ICG pour évaluer la perfusion du greffon après transplantation hépatique [108]. La **Figure 15** montre une angiographie par fluorescence après transplantation hépatique, effectuée par le Professeur Eric Vibert de l'Hôpital Paul Brousse de Paris.





*Figure 55. Confirmation d'une vascularisation hépatique satisfaisante après transplantation par angiographie fluorescente. Professeur Eric Vibert ; <https://www.youtube.com/watch?v=Gm8RReJJJD4>*

Une considération particulière mérite l'évaluation de la perfusion du tractus gastro-intestinal, car la vascularisation intestinale au moment de la création de l'anastomose est un paramètre fondamental pour la guérison, comme discuté dans la partie **2.2**.

En effet, une mauvaise vascularisation au niveau de l'anastomose engendre une défaillance énergétique et ceci va détériorer les capacités de guérison du tissu. La première étape lors d'une résection chirurgicale d'un segment d'intestin consiste à couper la vascularisation dudit segment. Cette approche vasculaire provoque une ischémie du segment intestinal, qui dépend de la distribution des branches de l'artère ayant été contrôlée. L'étendue du segment rendu ischémique n'est donc pas totalement prévisible. Le chirurgien devra alors évaluer l'étendue de la résection non seulement pour des raisons purement pathologiques (par exemple, en cas de tumeur, la résection doit tenir compte de la localisation de la tumeur et il faut rajouter des

marges de sécurité pouvant aller jusqu'à plusieurs centimètres), mais aussi pour des raisons de vascularisation des moignons restants qui seront anastomosés. Comme mentionné précédemment, l'évaluation clinique est très subjective car elle est basée sur des paramètres variables tels que la couleur de la séreuse après la « coupure » vasculaire et sur la présence ou non de pulsations vasculaires et de péristaltisme.

Comme souligné dans l'introduction, cette thèse porte sur l'imagerie par fluorescence pour évaluer la perfusion digestive de manière quantitative, via une approche mise au point par notre équipe de chercheurs en sciences informatiques. Cette partie sera reprise en détails dans l'introduction à la section dédiée aux travaux expérimentaux (Partie en anglais).

#### **4. Marqueurs de la perfusion et de l'état énergétique tissulaire**

Pour valider le système d'évaluation de la perfusion digestive à l'aide de l'imagerie par fluorescence, nous avons étudié au niveau intestinal des bio-marqueurs de perfusion et de métabolisme tissulaire (la fonction mitochondriale, la lactatémie capillaire et la quantification du métabolome), permettant une corrélation entre les données biologiques et morphologiques. Ci-après, voici quelques rappels de physiologie générale.

##### **4.1 La centrale énergétique de la cellule : la mitochondrie**

La mitochondrie est un organite hautement spécialisé, siège des réactions chimiques de production et de transformation d'énergie pour la cellule. La mitochondrie est composée de deux membranes : la membrane externe et la membrane interne, délimitant un espace inter-membranaire et une matrice. Les replis caractéristiques de la membrane interne sont appelés crêtes mitochondriales (**Figure 16**).

*Figure 16. Structure d'une mitochondrie. Source : Lejay A, et coll. Muscle biopsy 2011 (Ed Saunders).*

#### 4.1.1 La structure mitochondriale

La membrane externe abrite un nombre important de protéines permettant les échanges de métabolites de petit poids moléculaire entre le cytosol et l'espace inter-membranaire de la mitochondrie. L'espace inter-membranaire se situe entre les deux membranes et contient des protéines qui jouent un rôle majeur dans l'énergétique mitochondriale et la mort cellulaire [109]. La membrane interne présente une perméabilité sélective et forme la barrière entre le cytosol et la matrice mitochondriale. Cette perméabilité sélective permet de maintenir un gradient de concentration pour les protéines, les ions et les métabolites.

Des transporteurs permettent les échanges entre les compartiments et participent au bon fonctionnement de la mitochondrie :

- 1) les complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale, ancrés dans la membrane interne. Ils assurent le maintien du gradient de protons et la formation d'ATP ;
- 2) l'Adenine Nucleotide Translocator (ANT), échange l'ATP mitochondriale en ADP cytosolique dans un rapport 1:1. L'ANT est exprimé par trois isoformes : ANT1, ANT2 et ANT3. Chez l'homme, l'ANT1 est l'isoforme exprimée de manière prédominante dans le muscle cardiaque et squelettique, l'ANT2 est ubiquitaire, exprimée dans tous les tissus en quantité variable en fonction de l'activité respiratoire du tissu. L'ANT3 a un faible niveau d'expression dans le cerveau, le foie, le rein, le cœur et les muscles squelettiques.
- 3) les protéines découplantes, enchâssées dans la membrane interne, permettent le passage de protons de la matrice à l'espace inter-membranaire, créant une « fuite » et par conséquent un couplage incomplet entre les phosphorylations et les oxydations, appelé respiration mitochondriale découplée. Ce phénomène induit une dissipation de l'énergie sous forme de chaleur et une diminution de la production des radicaux libres par une augmentation de l'oxydation de l'ubiquinone. Il est possible que le rôle de ce phénomène de découplage soit de minimiser le stress oxydant et les dégâts inhérents au niveau de l'ADN [110].

La matrice mitochondriale est le compartiment interne de la mitochondrie délimité par la membrane interne. Elle contient des centaines d'enzymes nécessaires au **cycle de Krebs (voir ci-après)** et à la  $\beta$ -oxydation des acides gras, ainsi que l'ADN mitochondrial codant pour des protéines composant certaines sous-unités des complexes I, III, IV et V de la chaîne respiratoire, des ribosomes mitochondriaux, des tRNA, des rRNA et des enzymes nécessaires à l'expression de l'ADN.

#### 4.1.2 Fonctionnement de la mitochondrie

La production énergétique cellulaire est assurée par 2 voies principales : la glycolyse et la phosphorylation oxydative.

La glycolyse est la voie métabolique de transformation du glucose en énergie. Il s'agit d'une série de réactions enzymatiques qui dégradent une molécule de glucose (à 6 carbones) en 2 molécules de pyruvate (à 3 carbones). Elle a lieu dans le cytoplasme cellulaire et ne nécessite pas d'oxygène comme cofacteur. La glycolyse a un faible rendement énergétique, donnant lieu à 2 molécules d'ATP (Adénosine-tri-phosphate = la molécule qui fournit par hydrolyse l'énergie nécessaire aux réactions chimiques du métabolisme).

Le produit catabolique final de la glycolyse, le pyruvate, en présence d'oxygène, entre dans la voie oxydative du métabolisme, ayant lieu au niveau mitochondrial, avec un rendement nettement supérieur (36 ATP).

#### 4.1.3 La phosphorylation oxydative

C'est un processus enzymatique qui a lieu au niveau mitochondrial dans un complexe protéique appelé chaîne respiratoire mitochondriale ou chaîne de transport des électrons. La phosphorylation oxydative a besoin de la présence d'oxygène (l'accepteur d'électrons plus électronégatif) qui sera réduit en eau et la présence d'équivalents réducteurs NADH et FADH<sub>2</sub>. Ces équivalents réducteurs sont produits lors d'une étape préliminaire appelée **cycle de Krebs**.

Ce cycle intra-mitochondrial nécessite la conversion de pyruvate ou d'acyl-CoA, les produits cataboliques respectifs de la glycolyse et de la bêta-oxydation des acides gras, en acétyl-CoA. L'acétyl-CoA va être métabolisé par une succession d'enzymes (**Figure 17**) pour produire au total deux molécules de CO<sub>2</sub>, trois molécules de NADH, une molécule de FADH<sub>2</sub> et une molécule d'ATP.

Au cours de la phosphorylation oxydative, des électrons sont transférés de ces molécules réductrices vers des oxydants tels que l'oxygène au cours de réactions d'oxydoréduction. Ce sont ces réactions redox qui libèrent de l'énergie, utilisée pour former des molécules d'ATP. Ces réactions sont réalisées par une série de complexes protéiques situés dans la membrane interne des mitochondries, formant la chaîne respiratoire. L'énergie libérée par la circulation des électrons le long de la chaîne respiratoire sert à pomper des protons à travers la membrane mitochondriale et à générer un gradient électrochimique et un gradient de pH à travers cette membrane. Les protons, en s'accumulant, accroissent la pression chimiosmotique par rapport à celle qui règne à l'intérieur de la mitochondrie. En retournant à l'intérieur de la mitochondrie, ils passent à travers le canal ionique de l'ATP synthase, enzyme complexe qui utilise l'énergie chimiosmotique de ces protons pour permettre la phosphorylation d'une molécule d'ADP en ATP.

La chaîne de transport des électrons, ou chaîne respiratoire mitochondriale, est composée de 5 complexes :

**1) le complexe I ou NADH déshydrogénase** : c'est la première enzyme de la chaîne respiratoire. Elle catalyse le transfert de 2 électrons du NADH à l'ubiquinone (ou coenzyme Q10). Ce transfert est couplé au pompage de 4 protons à l'extérieur de la mitochondrie au travers de la membrane, ce qui participe à la force proton-motrice. Le domaine hydrophile de ce complexe contient le site de liaison du NADH, la flavine mononucléotide, qui est le premier

accepteur d'électrons, et neuf centres Fer/Soufre (Fe-S cluster) constituant le centre catalytique de l'enzyme. Le système de pompage des protons est localisé dans la partie membranaire du complexe [111].

**2) le complexe II ou Succinate déshydrogénase :** il fait partie de la chaîne respiratoire et aussi du cycle de Krebs. Il est donc un anneau de jonction crucial. Il est composé de quatre sous-unités (A à D). Les sous-unités A et B constituent le domaine hydrophile de l'enzyme dépassant dans la matrice tandis que les sous-unités C et D constituent le domaine d'ancrage du complexe dans la membrane interne mitochondriale. Ce complexe qui oxyde le succinate en fumarate peut cependant, dans certaines conditions, fonctionner dans le sens inverse [112].

**3) le complexe III ou Ubiquinol-cytochrome c réductase :** Il contient 4 groupes redox actifs : 2 cytochromes b (bL et bH), le cytochrome c1 et un centre Fer/Soufre. Ce complexe est composé de 11 sous-unités protéiques avec les sous-unités III, IV et V constituant les groupes redox.

Cette enzyme catalyse le transfert de 2 électrons de l'ubiquinol au cytochrome c. Cette étape est associée au transfert de 4 protons de la matrice vers l'espace inter-membranaire. Ainsi, des électrons dérivant de l'oxydation de l'ubiquinol sont recyclés par le site ubiquinol réductase de cette enzyme, ce qui permet le pompage des protons [113].

**4) le complexe IV ou Cytochrome c oxydase :** le cytochrome c cède des électrons qui rentrent dans le complexe IV par le centre cuivre CuA, puis sont transférés successivement à l'hème puis au site actif bi-nucléaire où s'effectue la liaison de l'oxygène et sa réduction en eau. Durant cette étape, 4 protons sont consommés et 4 autres sont pompés de la matrice vers l'espace inter-membranaire [113]

**5) le complexe V = ATP synthase :** Il s'agit d'une enzyme fonctionnant comme un micromoteur qui permet de coupler la chute du gradient électrochimique transmembranaire en une étape chimique de phosphorylation avec production d'ATP. Elle est composée de 2 sous-complexes. La partie F<sub>0</sub> est insérée dans la membrane interne mitochondriale et conduit les

protons depuis l'espace inter-membranaire vers la matrice. Le segment F1 est matriciel, au contact de la membrane interne et utilise le gradient de protons pour convertir l'ADP en ATP et vice-versa. Il est composé de 5 sous-unités ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ). Des protéines accessoires (e, f, g et F6) sont également associées à ce complexe. Le fonctionnement de ce dernier repose sur les sous-unités c (au nombre de 10) de la partie F0 qui, connectées à la sous-unité  $\gamma$  de F1, agissent comme un rotor qui utilise le passage des protons à travers le stator (sous-unités A6, b, d et OSCP) pour fonctionner. La sous-unité  $\gamma$  cause un changement conformationnel dans le trimère circulaire de sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  de la partie F1 et permet ainsi successivement la liaison de l'ADP, puis la réaction avec le phosphate inorganique pour générer l'ATP et enfin le relargage de l'ATP.

La fonction mitochondriale globale est celle de différents complexes. Elle peut être évaluée par plusieurs méthodes [114]. Nous avons utilisé une technique oxygraphique, qui sera décrite dans la session **Materials and Methods**, dans le chapitre des travaux expérimentaux.

*Figure 18. Glycolyse, production de lactate et pyruvate, cycle de Krebs et phosphorylation oxydative [115]*

## 4.2 L'ischémie-hypoxie tissulaire

L'ischémie est la diminution/interruption de la circulation sanguine artérielle au niveau de l'organe concerné, ce qui a par conséquent de priver les différents tissus de l'apport en oxygène et en éléments nutritifs. Ce phénomène va entraîner le passage vers un métabolisme anaérobie et une accumulation des produits du métabolisme. Une ischémie peut être secondaire à de multiples dysfonctionnements : traumatisme, embolie, thrombose, compression tumorale et iatrogène.

L'interruption du flux sanguin au segment intestinal à reséquer est fonctionnelle à l'exécution de la chirurgie : le problème est de reconnaître l'endroit où construire l'anastomose, car en

présence de tissu ischémique ou hypo-perfusé, les processus de guérison seront altérés et le risque de complications (sténose et/ou lâchage) sera augmenté. Une baisse de l'apport en oxygène peut également être secondaire à des troubles de la délivrance en oxygène, alors que le flux sanguin est préservé (anémie, anomalie du débit cardiaque ou de la pression de perfusion, hypoxémie par exemple). Ces situations correspondent plus fréquemment à une hypoperfusion qu'à une réelle ischémie, mais les mécanismes pathologiques et bioénergétiques sont similaires. Au cours de la phase initiale de l'ischémie, l'ATP est généré par la glycolyse. Il s'ensuit une déplétion des réserves en glycogène, un métabolisme en anaérobie et une acidose lactique locale. Pour compenser l'acidose intracellulaire, la pompe  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  va saturer le cytoplasme en ions  $\text{Na}^+$ , provoquant un appel osmotique et un œdème cellulaire. L'œdème est aggravé par la suite par manque d'ATP et par dysfonction de la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (ATP-dépendant). Par la suite, l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  s'active dans son mode inverse pour épurer les ions  $\text{Na}^+$  du cytosol, provoquant l'entrée d'ions  $\text{Ca}^{2+}$ . L'accumulation des ions  $\text{Ca}^{2+}$  au niveau intracellulaire induit l'activation d'enzymes tels que la phospholipase A2 et les lysozymes. La phospholipase A2 va métaboliser les phospholipides membranaires en acide arachidonique, un précurseur des médiateurs de l'inflammation (Prostaglandines, Leukotriènes et Tromboxanes), tandis que les lysozymes vont digérer les cellules nécrotiques. D'autres mécanismes sont également impliqués dans les altérations tissulaires liées à l'ischémie : la production de cytokines, de kinines, du complément et des voies de coagulation. Une activation de l'inflammation notamment cellulaire sera alors observée [116]. L'activation biologique de l'inflammation est retrouvée sur le plan histologique. L'ischémie provoque la production de radicaux libres dans le cytoplasme et provoque également une altération du fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale [117].



### 4.2.1 Le Lactate

Le lactate (2-hydroxypropanoate) est un sel d'acide hydroxycarboxylique. Le L-lactate est le stéréo-isomère prédominant en physiologie humaine [118]. Le lactate forme un couple de conversion par oxydo-réduction avec le pyruvate catalysé au niveau cytosolique par l'enzyme lactate déshydrogénase (LDH) : **Lactate + NAD<sup>+</sup> ⇌ Pyruvate + NADH + H<sup>+</sup>**.

La réduction du pyruvate en lactate entraîne une oxydation de NADH en NAD et inversement, l'oxydation du pyruvate à partir du lactate entraîne la réduction de NAD en NADH.

Le lactate est produit principalement à partir du catabolisme du glucose (**Figure 18**). Une deuxième source de lactate est le métabolisme de la L-alanine, catalysée par l'alanine aminotransférase (ALAT) [119], présente au niveau cytoplasmique et mitochondrial. Le pyruvate est un intermédiaire commun à ces voies de production. De plus, le lactate peut être issu du catabolisme d'autres acides aminés tels que la sérine, la thréonine et la cystéine [120].

Sur le plan bioénergétique, une molécule de glucose par glycolyse produira deux molécules de lactate, deux molécules d'ATP et deux protons. Cette voie métabolique est d'un rendement énergétique faible et responsable d'une acidification du cytosol par production protonique.

La production de lactate est augmentée en conditions d'hypoxie tissulaire [121], lorsque le métabolisme énergétique oxydatif n'étant plus fonctionnel par manque d'oxygène, le pyruvate issu de la glycolyse s'accumule et est transformé en lactate par la LDH [122, 123].

Néanmoins, il n'existe pas une véritable relation linéaire entre hyperlactatémie et hypoxie tissulaire, étant donné qu'il faut aussi tenir compte des altérations de la délivrance d'oxygène pouvant survenir au niveau de la microcirculation, comme en situation de choc septique, ou une hyperlactatémie peut s'accompagner d'une augmentation de la pression tissulaire en oxygène [124].

En clinique, la mesure de la lactatémie systémique est utilisée dans de multiples situations, telles que le monitoring et la stratification de patients à haut risque de mortalité pour sepsis et/ou pour ischémie digestive (ischémie mésentérique) : une lactatémie élevée de manière persistante est

un index prédictif de mortalité [125], alors qu'une clairance rapide des lactates est un signe de pronostic favorable [126]. Néanmoins, concernant l'ischémie digestive, la mesure des lactates systémiques, tout en restant un facteur prédictif de mortalité, ne corrèle pas bien ni avec le timing de l'ischémie [127], ni avec l'étendue de la nécrose intestinale [128].

En revanche, la lactatémie « locale » subit des variations beaucoup plus rapides et cohérentes avec la perfusion, comme démontré dans des modèles d'ischémie aiguë de membre [129].

Par extrapolation, nous avons formulé l'hypothèse que la lactatémie locale (capillaire) intestinale pouvait représenter un biomarqueur fiable de l'état énergétique des entérocytes, et que la mesure des lactates capillaires pouvait nous fournir une validation de notre technique de détection de la perfusion digestive par imagerie de fluorescence. Aujourd'hui, il est possible de mesurer la lactatémie capillaire à l'aide de dispositifs portatifs utilisant des bandelettes réactives, comme les glycomètres pour mesurer la glycémie chez les patients diabétiques. Plusieurs dispositifs pour la mesure des lactates capillaires sont disponibles sur le marché. Initialement, ces dispositifs ont été développés pour l'évaluation des nouveaux-nés en salle d'accouchement (lactates du scalp) [130] et pour déterminer la capacité physique maximale aérobie [131] en médecine du sport.

Ces dispositifs intègrent des senseurs électrochimiques capables de mesurer le taux de lactates en quelques secondes, dans une quantité de sang minime (de l'ordre des microlitres). Le fonctionnement des senseurs est basé sur une réaction enzymatique produisant une modification de la tension électrique mesurée par le dispositif [132]. La bandelette contient une enzyme (lactate oxydase, par exemple) utilisant le lactate comme substrat et les produits de cette réaction sont à l'origine de la variation ampérométrique mesurée dans la solution, dont l'intensité est proportionnelle à la quantité initiale en lactate [133].

**TRAVAUX EXPERIMENTAUX (Partie en anglais).**

**EXPERIMENTAL WORKS**

## BACKGROUND AND AIMS

Sufficient blood supply is of paramount importance to ensure proper healing of gastrointestinal anastomosis. For this reason, accurate intraoperative evaluation of peri-anastomotic gastrointestinal tract perfusion is essential to reduce the risk of anastomotic complications such as leakage or strictures[3].

Anastomotic leakage is the most dreadful complication of colorectal resections, with an incidence ranging between 2-19%[134]. Given the dramatic morbidity and mortality rates and the high economic burden of anastomotic leakage in digestive resections and reconstructions, continued research efforts are being made to reduce the risk of anastomotic failures [135].

Intestinal microcirculation and viability is usually estimated from the color of the serosal surface, presence of peristalsis, pulsation and bleeding from the marginal arteries. This is subjective and based on the experience of the surgeon and may be deceptive since 1) a dark color may be due to transient venous insufficiency and bowel may be in fact viable; 2) in early arterial occlusion bowel may appear normal; 3) absence of mesenteric pulse may be due to hypotension or spasm; 4) peristalsis may persist even in a grossly ischemic bowel.

The surgeon's clinical evaluation has a very low predictive accuracy for anastomotic leakage[2]. Basic techniques, such as mechanical anastomotic leak tests, have mild if no benefits at all in terms of complication prevention[4].

It has been shown that improvement in inadequate intraoperative colonic perfusion from increased collateral circulation is unlikely to develop during the first 5 postoperative days (POD) [136]. Thus, anastomotic perfusion is determined at the time of surgery and should be assessed intraoperatively.

Despite numerous techniques for intraoperative assessment of bowel perfusion have been developed, the global uptake by the surgical community is very low, because the majority of those techniques are expensive or time-consuming [3]. The most reliable techniques include spectroscopy and fluorescence methods.

Spectroscopic methods, Near-Infrared Spectroscopy (NIRS) and Visible Light Spectroscopy (VLS) evaluate O<sub>2</sub> tension (StO<sub>2</sub>) by assessing the amount of light passing through tissues. Based on wavelength, NIRS (700-730 nm) is suitable for all vascular segments while VLS (475-625 nm) is suitable mainly for capillaries. In a series of 20 patients undergoing colorectal resection, Hirano et al. showed that StO<sub>2</sub> can be safely and reliably measured by NIRS and that a low StO<sub>2</sub> is strongly related to an increased risk of anastomotic leakage[137]. An important limitation of the StO<sub>2</sub> method is the lack of uniformity in StO<sub>2</sub> measurements between various VLS and NIRS equipment and different wavelength profiles.

Fluorescence videography analysis or Laser Fluorescence Angiography (LFA), seems the most promising technique, as outlined in a recent systematic review of the literature[4]. LFA evaluates blood flow by referring to the fluorescence of a dye when illuminated by a laser (see introduction, French part). Fluorescence intensity is proportional to the amount of fluorescent dye diffused in the tissue and it consequently is a surrogate marker of tissue perfusion [138].

Kudszus et al. evaluated the impact of Indocyanine-Green LFA in a case-matched study involving 201 patients undergoing open colorectal resection with LFA compared to a retrospective well-matched cohort of 201 patients. Authors found that LFA may significantly reduce the rate of severe complications as well as the rate of anastomotic leakage [139].

In 2011, Matsui et al. evaluated the ability of intraoperative near-infrared (NIR) ICG-based angiography to predict ischemic bowel in an experimental model of mesenteric ischemia in pigs and rats. Authors used the FLARE™ (Fluorescence-Assisted Resection and Exploration) imaging system, consisting in light-emitting diodes in the spectra of white light (400–650 nm) and NIR fluorescence excitation light (745–779 nm). The exposed bowel images were acquired using customary optics and eventually merged with the ICG fluorescence distribution images. The FLARE™ demonstrated better accuracy in predicting bowel survival when compared with clinical evaluation alone [140].

The use of this technology has been limited to open surgery and new tools are becoming available to extend the benefits of fluorescence-guided surgery to the minimally invasive approach [141-143]. So far, few authors have performed fluorescence-based evaluation of bowel perfusion in the clinical setting, using different commercially available devices designed for minimally invasive surgery.

Carus et al. [144] performed laparoscopic ICG-based fluorescence angiography for real-time evaluation of anastomotic perfusion in 45 cases of colorectal resections and 4 sleeve gastrectomies, using a Near-Infrared laparoscope (D-Light P, Karl Storz®, Tuttlingen, Germany). A computer analysis evaluating the degree of relative fluorescence intensity between different intestinal regions was used as a marker of perfusion adequacy. The same device has been successfully evaluated by Boni et al. in 38 colorectal resections[145].

Ris et al. [71], using the PinPoint system (Novadaq, Ontario, Canada), obtained fluorescence angiographies in 30 patients undergoing minimally invasive colorectal resections. Fluorescence intensity arising from the distal ileum or caecum was used as positive control. Using subjective criteria, although supported by enhanced visualization, authors found fluorescence perfusion angiography to be helpful to support strategic decisions, such as prevention of stoma in low anastomoses in 3 cases. The peculiarity of the PinPoint system lies in the ability to display white light and Near-Infrared images separately or merged. Merged images allow for an easier visual evaluation of the perfusion.

The FireFly™ fluorescence imaging system, also developed by Novadaq and integrated in the surgical robotic platform da Vinci SI™ (Intuitive Surgical, Sunnyvale, CA), was used by Jafari et al. [7], in a retrospective case-series study including 40 patients undergoing robotic low anterior resections and by Hellan et al. [8]. The latter reported that fluorescence imaging of perfusion induced a significant modification of transection location, specifically at the proximal transection site, in 40% of cases of left-sided colorectal resections [8].

Sherwinter et al. [9], introduced the PinPoint laparoscopic system transanally, using a dedicated transanal introducer, to evaluate colonic mucosal uptake of the ICG immediately after anastomotic construction. Fluorescence uptake was evaluated subjectively and authors attempted to create a score based on the homogeneity of the fluorescence signal on the anastomosis as compared to surrounding areas. Mucosal perfusion angiography was abnormal in 4 out of 20 patients, and it was predictive of anastomotic leakage in 2 cases.

Recently, the prospective PILLAR II study (Perfusion Assessment in Laparoscopic Left Sided/Anterior Resection) has demonstrated that the Pinpoint evaluation of the anastomotic perfusion by transanal approach in 147 patients could induce a change in the operative strategy in 10% of the cases [10].

However, in all of these studies, perfusion was evaluated in a static and qualitative fashion, merely based on relative fluorescence intensity, without considering the diffusion of fluorophores over time. In fact, the dye can reach the boundaries of ischemic areas by capillary flow diffusion with time and may provide overestimation of the perfused zone.

Additionally, fluorescent intensity is highly dependent on the distance between the light source and the target, and requires the use of a “standard” reference calibration aid (which is a squared spot that yields a constant signal when illuminated by the Near-Infrared light) [11].

This calibration tool should be introduced into the abdomen of the patient during laparoscopy, which is cumbersome and time-consuming and would eventually require to enlarge one of the abdominal incisions.

Our aim was to develop a robust, quantitative, computer-assisted, real-time surgical navigation system, to evaluate organ perfusion based on the dynamic analysis of the fluorescence signal. Additionally, the system has been conceived to fit within the surgical workflow and to display to the surgeon the augmented information directly on the laparoscopic screen.

In the present experimental project, we propose a new fluorescence videography-based real-time Enhanced Reality (ER) tool to guide the intestinal resection and to assess vascular supply

at the future anastomotic site. We combined the concepts of surgical Virtual/Augmented Reality navigation and the Fluorescence guided surgery, in which virtual images are directly generated from the intraoperative “live” image signals produced by the specific laparoscope and light source. We have defined this approach FLuorescence-based Enhanced Reality (FLER). Accuracy of the system has been estimated using robust surrogate markers such as the level of capillary lactates, mitochondria respiratory rate, and metabolomics fingerprint of ischemia. The stepwise development and the experimental validations of the FLER surgical navigation to evaluate bowel perfusion and display the optimal anastomotic site, is described in the next sections.



# **MATERIALS AND METHODS**

## **EQUIPEMENT ENABLING FLER**

### **Near Infrared (NIR) optimized laparoscope**

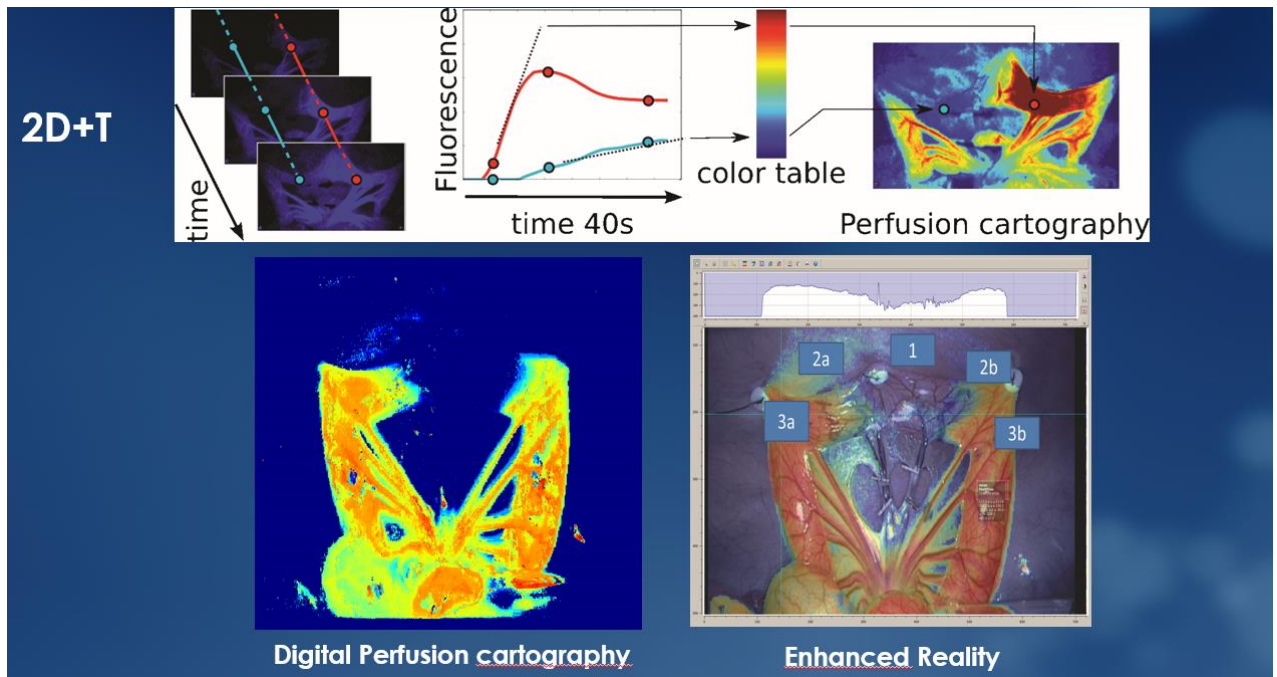
To capture the fluorescence signal, the new incoherent light source D-Light P (Karl Storz®, Tuttlingen, Germany) was used (Figure 10). The filter of the D-light P can be switched into the light transmission path. The filter transmits light in a range of 690 to 780 nm and completely blocks light > 800 nm. In addition, switching the filter out of the light path allows standard white light observation.

### **ER-PERFUSION Software**

The Research and Development department of the IRCAD, has developed a dedicated image analyzer software (ER-PERFUSION, IRCAD; France), using the Python Scientific Package.

The ER-PERFUSION was used to analyze the Region of Interest (ROI) within the operative field of the high definition laparoscopic camera, extrapolating the tissue perfusion difference by comparing it with a control area. The ER-PERFUSION can correlate fluorescence intensity over-time changes to tissue perfusion and allows to construct a virtual cartography based on fluorescence Time-to-peak. Time-to-peak is inversely correlated to perfusion level. Virtual cartography can be overlapped onto real-time laparoscopic images in order to obtain the FLuorescence-based Enhanced Reality (FLER) effect.

The perfusion analysis based on time-to-peak is 1) independent from the distance-to-target and 2) is dynamic: virtual perfusion cartography is created by averaging signals over a 20-40 second video at the speed of 5-25 frames per second and by attributing a color code based on the time required to reach the maximum intensity of each pixel. Each single pixel of perfusion cartography is a dynamic image (2D + diffusion time) representing the average of several images (from 100 to 200) (**Figure 19**).



*Figure 19 Dynamic perfusion cartography. The dynamic perfusion cartogram was created by averaging fluorescence signals over a 20–40-s video at a speed of 5–25 frames per second and by attributing a color code based on the slope intensity/time of each pixel. Each single pixel of the cartogram results from the average of multiple subsequent images*

We have computed and integrated in the software the **relationship between distance and fluorescence intensity**: **Figure 20** displays the experimental setting for distance-intensity relationship computation. A magnetic probe was secured to the tip of the Near-Infrared Laparoscope and a Planar Magnetic Field Generator was used to track spatial position and movements. The laparoscope was moved in and out alternatively while fixing the calibration tool. A distance-fluorescence intensity relationship was then computed and integrated in the FLuorescence-based Enhanced Reality software.

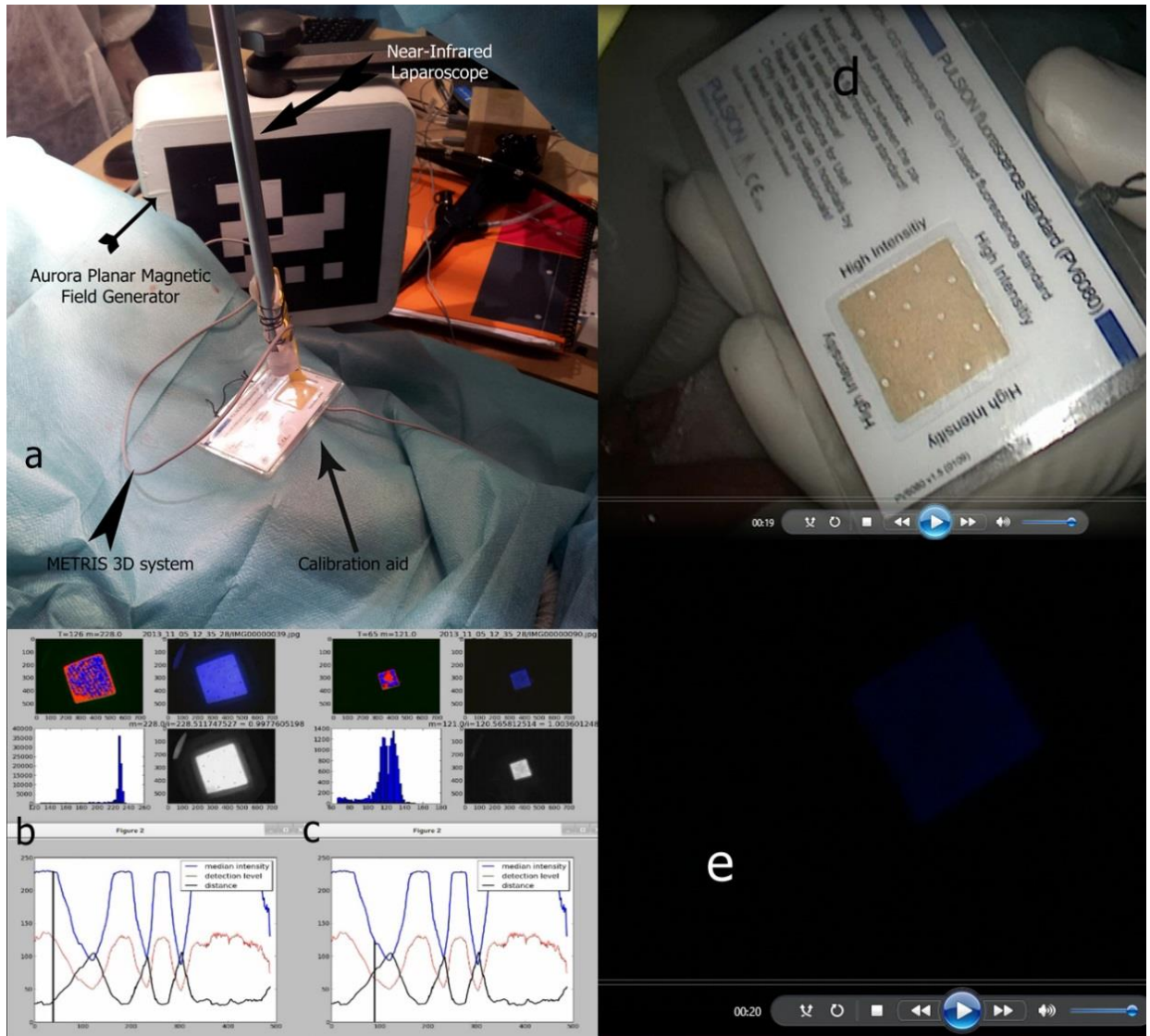
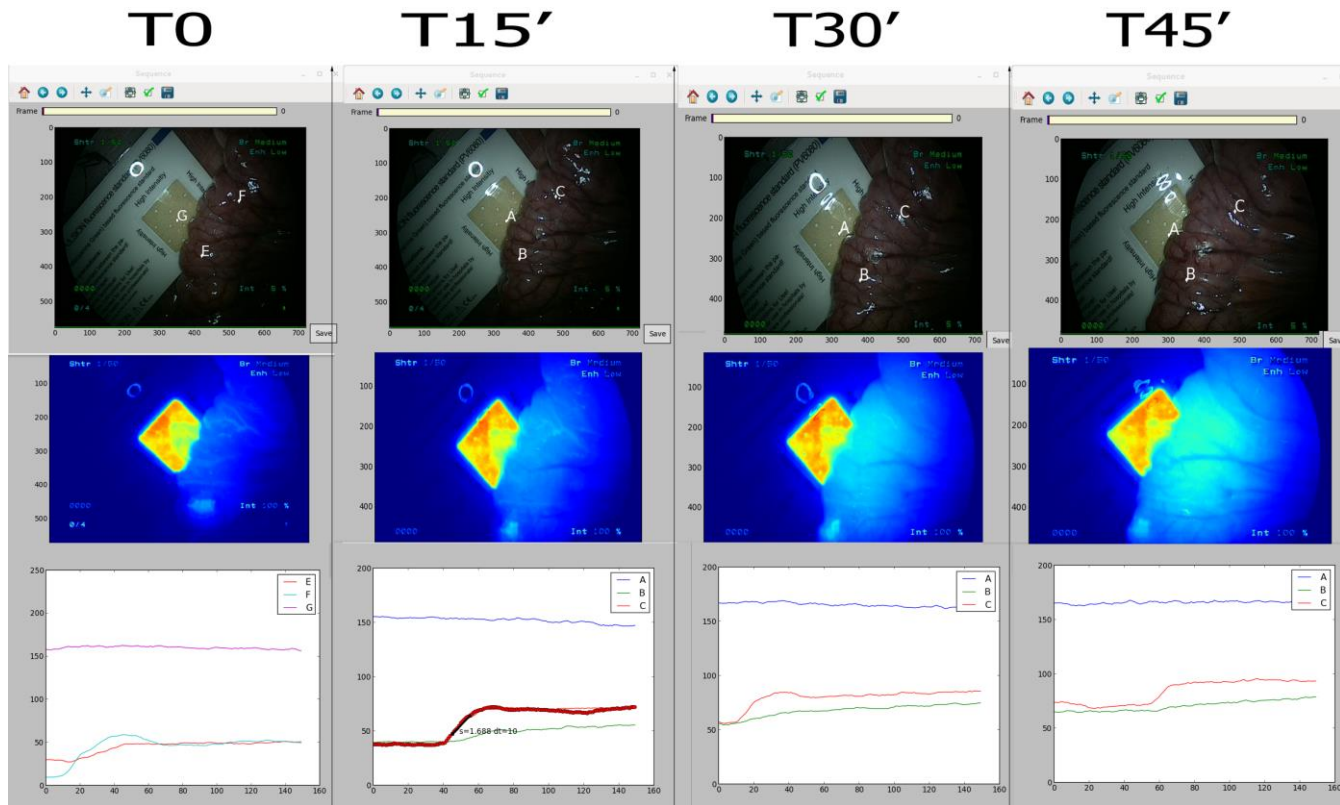


Figure 20 a) The METRIS 3D system is composed of a tube (1.2 meter long and 2.2mm in diameter) which fits into the operating channel of a conventional endoscope and contains seven 8 by 1mm miniature electromagnetic probes distributed on its length. Electromagnetic probes are tracked by a commercially available magnetic tracking system (Aurora, Northern Digital Inc, Waterloo, Ontario, Canada). To track the position of the D-Light P laparoscope and measure the distance between the tip of the scope and the fluorescence calibrating tool, the METRIS 3D system was attached onto the shaft of the laparoscope and a 2cm plastic tool was also fixed to establish a set distance. In b) and c) the inverse relationship between fluorescence intensity and distance is shown: the white square represents the “standard” response of the calibration tool when illuminated with the near-infrared laparoscope. The shorter the distance (black line), the higher the intensity (blue line). In d), the fluorescence calibration tool is shown in white light, and in e) the same image is shown after switching the D-Light P laparoscope to near-infrared mode.

Additionally, the perfusion analysis using time-to-peak allows for multiple injections of fluorophore as highlighted by the in-vivo pilot experiment displayed in **figure 21**



*Figure 21 Multiple intravenous injections of low dose of ICG and time-to-peak. Following repetitive injections, global fluorescence intensity at the same spot increases over time because of the accumulation of ICG. Using the “intensity” as a parameter of perfusion, repetitive doses might be interpreted wrongly as increased perfusion, which is not the case. However, the “steepness of the slope” given by the calculation of “time-to-peak” (RED LINE) remains constant over time and allows for repetitive calculations of perfusion cartography.*

The ER-PERFUSION SOFTWARE was developed from the first prototype to implement some specific features, which will be discussed further, as the development of a tracking algorithm to correctly register the virtual cartography position onto real laparoscopic images and compensate for motions [18].

### **ANALYTICS USED TO VALIDATE FLER**

To validate the concept of FLER, we have used various analytics to confirm that the dynamic computer-assisted interpretation of the fluorescent signal generated at the level of the bowel, is consistent with the biological changes occurring at the tissue level:

1) **Capillary lactates** measured with a lactate analyser on blood obtained by needle puncture of the bowel's wall. We have used the (EDGE® Apexbio, Taiwan; ROC), which is a handheld strip-based system, able to measure lactatemia on few microliters of blood in 45 seconds.

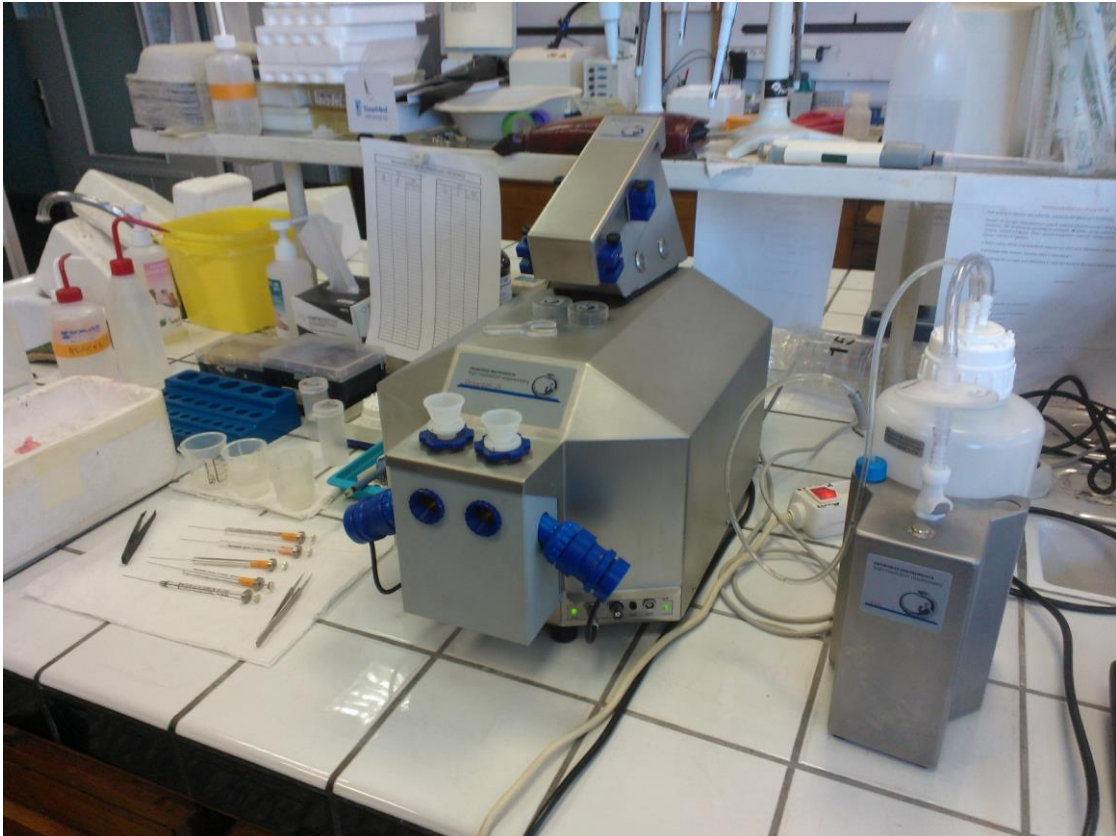
2) **Mitochondria respiratory rate** was measured as previously reported[117], on full-thickness biopsies taken at the ROI identified on the bowel by the FLER.

Immediately after surgical removal, intestinal biopsies were placed in Eppendorf tubes filled with S-Solution and covered with ice, for the transport to the laboratory (EA3072) for real-time analysis. The S-Solution (pH 7) preserves the metabolic activity and contains:

CaK2EGTA 2,77mM; K2EGTA 7,23mM (100nM of free Ca<sup>2+</sup>); MgCl<sub>2</sub> 6,56mM (1mM of free Mg<sup>2+</sup>); Imidazol 20mM; Taurine 20mM; Dihiothreitol 0,5mM; K-sulfonate of methane 50mM; Na<sub>2</sub>ATP 5,7mM and PCr 15mM. Biopsy were quickly cut into 5 pieces each (1-2 mm<sup>3</sup>) allowing mitochondria challenge within their cellular environment. The samples were placed in a 2 mL water-jacketed oxygraphic cell (Oxygraph-2k®, Oroboros instruments®, Innsbrück, Austria) equipped with a Clark electrode (**Figure 22**). After determination of basal oxygen consumption (**V<sub>0</sub>**), the maximal tissue respiration rates were measured at 37°C under continuous stirring in the presence of saturating amount of ADP as phosphate acceptor (**V<sub>max</sub>**). Once **V<sub>max</sub>** has been recorded, electron flow goes through complexes I, III and IV, because of the presence of glutamate (5 mmol/L) and malate (2 mmol/L). Complex I was then blocked with amytal (0.02 mmol/L) and complex II was stimulated with succinate (25 mmol/L). In this condition, mitochondrial respiration is evaluated by complexes II, III, IV (**V<sub>Succ</sub>**). Finally, N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride (TMPD, 0,5 mmol/L) and ascorbate (0,5 mmol/L) were added as an artificial electron donor to cytochrome c. So, cytochrome c oxidase (complex IV) is studied as an isolated step of respiratory chain (**V<sub>tmpd</sub>**). Activated complexes: V<sub>0</sub> (I); VADP (I, III, IV); VAMYTAL (II, III, IV); VMAX (I, II, III, IV); VTMPD (IV). Required substrate: V<sub>0</sub> (glutamate, malate); VADP (adenosine-diphosphate);

VAMYTAL (amytal, inhibitor of complex I); VMAX (succinate, stimulator of complex II); VTMPD (tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride and ascorbate, electron donors for complex IV, cytochrome C oxidase).

After the experiments, tissues were harvested and dried (15 min at 150°C) and respiration rates were expressed as pmol of Oxygen/second/mg of dry weight.



*Figure 226 Oxygraph-2k OROBOROS Instruments, Innsbruck, Austria).*

3) **Metabolomics** (or metabonomics) measurement: there are two main techniques to analyze the metabolome: Mass Spectroscopy (MS) and Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy. NMR spectroscopy is rapid, cost-effective, non-selective (i.e., it removes bias for a specific molecule), and sample preparation requires minimal manipulation and gives metabolic information on intact biological tissues. All in all, the principle of NMR spectroscopy is similar to the MR imaging process. The sample is placed into a magnetic field that aligns molecular nuclear spins. The application of a radiofrequency pulse enhances the energy level

by inverting spin orientation, and the magnetization of the sample is deflected away from the magnetic field. Switching off the radiofrequency pulse allows the spins to relax to the original and stable energy level. This modification produces a detectable NMR signal that can be analyzed. Each molecule is identified by a series of spikes in the spectrum and the area under the peak is proportional to the concentration. The NMR spectrum of most metabolites has been analyzed and new spectra may be extrapolated on the basis of the available metabolic fingerprints. NMR spectroscopy has been used to characterize malignant tissues [146, 147]. Our laboratory of membrane physics reported on the usefulness of metabonomic profiling to determine the adequacy of lung transplant [148].

Magnetic Resonance Spectroscopy, was performed on the same full-thickness surgical biopsies taken at the ROI, as determined by the FLER. Biopsies were immediately snapped frozen in liquid nitrogen to stop any metabolic activity and sent for Magnetic Resonance Spectroscopy. High-Resolution Magic-Angle Spinning (HRMAS) spectra were recorded on a Bruker Advance III 500 spectrometer (Bruker Biospin, Fällanden, Switzerland) operating at a proton frequency of 500.13 MHz (**Figure 23**). The spectrometer is equipped with a 4 mm double resonance ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) gradient HRMAS probe. A Bruker Cooling Unit regulates the temperature at  $4^\circ\text{C}$ . All Nuclear Magnetic Resonance (NMR) experiments were conducted on samples spinning at 3502 Hz. For each biopsy sample, a 1D  $^1\text{H}$  spectrum using a Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) pulse sequence was acquired as previously reported [149]. Metabolites were quantified using the 1D CPMG spectra. Spectra were normalized according to each sample weight and calibrated using the signal intensity of a reference solution containing a known amount of lactate. Peak area integration was used to calculate the concentration. For our experiments, only peaks that were well resolved in 1D CPMG spectra were quantified using MatLab R2010 (MathWorks, France).



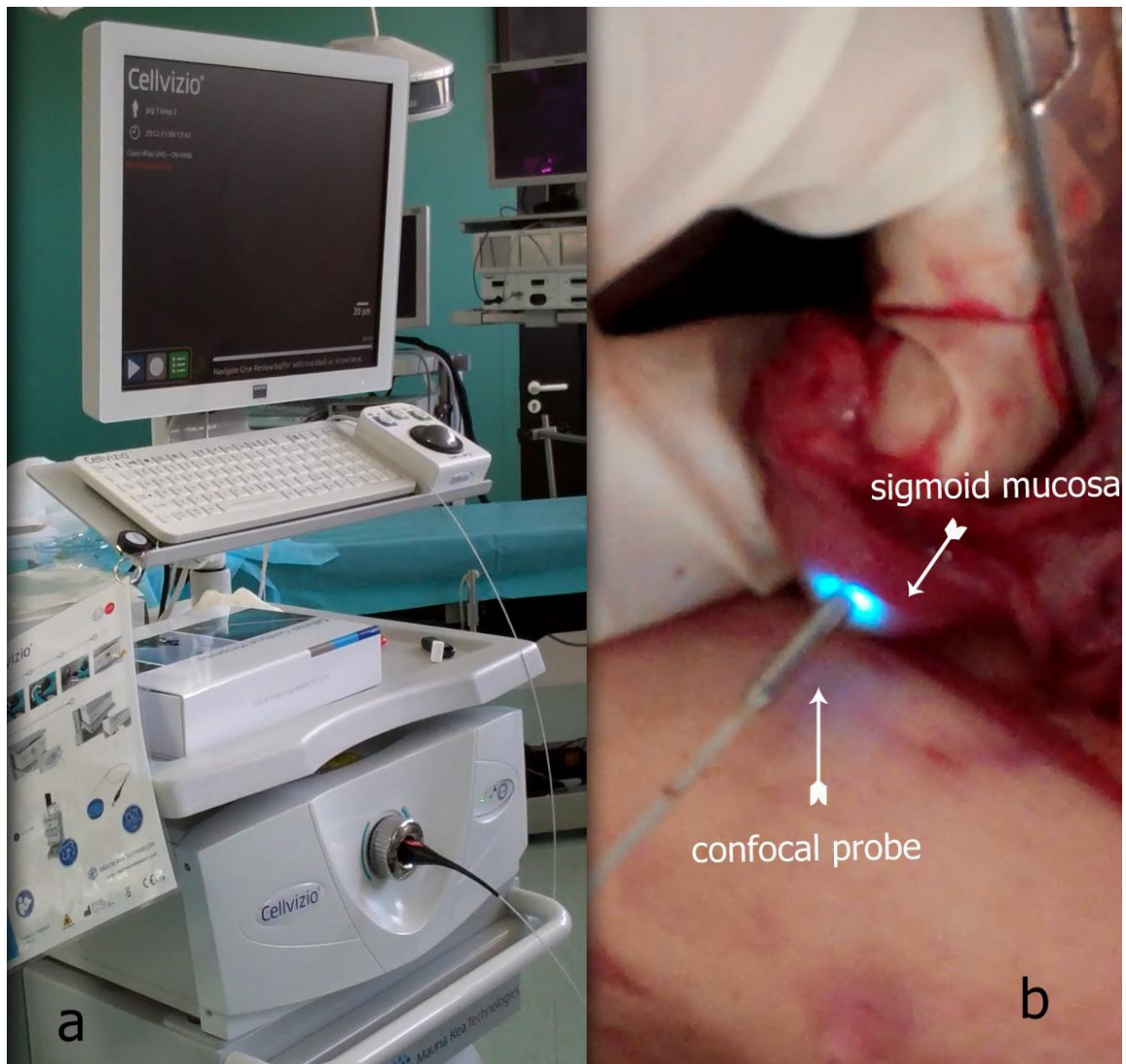


*Figure 23 Spectrometer Bruker Advance III 500 (Bruker Biospin, Fallanden, Switzerland).*

4) **Confocal Laser Endomicroscopy (CLE)** was also performed at the ischemic and perfused areas of the bowel according to the FLER or clinical evaluation. CLE is a high-resolution microscopic imaging modality with selective depth of focus. CLE allows for real-time histology for in vivo assessment of inflammatory or neoplastic diseases through the use of fluorescent dyes. Confocal images of intestinal mucosa can inform on the microcirculation giving capillary density or the circulating blood cells velocity and on the morphology of intestinal villi demonstrating changes due to the ischemic injury. We have used the **CellVizio® (Mauna Kea**

**Technology, Paris, France**), which is a CLE system which can be inserted into the operative channel of the majority of standard flexible endoscopes (probe-based CLE = pCLE) or through 19G needles (needle-based CLE = nCLE) (**Figure 24**). The minimally invasive probes (**Gastroflex™, Coloflex™** etc) of varying diameters (300 µm - 4.2 mm) are compatible with either 488 nm or 660 nm Mauna Kea Laser Scanning Units. CellVizio® received FDA approval for various applications, including, very recently, for minimally-invasive surgery.

**5) Conventional histology and ischemia score:** Specimens were fixed in 4% buffered formalin for at least 24 hours. Sections (4µm thick) were cut from paraffin-embedded tissues and stained with hematoxylin and eosin. Six sections per biopsy were analyzed. A standardized semi-quantitative histology score to evaluate ischemia was applied by a blinded pathologist to conventional histology and confocal imaging. The score was made up as follows: 0 = normal mucosa; 1 = partial epithelial edema and necrosis; 2 = diffuse swelling and necrosis of epithelium; 3 = necrosis with submucosal neutrophil infiltration; 4 = widespread necrosis and massive neutrophil infiltration and bleeding. The pathologist was blinded to confocal digital video sequencing of ROIs.



*Figure 24 A) CELLVIZIO® Confocal Laser Endomicroscopy unit; B) the confocal probe applied directly on the sigmoid mucosa*

## STATISTICS

Statistical analysis was performed using the GraphPad Prism Software. ANOVA followed by a Dunnet's multiple comparison test were performed to compare the ischemic zone to future resection lines and vascularized areas. A Student's t test was used to calculate p values for continuous variables. A p value  $<0.05$  was considered statistically significant. Fisher's exact test was used to calculate *P* values for categorical variables.

## **ETHICS AND ANIMAL MODELS**

This experimental study (Protocol No. 38.2012.01.039), received full approval by the local Ethical Committee on Animal Experimentation (ICOMETH n°38). All animals used in the experimental laboratory were managed according to the ARRIVE guidelines[150], French laws for animal use and care as well as directives of the European Community Council (2010/63/EU). Pigs were fasted for 24 hours before surgery with free access to water. Premedication by intramuscular injection of ketamine (20mg/kg) and azaperone (2mg/kg) (Stresnil; Janssen-Cilag, Belgium) was administered 10 minutes before surgery. Induction was achieved by intravenous propofol (3mg/kg) combined with pancuronium (0.2mg/kg), replaced since 2014 by rocuronium (0.8 mg/kg). Anaesthesia was maintained with 2% isoflurane. To prevent hypothermia, warming blankets were placed below the animals. At the end of the protocol, animals were sacrificed according to our protocol with an intravenous injection of a lethal dose of potassium chloride.

A total of 37 pigs (*Sus Scrofa domesticus*, ssp. Large White), were involved in this study.

Five additional pigs were necessary and an additional experimental protocol had to be filed (Protocol No. 38.2014.01.064), which received full approval by the Institutional Ethical Committee on Animal Experimentation and by the French Ministry for Superior Education and Research (MESR), reference n° 04297.01, working package COMPRESS (COncfocal Microscopy PeRfusion Evaluation of Stoma during Shock).

In-vivo experimental steps, in porcine models of ischemia and/or hypoperfusion, were as follows:

- 1) Proof of the concept of metabolic guided resection in open surgery model of small bowel ischemia (n=6) [12]

- 2) Proof of the concept of the use of confocal Endomicroscopy to appreciate bowel perfusion (this analysis was performed on the same pigs on both small bowel (unpublished) and sigmoid [13]).
- 3) Proof of the concept of FLER in laparoscopic model of small bowel ischemia [11, 14] (n=6)
- 4) Performance of FLER vs. Clinical judgment, in a laparoscopic model of sigmoid ischemia [16] (n=6)
- 5) Performance of FLER vs. Clinical evaluation in long-lasting laparoscopic model of small bowel ischemia [15] (n=6)
- 6) Accuracy of FLER in a survival model of laparoscopic small bowel resection and anastomosis using updated version of the software [17] (n=13)
- 7) Evaluation of the stoma perfusion in a hemorrhagic shock model by confocal Endomicroscopy (n=5).

### **STUDY 1 Metabolism-guided bowel resection: potential role and accuracy of instant capillary lactates to identify the optimal resection site**

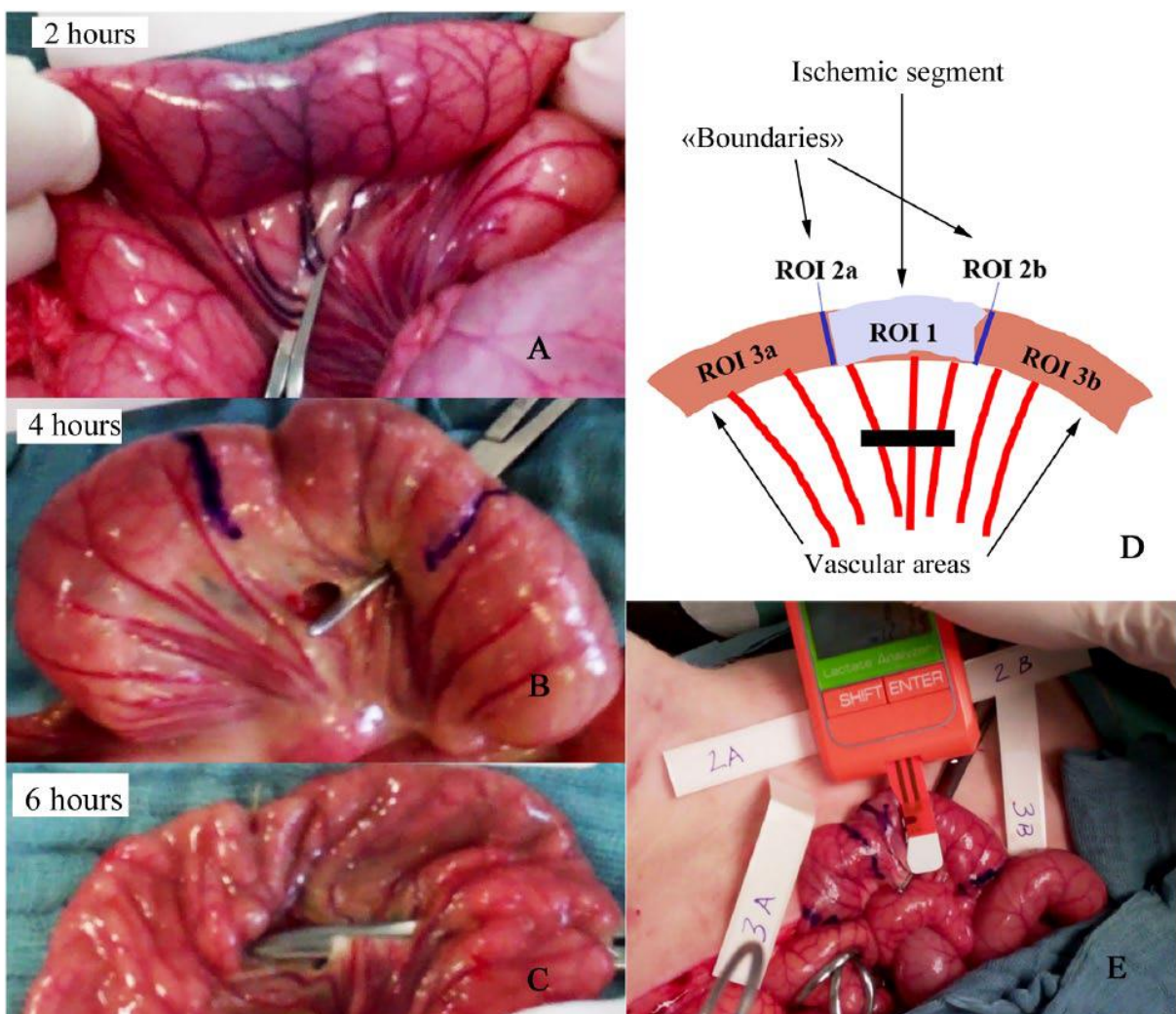
The aim of this study was to evaluate the performance of the biochemical markers of perfusion which were planned to be used as validating tool in subsequent experiments. This step was performed in an open surgical model of small bowel ischemia (**Figure 25**).

A venous central catheter was placed in the jugular vein, and an invasive arterial line was placed in the contralateral carotid artery for continuous invasive pressure registration.

In 6 pigs (mean weight  $30.2 \pm 3.1$  kg), a 3- to 4-cm ischemic segment was created in 6 small bowel loops (total = 36 loops) by clamping the vascular supply, for a duration of 1 to 6 hours. Hourly, 5 blood samples were obtained by puncturing the serosa, and lactates were measured using the EDGE® handheld analyzer. Samples were made at the following regions of interest (ROIs): center of the ischemic area (1), proximal and distal clinical margins of resection (2a-

2b), and vascularized zones (3a-3b). Every hour, surgical biopsies of ROIs were sampled. Activity of bowel mitochondria complexes was measured after 1, 3, and 5 hours of ischemia. Quantification of metabolites was performed on all samples (total N = 180).

Every hour, a blood gas analysis was performed on blood samples withdrawn from the carotid artery and the jugular vein, respectively. At the same time points, capillary lactates were measured using the EDGE analyzer, on blood drops obtained by puncturing the pig's groin (supposed to reflect systemic lactatemia) and by puncturing bowel serosa at the ROIs to measure local intestinal lactatemia

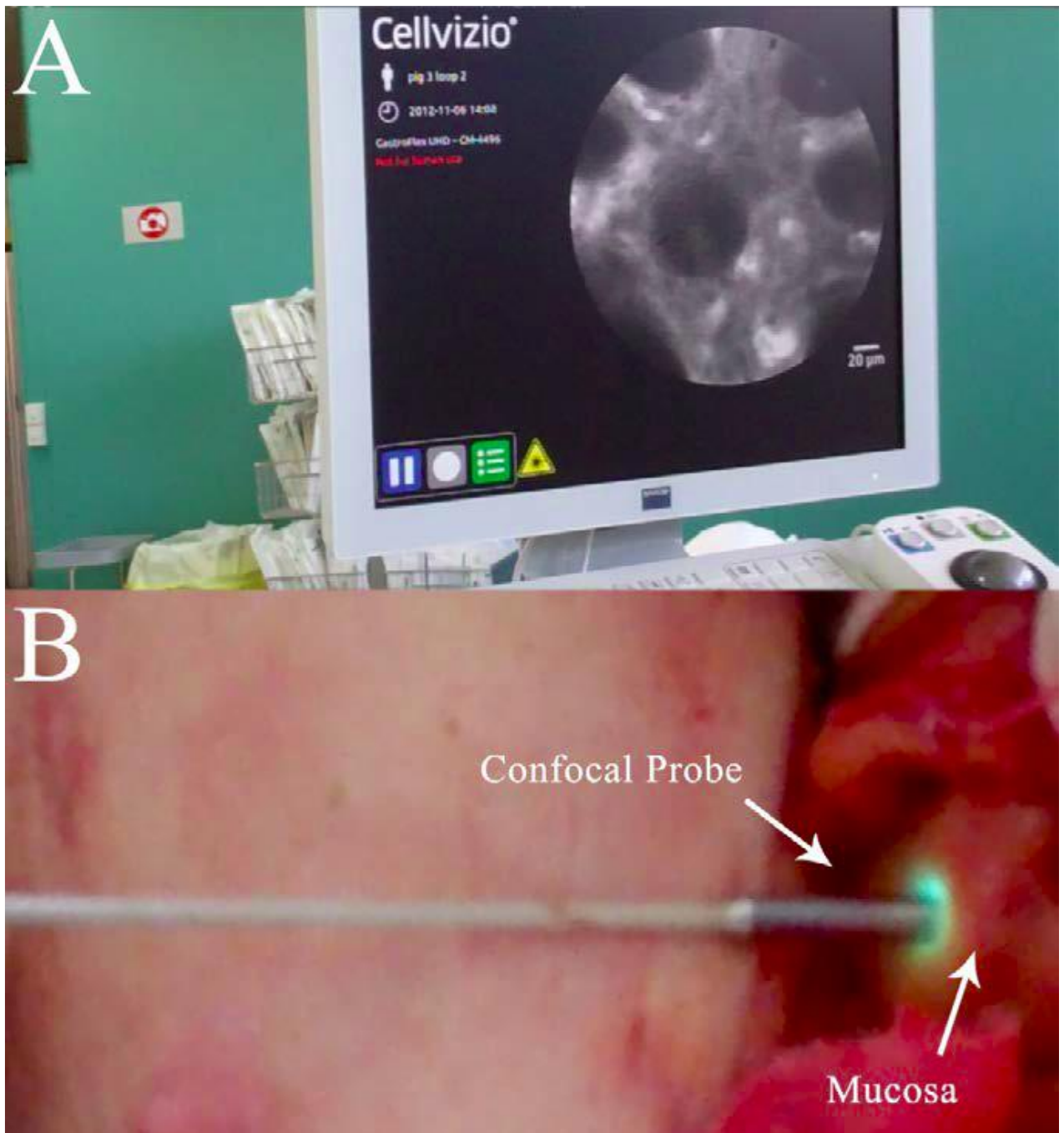


*Figure 25 Schema of intestinal regions of interest (ROIs). Visual aspect of small bowel loops after 2 hours (A), 4 hours (B), and 6 hours (C) of ischemia. Based on the discolored “bluish” aspect of the serosa, 5 ROIs were visually identified as the ischemic zone (ROI 1), margins of*

*resection (ROIs 2a-2b, “boundaries”), and normally vascularized (ROIs 3a-3b) zones (D). Capillary lactates were analyzed using the EDGE lactate analyzer (E).*

## **STUDY 2 Functional Capillary Density for in vivo estimation of intestinal perfusion using real-time Confocal Endomicroscopy**

The aim of this pilot study was to evaluate CLE scanning complemented by functional capillary density area (FCD-A) estimation to define the micro-vessel status in a reiterate, long-lasting porcine model of bowel ischemia. A laparotomy was performed in 4 pigs, and a segmental (3–4 cm) ischemia of the sigmoid colon was induced with vascular clamps. Ischemic and perfused regions were clinically defined. After an injection of 5 ml of sodium fluorescein 10% (Fluocyne, SERB, Paris, France), the Cellvizio™ confocal probe (Mauna Kea Technologies, Paris, France) was directly applied onto the mucosa’s surface through a full-thickness enterotomy (**Figure 26**). Both ischemic area (IA) and control region-perfused area (PA) – were scanned and video sequences were recorded.



*Figure 267 Probe-based Confocal Laser Endomicroscopy (pCLE). A) Cellvizio™ monitor showing perfused sigmoid mucosa. B) The Cellvizio™ pCLE Gastroflex UHD was applied directly onto the sigmoid mucosa through full-thickness enterotomies.*



### **STUDY 3 Proof of the concept of fluorescence-based enhanced reality**

The proof of the concept of FLER, using a prototype version of the software, has been established in an experimental study involving 6 pigs, in a laparoscopic model of mesenteric ischemia. FLER was feasible and displayed a high accuracy to detect areas of the bowel in which the perfusion was compromised.

A small bowel loop was exposed, and 3 to 4 mesenteric vessels were clipped in 6 pigs. Indocyanine green (ICG) was administered intravenously 15 minutes later. The bowel was illuminated with an incoherent light source laparoscope (D-light-P, KarlStorz). The ICG fluorescence signal was analyzed with Ad Hoc imaging software (VR-RENDER), which provides a digital perfusion cartography that was superimposed to the intraoperative laparoscopic image [augmented reality (AR) synthesis] (**Figures 27 & 28**). Five regions of interest (ROIs) were marked under AR guidance (1, 2a-2b, 3a-3b corresponding to the ischemic, marginal, and vascularized zones, respectively). One hour later, capillary blood samples were obtained by puncturing the bowel serosa at the identified ROIs and lactates were measured using the EDGE analyzer. A surgical biopsy of each intestinal ROI was sent for mitochondrial respiratory rate assessment and for metabolites quantification. (Video Clip in digital version).

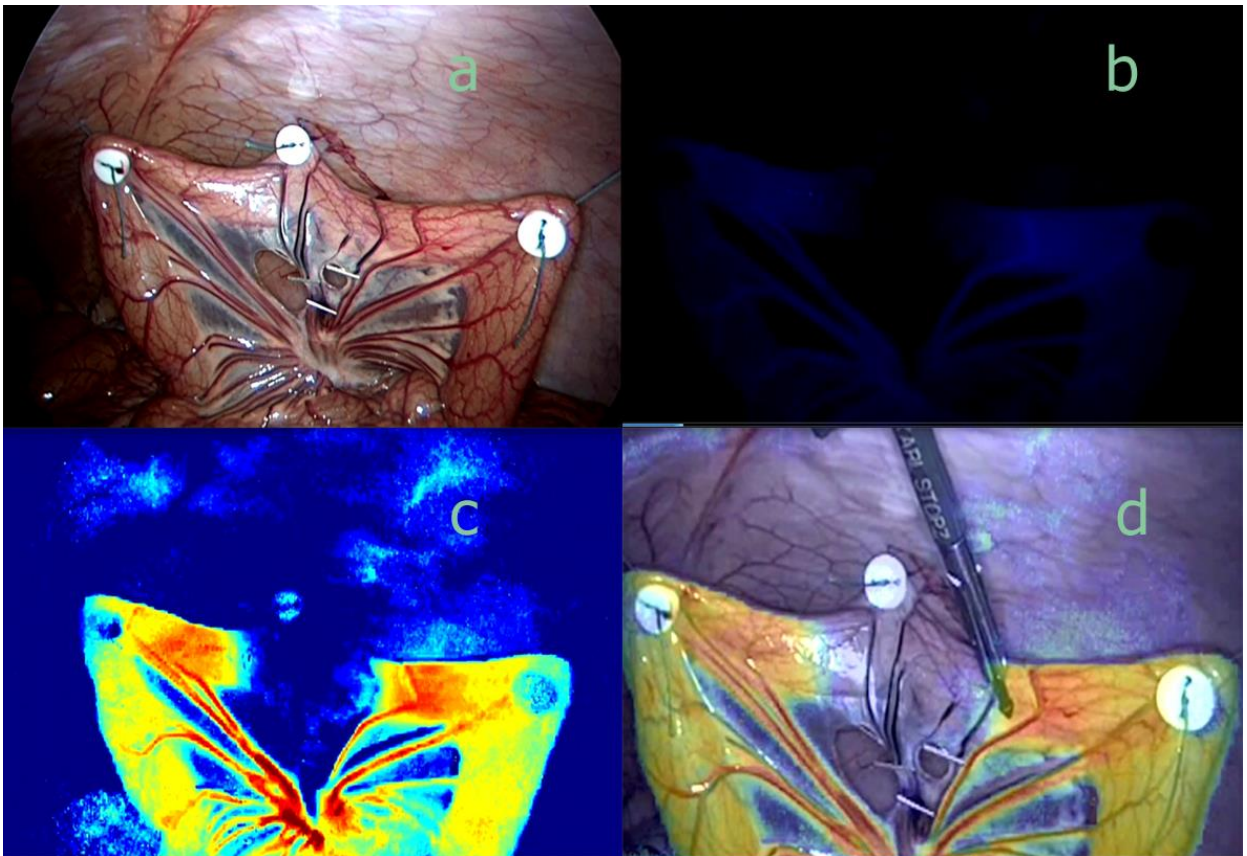


Figure 27 Intraoperative estimation of bowel perfusion by FLER. A) An ischemic segmented is created into a small bowel loop. B) After injection of ICG, the D-Light P (Karl Storz) is switched to NIR mode to capture the fluorescence signal. C) The ER-PERFUSION software reconstructs the video recorded into a perfusion cartography based on the time-to-peak of fluorescence. D) The virtual model of perfusion is overlapped onto real-time laparoscopic images and the perfusion boundaries displayed by FLER are marked by Augmented Reality using a surgical marker.

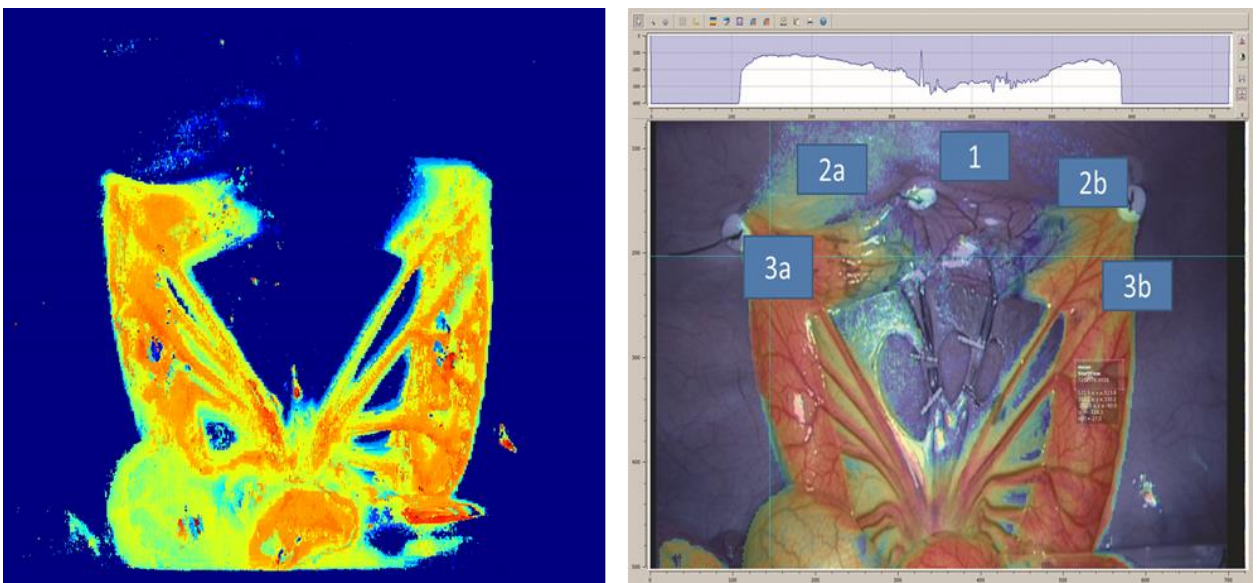


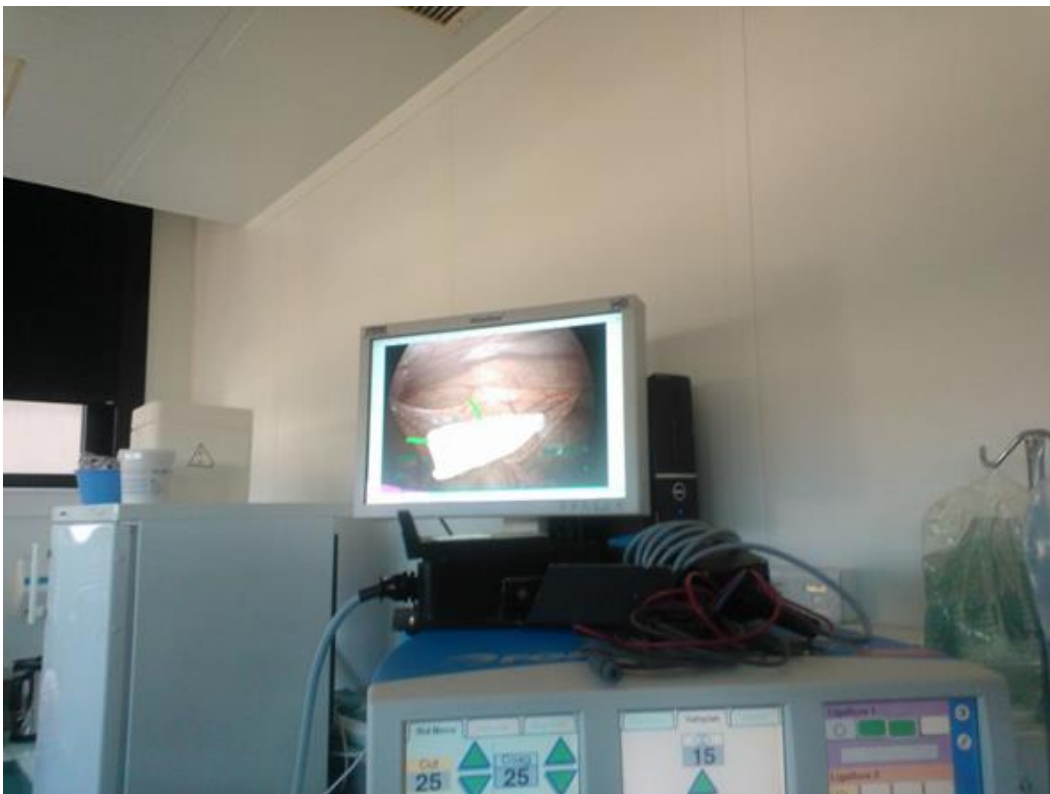
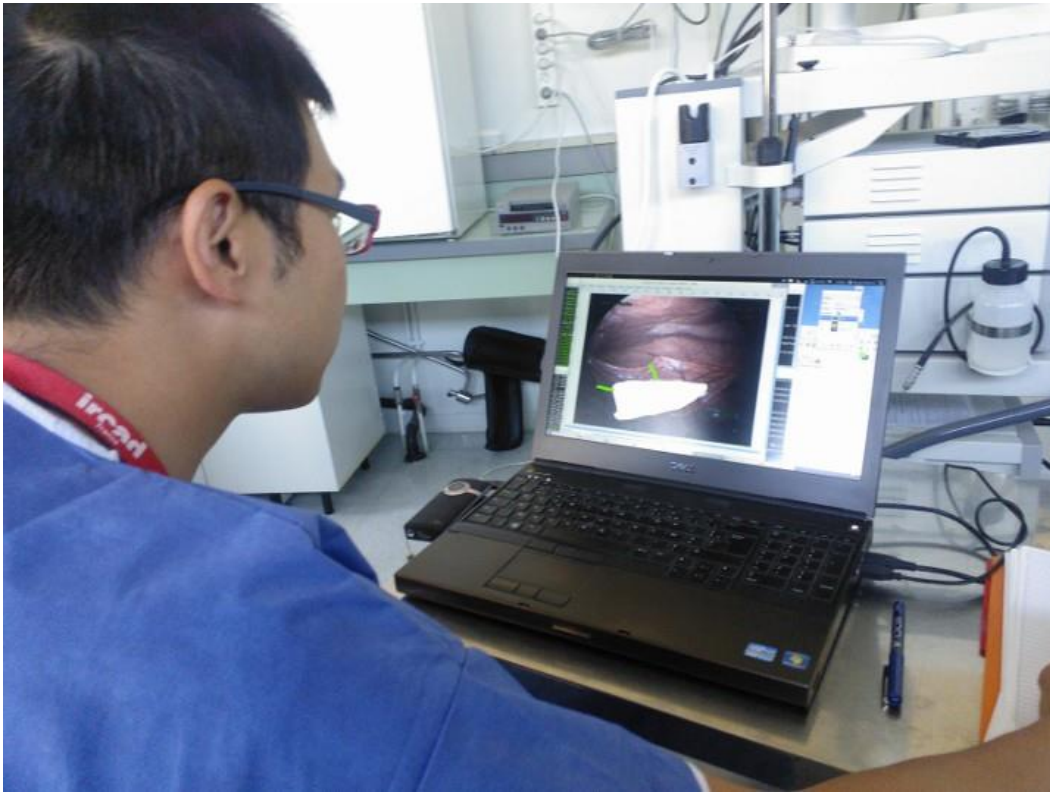
Figure 28 Virtual Perfusion Cartography of an ischemic segment of small bowel. The perfusion map is obtained by real-time computing of the « Fluorescence time-to-peak ». Five regions of interest can be identified by the virtual perfusion cartography: ROI1 = ischemic segment, ROI

*2a and 2b = future resection lines and ROI 3a and 3b = vascularized areas. In the proof of the concept the software was set to recognize areas (2a and 2b) in which the perfusion dropped at least by 50% when compared to the vascularized control areas (3a and 3b).*

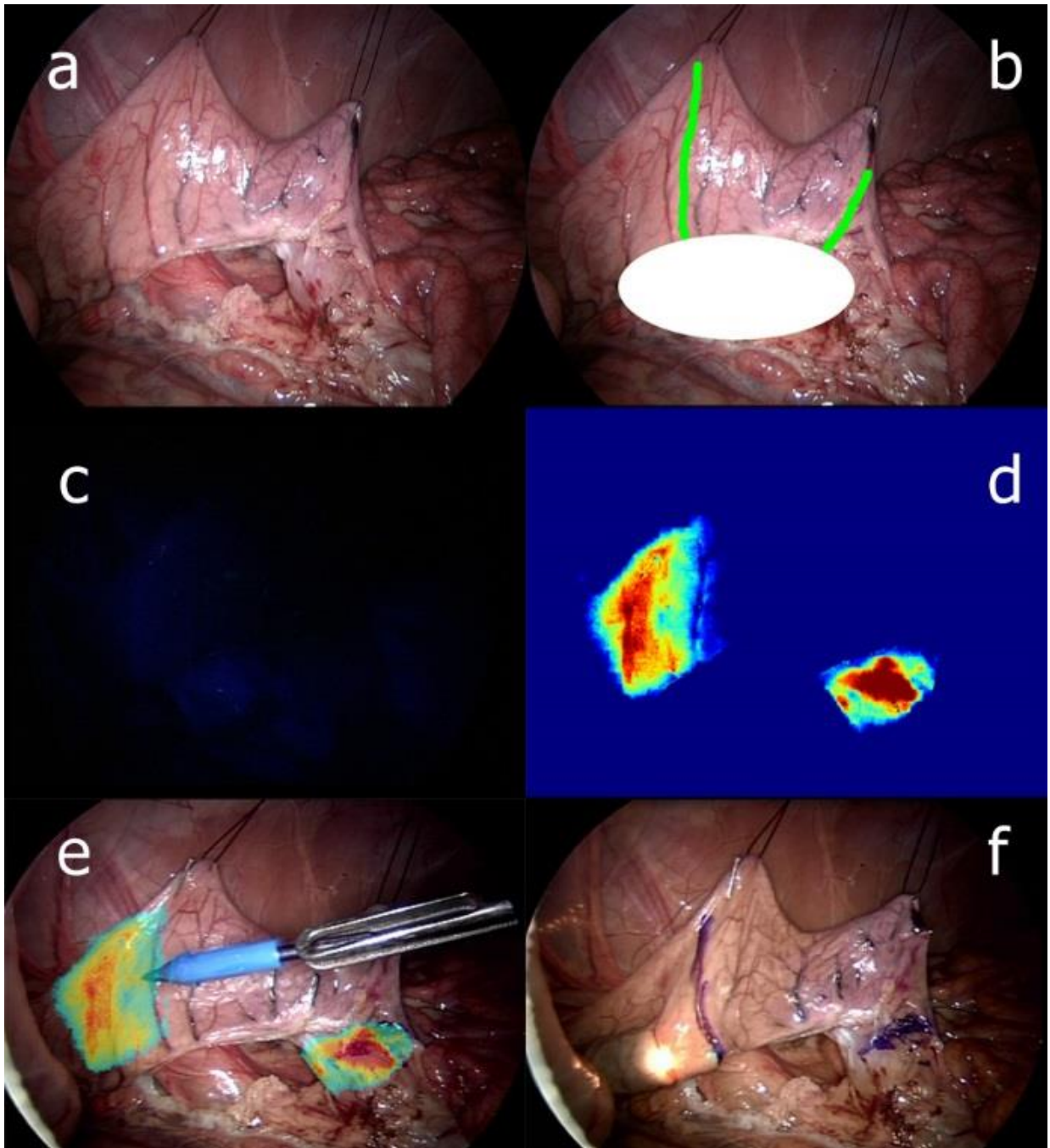
#### **STUDY 4 Performance of FLER vs. Clinical judgment in a laparoscopic model of sigmoid ischemia**

The next step in the development of FLER, was to evaluate the clinical impact of the technology when compared to the clinical assessment. In a segmental sigmoid ischemia model we could prove that FLER is superior to clinical evaluation, and this was confirmed by biological markers (capillary lactates) and by Confocal Endomicroscopy (Cellvizio)[16]

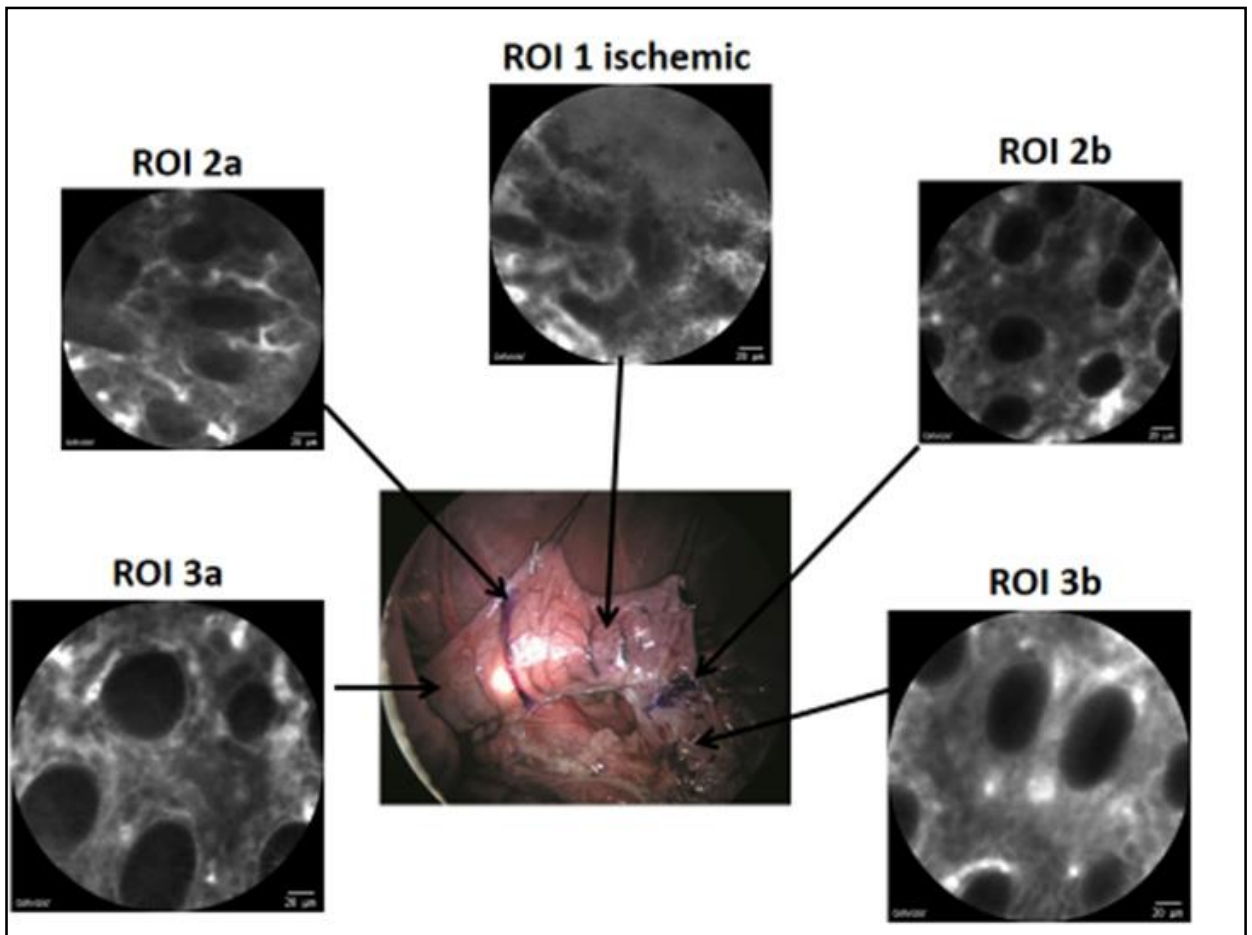
Six pigs underwent 1-h sigmoid segmental ischemia. The ischemic area was evaluated by clinical assessment (**A surgeon blinded to the extent of the mesenteric window was looking on a laptop to the surgical field and delimited the resection lines: FIGURE 29**) and FLER to determine presumed viable margins. For each sigmoid colon, 5 regions of interest (ROIs) were identified: ischemic (ROI 1), presumed viable margins ROI 2a (distal) and 2b (proximal), and vascular areas 3a (distal) and 3b (proximal) (**FIGURE 30**). After injection of fluorescein, CLE scanning of the mucosa from the ischemic area toward viable margins was performed (**FIGURE 31**). Capillary blood samples were obtained by puncturing the serosa at the ROIs, and capillary lactates were measured with the EDGE<sup>®</sup> analyzer.



*Figure 29 Clinical evaluation performed by a second surgeon, based on the color of the serosa and blinded to the extent of the mesenteric window. The presumed resection lines according to the clinical evaluation were marked with the mouse on the laptop and transferred as augmented reality on the laparoscopic screen*



*Figure 30 a) Sigmoid loop suspended to the abdominal wall; b) Blinded clinical evaluation of resection lines (green): the window in the mesentery was hidden by overlapping a white spot and surgeons drew two resection lines on a PC monitor. They placed two clips on the corresponding lines projected onto the operating monitor; c) fluorescence signal as seen in near-infrared mode after injection of Indocyanine Green; d) Virtual perfusion cartography obtained with image analyzer software (VR-RENDER® PERFUSION); e) Enhanced Reality obtained by overlapping the virtual cartography onto real-time laparoscopic images: resection lines (2a= distal and 2b= proximal) are outlined with a surgical marker; f) the confocal probe analyzes the resection line 2a according to FLER.*

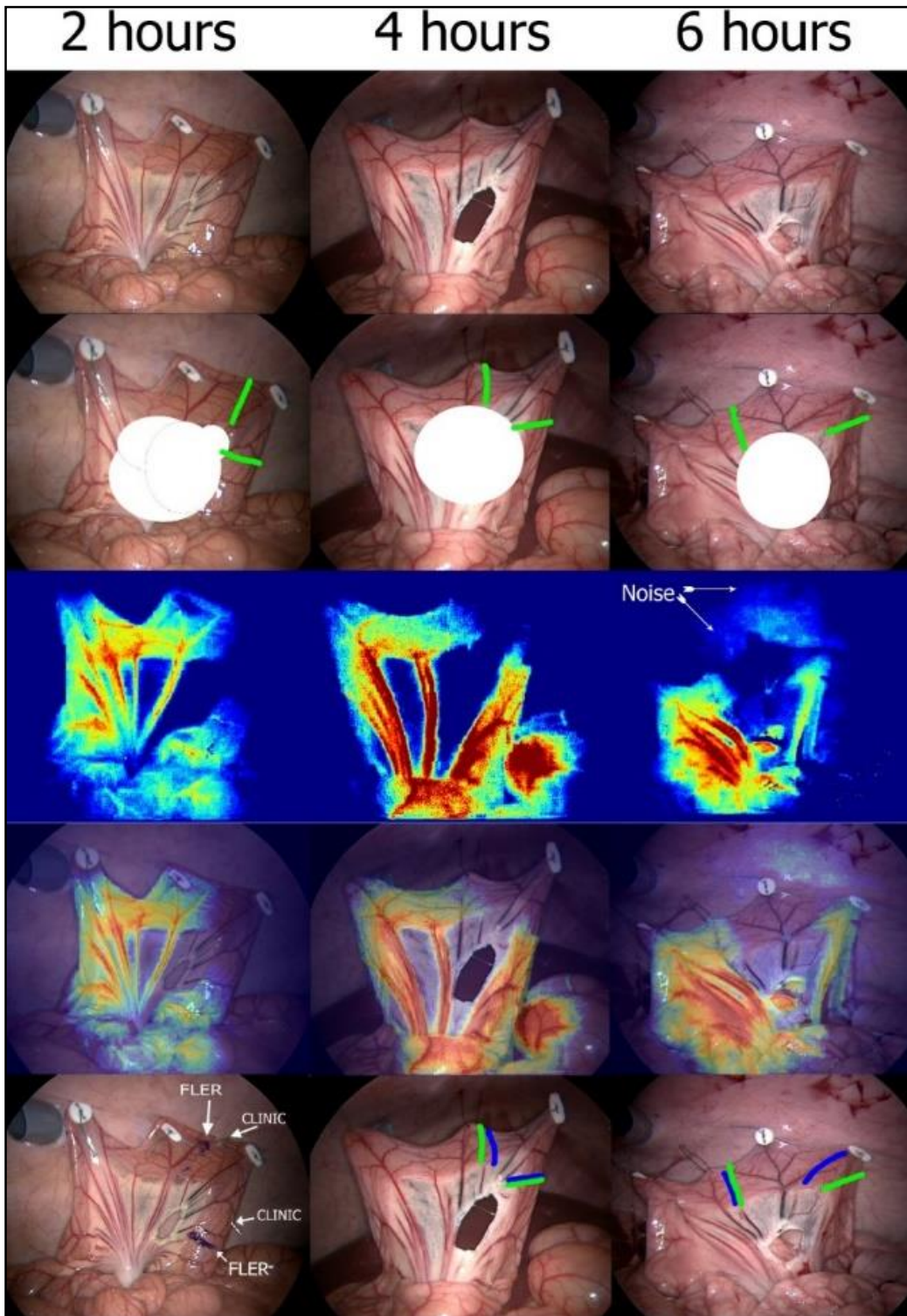


*Figure 31 Cellvizio® probe scanning of the intestinal mucosa was made following the lines drawn on the intestinal wall according to FLER (marked with surgical marker) and clinical evaluation (marked with clips) based on the serosal aspect. Digital videos of confocal scanning were recorded moving from the center of the ischemic ROI (ROI center) towards presumed viable margins and vascular areas first distally (2a and 3a) and then proximally (2b and 3b).*

### **STUDY 5 Real-time navigation by fluorescence-based enhanced reality for precise estimation of future anastomotic site in digestive surgery**

The next question was to evaluate robustness of FLER and specifically if FLER holds a clinical interest in long lasting ischemia time, when the serosa colour becomes more markedly bluish and the clinical ability to detect hypoperfused areas increases exponentially. Again, in this model including 6 animals and 18 small bowel ischemic loops, FLER has shown a superior performance when compared to clinical assessment, particularly after 4h of ischemia, as confirmed by robust biomarkers such as mitochondria respiratory rate. An ischemic segment was created in 18 small bowel loops in 6 pigs. After 2 h (n = 6), 4 h (n = 6), and 6 h (n = 6),

loops were evaluated clinically and by FLER to delineate five regions of interest (ROIs): ischemic zone (ROI 1), presumed viable margins (ROI 2a-2b), and vascularized areas (3a-3b) (**FIGURE 32**). Capillary lactates were measured to compare clinical vs. FLER assessment. Basal ( $V_0$ ) and maximal ( $V_{max}$ ) mitochondrial respiration rates were determined according to FLER.



**Figure 328** *First row: 3 bowel loops were exposed and an ischemic segment was created sealing some mesenteric vessels using the LigaSure™ vessel-sealing device. Second row: blinded clinical evaluation after 2, 4 and 6 h of ischemia. Third row: a virtual perfusion cartography was generated by the ER PERFUSION software based on time-to-peak fluorescence signals (in seconds) recorded with the D-Light-P (Karl Storz, Tuttlingen, Germany). Fourth row: FLER was obtained by superimposing the virtual perfusion cartography onto the screen. Fifth row: resection lines identified by FLER were marked with a surgical pen (over the blue lines) while those identified by the clinic were marked with a surgical clip (over the green lines).*

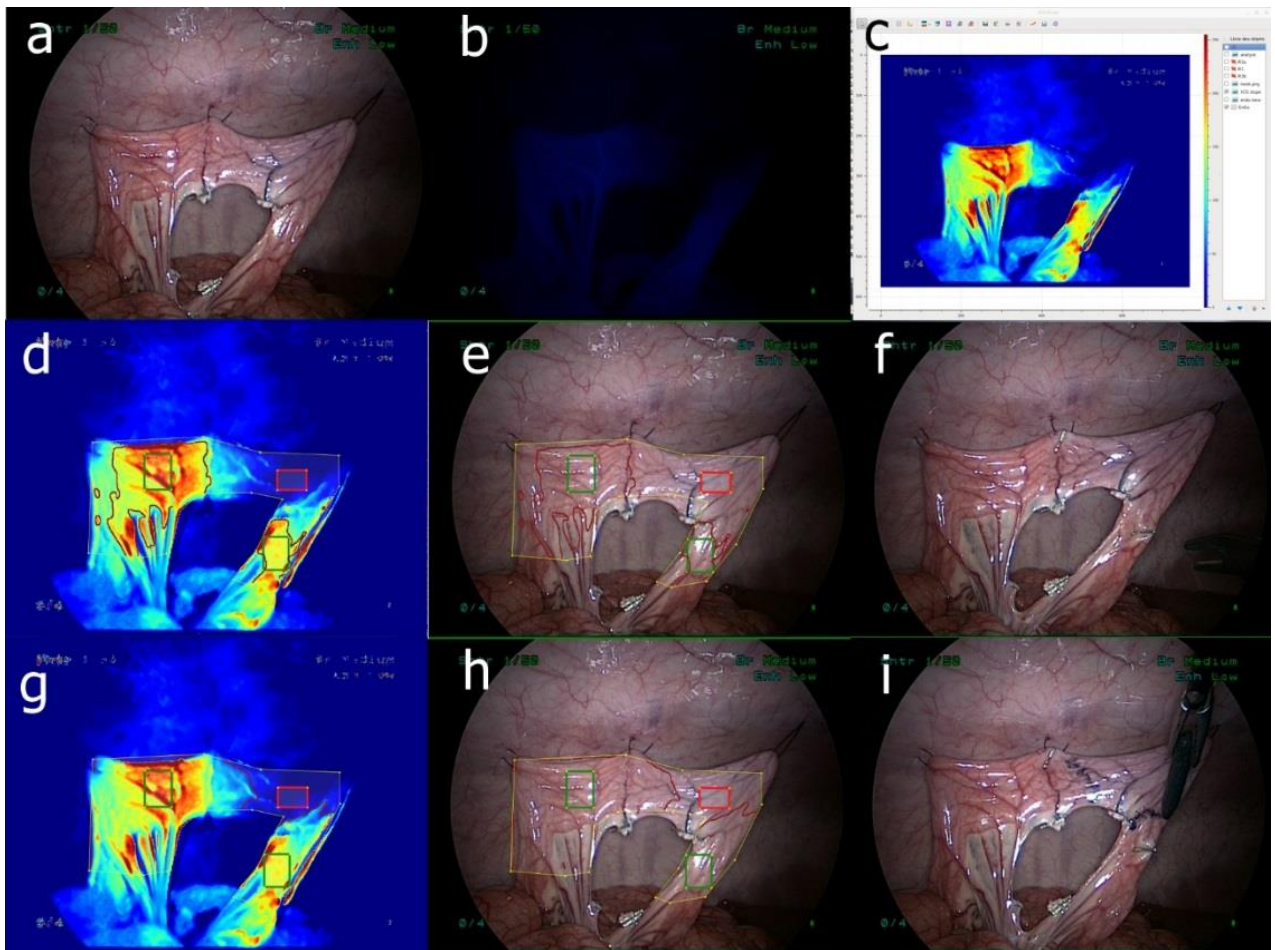
**STUDY 6** Intraoperative fluorescence-based enhanced reality laparoscopic real-time imaging to assess bowel perfusion at the anastomotic site in an experimental model.

In the first generation, the ER-PERFUSION software could display perfusion cartography as a colour-code. Recently, the software has been improved to display on the laparoscopic screen only the future resection lines superimposed to the bowel, according to predetermined degrees of perfusion. We aimed to assess the accuracy of the FLER system to detect differences in perfusion ranging from 25 to 75% in a survival model of laparoscopic small bowel mesenteric ischemia. (**Figure 33**)

This experimental study demonstrates the accuracy of FLER in detecting differences in bowel perfusion in a survival model of laparoscopic small bowel resection-anastomosis, based on biochemical and histopathological data [17].

A small bowel ischaemic segment was created laparoscopically in 13 pigs. Animals were allocated to having anastomoses performed at either low perfusion (25 per cent; n = 7) or high perfusion (75 per cent; n = 6), as determined by FLER analysis. Capillary lactate levels were measured in blood samples obtained by serosal puncturing in the ischaemic area, resection lines and vascularized areas. Pathological inflammation scoring of the anastomosis was carried out.



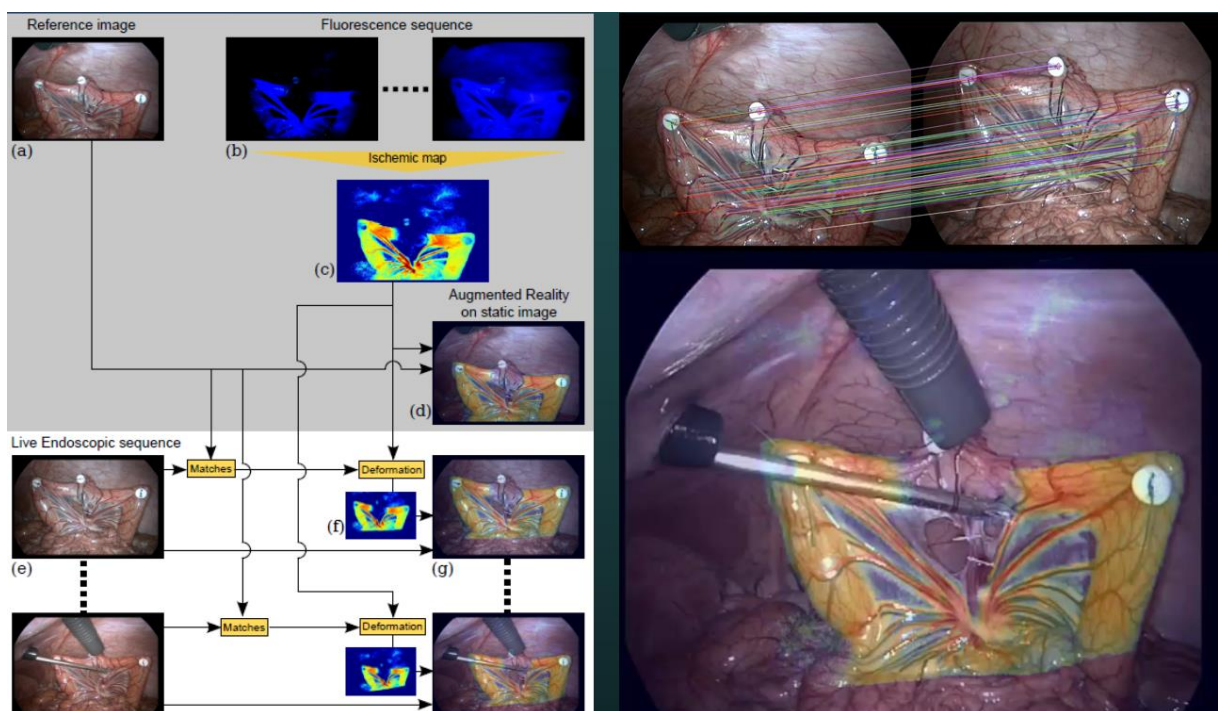


**Figure 33 Fluorescence-based Enhanced Reality: determination of bowel perfusion level.** Example from an experimental subject allocated to the 25% group: a) Ischemic segment created in a small bowel loop; b) near-infrared visualization of Indocyanine Green fluorescence; c) the ER-PERFUSION software analyzed the fluorescence signal and generated virtual perfusion cartography based on fluorescence time-to-peak; d) color code virtual perfusion cartography at 75%; e) resection lines at 75% (black arrows) displayed onto the laparoscopic screen, obtaining enhanced reality; f) resection lines at 75% marked with a surgical clip; g) color code cartography at 25%; h) resection lines at 25% (white arrows) superimposed on laparoscopic images, and i) marked with a surgical marker.

## STUDY 7: Ability to register the virtual perfusion cartography in moving organs

One of the fundamental requirements for a successful clinical implementation of the FLER technology has been identified in the ability to register the virtual perfusion map, generated by the software, on the real-time images. Respiratory movements, bowel peristalsis and surgical manipulation alter the instant anatomy and consistency of FLER depend on a perfect real-time registration. A successful approach developed so far takes advantage of an algorithm based on image identification and tracking (**Figure 34**).

This method has been presented by one of the software engineers of the IRCAD (Dr Selka Faical) and the manuscript has been published recently on Biomedical Registration Imaging journal[18]. For methods detail, refer to the attached manuscript.



*Figure 349 Algorithm for automatic tracking of the virtual perfusion cartography. On the right: the reference image is deformed after tilting the camera downward (producing a vertical down-up movement). The two images are matched (feature matching algorithm), and the same vectors of displacement are applied to the virtual perfusion cartography in order to D constantly register FLER on the laparoscopic image.*

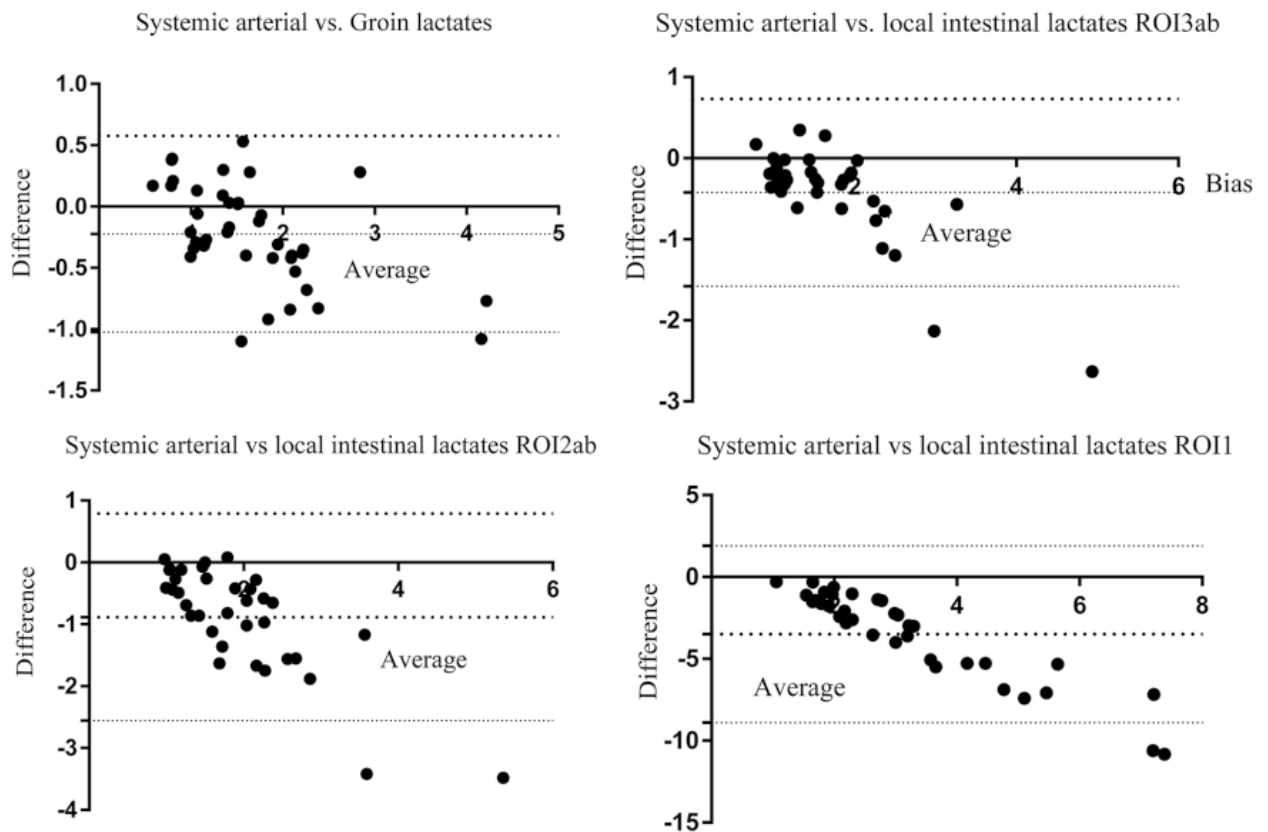
# RESULTS

## STUDY 1

### METABOLISM-GUIDED BOWEL RESECTION POTENTIAL ROLE AND ACCURACY OF INSTANT CAPILLARY LACTATES TO IDENTIFY THE OPTIMAL RESECTION SITE

#### *Systemic Arterial and Capillary Lactates (mmol/L)*

Pearson's R correlation between systemic arterial and systemic groin capillary lactates per all-time points was 0.9. Rho coefficients between systemic arterial and local capillary lactates were 0.87 (ROI 3a), 0.85 (ROI 3b), 0.75 (ROI 2a), 0.79 (ROI 2b), and 0.53 (ROI 1). The Bland–Altman method showed a good agreement with low bias (difference between the means) for arterial and groin capillary lactates and for arterial and vascularized intestinal areas. High biases were found between arterial and capillary lactates at the ischemic area (**Figure 35**).



*Figure 35 Bland–Altman difference versus average of arterial versus capillary lactates. The Bland–Altman bias between systemic and capillary lactates was  $-0.22$  ( $SD\ 0.4$ ),  $-0.42$  ( $SD\ 0.58$ ),  $-0.88$  ( $SD\ 0.85$ ), and  $-3.5$  ( $SD\ 2.75$ ) for groin, vascular areas (region of interest [ROI] 3ab), boundaries (ROI 2ab), and ischemic area (ROI 1), respectively. Upper and lower 95% limits of agreement with arterial lactates ranged from  $-1.02$  to  $0.57$  (groin), from  $-1.58$  to  $0.73$  (ROI 3ab), from  $-2.55$  to  $0.79$  (ROI 2ab), and from  $-8.9$  to  $1.9$  (ROI 1).*

Mean capillary lactates (mmol/L) were significantly higher at the ischemic zone (ROI 1) than at the clinically identified margins of resection (ROIs 2ab) at all-time points but after 5 hours of ischemia, and higher than at the vascularized zones (ROIs 3ab) at all-time points. Mean capillary lactates were statistically significantly higher at the clinically identified margins of resection (ROI 2ab) when compared with ROIs 3ab after 1 hour of ischemia ( $P = .0095$ ). At longer ischemia times, there was no statistically significant difference (**Table 4**)

**Tableau 4 Local Capillary Lactates**

	ROI	1ROI	2a/2bP	Value <sup>a</sup> ROI	3a/3bP	Value <sup>a</sup> P	Value <sup>a</sup>
Ischemia Time	(Ischemic Zone)	(Resection Lines)	(1 vs 2a/2b)	vs(Vascular Zones)	(1 vs 3a/3b)	vs(2a/2b vs 3a/3b)	vs
1 hour	4.75 ± 2.54	2.38 ± 0.74	<b>.007</b>	1.67 ± 0.45	<b>.0007</b>	<b>.0095</b>	
2 hours	7.68 ± 4.16	3.14 ± 1.59	<b>.003</b>	2.34 ± 0.78	<b>.0004</b>	.13	
3 hours	4.5 ± 2.11	2.02 ± 0.56	<b>.0012</b>	1.85 ± 0.62	<b>.0008</b>	.48	
4 hours	4.08 ± 2.85	2.24 ± 0.82	<b>.04</b>	1.87 ± 1.13	<b>.029</b>	.36	
5 hours	4.75 ± 3.21	2.32 ± 2.27	.08	2.09 ± 2.04	<b>.04</b>	.79	
6 hours	3.82 ± 2.24	2.10 ± 1.17	<b>.045</b>	1.74 ± 1.02	<b>.014</b>	.43	

Abbreviation: ROI, region of interest.

<sup>a</sup> $P < .05$  was considered statistically significant.

#### **Mitochondria Respiratory Rate (pmol of Oxygen/Second/mg of Dry Weight)**

Mean maximal tissue respiration rate ( $V_{MAX}$ ) was statistically significantly reduced after 1 hour of ischemia when compared to the control area ( $P = .03$ ). At a longer duration, the difference was not significant. Mean  $V_{ADP}$  was significantly decreased after 3 hours of ischemia when compared to viable margins ( $P = .01$ ) but improved after 5 hours at the ischemic zone. Mean

$V_{TMPD}$  was progressively reduced with increased ischemia time without reaching statistical significance at any time point (**Figure 36**).

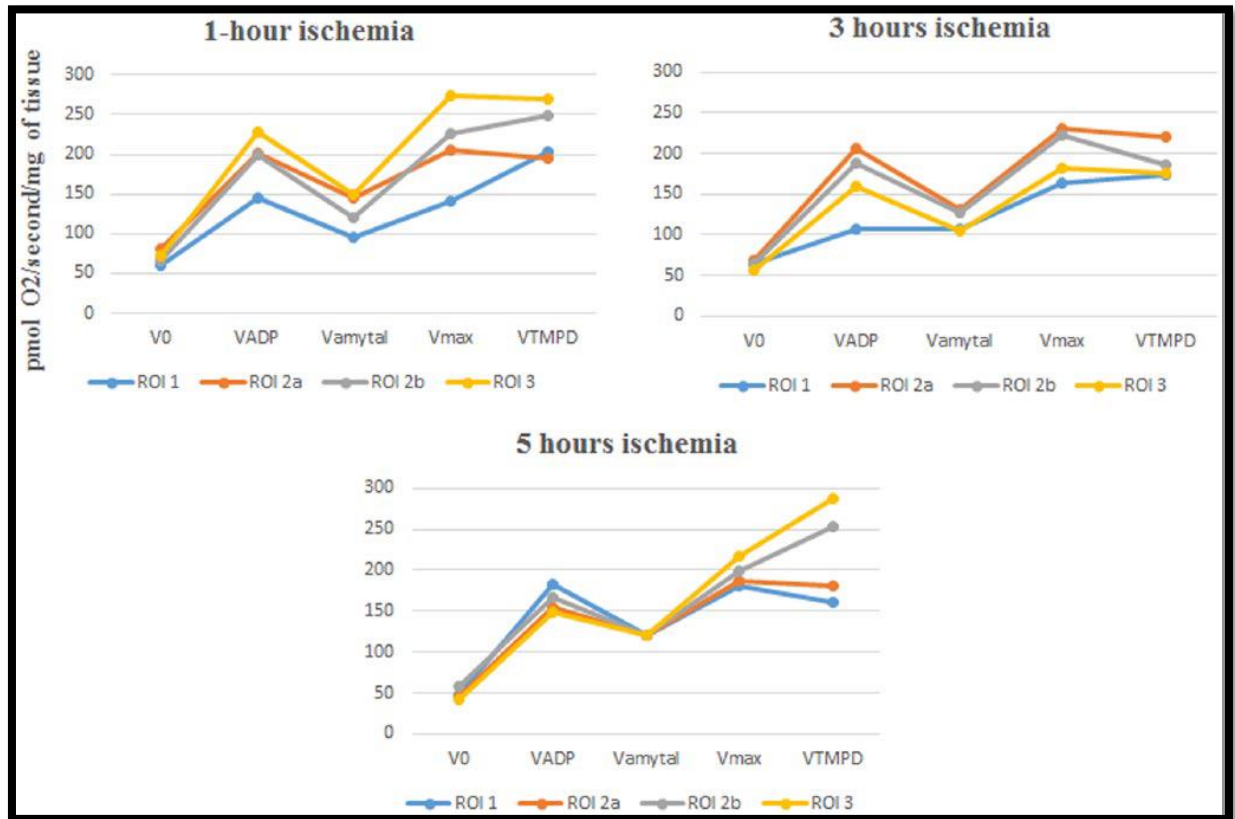
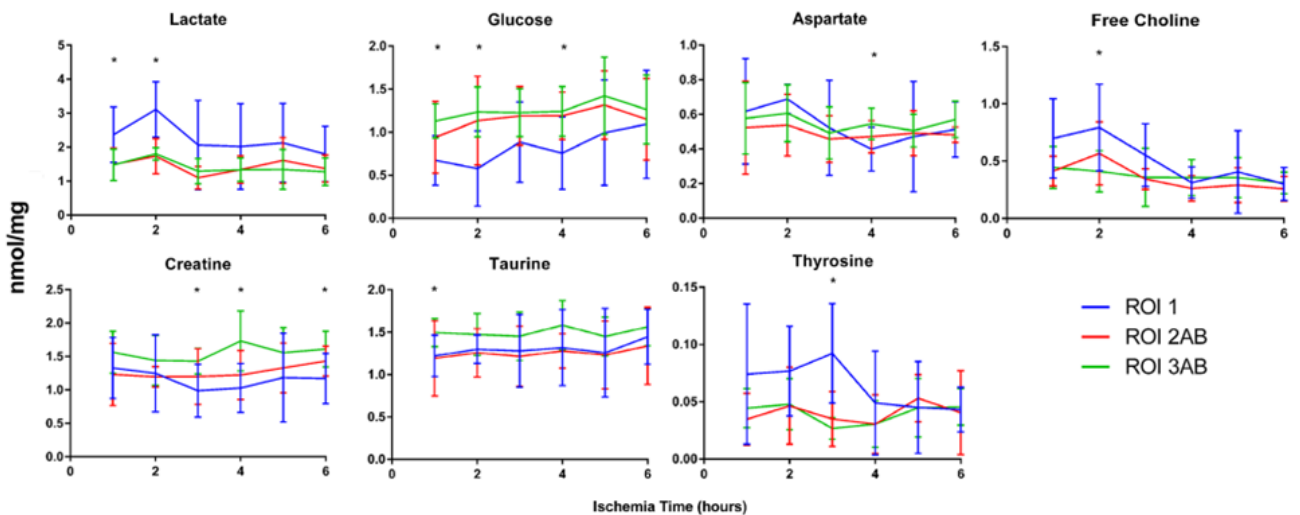


Figure 36 Changes over time in mitochondria respiratory rate. The figure shows the sequencing of mitochondria respiration rates (V<sub>0</sub>, VADP, VAMYTAL, VMAX, VTMPD) in the ischemic zone (region of interest [ROI]1), in boundaries (ROI 2a-2b), and in the vascularized control area (ROI 3).

### HRMAS NMR Spectroscopy (nmol/mg of Tissue)

A total of 25 metabolites could be quantified in small bowel biopsies (lactate, glucose, acetate, alanine, ascorbate, asparagine, aspartate, free choline, creatine, ethanolamine, glutamine, glutamate, reduced glutathione, glycerophosphocholine, glycine, lysine, myo-inositol, phenylalanine, phosphocholine, sylo-inositol, taurine, tyrosine, valine, isoleucine, total choline).

At some point, 7 metabolites (lactate, glucose, aspartate, free choline, creatine, taurine, and tyrosine) expressed a statistically significant different values between the ischemic area (ROI 1) and vascular areas (ROI 3ab; **(Figure 37)**). Pearson's R correlation between capillary lactates and HRMAS lactates per all time points ( $n = 180$  replicates) was 0.69 (Figure 5).



*Figure 37 High-resolution magic angle spin nuclear magnetic resonance spectroscopy (nmol/mg of tissue): significant metabolites. Lactate, glucose, aspartate, free choline, creatine, taurine, and tyrosine, expressed at some point statistically significant different values between the ischemic area (region of interest [ROI] 1) and vascular areas (ROI 3ab) at the ANOVA analysis.  $P < .05$  was considered statistically significant*

Figure 38 shows a typical High Resolution Magic Angle Spin (HRMAS) Magnetic Resonance Spectroscopy spectra

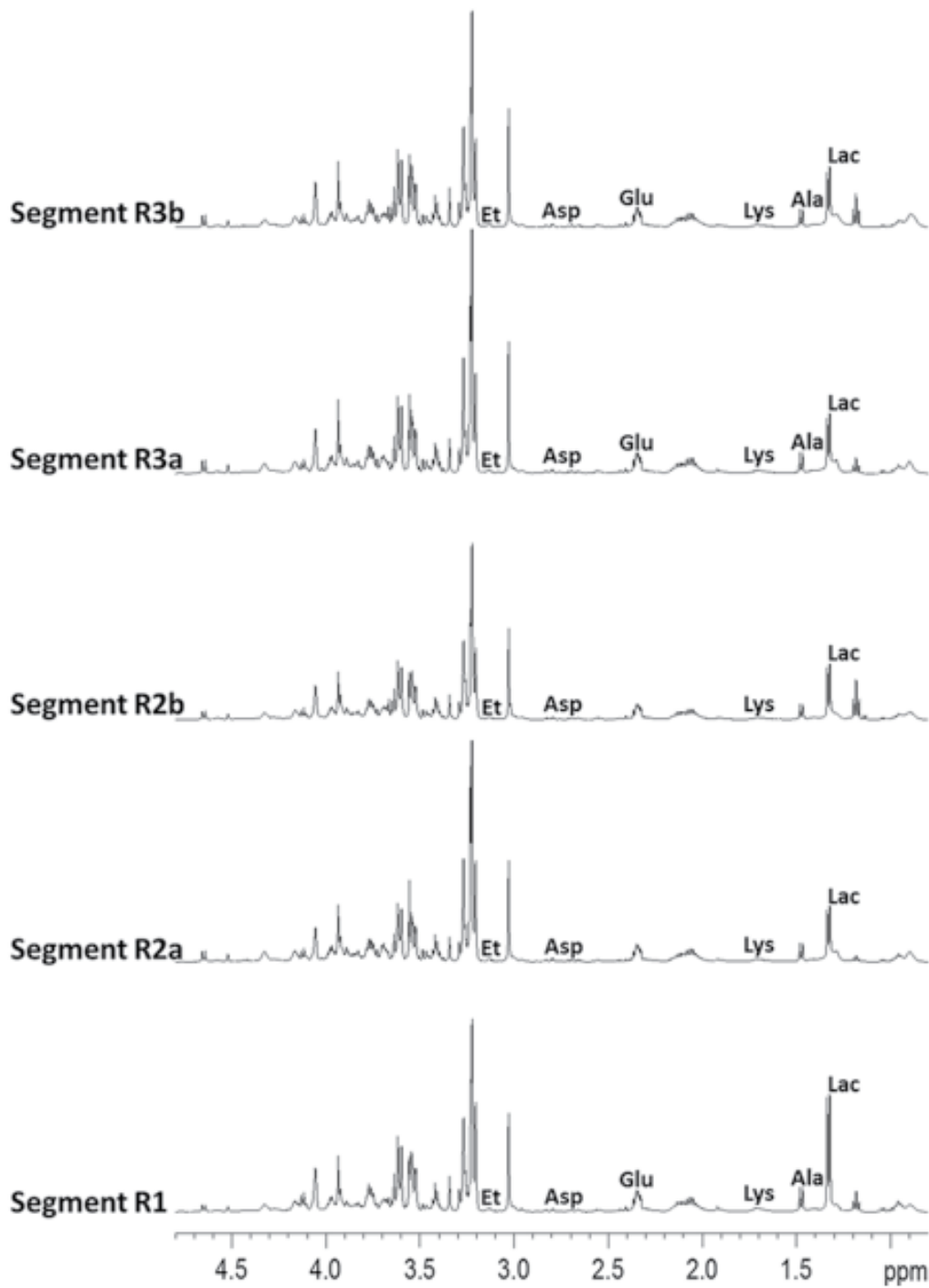


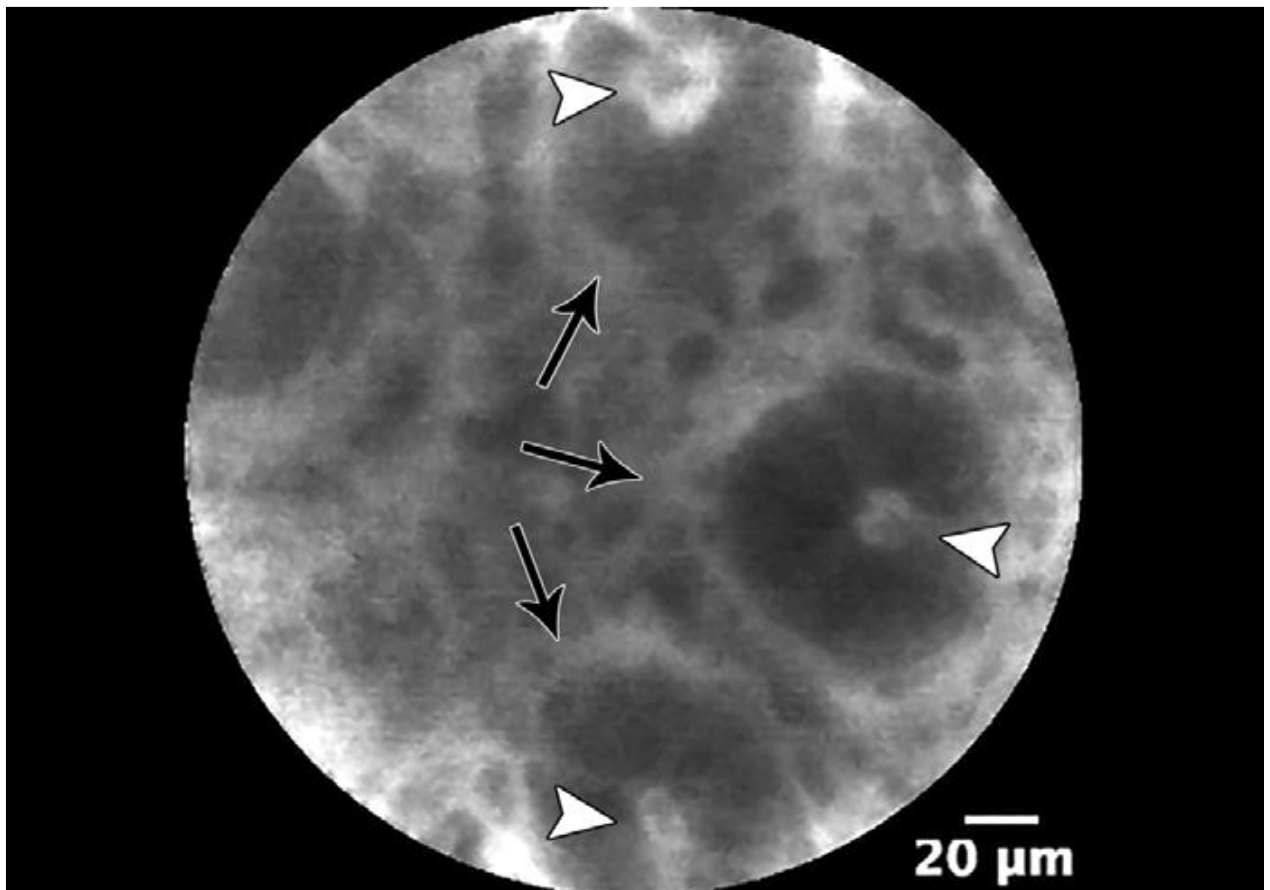
Figure 38 High-resolution magic-angle spin (HRMAS) spectra. Typical HRMAS spectra. Note the taller lactate spike in the ischemic area region of interest (ROI) 1, after 2 hours of ischemia in this case

## STUDY 2

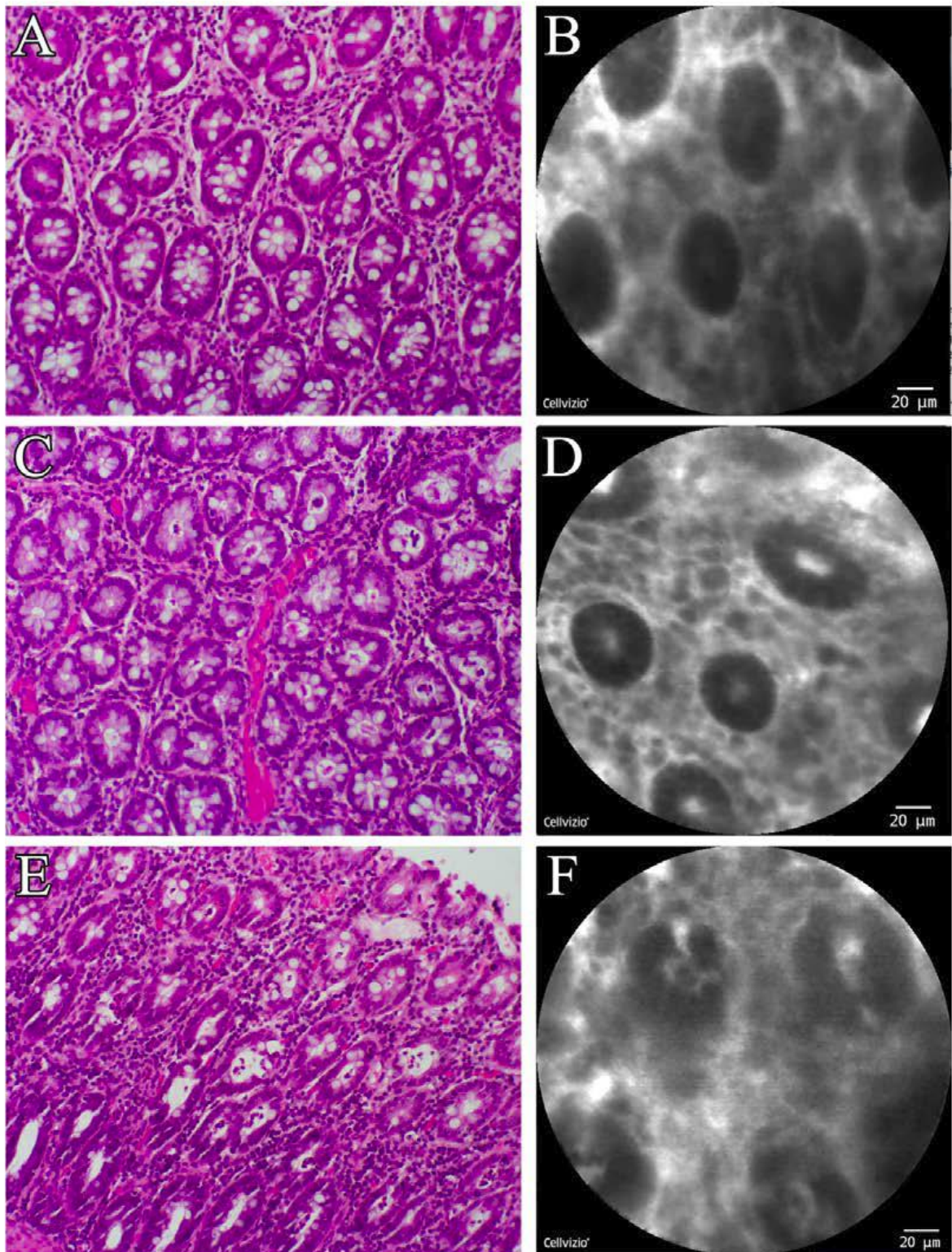
### FUNCTIONAL CAPILLARY DENSITY FOR IN VIVO ESTIMATION OF INTESTINAL PERFUSION USING REAL-TIME CONFOCAL ENDOMICROSCOPY



Confocal evaluation of the ischemic area revealed a different aspect of the mucosal tissue when compared to the normal perfused area. CLE identifies the ischemic area with blurred images and swelling with an increased demarcation of the cryptal border, due to increased basolateral permeability. The presence of “target cells” is also characteristic, defined by the presence of a hyper-fluorescent crypt centre and by the distortion of the enterocyte silhouette. These typical features cannot be found in the normally perfused area (**Figures 39 and 40**).

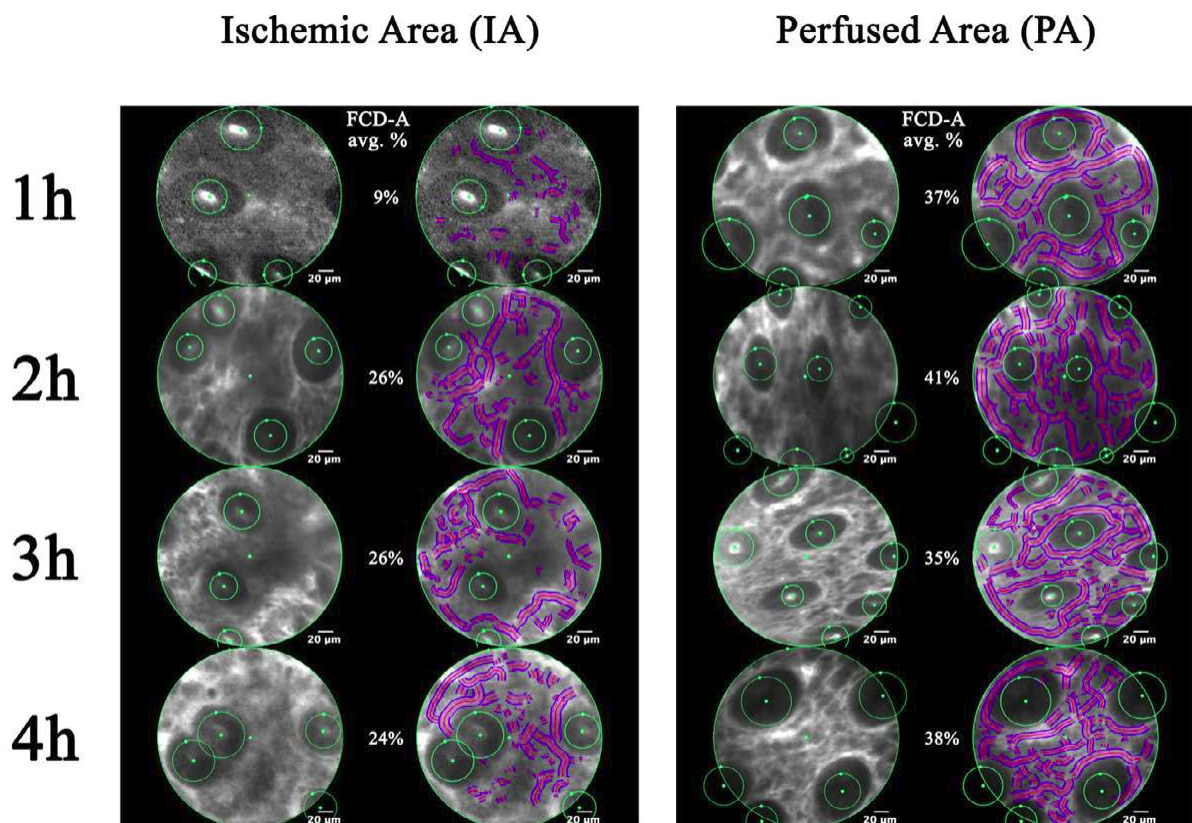


*Figure 39 Confocal description of ischemic area. Black arrows indicate an enhanced cryptal border in the colonic mucosa. White arrowheads show the fluorescein leakage inside the cryptal lumen.*



*Figure 40 Comparative images: standard histology versus confocal analysis. A blinded pathologist assigned an ischemia score to histological and confocal images. A) 20X Hematoxylin-eosin (HE), and B) confocal imaging score 0 (normal mucosa), C) 20X HE, and D) confocal imaging score 1 (submucosal congestion and swelling), E) 20X HE, and F) confocal imaging score 2 (diffuse swelling and necrosis of epithelium)*

Statistically, FCD-A (**Figure 41**) at the perfused area was significantly higher when compared to the ischemic area, irrespective of the time point. After 1 hour, FCD-A was ( $0.189 \pm 0.094$  vs.  $0.365 \pm 0.030$ ;  $p=0.0001$ ), after 2 hours ( $0.252 \pm 0.056$  vs.  $0.389 \pm 0.024$ ;  $p<0.0001$ ), after 3 hours ( $0.252 \pm 0.050$  vs.  $0.353 \pm 0.030$ ;  $p=0.0001$ ), and after 4 hours ( $0.262 \pm 0.044$  vs.  $0.358 \pm 0.019$ ;  $p<0.0001$ ), at ischemic and perfused areas respectively.



*Figure 41 Functional Capillary Density Area (FCD-A) assessment. FCD-A assessed with the IC Viewer software (version 3.8.5). The FCD-A could precisely discriminate between ischemic and perfused areas at any time point. The green circles were applied to both ischemic and perfused areas to subtract fluorescein leaks occurring in the middle of the crypts.*

### STUDY 3

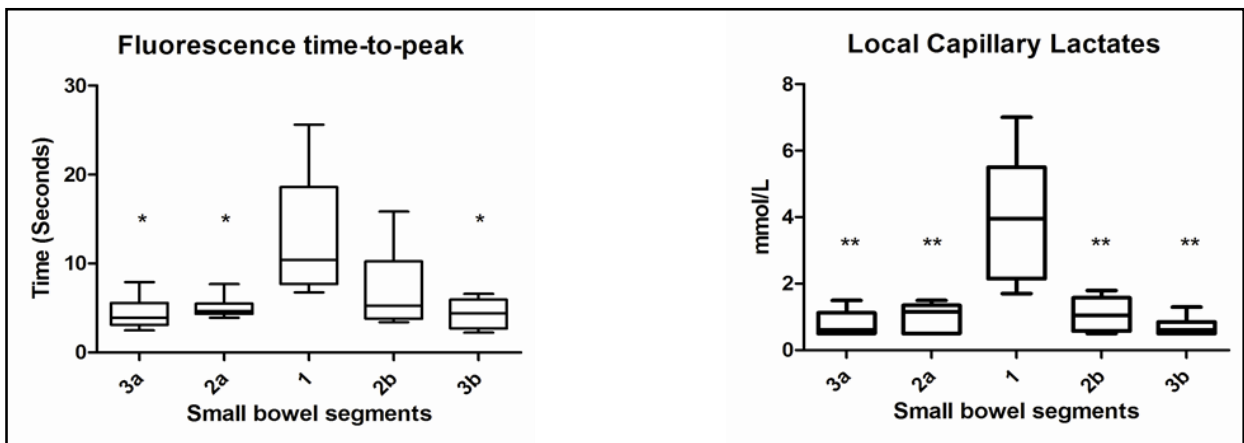
#### PROOF OF THE CONCEPT OF FLUORESCENCE-BASED ENHANCED REALITY

Mean **fluorescence time-to-peak** in Segment 1 (= ischemic area) was 12.89 sec (SD 7.02) and was significantly longer when compared to Segments 2a+2b (= future resection lines) in which

it was 6.01 sec (SD 3.44),  $p=0.01$  and to Segments 3a+3b (= vascular zones) in which it was 5.69 sec (SD 3.68),  $p=0.01$ . There was no statistically significant difference between marginal (2a+2b) and vascular (3a+3b) zones

Mean **capillary lactate** levels were 3.98 (SD = 1.91) versus 1.05 (SD = 0.46) versus 0.74 (SD = 0.34) mmol/L at ROI 1 versus 2a-2b ( $P = 0.0001$ ) versus 3a-3b ( $P = 0.0001$ ), respectively.

The non-parametric Spearman correlation showed a correct relationship between local lactates and fluorescence time-to-peak in the ischemic area ( $\rho$  0.71) and a decreasing correlation in future resection lines ( $\rho$  0.5 for 2a and 0.42 for 2b) as well as in vascular areas ( $\rho$  0.33 and 0.30). (**Figure 42**)



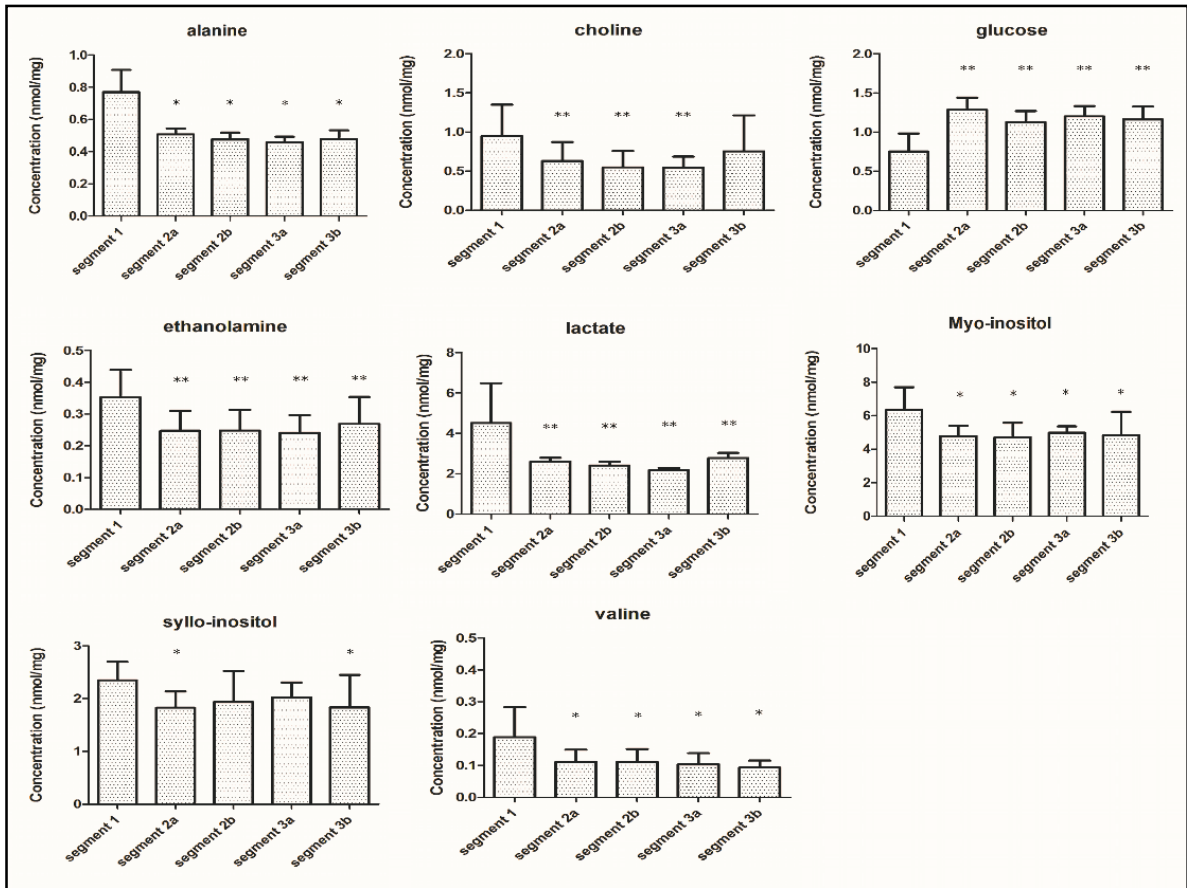
**Figure 4210** Local capillary lactates levels on blood samples obtained from the ROI1 (ischemic) and ROI 2a-2b (resection lines) and ROI 3a-3b (control vascularized areas). There was a statistically significant difference between the ischemic area (ROI1) and the future resection lines, but no difference between resection lines as identified by FLER and vascular areas.

**Mitochondrial Respiratory Chain:** Mean  $\underline{V_0}$  (basal oxygen consumption) in the ischemic area (Segment 1) was 66.4 pmol O<sub>2</sub>/sec/mg (SD 25.67), and as a result, lower when compared to the mean values of all the other segments reaching a statistically significant difference when compared to the mean values of segment 3a (110 pmol O<sub>2</sub>/sec/mg; SD 24.68).

Mean  $\underline{V_{max}}$  (Complexes I, III, IV) was statistically significantly reduced in the ischemic zone (104.4 pmol O<sub>2</sub>/sec/mg of dry tissue; SD 52.87) when compared to resection line 2b (191.1

pmol O<sub>2</sub>/sec/mg of dry tissue; SD 25.08) ( $p = 0.03$ ) and to both perfused zones 3a (180.4 pmol O<sub>2</sub>/sec/mg of dry tissue; SD 37.36) ( $p = 0.02$ ) and 3b (199.2 pmol O<sub>2</sub>/sec/mg of dry tissue; SD 50.41) ( $p = 0.02$ ). Mean  $V_{\text{succi}}$  (Complexes II, III, IV) was statistically significantly reduced in the ischemic zone (105.3 pmol O<sub>2</sub>/sec/mg of dry tissue; SD 58.14) when compared to zones 2b (213.2 pmol O<sub>2</sub>/sec/mg of dry tissue; SD 22.75) ( $p = 0.02$ ) and 3b (219.1 pmol O<sub>2</sub>/sec/mg of dry tissue SD 63.86) ( $p = 0.01$ ). Mean  $V_{\text{tmpd}}$  (Complex IV) was lower in the ischemic zone when compared to both resection lines and vascular zones but the difference was not statistically significant

**Metabonomics:** A total of 23 metabolites were quantified in the small bowel biopsies by the NMR HRMAS: 1) Lactate, 2) Glucose, 3) Acetate, 4) Alanine, 5) Ascorbic Acid, 6) Asparagine, 7) Aspartate, 8) Choline, 9) Creatinine, 10) Ethanolamine, 11) Glutamine, 12) Glutamate, 13) Glutathione, 14) Glycerophosphocoline, 15) Glycine, 16) Lysine, 17) Myo-inositol, 18) Phenylalanine, 19) Phosphocholine, 20) Sylo-inositol, 21) Taurine, 22) Tyrosine, and 23) Valine. For the remaining metabolites, quantification was compromised due to low signals and/or overlapping of the spectra. Among these metabolites, statistically significant different concentrations (expressed in nmol/mg of tissue) between the ROI 2a, 2b, 3a and 3b when compared to the ischemic Segment 1 were found for Alanine, Choline, Ethanolamine, Glucose, Lactate, Myo-inositol, Sylo-inositol and Valine (**Figure 42**). No statistically significant differences in concentrations were found between Segments 2a or 2b (resection lines) vs. 3a or 3b (vascular zones).



**Figure 42** Metabolomics fingerprint of ischemia. High-Resolution Magic-Angle Spinning (HRMAS) Magnetic Resonance Spectroscopy demonstrated decreased glucose levels and increased tissue lactate and amino acids following ischemia, showing an increased anaerobic glycolysis. The significant increase of Choline, Ethanolamine, Syloinositol and Myoinositol, which are phospholipids involved in the cellular membrane integrity, may represent an early sign of cellular ischemic damage.

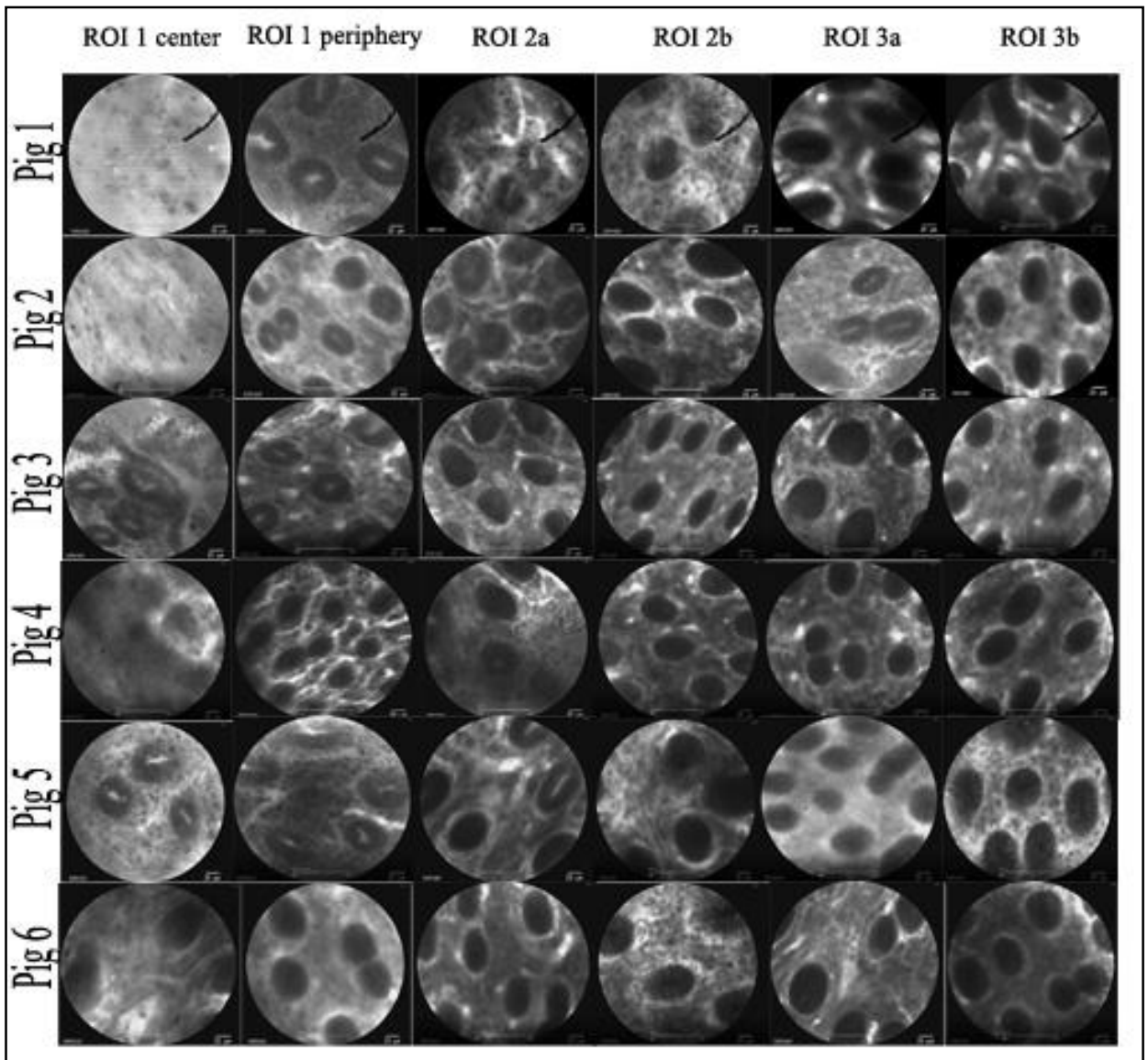
## STUDY 4

### PERFORMANCE OF FLER vs. CLINICAL JUDGMENT IN A LAPAROSCOPIC MODEL OF SIGMOID ISCHEMIA

**1) FLuorescence-based Enhanced Reality (FLER) and clinical evaluation:** Clinical ( $2a_{\text{CLIN}}$ - $2b_{\text{CLIN}}$ ;  $n=12$ ) and FLER ( $2a_{\text{FLER}}$ - $2b_{\text{FLER}}$ ;  $n=12$ ) regions of interests (ROI) were compared. In 50% of cases ( $n=6$ ), there was a concordance ( $<1\text{cm}$  distance) between clinical assessment and FLER imaging for resection lines ( $2a$  and  $2b$ ). In 5 cases, resection lines according to clinical assessment were closer to the ischemic zone with a mean distance of  $2.2\text{cm}$  (SD  $1.78$ ) when compared to FLER assessment.

**2) Capillary lactates:** Capillary lactates were significantly higher at ROI 1 ( $4.91\text{ mmol/L}$ ) when compared to resection margins ( $2.8\text{ mmol/L}$ ; mean difference:  $2.11$ ;  $p < 0.05$ ) identified by FLER. There was no significant difference in lactates between ROI1 and resection margins identified by clinical evaluation. In 50 % of cases, ROI  $2a_{\text{CLINIC}}-2b_{\text{CLINIC}}$  were considered to match ( $<1\text{ cm}$  distance) with ROI  $2a_{\text{FLER}}-2b_{\text{FLER}}$ .

**3) Confocal assessment:** The almost constant endomicroscopic changes reflecting the presence of hypoperfusion could be identified 1) *at the center of ROI 1* as a blurred image with inability to obtain clear “confocal” imaging of enterocytes, and 2) *at the periphery of ROI 1* (still within the identified ischemic area but closer to one of the future resection lines), as the presence of a “target cell” image of enterocytes. A sudden change when reaching vascular areas with clear imaging of enterocytes was observed when the areas were scanned by the probe corresponding to the ones identified by  $2a_{\text{FLER}}-2b_{\text{FLER}}$  in 11/12 cases vs. 7/12 in  $2a_{\text{CLINIC}}-2b_{\text{CLINIC}}$  (6 cases concordant with FLER and 1 discordant). In one case (pig 6), there were no target cells (**Figure 43**). In addition to specific features caused by fluorescein injection, it was possible to apply the same score used in conventional pathology demonstrating the presence of edema, disruption of epithelium, and necrosis with submucosal neutrophil infiltration

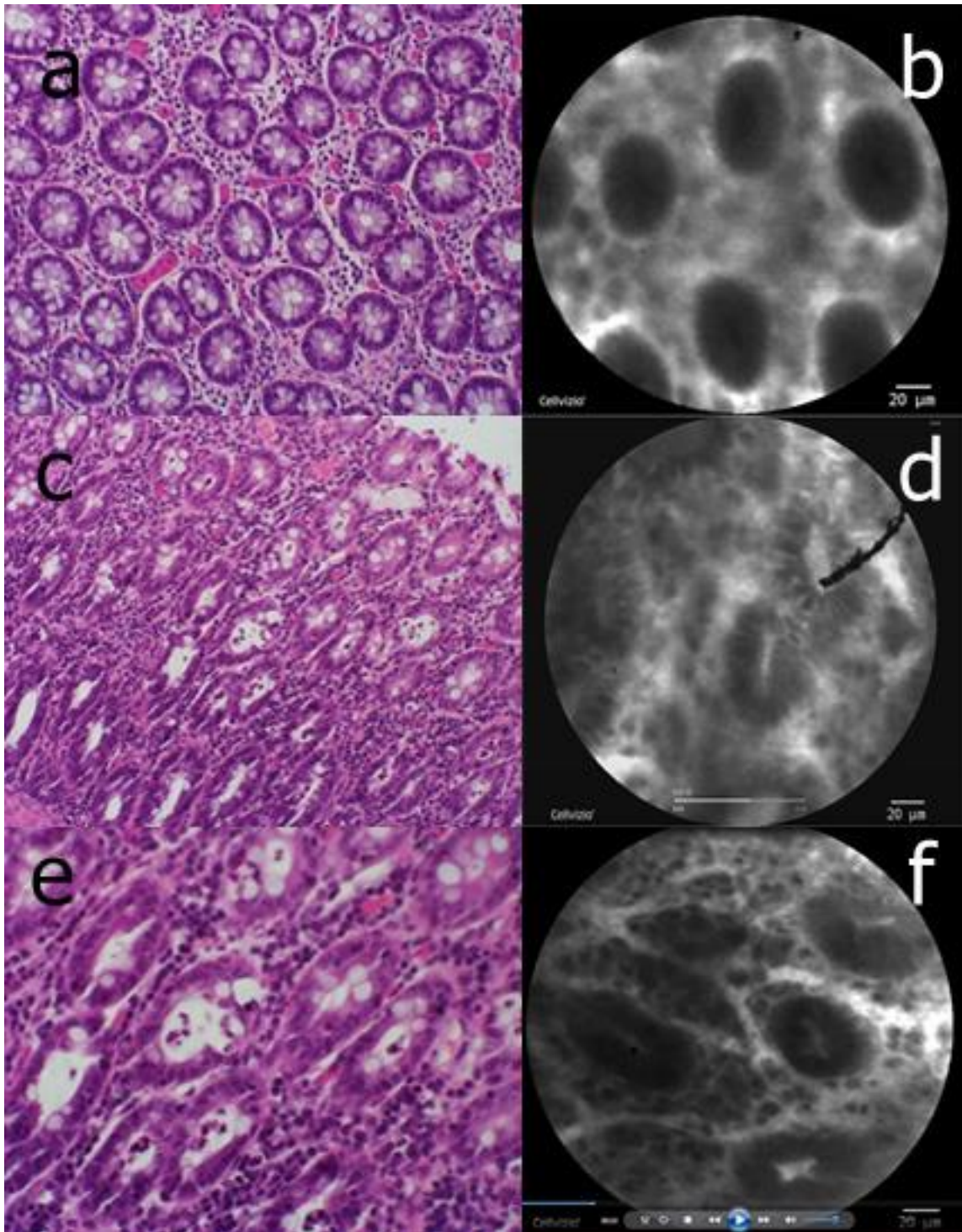


*Figure 43 At the center of the ischemic area, an almost constant finding was the presence of “blurred images”, due to the absence of penetration of fluorescein into the ischemic tissue. Still within the ischemic zone, but closer to resection lines, a consistent change was the presence of “target cells”, with a clear center due to increased permeability and fluoresceine leakage in the glandular lumen of enterocytes. This “target cell” image was not visible in vascular zones, in which the center of enterocytes was constantly black.*

**4) Comparison between confocal and standard pathology using a standardized score.** In the pilot phase, the ischemia score confocal analysis ranged from 0 (normal mucosa) after 1-hour ischemia, increasing to 2 (diffuse swelling and necrosis of epithelium) after 3 hours. In the laparoscopic 1-hour ischemia model, mean ischemia score at the ROI 1 ischemic zone was statistically significantly higher at confocal assessment when compared to standard pathology 1.33 (SD 0.51) vs. 0.66 (SD 0.51) ( $p=0.01$ ). At vascular areas, the score was invariably 0



(normal mucosa; n=6) at the standard pathology and was 0 in 10/12 cases according to confocal analysis. **(Figure 44)** The overall Spearman correlation coefficient between standard pathology and confocal assessment was 0.685, but it decreased to 0.5 when considering ischemic zones separately.



*Figure 114 Comparative images of standard histology and confocal analysis matched according to the ischemia score assigned by a blinded pathologist Matched images at standard pathology and confocal analysis. a) 20x Hematoxylin-Eosin (HE) and b) confocal imaging*

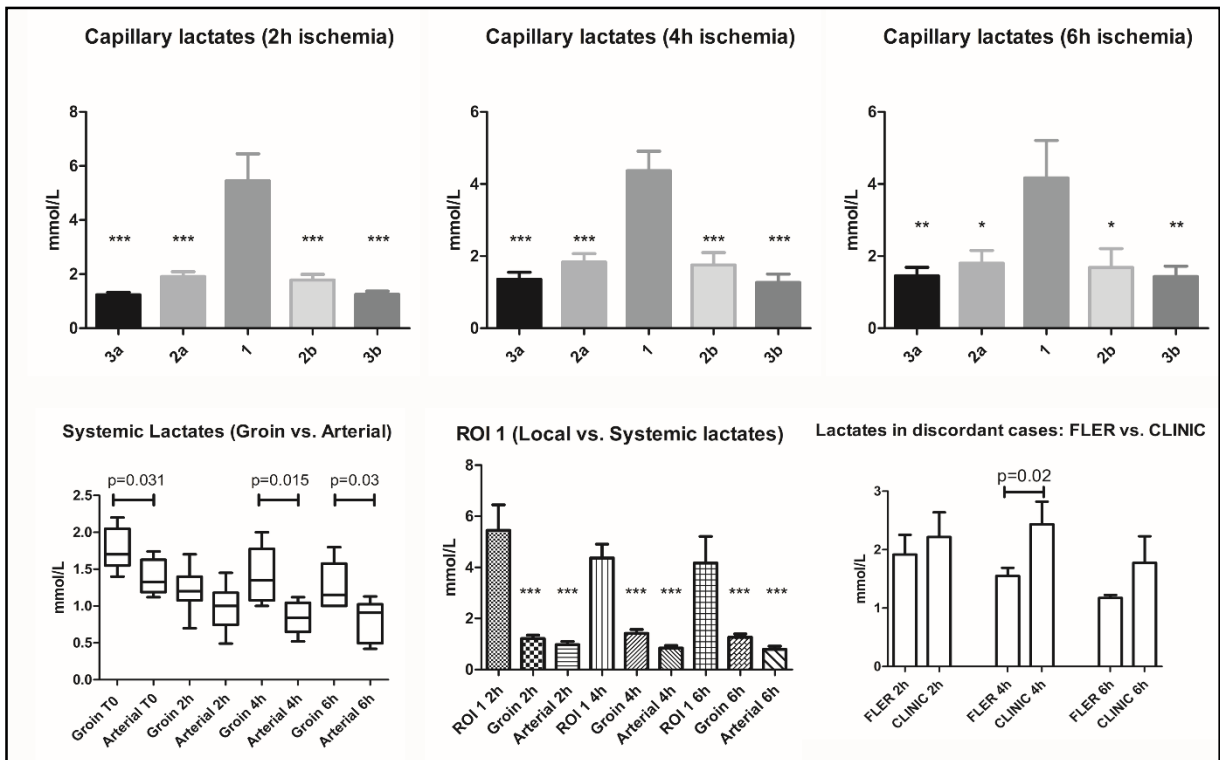
score 0 (normal mucosa); c) 20x HE and d) confocal imaging score 1 (submucosal congestion and swelling); e) 40x HE; and f) confocal imaging score 2 (diffuse swelling and necrosis of epithelium).

## STUDY 5

### REAL-TIME NAVIGATION BY FLUORESCENCE-BASED ENHANCED REALITY FOR PRECISE ESTIMATION OF FUTURE ANASTOMOTIC SITE IN DIGESTIVE SURGERY

**1) FLuorescence-based Enhanced Reality:** Clinical assessment and FLER were concordant regarding the position of resection lines 2a and 2b) in 50% (6/12) of cases after 2h and 4h of ischemia, and in 75% (8/12) at 6h of ischemia. In discordant cases, clinical resection lines were traced closer to the ischemic area in 50% (3/6), 83% (5/6) and 75% (3/4) of cases after 2, 4 and 6 hours respectively. Mean distance between clinical assessment and FLER was  $2\pm 0.63$ cm,  $1.91\pm 0.2$ , and  $1.87\pm 0.25$  after 2, 4, and 6h respectively.

**Local bowel capillary lactates:** Mean capillary lactate levels at 2, 4 and 6 hours were significantly higher in the ischemic zone (ROI1) than in the others regions (2 hours:  $5.45\pm 2.44$  vs.  $1.9\pm 0.6$  vs.  $1.2\pm 0.3$  mmol/L at ROI 1 vs. 2a-2b ( $p<0.0001$ ) vs. 3a-3b ( $p<0.0001$ ) respectively; 4 hours:  $4.36\pm 1.32$  vs.  $1.83\pm 0.81$  vs.  $1.35\pm 0.67$  mmol/L at ROI 1 vs. 2a-2b ( $p<0.0001$ ) vs. 3a-3b ( $p<0.0001$ ); 6 hours:  $4.16\pm 2.55$  vs.  $1.8\pm 1.2$  vs.  $1.45\pm 0.83$  at ROI 1 vs. 2a-2b ( $p=0.013$ ) vs. 3a-3b ( $p=0.0035$ ). In discordant cases (distance between CLINIC and FLER  $>1$ cm), lactate levels at presumed viable margins assessed by clinical evaluation ( $2a_{\text{CLINIC}}+2b_{\text{CLINIC}}$ ) were statistically significantly higher when compared to those at  $2a_{\text{FLER}}+2b_{\text{FLER}}$  ( $2.43\pm 0.95$  mmol/L vs.  $1.55\pm 0.33$   $p=0.02$ ) after 4h of ischemia. There was no statistically significant difference at 2h and 6h (**Figure 45**).



**Figure 4512** The graph shows the evolution of capillary lactates over time (first row) at the ischemic ROI 1, resection lines 2a-2b, and control areas 3a-3b. Local lactates were significantly higher ( $p < 0.0001$ ) at the ischemic area when compared to both systemic lactates (groin and arterial) per all-time points. Second row: groin capillary lactates were statistically significantly higher when compared to arterial lactates at induction, after 4 h and 6 h of ischemia. Systemic lactates (groin and arterial) were comparable to local capillary lactates at resection lines (2a-2b) and to vascularized areas (3a-3b) per all-time points. Local lactates at presumed viable margins in discordant cases (distance between CLINIC and FLER  $> 1$ cm) were significantly higher at ( $2a_{CLINIC} + 2b_{CLINIC}$ ) when compared to those at ( $2a_{FLER} + 2b_{FLER}$ ) ( $p = 0.02$ ) after 4 h of ischemia. \* =  $p < 0.01$ ; \*\* =  $p < 0.001$ ; \*\*\* =  $p < 0.0001$ .

**Mitochondria respiratory rate (pmol O<sub>2</sub>/second/mg of dry tissue):** Mean basal and maximal mitochondrial respiratory rate expressed in pmol O<sub>2</sub>/second/mg of dry tissue ( $V_0$  and  $V_{MAX}$ ) were significantly impaired after 4h and 6h of ischemia at ROI1 ( $V_0^{4h} = 34.83 \pm 10.39$ ;  $V_{MAX}^{4h} = 76.6 \pm 29.09$ ;  $V_0^{6h} = 44.1 \pm 12.37$  and  $V_{MAX}^{6h} = 116.1 \pm 40.1$ ) when compared to 2a-2b ( $V_0^{4h} = 67.1 \pm 17.47$   $p = 0.00039$ ;  $V_{MAX}^{4h} = 146.8 \pm 55.47$   $p = 0.0054$ ;  $V_0^{6h} = 63.9 \pm 28.99$   $p = 0.03$ ;  $V_{MAX}^{6h} = 167.2 \pm 56.96$   $p = 0.01$ ).  $V_0$  and  $V_{MAX}$  were statistically significantly higher at vascular areas at all-time points (except  $V_{max}$  at 4h). No differences between ROIs 2a-2b and 3a-3b were found in lactate levels and mitochondrial respiratory rate (**Figure 46**).

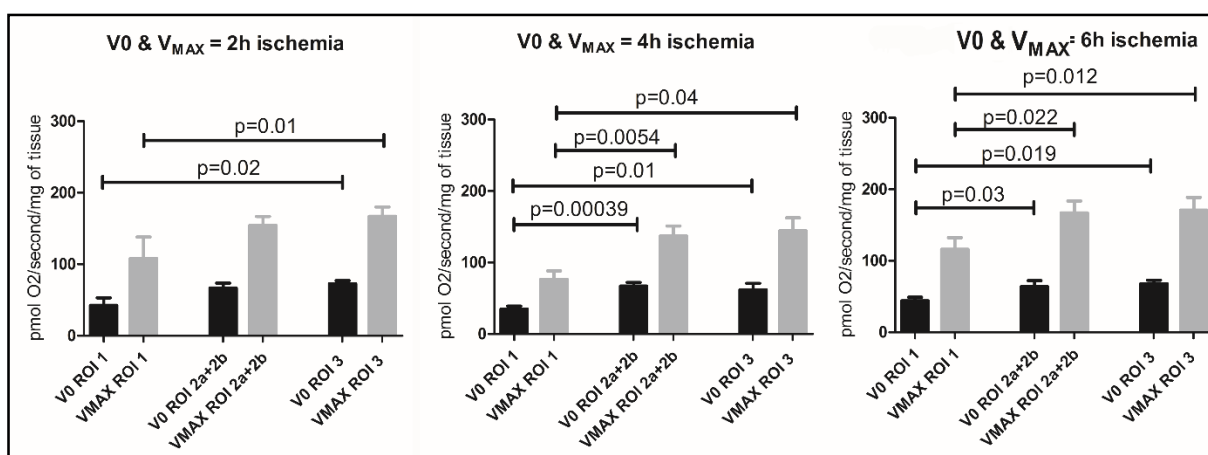


Figure 4613 Basal and maximal mitochondrial respiratory rate ( $V_0$  and  $V_{MAX}$ ) were significantly impaired after 4 h and 6 h of ischemia at ROI 1 when compared to 2a-2b.  $V_0$  and  $V_{MAX}$  were statistically significantly higher at vascular areas at all-time points (except  $V_{max}$  at 4 h). No differences between ROIs 2a-2b and 3a-3b were found for lactate levels and mitochondrial respiratory rate.

**Pathology:** Mean ischemia score at ROI1 was  $2 \pm 0.63$ ,  $1.83 \pm 0.98$  and  $2.33 \pm 0.81$  after 2, 4, and 6 hours of ischemia respectively. Widespread necrosis (score 4) was not observed. Ischemia score at control areas was invariably 0 (normal mucosa) at all-time points.

## STUDY 6

### INTRAOPERATIVE FLUORESCENCE-BASED ENHANCED REALITY LAPAROSCOPIC REAL-TIME IMAGING TO ASSESS BOWEL PERFUSION AT THE ANASTOMOTIC SITE IN AN EXPERIMENTAL MODEL.

One pig was sacrificed on POD1 for the occurrence of flaccid palsy due to bilateral cortical stroke as demonstrated by brain MRI. This complication was due to a problem with endotracheal intubation, which was noticed at the end of the procedure. Data from this animal were excluded from the analysis. There were no technical intraoperative complications. The survival period ranged from 7 to 12 days. At POD6, one pig from the 25% perfusion group presented prostration, distended abdomen, and ileus. Explorative laparotomy at POD7 revealed a frank anastomotic leak with fecal peritonitis. The animal was euthanized. One pig from the 75% perfusion group presented with ileus at POD2. Explorative laparoscopy was negative for

leaks or any other intra-abdominal problems, and the animal survived without any further complication. Mean weight gain was  $2.4\pm 1.5$ kg.

### **FLER analysis of resection lines**

FLER analysis could be effectively performed in all cases in a maximum of 10 minutes when considering both 25% and 75% marking. Mean distance between resection lines identified by FLER at 25% and 75% of perfusion was  $1.5\pm 1.2$ cm

### **Capillary lactates**

- *Pre-anastomotic capillary lactates*

Mean capillary lactate levels at the ischemic area (ROI 1) were  $5.6\pm 2.8$ mmol/L and were statistically significantly higher when compared to lactates at resection lines 2a+2b (25%) ( $3.7\pm 1.7$ mmol/L;  $p=0.01$ ) and 2a+2b (75%) ( $2.9\pm 1.3$ mmol/L;  $p=0.0001$ ) and when compared to vascular zones 3a+3b ( $2.5\pm 0.9$ mmol/L;  $p<0.0001$ ). Lactates at 2a+2b (75%) were statistically significantly lower than those at 2a+2b (25%) ( $p<0.0001$ ), and were similar to those at vascular zones ( $p=0.18$ ). Lactates at 2a+2b (25%) were statistically significantly higher than those at vascular zones ( $p=0.0017$ ).

- *Post-anastomotic capillary lactates*

Mean level of capillary lactates at the anastomosis was  $4\pm 1.9$  and  $2.9\pm 1.4$ mmol/L in the 25% and 75% group respectively ( $p=0.16$ ). Lactates at the peri-anastomotic areas 3a+3b were statistically significantly higher in the 25% group ( $3.9\pm 1.8$  vs.  $2.2\pm 1.2$ mmol/L;  $p=0.01$ ). The ratio between lactates at the anastomosis and those at vascularized areas was statistically significantly higher in the 25% group when compared to the 75% group ( $0.9\pm 0.1$  vs.  $0.7\pm 0.16$ ;  $p=0.01$ ). **(Figure 47)**

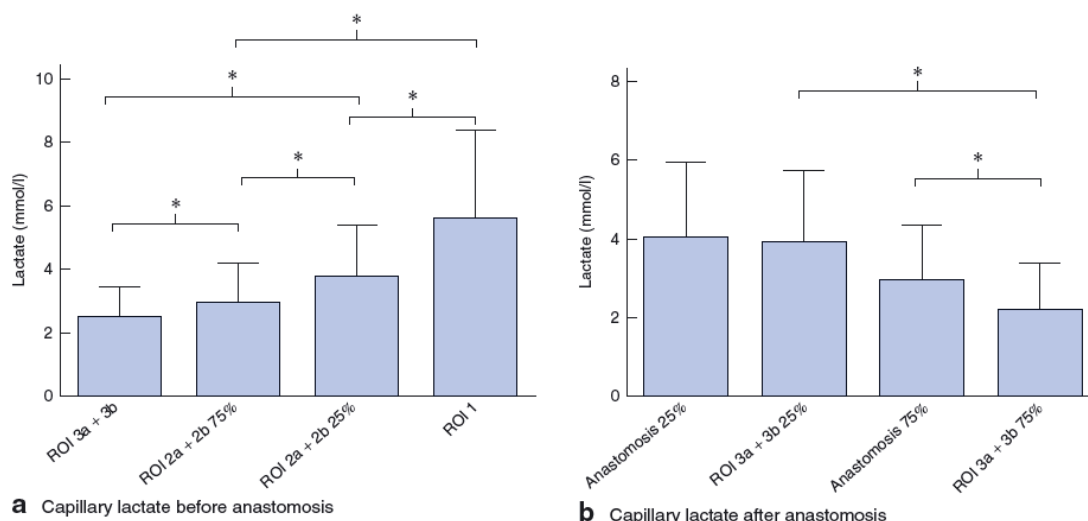


Figure 47 Mean (*s.d.*) capillary lactate levels **a** before and **b** after anastomosis in regions of interest (ROIs) with different perfusion levels (25 or 75 per cent) identified by fluorescence-based enhanced reality. \* $P < 0.050$  (ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons).

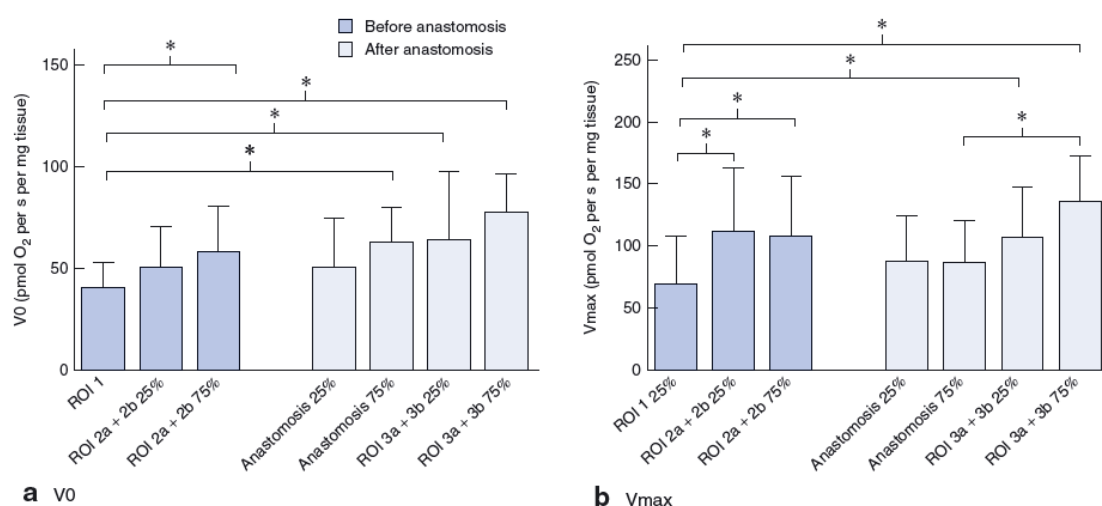
- **Pre-anastomotic  $V_0$  and  $V_{max}$**

Mean basal oxygen consumption ( $V_0$ ) at ROI 1 was  $40.2 \pm 12.7$  pmol of Oxygen/second/mg of dry weight and was statistically significantly lower when compared to that of 2a+2b at 75% of perfusion ( $57.7 \pm 22.8$ ;  $p=0.036$ ) while there was no difference between  $V_0$  at ROI 1 and  $V_0$  measured at 2a+2b at 25% of perfusion ( $50.1 \pm 20.3$ ;  $p=0.17$ ). Mean maximal respiratory rate in excess of substrate ( $V_{max}$ ) at ROI 1 ( $68.4 \pm 39.4$  pmol of Oxygen/second/mg of dry weight) was statistically significantly lower when compared to that of 2a+2b at 25% according to FLER ( $111.6 \pm 51$ ;  $p=0.02$ ) and to that of 2a+2b at 75% ( $107.6 \pm 48.6$ ;  $p=0.03$ ). No statistically significant difference was found in  $V_0$  and  $V_{max}$  between resection lines identified by FLER at 25 and 75% of perfusion.

- **Post-anastomotic  $V_0$  and  $V_{max}$**

Mean  $V_0$  at the anastomosis (formed by the connection of 2a and 2b) was  $50.4 \pm 24.2$  pmol of Oxygen/second/mg of dry weight in the 25% group and  $62.1 \pm 17.6$  in the 75% group ( $p=0.21$ ). There was a statistically significant difference between  $V_0$  at the ROI 1 (pre-anastomotic) and the  $V_0$  at biopsies sampled after the survival period at control areas 3a+3b (25% =  $63.2 \pm 33.8$

pmol of Oxygen/second/mg of dry weight;  $p=0.044$ ;  $75\% = 76.8 \pm 19.5$ ;  $p < 0.0001$ ). Mean **V<sub>max</sub>** at the anastomosis was similar in both groups ( $87.9 \pm 36.1$  vs.  $86.7 \pm 34.1$  in 25% and 75% respectively). **V<sub>max</sub>** at vascular peri-anastomotic areas (3a+3b) was statistically significantly higher when compared to that of the anastomosis in the 75% group ( $p=0.0288$ ). (**Figure 48**)



*Figure 48 Mitochondrial respiratory rate. Mean (s.d.) a basal oxygen consumption (V<sub>0</sub>) and b maximum respiratory rate (V<sub>max</sub>) before and after anastomosis in regions of interest (ROI) with perfusion levels of 25 or 75 per cent identified by fluorescence-based enhanced reality. \* $P < 0.050$  (Student's *t* test)*

### Explorative laparotomy (Table 5)

Mean adhesion score was  $2.6 \pm 1.3$  and  $1.4 \pm 1.5$  in the 25% and 75% of perfusion groups respectively ( $p=0.08$ ). In two pigs of the 25% group, there were clear signs of anastomotic leakage with peri-anastomotic abscesses and fecal peritonitis (pig No. 3). There was no anastomotic leakage in the 75% group. One pig presented with multiple and diffuse adhesions but the anastomotic site was completely clear of adhesions.

**Tableau 5 Explorative laparotomy findings**

Group	PIG No.	Second Look	Abscess	Adhesions: location and description	Score
25%	1	10	No	Anastomosis: severe adhesions among bowel loops	3
	3	7	Yes	Anastomosis: severe adhesions with strangulated loop and fecal peritonitis	4
	5	11	Yes	Anastomosis: severe adhesions, multiple peri-anastomotic abscesses	4
	7	11	No	Anastomosis: severe adhesions with anastomosis twisted on itself	3
	9	11	No	Anastomosis: mild adhesion (omentum on the anastomosis)	1
	11	11	No	Anastomosis: multiple adhesions with the abdominal wall	2
	13	12	No	Anastomosis: mild adhesion (omentum on the anastomosis)	1
75%	4	9	No	No adhesions	0
	6	10	No	Anastomosis: severe adhesion among bowel loops	3
	8	12	No	Multiple adhesions, but not at the anastomotic site (first look on POD2)	3
	10	12	No	No adhesions	0
	12	12	No	Anastomosis: mild adhesion (omentum on the anastomosis)	1

*POD: postoperative day. Adhesion score: 0 = no adhesions; 1 = one thin band of adhesion on the anastomotic line and/or among viscera or between one viscera and the abdominal wall; 2 = multiple thin adhesions on the anastomotic line and/or among viscera or from viscera to the abdominal wall; 3 = multiple adhesions but adhesiolysis is still possible; 4 = severe thick adhesions, adhesiolysis is not possible without organ damage.*

#### **Pathology evaluation of the anastomosis (Table 6)**

At macroscopic evaluation of the anastomosis, the mean ulceration extent was 2.7( $\pm$ 3) mm and 1.4( $\pm$ 1) mm in the 25% and 75% groups respectively ( $p=0.37$ ).

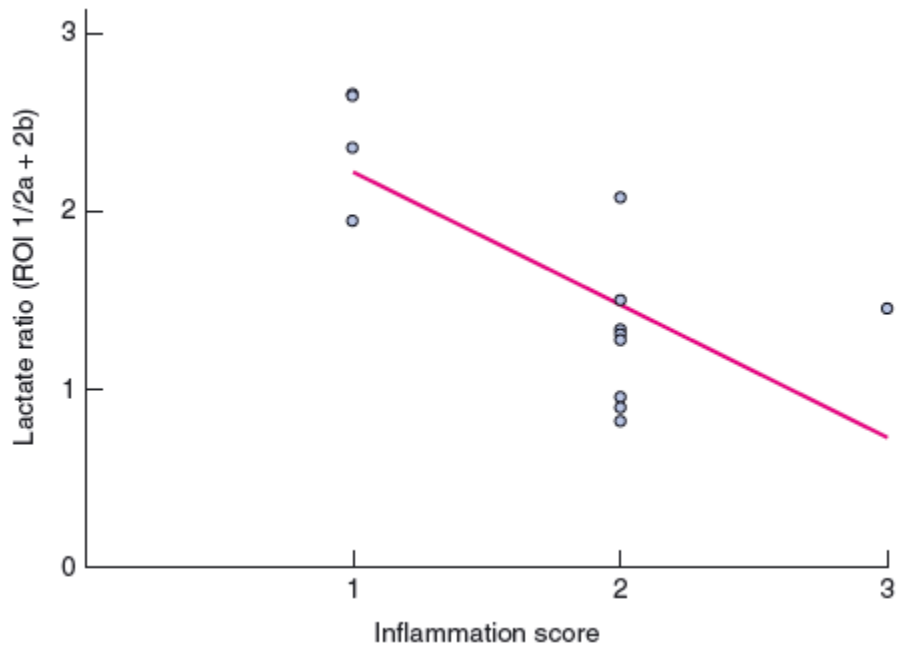
Mean global inflammation scores were statistically significantly higher in the 25% group when compared to the 75% group for the mucosa/submucosa (2.1 $\pm$ 0.4 vs. 1.2 $\pm$ 0.4;  $p=0.0027$ ) and for the serosa (1.8 $\pm$ 0.4 vs. 0.8 $\pm$ 0.8;  $p=0.0137$ ). The ratio of pre-anastomotic lactates (ROI1/2a+2b) at the ischemic area and at resection lines (future anastomotic segments) was predictive of a more severe inflammation score when  $\leq 2$  (**Figure 49**).



Tableau 6 Pathology findings

GROUP	PIG N°	MACRO	HISTOLOGY										
		ANASTOMOSIS	MUCOSA/SUBMUCOSA					MUSCULAR			SEROSEA		
		ULCERATION (mm)	INFLAMMATION GLOBAL SCORE	ACUTE INFLAMMATION (PMN; %)	CHRONIC INFLAMMATION			INFLAMMATION GLOBAL SCORE	ACUTE INFLAMMATION (%)	CHRONIC INFLAMMATION (%)	INFLAMMATION GLOBAL SCORE	ACUTE INFLAMMATION (%)	CHRONIC INFLAMMATION (%)
			LP MONO (%)	PNEo (%)	Macro (%)								
25%	1	2	2	50	10	0	40	2	20	80	2	10	90
	3	0	2	20	30	0	50	1	10	90	2	20	80
	5	1	2	50	<10	30	<10	1	<10	90	2	10	90
	7	3	2	40	45	5	10	1	<10	90	2	<5	95
	9	9	3	60	20	<1	20	2	20	80	2	50	50
	11	1	2	60	20	10	10	1	40	60	1	20	80
	13	3	2	30	30	20	20	1	<5	95	2	20	80
75%	4	0	1	20	30	30	20	0	20	80	1	40	60
	6	1.5	1	20	10	50	20	1	<5	95	1	10	90
	8	1	1	50	30	<1	20	1	30	70	2	20	80
	10	1.5	1	20	50	20	10	1	40	60	0	0	100
	12	3	2	30	40	20	10	1	30	70	0	20	80

*PMN: polymorphonuclear leukocytes, LP: lymphocytes, MONO: monocytes, Macro: Macrophages, PNeo: polymorphonuclear eosinophils. The percentage of the anastomosis surface occupied by inflammatory cells was measured and scored as follows: 0 = no inflammation; 1 = mild (1%-30%); 2 = moderate (31%-60%); and 3 = severe (>60%). The same score was used to evaluate the extent and severity of fibrosis.*



*Figure 49 Relationship between pre-anastomotic lactate levels (ratio of ROI 1/2a+2b) and histological inflammation score*

## **STUDY 7**

**Ability to register the virtual perfusion cartography in moving organs**

**Refer to the attached manuscript**

# DISCUSSION

Proper evaluation of bowel perfusion is the key to success for resection anastomoses in surgery of the gastrointestinal tract. Indeed, improvement in local perfusion due to the development of collateral circulation is unlikely to occur during the first 5 days following a bowel resection with inadequately vascularized margins [136]. Consequently, anastomotic perfusion and intestinal viability are determined at the time of surgery and should be assessed correctly during the surgical procedure. Implementation in the clinical routine of an objective and accurate assessment method of intestinal blood supply could be desirable to decrease the rate of anastomotic complications directly ascribable to reduced perfusion.

Fluorescence videography is a surgical navigation modality which is flexible, rapid, easy to use and easy to integrate in the routine surgical work flow [48, 50, 143, 151].

Fluorescence-based methods for perfusion evaluation are the most promising, and new platforms are now available for intraoperative assessment in the setting of minimally invasive laparoscopic surgery.

Many authors have successfully tested fluorescence videography to assess digestive tract perfusion in the clinical setting for minimally-invasive colorectal resections [7, 9, 10, 71, 141, 144, 145] or for esophageal resections [152, 153].

In those studies, the presence or absence of fluorescence signal, due to the diffusion of the fluorophore within the GI wall, was used as metric to define the tissue as perfused or not.

However, the analysis is “static” and remains subjective. To correctly evaluate the fluorescent signal when assessing dynamic elements, such as intestinal perfusion, a dynamic, real-time and computer-based analysis is required for the following reasons:

- 1) Fluorescence intensity only does not take into account the over-time diffusion of the fluorescent dye, which can reach ischemic areas by retrograde flow and provide incorrect information on the exact perfusion status;
- 2) Fluorescence intensity is highly dependent on the source-to-target distance and could not be used for comparisons between patients without the use of a “standard” reference calibration

tool (which is a squared spot that elicits a constant signal when illuminated by the Near-Infrared light that should be introduced into the abdomen of the patient);

3) Repeated injections of fluorescents may perturb the evaluation of the signal, by accumulation of the fluorophore, leading to a saturated background.

To overcome those limitations, we have developed and validated in this thesis project an innovative method that merges the concept of fluorescence videography with the one of augmented reality (AR) to guide intestinal resection and assess vascular supply at the future anastomotic site. In our method, FLuorescence-based Enhanced Reality (FLER), virtual images of bowel perfusion (virtual vascular cartography) are generated from intraoperative live images based on fluorescence time-to-peak of Indocyanine Green as detected by a Near-Infrared endoscope and interpreted by an image analyzer software (ER-PERFUSION, IRCAD) [154].

To assess time-to-peak, dye injection is performed in real time while looking at the region of interest, in order to capture and record the “dynamics” of the diffusion as well as the evolution of fluorescence. The virtual perfusion cartography is created by averaging the signals over a 20- to 40-second video at the speed of 5 frames per second and attributing a color code based on the time required to reach the maximum intensity for each pixel. Each single pixel making up virtual perfusion cartography is a dynamic image (2D + diffusion time) standing for the average of several images (from 100 to 200). Virtual cartography is overlapped with real-time laparoscopic images in order to obtain an “augmented reality” effect.

The use of the fluorescence time-to-peak slope has two advantages when compared to the use of the absolute value of “fluorescence intensity”.

First, time-to-peak is independent of the distance between the light source and the imaged area. This is not the case with fluorescence intensity, which is highly dependent upon distance (a low perfused area may look more intensively fluorescent when observed closely and vice versa; a

highly perfused area may look poorly fluorescent when observed from afar). Secondly, time-to-peak allows for multiple and repetitive assessments since the “noise” produced by the accumulation of fluorescent dye does not affect the steepness of the slope.

Using time-to-peak allows to eliminate the need for the calibration tool and allows for objective inter-patient comparisons.

We started our project by verifying those hypotheses, when building the ER-PERFUSION software (as previously described in Materials and Methods).

We measured the inverse relationship between distance (light source-target) and fluorescence intensity, using a customary electromagnetic tracking device (METRIS 3D) [155]. To track the position of the D-Light P laparoscope, the METRIS 3D system was attached to the shaft of the laparoscope, and a 2cm plastic tool was also fixed to establish a set distance. The laparoscope was then used to target the fluorescence calibrating tool in a dark environment, and was moved in and out several times (**Figure 20**).

Secondly, we verified that time-to-peak allows for multiple and repetitive assessments, since the “noise” produced by the accumulation of fluorescent dye do not affect the steepness of the slope. In a preliminary test on a living animal, before starting the research protocol, a series of injections of ICG (0.125mg/kg) were performed while constantly focusing on the same small bowel loop (without ischemia). ICG was injected every 15 minutes and time-to-peak was calculated on two separate points of the loop and on the calibration tool delivering a constant signal. This test showed saturation occurring even with small doses if interval time is too short to wash out ICG. Global fluorescence intensity raised progressively, even if there were no changes in perfusion, while the steepness of the slope for time-to-peak was constant at each assessment (**Figure 21**). With time-to-peak, the background can be zeroed to allow for an additional dye injection. Only the additional signal is interpreted to generate virtual perfusion cartography.

A similar approach was used by Toens et al. in 2006, when validating the Indocyanine (IC) View Videography in a rabbit model of ischemia. Animals were injected with ICG at 0.25 mg/kg. The regions of interest were illuminated with a laser (0.16 w; wavelength 780 nm). Digital videos were recorded using a Digital Video Camcorder (IC View System, Pulsion Medical System, Munich; Germany), showing uptake, steady-state distribution, and substance clearance. Recorded fluorescence was correlated to tissue perfusion using the specific software (IC-CALC® SOFTWARE, Pulsion Medical System, Munich, Germany). The increment of fluorescence (Pixel Intensity) in regions of interest was measured as the curve steepness of light emission Pixel Intensity/sec [156]. The accuracy of the IC View in assessing intestinal viability was very high.

The main differences between the Toens study and our model are as follows: first, we used a laparoscopic platform equipped with a Near-Infrared optical system and secondly, we converted the fluorescence signal into a digital cartography that was overlapped to the live laparoscopic images to guide resection according to perfusion degree. A third major difference lies in the fact that we did not refer at all to fluorescence intensity, which is influenced by the distance between light source and target, but fluorescence time-to-peak is independent of the distance and is related to the blood flow, and gives a dynamic information as opposed to fluorescence intensity alone.

Another similar approach has been published by Zehetner et al. in 2015, using a specific software (SPY-Q system, Novadaq) providing quantitative information on perfusion of the gastric conduit during esophagectomy. The software produces a vascular cartography which can also be overlaid, but cannot be visualized as modular transparency Augmented Reality [157]. Authors concluded that the real-time assessment of perfusion using fluorescence angiography was correlated with the risk of anastomotic leak occurrence, confirming the relationship between sufficient perfusion and anastomotic healing.

To validate experimentally our system, the FLER (Fluorescence-based Enhanced Reality), we designed a series of experimental steps in the porcine models of bowel ischemia and we aimed to compare the performances of the software to objective measures of visceral and cellular suffering, as well as to real-time microscopic images.

### **STEP 1: VALIDATION OF CAPILLARY LACTATES AS A BIOMARKER OF INTESTINAL PERFUSION [12]**

We started with the validation of the measures that were later used for the laparoscopic FLER assessment, in an open surgery model of bowel ischemia: capillary lactates, mitochondria respiratory rate and metabolomics. Among those parameters, the measurement of capillary lactates with strip-based handheld devices, is a simple and inexpensive tool, (approximately 2 Euros per strip), providing the results in few seconds. Additionally, capillary lactates have been largely used by athletes to self-monitor their pre and post effort levels. In medicine, the largest use of real-time lactate assessment is done in obstetrics (scalp or umbilical cord lactates) to exclude an acidotic status of the baby. In an experimental model of acute limb ischemia, Noll et al. showed that local capillary lactates directly measured in blood obtained by limb needle puncture demonstrated both a rapid increase during ischemia and a rapid decrease during reperfusion, as they represent better markers than systemic lactates [158].

Systemic lactatemia is an unspecific marker of tissue hypoperfusion and slowly increases in response to mesenteric ischemia with significant elevation only after advanced damage [127].

In other words, oxygen debt leads to a local rapid accumulation of lactate in ischemic tissues and, more slowly, in the systemic circulation.

In the long-lasting ischemia model used in the STUDY 1, systemic lactates (arterial measured on blood sampled at the femoral artery and capillary lactates measured at the pig's groin) showed a high agreement and were both comparable to local capillary lactates at the clinically identified boundaries (2a-2b) and to those at vascularized areas (3a-3b) per all time points. A low agreement was found with ischemic bowel areas, confirming that systemic lactatemia is



unreliable to identify bowel hypoperfusion, at least when a small portion of the bowel is ischemic.

Capillary lactates allowed to build an accurate cartography of bowel perfusion. More interestingly, after 1 hour ischemia, lactates at the clinically identified resection line were still significantly higher than those at the vascular zone, demonstrating a mismatch between the visual appreciation and the real metabolic status of the bowel.

Capillary lactates assessment was complemented with the analysis, on the same spots of bowel, with the oxygraphic assessment of the mitochondria respiratory rate. This technique allows for the dynamic assessment of the functional status of mitochondria by measuring the activity of various oxidative phosphorylation enzymatic complexes. As previously seen, oxidative phosphorylation starts with a series of redox reactions (electron transport chain) in which electrons are transferred from donors (NADH or QH<sub>2</sub>) to the oxygen, which is the most electronegative acceptor. These reactions generate the energy necessary to actively pump H<sup>+</sup> protons in the inter-membrane space and create an electrochemical transmembrane gradient, which is used to produce adenosine triphosphate (ATP). There are 3 enzymatic proton pumps: complexes I, III, and IV. While severe impairment of complex IV (cytochrome C oxidase) leads to irreversible lesions, ischemia-induced dysfunction of complexes I and III can be readily reversible during the reperfusion phase.

Ischemia, by reducing the presence of O<sub>2</sub> as terminal electron acceptor, impairs the activity of those complexes, with progressive reduction of the gradient, energy depletion, and ultimately necrosis [159].

After 1 hour of ischemia, we found a significant respiratory chain impairment in the ischemic zone as compared to the nonischemic segments as expressed by reduced V<sub>MAX</sub> (1 hour).

Additionally, we performed a metabolomics analysis of small bowel full-thickness biopsies, using nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMRS). This is a powerful research tool,

which provides a quantitative snapshot of the tissue metabolism in a given condition[160] including intestinal ischemia/reperfusion [161].

What must be remembered concerning this highly controlled study is the following: (*a*) that the measurement of local capillary lactates using strip-based low-cost technology can very accurately build a metabolic cartography of the bowel in almost real time and (*b*) that there was a concordance between kinetics of capillary lactates, mitochondria respiratory rate, and metabolomics profiling of ischemia, witnessing the robustness of the experimental model. The ability to precisely discriminate well-perfused areas using capillary lactates was preserved during the progression of ischemia per all time points.

For this reason, we introduced the concept of metabolism guided resection based on pinpoint measure of capillary lactates, which can be also transferred to the minimally invasive setting [12]. To obtain capillary blood samples in the laparoscopic setting, we have used in previous experiments[162, 163] a motorized sterile pipette introduced through one of the laparoscopic ports. Capillary blood is aspirated from the bowel and then transferred on the strip of the lactate analyzer. More generally, the indications for the use of capillary lactates in gastrointestinal surgery are all those requiring some resection (eg, sleeve gastrectomy) or resection-anastomosis (eg, colorectal surgery). The threshold value of capillary lactates ensuring optimal anastomotic healing was evaluated in the survival model described hereinafter.

Based on those initial results, we felt comfortable to use those markers to validate and assess the accuracy of the FLER system.

## **STEP 2: VALIDATION OF CONFOCAL LASER ENDOMICROSCOPY AS A MORPHOLOGIC MARKER OF INTESTINAL PERFUSION [13]**

In the STUDY 2 we aimed to assess the ability of Confocal Laser Endomicroscopy (CLE) to evaluate intestinal mucosa changes due to ischemia, in order to correlate real-time histology with FLER identification of the future anastomotic site. We used the Cellvizio® (Mauna Kea

Technologies, Paris, France), which is a probe-based CLE system. The probe can be inserted through conventional endoscopes, and allows for intraoperative microscopic imaging of neoplastic and inflammatory lesions virtually throughout the entire gastrointestinal tract [164]. The clinical interest of confocal technology in the evaluation of neoplasia in Barrett's metaplasia[165], gastric[166] and colorectal[167] neoplasia seems to be increasingly confirmed. The Cellvizio® is not meant for the evaluation of intestinal ischemia, and as a result, no reference atlas on mucosal changes due to ischemia is available. In the STEP 2 we performed confocal scanning of the bowel mucosa at different ischemia times and some obvious changes could be observed as early as 1 hour after ischemia induction. The inability to obtain a clear confocal image of enterocytes and crypts was an almost constant finding at the center of the ischemic area due to the absence of penetration of fluorescein into the ischemic tissue. Moving towards future resection lines but still within the ischemic zone, a consistent change was the presence of enterocytes with a "target cell" image, with a clear acinar center. This was due to a distortion of the glandular lumen, with increased permeability to fluorescein. This "target cell" image was not visible in vascular zones, in which the center of enterocytes was constantly black [13]. This semantic was prospectively applied in further validation steps.

### **STEP 3: PROOF OF THE CONCEPT OF LAPAROSCOPIC FLER ASSESSMENT OF PERFUSION [11, 14]**

For the proof of the concept, the ER-PERFUSION software was set to discriminate a difference of 50% in time-to-peak (perfusion delay) and alter the color code attributing an "empty spot" to the digital perfusion cartography when the rise in the fluorescence signal was delayed by more than 50%. With this setting of 1h laparoscopic bowel ischemia model, FLER provided a fast, consistent and quantitative grading of perfusion and allowed to precisely identify the ischemic region and the lines separating ischemic zone from the well-vascularized bowel (**Figures xy**). The surrogate use of cellular suffering markers in place of anastomotic leaks as primary outcome, allowed to considerably reduce the number of experimental subjects.

There was a strong agreement between the Fluorescence-based Enhanced Reality discrimination of the intestinal perfusion at the ROIs and different markers of cellular energetic status and metabolism: local lactates, mitochondrial respiration rate and metabonomic profiling. As per capillary lactates, there was a statistically significant difference in their levels between the ischemic area and the future resection lines, but no difference between resection lines as identified by FLER and vascular areas. So, FLER was effective to discriminate precisely the perfusion level as predetermined by the software setting.

In a porcine model of free small bowel flaps, Birke-Sorensen et al. used a microdialysis catheter to monitor local lactate and glucose. They could identify a cut-off of the lactate/glucose ratio yielding excellent accuracy to discriminate between ischemic and non-ischemic segments [168]

We found an already significant impairment of respiratory chain in the ischemic zone as compared to the non-ischemic segments as expressed by the  $V_{max}$  and  $V_{succi}$ . The FLER could effectively differentiate the small bowel zones presenting these very early signs of energetic suffering. The preserved activity of complex IV ( $V_{tmpd}$ ) can be easily explained by the short duration of the ischemia and is a sign of cellular viability, since the reactions depending on complexes I and III are ready reversible in the ischemia-reperfusion models.

Vincenti et al.[161] assessed metabonomic profiling in small bowel samples after induction of intestinal ischemia-reperfusion injury by mesenteric artery (MA) or portal vein (PV) outflow occlusion in rats. Similarly to our study, the authors found dramatic changes in the intestinal biochemical profile and outlined 9 metabolites (out of 43 quantified) as being significantly different among the MA, PV, and sham groups. Among these metabolites, there were glucose, lactate, and amino acids such as glutamate, glutamine, methionine, valine, leucine, and isoleucine. In our study, metabolomics profiles demonstrated decreased glucose levels and increased tissue lactate and amino acids following ischemia, showing an increased anaerobic glycolysis. The significant increase of Choline, Ethanolamine, Syloinositol and Myoinositol,

which are phospholipids involved in the cellular membrane integrity, may represent an early sign of cellular ischemic damage.

#### **STEP 4: PERFORMANCE OF FLER vs. CLINICAL JUDGMENT IN A LAPAROSCOPIC MODEL OF SIGMOID ISCHEMIA USING PROBE-BASED CONFOCAL ENDOMICROSCOPY (CLE)[16]**

When designing this step, we aimed at 1) determine if FLER was more accurate than clinical assessment to discriminate the bowel resection lines based on perfusion and 2) to determine if there is any measurable difference between mucosal ischemic changes as evidenced by CLE and visually defined or FLER-determined levels. In other words, we aimed to verify if the “external” serosa bowel signs detected by FLER were correlated to the changes at the corresponding mucosa level. To explore microscopic morphologic ischemic changes occurring at the mucosa, a model of sigmoid ischemia was preferred over the small bowel enabling access with the confocal Cellvizio® probe through a conventional endoscope. A 1-hour ischemia duration was chosen to be consistent with “ischemic time” occurring during a standard laparoscopic sigmoid resection with a vascular-first, medial-to-lateral approach.

FLER was compared to the clinical evaluation made by two blinded surgeons (BD and YN who are consultant and PGY8 respectively). In 50% of cases, distance measured between clips (clinical estimation) and the drawing made with the surgical marker under FLER guidance was less than 1cm, and, as a result, evaluations were defined as concordant. However, in all but one case, the FLER-guided marking was invariably more distant to the ischemic zone.

FLER was able to identify the location of the bowel where typical semantics described as CLE imaging of ischemia appeared on the mucosa, more accurately than the clinical assessment, which were also confirmed by the capillary lactates levels.

It is not currently known how ischemic changes of colonic intestinal mucosa correlate to changes in seromuscular layers, or whether one is a better predicting factor of anastomotic ischemia as compared to the other. Yasumura et al.[169] used a charge-coupled microscopic

device to perform the microscopic analysis of the serosal bowel layer. It could calculate the ratio of blood cells to the effective intestinal vascular bed as a predictive index of bowel survival. This technique which quantifies blood flow objectively seems to be very promising and useful, unless it is time-consuming.

However, CLE requires the mobilization of too many resources. It is time-consuming and less adapted than FLER to routine use in clinical practice for anastomotic perfusion assessment. Nonetheless, CLE remains a very appealing technology for some clinical applications such as stoma perfusion assessment. Additionally, the ability to visually follow up intestinal perfusion could be of paramount importance, especially in the Intensive Care Unit, to adjust resuscitation treatment in patients undergoing an open abdomen procedure or in patients treated for abdominal compartment syndrome. This might have a prognostic value in septic shock of abdominal origins. Schmidt et al. used Confocal Laser Endomicroscopy to detect sepsis-related changes in intestinal mucosal microcirculation[170] in a porcine model of septic shock and also in patients in severe sepsis and in healthy controls.

The dynamic aspect of confocal scanning provides the ability to identify precise clues at any level of ischemia and yields advantages regarding the static picture of standard pathology. It also allows for more precise assessments.

#### **STEP 5: REAL-TIME NAVIGATION BY FLUORESCENCE-BASED ENHANCED REALITY FOR PRECISE ESTIMATION OF FUTURE ANASTOMOTIC SITE IN DIGESTIVE SURGERY [15]**

In this step, we aimed to check the possibility to perform repeated injections and to evaluate FLER performances over time when compared to clinical assessment, in a longer ischemia model. Performances of fluorescence evaluation to detect perfused areas can decrease because of ICG accumulation from previous injections that might alter signal interpretation by increasing the noise given by a saturated background. Simultaneously, clinical evaluation could be superior because of a clearer delineation during ischemia progression.

The distance between resection lines as identified by FLER and blinded clinical assessment, and levels of local capillary lactates were used to compare performances.

The minimum discriminating distance between the two evaluation methods was fixed to 1cm because the width of the laparoscopic linear staplers commercially available is 1cm, and thus a lower distance would have minimal clinical impact. A second reason was that full-thickness biopsies of approximately 0.5cm were taken at the ROIs to measure mitochondria activity and for histology.

The distance between resection lines (2a and 2b) at clinical assessment and FLER in discordant cases (distance >1cm; n=18) decreased with duration of ischemia. In such cases, a blinded clinical evaluation identified resection lines closer to the ischemic area or within the ischemic area in 3 out of 6 cases at 2h, in 5 out of 6 cases at 4h, and in 3 out of 4 at 6h. The better performance of FLER in terms of distance at 4h of ischemia was confirmed by the analysis of local capillary lactates.

Local lactates at presumed viable margins in discordant cases (distance between Clinic and FLER >1cm) were statistically significantly higher at ( $2a_{\text{CLINIC}}+2b_{\text{CLINIC}}$ ) when compared to those at ( $2a_{\text{FLER}}+2b_{\text{FLER}}$ ) ( $p=0.02$ ) after 4h of ischemia.

Pathology evaluation in our study did not show a clearly time-dependent progression of mucosal damage. On the contrary, the ischemia score was regularly worse after shorter ischemic periods. This could partly be explained by the limited size of the ischemic segment and the presence of some overlapping vascular networks on the bowel serosa which might have protected from further ischemic damage.

FLER could effectively differentiate the small bowel zones presenting early signs of energetic suffering as demonstrated by the oxygraphic measurement of the mitochondria respiratory rate.

The preserved mitochondria activity at the FLER designed zones, confirmed the efficacy of

ischemic vs. non-ischemic bowel discrimination at all-time points, with an increased accuracy after 4h and 6h of ischemia.

#### **STEP 6 INTRAOPERATIVE FLUORESCENCE-BASED ENHANCED REALITY LAPAROSCOPIC REAL-TIME IMAGING TO ASSESS BOWEL PERFUSION AT THE ANASTOMOTIC SITE IN AN EXPERIMENTAL MODEL [17]**

This was the last pre-clinical step validating the FLER system in a survival animal model before going to clinical assessment.

This step was a logic requirement to evaluate the accuracy of the software and to correlate the quantitative FLER evaluation of bowel perfusion before resection and anastomosis with the healing process.

The quantitative definition of critical pre-anastomotic perfusion is not known. The need for a subcritical model of perfusion was felt to increase the likelihood of occurrence of anastomotic complications in order to reduce the number of experimental subjects.

For this step, the ER-PERFUSION software was upgraded to (1) improve the interface, and (2) to improve efficacy by reducing the time to calculate virtual perfusion cartography as well as registration of cartography with real images. The upgraded software can display, upon surgeon demand, only the resection lines projected onto the bowel with an enhanced reality effect.

The software was preset to identify various levels of bowel perfusions as low (25% of a control vascular area) and high (75%), where to perform the resection and the consequent anastomosis. When designing the protocol, balancing the weight of ethical and statistical considerations, a critical perfusion of 25% of the maximal, was considered acceptable given the possibility to significantly reduce the required sample size. Lower perfusions than 25% were considered at too high theoretical risk to generate substantial sufferance to the animal in the postoperative period, with no additional scientific benefits.

FLER analysis applies to perfusion evaluation at any location of the GI tract, and this model should be considered as a simulation of anastomotic perfusion and not as a small bowel



mesenteric ischemia model, in which the ischemic segment would be removed at large, without paying that much attention to resection lines. In colorectal resections, any centimeter of the anastomotic line can have an impact on tension and on the healing process, and a system able to display the exact perfusion value might have a high significant clinical impact.

Additionally, this was the first study, to the best of our knowledge, in which the pre-anastomotic and post-anastomotic capillary lactates levels and mitochondria respiratory chain level are assessed in a survival study.

Local capillary lactates reflect tissue oxygenation more closely than systemic lactates [158].

A clinical trial is currently underway at the University Hospital of Strasbourg in which capillary lactates, measured by means of a strip-based lactate analyzer, requiring a single drop of blood, are being used as a means to guide the level of limb amputation.

The impact of pre-anastomotic capillary lactate levels on digestive anastomosis healing has not been evaluated so far. As expected, FLER analysis found a significant difference in local lactates between areas at 25% and 75%, with a linear correlation with the software presetting. Although not statistically significant, due to the limited sample size, the only cases of anastomotic complications (n=2) and clearly higher postoperative adhesions scores were observed in the 25% group presenting higher mean pre-anastomotic local lactates levels. A ratio between lactates at the ischemic area and resection lines ( $2a-2b$ )  $\leq 2$  was identified as predictive of higher inflammation scores at the microscopic analysis. From these limited data, 25% of perfusion seems to be a subcritical level of perfusion, at least in the porcine model, which certainly impairs healing but does not necessarily generate surgical complications.

Similar results were found concerning the mitochondria respiratory rate. As expected, before anastomosis, the ischemic small bowel demonstrated reduced mitochondrial respiration. Importantly, V0 did not show impairment 10 days after surgery. Nevertheless, it was significantly more impaired in areas identified as 25% perfused when compared to those identified at 75% by FLER. However, the remnant perfusion preserved mitochondria activity,

as demonstrated by the ability to reach comparable values of maximal respiratory rate ( $V_{max}$ ) in both 25% and 75% areas. We were not expecting any improvement in mitochondrial performances after the healing process, even in the best perfusion conditions, since only ischemia was induced, with no reperfusion cycles. An improvement in mitochondria respiration can be expected by pre-conditioning the tissue, through ischemia reperfusion cycles[117].

#### **STEP 7 ABILITY TO REGISTER THE VIRTUAL PERFUSION CARTOGRAPHY IN MOVING ORGANS [18].**

Recently, a tracking feature was developed and implemented in the ER software package. This was a strong clinical requirement, to allow for constant registration of virtual perfusion cartography obtained by fluorescence time-to-peak onto real images, even during bowel manipulation or respiratory movements. To track and constantly register FLER, virtual cartography is deformed by using an affine deformation created by pixel displacement estimated by a feature matching algorithm (BRIEF: binary robust independent elementary features) [171], in order to follow the motion of the regions of interest. This tracking system is undergoing optimization.

### **Future perspectives**

An image-merging modality is being implemented in the D-Light P with the aim to obtain a real-time update of quantitative time-to-peak values. These improvements will decrease the time to obtain FLER from the actual 4 to 5 minutes to around 1 minute.

A clinical trial (**Protocol n° 15-005 N° IDRCB: 2015-A01223-46**, see pdf attached), has been recently approved by the Ethical Committee and is expected to start enrolling soon at our Institute of Image-Guided Surgery in Strasbourg: Perfusion Evaluation by Real-time Fluorescence-based Enhanced Reality of anastomosis (PERFECT) ClinicalTrials.gov Identifier: NCT0262609.1

# CONCLUSIONS

## CONCLUSIONS

The real-time FLER system allows for a rapid, quantitative, and reproducible assessment of bowel perfusion to determine the optimal anastomotic site.

In the experimental setting, FLER has shown a high accuracy to predict anastomotic healing and a superior performance when compared to clinical evaluation.

Robust biomarkers of tissue perfusion such as the intraoperative measurement of capillary lactates, the oxygraphic evaluation of mitochondria respiratory rate and the quantification and evolution of the metabolomics profiling over time supported the accuracy of the FLER system. showed concordant kinetics in this experimental model. Confocal analysis confirmed that FLER is effective to discriminate the transition zone at the future anastomotic site.

A transfer of this technology to the clinical setting is scheduled at IHU-Strasbourg, Institute for Image-Guided Surgery, during 2016, ClinicalTrials.gov Identifier: NCT0262609.1.

**BIBLIOGRAPHIE**

1. Karliczek A, Benaron DA, Baas PC, Zeebregts CJ, Wiggers T, van Dam GM (2010) Intraoperative assessment of microperfusion with visible light spectroscopy for prediction of anastomotic leakage in colorectal anastomoses. *Colorectal disease : the official journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland* 12:1018-1025
2. Karliczek A, Harlaar NJ, Zeebregts CJ, Wiggers T, Baas PC, van Dam GM (2009) Surgeons lack predictive accuracy for anastomotic leakage in gastrointestinal surgery. *International journal of colorectal disease* 24:569-576
3. Urbanavicius L, Pattyn P, de Putte DV, Venskutonis D (2011) How to assess intestinal viability during surgery: A review of techniques. *World journal of gastrointestinal surgery* 3:59-69
4. Nachiappan S, Askari A, Currie A, Kennedy RH, Faiz O (2014) Intraoperative assessment of colorectal anastomotic integrity: a systematic review. *Surgical endoscopy* 28:2513-2530
5. Carus T, Dammer R (2012) Laparoscop fluorescence angiography with indocyanine green to control the perfusion of gastrointestinal anastomoses intraoperatively. *Surgical technology international* 22:27-32
6. Ris F, Hompes R, Cunningham C, Lindsey I, Guy R, Jones O, George B, Cahill RA, Mortensen NJ (2014) Near-infrared (NIR) perfusion angiography in minimally invasive colorectal surgery. *Surgical endoscopy* 28:2221-2226
7. Jafari MD, Lee KH, Halabi WJ, Mills SD, Carmichael JC, Stamos MJ, Pigazzi A (2013) The use of indocyanine green fluorescence to assess anastomotic perfusion during robotic assisted laparoscopic rectal surgery. *Surgical endoscopy* 27:3003-3008
8. Hellan M, Spinoglio G, Pigazzi A, Lagares-Garcia JA (2014) The influence of fluorescence imaging on the location of bowel transection during robotic left-sided colorectal surgery. *Surgical endoscopy* 28:1695-1702
9. Sherwinter DA, Gallagher J, Donkar T (2013) Intra-operative transanal near infrared imaging of colorectal anastomotic perfusion: a feasibility study. *Colorectal disease : the official journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland* 15:91-96
10. Jafari MD, Wexner SD, Martz JE, McLemore EC, Margolin DA, Sherwinter DA, Lee SW, Senagore AJ, Phelan MJ, Stamos MJ (2015) Perfusion assessment in laparoscopic left-sided/anterior resection (PILLAR II): a multi-institutional study. *Journal of the American College of Surgeons* 220:82-92 e81
11. Diana M, Noll E, Agnus V, Liu YY, Kong SH, Legner A, Diemunsch P, Marescaux J (2015) Reply to Letter: "Enhanced Reality Fluorescence Videography to Assess Bowel Perfusion: The Cybernetic Eye". *Annals of surgery*

12. Diana M, Noll E, Diemunsch P, Moussallieh FM, Namer IJ, Charles AL, Lindner V, Agnus V, Geny B, Marescaux J (2015) Metabolism-Guided Bowel Resection: Potential Role and Accuracy of Instant Capillary Lactates to Identify the Optimal Resection Site. *Surgical innovation* 22:453-461
13. Schiraldi L, Marchegiani F, Diana M, Lindner V, Noll E, Marescaux J (2015) Functional Capillary Density for in Vivo Estimation of Intestinal Perfusion using Real-Time Confocal Endomicroscopy. *J Cytol Histol* 6
14. Diana M, Noll E, Diemunsch P, Dallemagne B, Benahmed MA, Agnus V, Soler L, Barry B, Namer IJ, Demartines N, Charles AL, Geny B, Marescaux J (2014) Enhanced-reality video fluorescence: a real-time assessment of intestinal viability. *Annals of surgery* 259:700-707
15. Diana M, Halvax P, Dallemagne B, Nagao Y, Diemunsch P, Charles AL, Agnus V, Soler L, Demartines N, Lindner V, Geny B, Marescaux J (2014) Real-time navigation by fluorescence-based enhanced reality for precise estimation of future anastomotic site in digestive surgery. *Surgical endoscopy* 28:3108-3118
16. Diana M, Dallemagne B, Chung H, Nagao Y, Halvax P, Agnus V, Soler L, Lindner V, Demartines N, Diemunsch P, Geny B, Swanstrom L, Marescaux J (2014) Probe-based confocal laser endomicroscopy and fluorescence-based enhanced reality for real-time assessment of intestinal microcirculation in a porcine model of sigmoid ischemia. *Surgical endoscopy* 28:3224-3233
17. Diana M, Agnus V, Halvax P, Liu YY, Dallemagne B, Schlagowski AI, Geny B, Diemunsch P, Lindner V, Marescaux J (2015) Intraoperative fluorescence-based enhanced reality laparoscopic real-time imaging to assess bowel perfusion at the anastomotic site in an experimental model. *The British journal of surgery* 102:e169-176
18. Selka F, Agnus V, Nicolau S, Bessaid A, Soler L, Marescaux J, Diana M (2014) Fluorescence-Based Enhanced Reality for Colorectal Endoscopic Surgery. *Biomedical Image Registration* 8545 114-123
19. Collins FS, Varmus H (2015) A new initiative on precision medicine. *N Engl J Med* 372:793-795
20. Marescaux J, Diana M (2015) Inventing the future of surgery. *World journal of surgery* 39:615-622
21. Pessaux P, Diana M, Soler L, Piardi T, Mutter D, Marescaux J (2015) Towards cybernetic surgery: robotic and augmented reality-assisted liver segmentectomy. *Langenbeck's archives of surgery / Deutsche Gesellschaft fur Chirurgie* 400:381-385
22. Diana M, Marescaux J (2015) Robotic surgery. *The British journal of surgery* 102:e15-28
23. Marescaux J, Diana M (2015) Next step in minimally invasive surgery: hybrid image-guided surgery. *Journal of pediatric surgery* 50:30-36

24. Weissleder R, Pittet MJ (2008) Imaging in the era of molecular oncology. *Nature* 452:580-589
25. Marescaux J, Diana M, Soler L (2013) Augmented Reality and Minimally Invasive Surgery. *Journal of Gastroenterology and Hepatology Research* 2
26. Nicolau S, Soler L, Mutter D, Marescaux J (2011) Augmented reality in laparoscopic surgical oncology. *Surgical oncology* 20:189-201
27. D'Agostino J, Diana M, Vix M, Soler L, Marescaux J (2012) Three-dimensional virtual neck exploration before parathyroidectomy. *The New England journal of medicine* 367:1072-1073
28. Marescaux J, Rubino F, Arenas M, Mutter D, Soler L (2004) Augmented-reality-assisted laparoscopic adrenalectomy. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 292:2214-2215
29. Pessaux P, Diana M, Soler L, Piardi T, Mutter D, Marescaux J (2014) Robotic duodenopancreatectomy assisted with augmented reality and real-time fluorescence guidance. *Surgical endoscopy*
30. Rutegard M, Rutegard J (2015) Anastomotic leakage in rectal cancer surgery: The role of blood perfusion. *World journal of gastrointestinal surgery* 7:289-292
31. Ho YH, Ashour MA Techniques for colorectal anastomosis. *World J Gastroenterol* 16:1610-1621
32. Diana M, Mutter D, Lindner V, Vix M, Chung H, Demartines N, Marescaux J (2014) A modular magnetic anastomotic device for minimally invasive digestive anastomosis: proof of concept and preliminary data in the pig model. *Surgical endoscopy*
33. Bosmans JW, Jongen AC, Bouvy ND, Derikx JP (2015) Colorectal anastomotic healing: why the biological processes that lead to anastomotic leakage should be revealed prior to conducting intervention studies. *BMC Gastroenterol* 15:180
34. Oines MN, Krarup PM, Jorgensen LN, Agren MS (2014) Pharmacological interventions for improved colonic anastomotic healing: a meta-analysis. *World journal of gastroenterology : WJG* 20:12637-12648
35. Hyman N, Manchester TL, Osler T, Burns B, Cataldo PA (2007) Anastomotic leaks after intestinal anastomosis: it's later than you think. *Annals of surgery* 245:254-258
36. Bruce J, Krukowski ZH, Al-Khairi G, Russell EM, Park KG (2001) Systematic review of the definition and measurement of anastomotic leak after gastrointestinal surgery. *The British journal of surgery* 88:1157-1168
37. Cong ZJ, Hu LH, Bian ZQ, Ye GY, Yu MH, Gao YH, Li ZS, Yu ED, Zhong M (2013) Systematic review of anastomotic leakage rate according to an international grading system following anterior resection for rectal cancer. *PLoS One* 8:e75519



38. Matthiessen P, Hallbook O, Rutegard J, Simert G, Sjodahl R (2007) Defunctioning stoma reduces symptomatic anastomotic leakage after low anterior resection of the rectum for cancer: a randomized multicenter trial. *Annals of surgery* 246:207-214
39. Enker WE, Merchant N, Cohen AM, Lanouette NM, Swallow C, Guillem J, Paty P, Minsky B, Weyrauch K, Quan SH (1999) Safety and efficacy of low anterior resection for rectal cancer: 681 consecutive cases from a specialty service. *Annals of surgery* 230:544-552; discussion 552-544
40. Matthiessen P, Lindgren R, Hallbook O, Rutegard J, Sjodahl R Symptomatic anastomotic leakage diagnosed after hospital discharge following low anterior resection for rectal cancer. *Colorectal Dis* 12:e82-87
41. Kassis ES, Kosinski AS, Ross P, Jr., Koppes KE, Donahue JM, Daniel VC (2013) Predictors of anastomotic leak after esophagectomy: an analysis of the society of thoracic surgeons general thoracic database. *Ann Thorac Surg* 96:1919-1926
42. Frasson M, Flor-Lorente B, Rodriguez JL, Granero-Castro P, Hervas D, Alvarez Rico MA, Brao MJ, Sanchez Gonzalez JM, Garcia-Granero E, Group AS (2015) Risk Factors for Anastomotic Leak After Colon Resection for Cancer: Multivariate Analysis and Nomogram From a Multicentric, Prospective, National Study With 3193 Patients. *Annals of surgery* 262:321-330
43. Midura EF, Hanseman D, Davis BR, Atkinson SJ, Abbott DE, Shah SA, Paquette IM (2015) Risk factors and consequences of anastomotic leak after colectomy: a national analysis. *Dis Colon Rectum* 58:333-338
44. Hayden DM, Mora Pinzon MC, Francescatti AB, Saclarides TJ (2015) Patient factors may predict anastomotic complications after rectal cancer surgery: Anastomotic complications in rectal cancer. *Ann Med Surg (Lond)* 4:11-16
45. Ballantyne GH, Burke JB, Rogers G, Lampert EG, Boccia J (1985) Accelerated wound healing with stapled enteric suture lines. An experimental study comparing traditional sewing techniques and a stapling device. *Annals of surgery* 201:360-364
46. Graffner H, Andersson L, Lowenhielm P, Walther B (1984) The healing process of anastomoses of the colon. A comparative study using single, double-layer or stapled anastomosis. *Diseases of the colon and rectum* 27:767-771
47. Lustosa SA, Matos D, Atallah AN, Castro AA (2001) Stapled versus handsewn methods for colorectal anastomosis surgery. *Cochrane database of systematic reviews (Online):*CD003144
48. Gioux S, Choi HS, Frangioni JV (2010) Image-guided surgery using invisible near-infrared light: fundamentals of clinical translation. *Molecular imaging* 9:237-255
49. Nguyen QT, Tsien RY (2013) Fluorescence-guided surgery with live molecular navigation--a new cutting edge. *Nat Rev Cancer* 13:653-662
50. Alander JT, Kaartinen I, Laakso A, Patila T, Spillmann T, Tuchin VV, Venermo M, Valisuo P (2012) A review of indocyanine green fluorescent imaging in surgery. *Int J Biomed Imaging* 2012:940585

51. Marshall MV, Rasmussen JC, Tan IC, Aldrich MB, Adams KE, Wang X, Fife CE, Maus EA, Smith LA, Sevick-Muraca EM (2010) Near-Infrared Fluorescence Imaging in Humans with Indocyanine Green: A Review and Update. *Open Surg Oncol J* 2:12-25
52. Matsui A, Tanaka E, Choi HS, Kianzad V, Gioux S, Lomnes SJ, Frangioni JV (2010) Real-time, near-infrared, fluorescence-guided identification of the ureters using methylene blue. *Surgery* 148:78-86
53. Ashitate Y, Vooght CS, Hutteman M, Oketokoun R, Choi HS, Frangioni JV (2012) Simultaneous assessment of luminal integrity and vascular perfusion of the gastrointestinal tract using dual-channel near-infrared fluorescence. *Molecular imaging* 11:301-308
54. Shin D, Vigneswaran N, Gillenwater A, Richards-Kortum R (2010) Advances in fluorescence imaging techniques to detect oral cancer and its precursors. *Future Oncol* 6:1143-1154
55. D'Hallewin MA, Bezdetnaya L, Guillemin F (2002) Fluorescence detection of bladder cancer: a review. *Eur Urol* 42:417-425
56. Tsuruki ES, Saito Y, Abe S, Takamaru H, Yamada M, Sakamoto T, Nakajima T, Matsuda T, Sekine S, Taniguchi H (2016) Evaluating the efficacy and safety of a novel endoscopic fluorescence imaging modality using oral 5-aminolevulinic acid for colorectal tumors. *Endosc Int Open* 4:E30-35
57. McElroy M, Kaushal S, Luiken GA, Talamini MA, Moossa AR, Hoffman RM, Bouvet M (2008) Imaging of primary and metastatic pancreatic cancer using a fluorophore-conjugated anti-CA19-9 antibody for surgical navigation. *World journal of surgery* 32:1057-1066
58. Tran Cao HS, Kaushal S, Metildi CA, Menen RS, Lee C, Snyder CS, Messer K, Pu M, Luiken GA, Talamini MA, Hoffman RM, Bouvet M (2012) Tumor-specific fluorescence antibody imaging enables accurate staging laparoscopy in an orthotopic model of pancreatic cancer. *Hepatogastroenterology* 59:1994-1999
59. Hall MA, Pinkston KL, Wilganowski N, Robinson H, Ghosh P, Azhdarinia A, Vazquez-Arreguin K, Kolonin AM, Harvey BR, Sevick-Muraca EM (2012) Comparison of mAbs targeting epithelial cell adhesion molecule for the detection of prostate cancer lymph node metastases with multimodal contrast agents: quantitative small-animal PET/CT and NIRF. *J Nucl Med* 53:1427-1437
60. Nakajima T, Mitsunaga M, Bander NH, Heston WD, Choyke PL, Kobayashi H (2011) Targeted, activatable, in vivo fluorescence imaging of prostate-specific membrane antigen (PSMA) positive tumors using the quenched humanized J591 antibody-indocyanine green (ICG) conjugate. *Bioconjug Chem* 22:1700-1705
61. Rosbach KJ, Williams MD, Gillenwater AM, Richards-Kortum RR (2012) Optical molecular imaging of multiple biomarkers of epithelial neoplasia: epidermal growth factor receptor expression and metabolic activity in oral mucosa. *Transl Oncol* 5:160-171

62. Hellebust A, Richards-Kortum R (2012) Advances in molecular imaging: targeted optical contrast agents for cancer diagnostics. *Nanomedicine (Lond)* 7:429-445
63. Sevick-Muraca EM, Houston JP, Gurfinkel M (2002) Fluorescence-enhanced, near infrared diagnostic imaging with contrast agents. *Curr Opin Chem Biol* 6:642-650
64. Nakayama A, del Monte F, Hajjar RJ, Frangioni JV (2002) Functional near-infrared fluorescence imaging for cardiac surgery and targeted gene therapy. *Molecular imaging* 1:365-377
65. Ntziachristos V, Bremer C, Weissleder R (2003) Fluorescence imaging with near-infrared light: new technological advances that enable in vivo molecular imaging. *Eur Radiol* 13:195-208
66. Themelis G, Yoo JS, Soh KS, Schulz R, Ntziachristos V (2009) Real-time intraoperative fluorescence imaging system using light-absorption correction. *J Biomed Opt* 14:064012
67. Furukawa N, Oi H, Yoshida S, Shigetomi H, Kanayama S, Kobayashi H (2010) The usefulness of photodynamic eye for sentinel lymph node identification in patients with cervical cancer. *Tumori* 96:936-940
68. Hirche C, Engel H, Kolios L, Cognie J, Hunerbein M, Lehnhardt M, Kremer T (2013) An experimental study to evaluate the Fluobeam 800 imaging system for fluorescence-guided lymphatic imaging and sentinel node biopsy. *Surgical innovation* 20:516-523
69. Lim C, Vibert E, Azoulay D, Salloum C, Ishizawa T, Yoshioka R, Mise Y, Sakamoto Y, Aoki T, Sugawara Y, Hasegawa K, Kokudo N (2014) Indocyanine green fluorescence imaging in the surgical management of liver cancers: current facts and future implications. *Journal of visceral surgery* 151:117-124
70. Gioux S, Coutard JG, Berger M, Grateau H, Josserand V, Keramidis M, Righini C, Coll JL, Dinten JM (2012) FluoSTIC: miniaturized fluorescence image-guided surgery system. *J Biomed Opt* 17:106014
71. Ris F, Hompes R, Cunningham C, Lindsey I, Guy R, Jones O, George B, Cahill RA, Mortensen NJ (2014) Near-infrared (NIR) perfusion angiography in minimally invasive colorectal surgery. *Surgical endoscopy*
72. Lee BT, Hutteman M, Gioux S, Stockdale A, Lin SJ, Ngo LH, Frangioni JV (2010) The FLARE intraoperative near-infrared fluorescence imaging system: a first-in-human clinical trial in perforator flap breast reconstruction. *Plast Reconstr Surg* 126:1472-1481
73. Metildi CA, Felsen CN, Savariar EN, Nguyen QT, Kaushal S, Hoffman RM, Tsien RY, Bouvet M (2014) Ratiometric Activatable Cell-Penetrating Peptides Label Pancreatic Cancer, Enabling Fluorescence-Guided Surgery, Which Reduces Metastases and Recurrence in Orthotopic Mouse Models. *Annals of surgical oncology*
74. Metildi CA, Kaushal S, Luiken GA, Hoffman RM, Bouvet M (2014) Advantages of fluorescence-guided laparoscopic surgery of pancreatic cancer labeled with

- fluorescent anti-carcinoembryonic antigen antibodies in an orthotopic mouse model. *Journal of the American College of Surgeons* 219:132-141
75. Metildi CA, Kaushal S, Pu M, Messer KA, Luiken GA, Moossa AR, Hoffman RM, Bouvet M (2014) Fluorescence-guided surgery with a fluorophore-conjugated antibody to carcinoembryonic antigen (CEA), that highlights the tumor, improves surgical resection and increases survival in orthotopic mouse models of human pancreatic cancer. *Annals of surgical oncology* 21:1405-1411
  76. Metildi CA, Tang CM, Kaushal S, Leonard SY, Magistri P, Tran Cao HS, Hoffman RM, Bouvet M, Sicklick JK (2013) In vivo fluorescence imaging of gastrointestinal stromal tumors using fluorophore-conjugated anti-KIT antibody. *Annals of surgical oncology* 20 Suppl 3:S693-700
  77. van Dam GM, Themelis G, Crane LM, Harlaar NJ, Pleijhuis RG, Kelder W, Sarantopoulos A, de Jong JS, Arts HJ, van der Zee AG, Bart J, Low PS, Ntziachristos V (2011) Intraoperative tumor-specific fluorescence imaging in ovarian cancer by folate receptor-alpha targeting: first in-human results. *Nat Med* 17:1315-1319
  78. Flum DR, Cheadle A, Prella C, Dellinger EP, Chan L (2003) Bile duct injury during cholecystectomy and survival in medicare beneficiaries. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 290:2168-2173
  79. Paczynski A, Koziarski T, Stanowski E, Krupa J (2002) Extrahepatic bile duct injury during laparoscopic cholecystectomy -- own material. *Med Sci Monit* 8:CR438-440
  80. Shea JA, Healey MJ, Berlin JA, Clarke JR, Malet PF, Staroscik RN, Schwartz JS, Williams SV (1996) Mortality and complications associated with laparoscopic cholecystectomy. A meta-analysis. *Annals of surgery* 224:609-620
  81. Navez B, Ungureanu F, Michiels M, Claeys D, Muysoms F, Hubert C, Vanderveken M, Detry O, Detroz B, Closset J, Devos B, Kint M, Navez J, Zech F, Gigot JF, Belgian Group for Endoscopic S, the H, Pancreatic Section of the Royal Belgian Society of S (2012) Surgical management of acute cholecystitis: results of a 2-year prospective multicenter survey in Belgium. *Surgical endoscopy* 26:2436-2445
  82. Kum CK, Eypasch E, Lefering R, Paul A, Neugebauer E, Troidl H (1996) Laparoscopic cholecystectomy for acute cholecystitis: is it really safe? *World journal of surgery* 20:43-48; discussion 48-49
  83. Mir IS, Mohsin M, Kirmani O, Majid T, Wani K, Hassan MU, Naqshbandi J, Maqbool M (2007) Is intra-operative cholangiography necessary during laparoscopic cholecystectomy? A multicentre rural experience from a developing world country. *World journal of gastroenterology : WJG* 13:4493-4497
  84. Kaczynski J, Hilton J (2015) A gallbladder with the "hidden cystic duct": A brief overview of various surgical techniques of the Calot's triangle dissection. *Interventional medicine & applied science* 7:42-45
  85. Sanjay P, Fulke JL, Exon DJ (2010) 'Critical view of safety' as an alternative to routine intraoperative cholangiography during laparoscopic cholecystectomy for acute

biliary pathology. *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract* 14:1280-1284

86. Sanjay P, Kulli C, Polignano FM, Tait IS (2010) Optimal surgical technique, use of intra-operative cholangiography (IOC), and management of acute gallbladder disease: the results of a nation-wide survey in the UK and Ireland. *Annals of the Royal College of Surgeons of England* 92:302-306
87. Boni L, David G, Mangano A, Dionigi G, Rausei S, Spampatti S, Cassinotti E, Fingerhut A (2014) Clinical applications of indocyanine green (ICG) enhanced fluorescence in laparoscopic surgery. *Surgical endoscopy*
88. Ishizawa T, Bandai Y, Ijichi M, Kaneko J, Hasegawa K, Kokudo N (2010) Fluorescent cholangiography illuminating the biliary tree during laparoscopic cholecystectomy. *The British journal of surgery* 97:1369-1377
89. Schols RM, Bouvy ND, van Dam RM, Masclee AA, Dejong CH, Stassen LP (2013) Combined vascular and biliary fluorescence imaging in laparoscopic cholecystectomy. *Surgical endoscopy* 27:4511-4517
90. Dip FD, Asbun D, Rosales-Velderrain A, Lo Menzo E, Simpfendorfer CH, Szomstein S, Rosenthal RJ (2014) Cost analysis and effectiveness comparing the routine use of intraoperative fluorescent cholangiography with fluoroscopic cholangiogram in patients undergoing laparoscopic cholecystectomy. *Surgical endoscopy* 28:1838-1843
91. Pesce A, Piccolo G, La Greca G, Puleo S (2015) Utility of fluorescent cholangiography during laparoscopic cholecystectomy: A systematic review. *World journal of gastroenterology : WJG* 21:7877-7883
92. Verbeek FP, Schaafsma BE, Tummers QR, van der Vorst JR, van der Made WJ, Baeten CI, Bonsing BA, Frangioni JV, van de Velde CJ, Vahrmeijer AL, Swijnenburg RJ (2014) Optimization of near-infrared fluorescence cholangiography for open and laparoscopic surgery. *Surgical endoscopy* 28:1076-1082
93. Liu YY, Kong SH, Diana M, Legner A, Wu CC, Kameyama N, Dallemagne B, Marescaux J (2015) Near-infrared cholecysto-cholangiography with indocyanine green may secure cholecystectomy in difficult clinical situations: proof of the concept in a porcine model. *Surgical endoscopy*
94. Lee JH, Lee MS, Kim HH, Park do J, Lee KH, Hwang JY, Lee HJ, Yang HK, Lee KU (2011) Feasibility of laparoscopic partial gastrectomy with sentinel node basin dissection in a porcine model. *Surgical endoscopy* 25:1070-1075
95. Mitsumori N, Nimura H, Takahashi N, Kawamura M, Aoki H, Shida A, Omura N, Yanaga K (2014) Sentinel lymph node navigation surgery for early stage gastric cancer. *World journal of gastroenterology : WJG* 20:5685-5693
96. Xiong L, Gazyakan E, Yang W, Engel H, Hunerbein M, Kneser U, Hirche C (2014) Indocyanine green fluorescence-guided sentinel node biopsy: a meta-analysis on detection rate and diagnostic performance. *Eur J Surg Oncol* 40:843-849

97. Miwa K, Fujimura T, Fushida S, Kinami S, Miyashita T, Ajisaka H (2003) [Sentinel node navigation surgery in early-stage gastric carcinoma: a limited gastric resection with lymphatic basin dissection in sentinel node-negative patients]. *Nihon Geka Gakkai Zasshi* 104:785-788
98. Miwa K, Kinami S, Taniguchi K, Fushida S, Fujimura T, Nonomura A (2003) Mapping sentinel nodes in patients with early-stage gastric carcinoma. *The British journal of surgery* 90:178-182
99. Miyashiro I, Hiratsuka M, Sasako M, Sano T, Mizusawa J, Nakamura K, Nashimoto A, Tsuburaya A, Fukushima N, Gastric Cancer Surgical Study Group in the Japan Clinical Oncology G (2014) High false-negative proportion of intraoperative histological examination as a serious problem for clinical application of sentinel node biopsy for early gastric cancer: final results of the Japan Clinical Oncology Group multicenter trial JCOG0302. *Gastric cancer : official journal of the International Gastric Cancer Association and the Japanese Gastric Cancer Association* 17:316-323
100. Kong SH, Noh YW, Suh YS, Park HS, Lee HJ, Kang KW, Kim HC, Lim YT, Yang HK (2015) Evaluation of the novel near-infrared fluorescence tracers pullulan polymer nanogel and indocyanine green/gamma-glutamic acid complex for sentinel lymph node navigation surgery in large animal models. *Gastric Cancer* 18:55-64
101. Diana M, Robinet E, Liu YY, Legner A, Kong SH, Schiraldi L, Marchegiani F, Halvax P, Swanstrom L, Dallemagne B, Marescaux J (2015) Confocal Imaging and Tissue-Specific Fluorescent Probes for Real-Time In Vivo Immunohistochemistry. Proof of the Concept in a Gastric Lymph Node Metastasis Model. *Ann Surg Oncol*
102. Lohman RF, Ozturk CN, Ozturk C, Jayaprakash V, Djohan R (2015) An Analysis of Current Techniques Used for Intraoperative Flap Evaluation. *Ann Plast Surg* 75:679-685
103. Sekijima M, Tojimbara T, Sato S, Nakamura M, Kawase T, Kai K, Urashima Y, Nakajima I, Fuchinoue S, Teraoka S (2004) An intraoperative fluorescent imaging system in organ transplantation. *Transplant Proc* 36:2188-2190
104. Hoffmann C, Compton F, Schafer JH, Steiner U, Fuller TF, Schostak M, Zidek W, van der Giet M, Westhoff TH (2010) Intraoperative assessment of kidney allograft perfusion by laser-assisted indocyanine green fluorescence videography. *Transplant Proc* 42:1526-1530
105. Sawada T, Solly M, Kita J, Shimoda M, Kubota K (2010) An alternative tool for intraoperative assessment of renal vasculature after revascularization of a transplanted kidney. *Am J Surg* 199:e69-71
106. Arichi N, Mitsui Y, Ogawa K, Nagami T, Nakamura S, Hiraoka T, Yasumoto H, Shiina H (2014) Intraoperative fluorescence vascular imaging using indocyanine green for assessment of transplanted kidney perfusion. *Transplant Proc* 46:342-345
107. Tozzi M, Boni L, Soldini G, Franchin M, Piffaretti G (2014) Vascular fluorescence imaging control for complex renal artery aneurysm repair using laparoscopic nephrectomy and autotransplantation. *Case Rep Transplant* 2014:563408

108. Kawaguchi Y, Akamatsu N, Ishizawa T, Kaneko J, Arita J, Sakamoto Y, Hasegawa K, Kokudo N (2015) Evaluation of hepatic perfusion in the liver graft using fluorescence imaging with indocyanine green. *Int J Surg Case Rep* 14:149-151
109. Ventura-Clapier R, Kaasik A, Veksler V (2004) Structural and functional adaptations of striated muscles to CK deficiency. *Mol Cell Biochem* 256-257:29-41
110. Echtay KS, Roussel D, St-Pierre J, Jekabsons MB, Cadenas S, Stuart JA, Harper JA, Roebuck SJ, Morrison A, Pickering S, Clapham JC, Brand MD (2002) Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature* 415:96-99
111. Sazanov LA (2007) Respiratory complex I: mechanistic and structural insights provided by the crystal structure of the hydrophilic domain. *Biochemistry* 46:2275-2288
112. Bourgeron T, Rustin P, Chretien D, Birch-Machin M, Bourgeois M, Viegas-Pequignot E, Munnich A, Rotig A (1995) Mutation of a nuclear succinate dehydrogenase gene results in mitochondrial respiratory chain deficiency. *Nat Genet* 11:144-149
113. Borisov VB (2002) Defects in mitochondrial respiratory complexes III and IV, and human pathologies. *Mol Aspects Med* 23:385-412
114. Brand MD, Nicholls DG (2011) Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem J* 435:297-312
115. Alberti KG (1977) The biochemical consequences of hypoxia. *J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol)* 11:14-20
116. Khalil AA, Aziz FA, Hall JC (2006) Reperfusion injury. *Plast Reconstr Surg* 117:1024-1033
117. Thaveau F, Zoll J, Rouyer O, Chafke N, Kretz JG, Piquard F, Geny B (2007) Ischemic preconditioning specifically restores complexes I and II activities of the mitochondrial respiratory chain in ischemic skeletal muscle. *J Vasc Surg* 46:541-547; discussion 547
118. Connor H, Woods HF, Ledingham JG (1983) Comparison of the kinetics and utilisation of D(-)-and L(+)-sodium lactate in normal man. *Ann Nutr Metab* 27:481-487
119. Glinghammar B, Rafter I, Lindstrom AK, Hedberg JJ, Andersson HB, Lindblom P, Berg AL, Cotgreave I (2009) Detection of the mitochondrial and catalytically active alanine aminotransferase in human tissues and plasma. *Int J Mol Med* 23:621-631
120. Perriello G, Jorde R, Nurjhan N, Stumvoll M, Dailey G, Jenssen T, Bier DM, Gerich JE (1995) Estimation of glucose-alanine-lactate-glutamine cycles in postabsorptive humans: role of skeletal muscle. *Am J Physiol* 269:E443-450
121. De Backer D (2003) Lactic acidosis. *Intensive Care Med* 29:699-702
122. Adeva-Andany M, Lopez-Ojen M, Funcasta-Calderon R, Ameneiros-Rodriguez E, Donapetry-Garcia C, Vila-Altesor M, Rodriguez-Seijas J (2014) Comprehensive review on lactate metabolism in human health. *Mitochondrion* 17:76-100

123. Rogatzki MJ, Ferguson BS, Goodwin ML, Gladden LB (2015) Lactate is always the end product of glycolysis. *Front Neurosci* 9:22
124. Boekstegers P, Weidenhofer S, Kapsner T, Werdan K (1994) Skeletal muscle partial pressure of oxygen in patients with sepsis. *Crit Care Med* 22:640-650
125. Shapiro NI, Howell MD, Talmor D, Nathanson LA, Lisbon A, Wolfe RE, Weiss JW (2005) Serum lactate as a predictor of mortality in emergency department patients with infection. *Ann Emerg Med* 45:524-528
126. Nguyen HB, Rivers EP, Knoblich BP, Jacobsen G, Muzzin A, Ressler JA, Tomlanovich MC (2004) Early lactate clearance is associated with improved outcome in severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med* 32:1637-1642
127. Demir IE, Ceyhan GO, Friess H (2012) Beyond lactate: is there a role for serum lactate measurement in diagnosing acute mesenteric ischemia? *Dig Surg* 29:226-235
128. Studer P, Vaucher A, Candinas D, Schnuriger B (2015) The value of serial serum lactate measurements in predicting the extent of ischemic bowel and outcome of patients suffering acute mesenteric ischemia. *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract* 19:751-755
129. Noll E, Bouitbir J, Collange O, Zoll J, Charles AL, Thaveau F, Diemunsch P, Geny B (2012) Local but not systemic capillary lactate is a reperfusion biomarker in experimental acute limb ischaemia. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 43:339-340
130. Nordstrom L, Ingemarsson I, Kublickas M, Persson B, Shimojo N, Westgren M (1995) Scalp blood lactate: a new test strip method for monitoring fetal wellbeing in labour. *Br J Obstet Gynaecol* 102:894-899
131. Bentley DJ, Newell J, Bishop D (2007) Incremental exercise test design and analysis: implications for performance diagnostics in endurance athletes. *Sports Med* 37:575-586
132. Bonaventura JM, Sharpe K, Knight E, Fuller KL, Tanner RK, Gore CJ (2015) Reliability and accuracy of six hand-held blood lactate analysers. *J Sports Sci Med* 14:203-214
133. Tanner RK, Fuller KL, Ross ML (2010) Evaluation of three portable blood lactate analysers: Lactate Pro, Lactate Scout and Lactate Plus. *Eur J Appl Physiol* 109:551-559
134. Karliczek A, Benaron DA, Baas PC, Zeebregts CJ, Wiggers T, van Dam GM (2012) Intraoperative assessment of microperfusion with visible light spectroscopy for prediction of anastomotic leakage in colorectal anastomoses. *Colorectal Dis* 12:1018-1025
135. Hammond J, Lim S, Wan Y, Gao X, Patkar A (2014) The burden of gastrointestinal anastomotic leaks: an evaluation of clinical and economic outcomes. *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract* 18:1176-1185



136. Seike K, Koda K, Saito N, Oda K, Kosugi C, Shimizu K, Miyazaki M (2007) Laser Doppler assessment of the influence of division at the root of the inferior mesenteric artery on anastomotic blood flow in rectosigmoid cancer surgery. *International journal of colorectal disease* 22:689-697
137. Hirano Y, Omura K, Tatsuzawa Y, Shimizu J, Kawaura Y, Watanabe G (2006) Tissue oxygen saturation during colorectal surgery measured by near-infrared spectroscopy: pilot study to predict anastomotic complications. *World journal of surgery* 30:457-461
138. Nachiappan S, Askari A, Currie A, Kennedy RH, Faiz O (2014) Intraoperative assessment of colorectal anastomotic integrity: a systematic review. *Surgical endoscopy*
139. Kudzus S, Roesel C, Schachtrupp A, Hoer JJ Intraoperative laser fluorescence angiography in colorectal surgery: a noninvasive analysis to reduce the rate of anastomotic leakage. *Langenbeck's archives of surgery / Deutsche Gesellschaft fur Chirurgie* 395:1025-1030
140. Matsui A, Winer JH, Laurence RG, Frangioni JV (2011) Predicting the survival of experimental ischaemic small bowel using intraoperative near-infrared fluorescence angiography. *The British journal of surgery* 98:1725-1734
141. Cahill RA, Anderson M, Wang LM, Lindsey I, Cunningham C, Mortensen NJ (2012) Near-infrared (NIR) laparoscopy for intraoperative lymphatic road-mapping and sentinel node identification during definitive surgical resection of early-stage colorectal neoplasia. *Surgical endoscopy* 26:197-204
142. Cahill RA, Mortensen NJ (2010) Intraoperative augmented reality for laparoscopic colorectal surgery by intraoperative near-infrared fluorescence imaging and optical coherence tomography. *Minerva chirurgica* 65:451-462
143. Cahill RA, Ris F, Mortensen NJ (2011) Near-infrared laparoscopy for real-time intraoperative arterial and lymphatic perfusion imaging. *Colorectal disease : the official journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland* 13 Suppl 7:12-17
144. Carus T, Dammer R (2012) Laparoscopic Fluorescence Angiography with Indocyanine Green to Control the Perfusion of Gastrointestinal Anastomoses Intraoperatively. *Surgical technology international* XXII
145. Boni L, David G, Mangano A, Dionigi G, Rausei S, Spampatti S, Cassinotti E, Fingerhut A (2015) Clinical applications of indocyanine green (ICG) enhanced fluorescence in laparoscopic surgery. *Surgical endoscopy* 29:2046-2055
146. Lehnhardt FG, Rohn G, Ernestus RI, Grune M, Hoehn M (2001) <sup>1</sup>H- and <sup>31</sup>P-MR spectroscopy of primary and recurrent human brain tumors in vitro: malignancy-characteristic profiles of water soluble and lipophilic spectral components. *NMR in biomedicine* 14:307-317
147. Rocha CM, Barros AS, Gil AM, Goodfellow BJ, Humpfer E, Spraul M, Carreira IM, Melo JB, Bernardo J, Gomes A, Sousa V, Carvalho L, Duarte IF (2010) Metabolic

- profiling of human lung cancer tissue by <sup>1</sup>H high resolution magic angle spinning (HRMAS) NMR spectroscopy. *Journal of proteome research* 9:319-332
148. Benahmed MA, Santelmo N, Elbayed K, Frossard N, Noll E, Canuet M, Pottecher J, Diemunsch P, Piotto M, Massard G, Namer IJ (2011) The assessment of the quality of the graft in an animal model for lung transplantation using the metabolomics (<sup>1</sup>H high-resolution magic angle spinning NMR spectroscopy). *Magnetic resonance in medicine : official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine*
  149. Imperiale A, Elbayed K, Moussallieh FM, Neuville A, Piotto M, Bellocq JP, Lutz P, Namer IJ (2011) Metabolomic pattern of childhood neuroblastoma obtained by (<sup>1</sup>H)-high-resolution magic angle spinning (HRMAS) NMR spectroscopy. *Pediatric blood & cancer* 56:24-34
  150. Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG (2010) Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS biology* 8:e1000412
  151. Luo S, Zhang E, Su Y, Cheng T, Shi C (2011) A review of NIR dyes in cancer targeting and imaging. *Biomaterials* 32:7127-7138
  152. Pacheco PE, Hill SM, Henriques SM, Paulsen JK, Anderson RC (2013) The novel use of intraoperative laser-induced fluorescence of indocyanine green tissue angiography for evaluation of the gastric conduit in esophageal reconstructive surgery. *Am J Surg* 205:349-352; discussion 352-343
  153. Fikfak V, Gaur P, Kim MP (2016) Endoscopic evaluation of gastric conduit perfusion in minimally invasive Ivor Lewis esophagectomy. *Int J Surg Case Rep* 19:112-114
  154. Diana M, Noll E, Diemunsch P, Dallemagne B, Benahmed MA, Agnus V, Soler L, Barry B, Namer IJ, Demartines N, Charles AL, Geny B, Marescaux J (2013) Enhanced-Reality Video Fluorescence: A Real-Time Assessment of Intestinal Viability. *Annals of surgery*
  155. Diana M, Wall J, Perretta S, Dallemagne B, Gonzales KD, Harrison MR, Agnus V, Soler L, Nicolau S, Marescaux J (2011) Totally endoscopic magnetic enteral bypass by external guided rendez-vous technique. *Surgical innovation* 18:317-320
  156. Toens C, Krones CJ, Blum U, Fernandez V, Grommes J, Hoelzl F, Stumpf M, Klinge U, Schumpelick V (2006) Validation of IC-VIEW fluorescence videography in a rabbit model of mesenteric ischaemia and reperfusion. *International journal of colorectal disease* 21:332-338
  157. Zehetner J, DeMeester SR, Alicuben ET, Oh DS, Lipham JC, Hagen JA, DeMeester TR (2015) Intraoperative Assessment of Perfusion of the Gastric Graft and Correlation With Anastomotic Leaks After Esophagectomy. *Annals of surgery* 262:74-78
  158. Noll E, Bouitbir J, Collange O, Zoll J, Charles AL, Thaveau F, Diemunsch P, Geny B (2012) Local but not Systemic Capillary Lactate is a Reperfusion Biomarker in Experimental Acute Limb Ischaemia. *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery*

159. Thaveau F, Zoll J, Bouitbir J, Ribera F, Di Marco P, Chakfe N, Kretz JG, Piquard F, Geny B (2009) Contralateral leg as a control during skeletal muscle ischemia-reperfusion. *The Journal of surgical research* 155:65-69
160. Goldsmith P, Fenton H, Morris-Stiff G, Ahmad N, Fisher J, Prasad KR (2010) Metabonomics: a useful tool for the future surgeon. *The Journal of surgical research* 160:122-132
161. Vincenti M, Behrends M, Dang K, Park YH, Hirose R, Blasi-Ibanez A, Liu T, Serkova NJ, Niemann CU (2010) Induction of intestinal ischemia reperfusion injury by portal vein outflow occlusion in rats. *J Gastroenterol* 45:1103-1110
162. Diana M, Halvax P, Pop R, Schlagowski I, Bour G, Liu YY, Legner A, Diemunsch P, Geny B, Dallemagne B, Beaujeux R, Demartines N, Marescaux J (2015) Gastric supply manipulation to modulate ghrelin production and enhance vascularization to the cardia: proof of the concept in a porcine model. *Surgical innovation* 22:5-14
163. Diana M, Pop R, Beaujeux R, Dallemagne B, Halvax P, Schlagowski I, Liu YY, Diemunsch P, Geny B, Lindner V, Marescaux J (2015) Embolization of arterial gastric supply in obesity (EMBARGO): an endovascular approach in the management of morbid obesity. proof of the concept in the porcine model. *Obes Surg* 25:550-558
164. Kuiper T, van den Broek FJ, van Eeden S, Wallace MB, Buchner AM, Meining A, van Hee K, Fockens P, Dekker E (2011) New classification for probe-based confocal laser endomicroscopy in the colon. *Endoscopy* 43:1076-1081
165. Wu J, Pan YM, Wang TT, Hu B (2013) Confocal laser endomicroscopy for detection of neoplasia in Barrett's esophagus: a meta-analysis. *Diseases of the esophagus : official journal of the International Society for Diseases of the Esophagus / ISDE*
166. Wang SF, Yang YS, Wei LX, Lu ZS, Guo MZ, Huang J, Peng LH, Sun G, Ling-Hu EQ, Meng JY (2012) Diagnosis of gastric intraepithelial neoplasia by narrow-band imaging and confocal laser endomicroscopy. *World journal of gastroenterology : WJG* 18:4771-4780
167. Dong YY, Li YQ, Yu YB, Liu J, Li M, Luan XR (2013) Meta-analysis of confocal laser endomicroscopy for the detection of colorectal neoplasia. *Colorectal Dis* 15:e488-495
168. Birke-Sorensen H, Andersen NT (2010) Metabolic markers obtained by microdialysis can detect secondary intestinal ischemia: an experimental study of ischemia in porcine intestinal segments. *World journal of surgery* 34:923-932
169. Yasumura M, Mori Y, Takagi H, Yamada T, Sakamoto K, Iwata H, Hirose H (2003) Experimental model to estimate intestinal viability using charge-coupled device microscopy. *The British journal of surgery* 90:460-465
170. Schmidt C, Lautenschlager C, Petzold B, Sakr Y, Marx G, Stallmach A (2013) Confocal laser endomicroscopy reliably detects sepsis-related and treatment-associated changes in intestinal mucosal microcirculation. *British journal of anaesthesia*

171. Calonder M, Lepetit V, Ozuysal M, Trzcinski T, Strecha C, Fua P (2012) BRIEF: Computing a local binary descriptor very fast. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence* 34:1281-1998

## COMMUNICATIONS

ANNEE	CONFERENCE/VILLE	PRESENTATION	TITRE
2013	<u>International Anaesthesia Research Society (IARS)</u> <u>May 5 –8, 2013 San Diego, CA, USA</u>	Orale et poster	Instant capillary lactates to evaluate bowel ischemia: proof of concept in a porcine model
2013	<u>International Anaesthesia Research Society (IARS)</u> <u>May 5 –8, 2013 San Diego, CA, USA</u>	Orale et poster	Oxygraphic assessment of mitochondria respiratory rate kinetics in a porcine model of small bowel ischemia
2014	First World Conference on Fluorescence Guided Surgery; Coral Gables Miami Florida February 15-16, 2014	Keynote	Fluorescence-based Enhanced Reality for real-time evaluation of bowel perfusion
2014	<u>Society of American Gastrointestinal Endoscopic Surgeons (SAGES)</u> , <u>April 2-5, 2014 Salt Lake City, Utah, USA</u>	Orale	Real-time navigation by fluorescence-based enhanced reality for precise estimation of future anastomotic site in digestive surgery.
2014	<u>Society of American Gastrointestinal Endoscopic Surgeons (SAGES)</u> , <u>April 2-5, 2014 Salt Lake City, Utah, USA</u>	Poster	Probe-based confocal laser endomicroscopy and fluorescence-based enhanced reality for real-time assessment of intestinal microcirculation in a porcine model of sigmoid ischemia.
2015	<u>Second International Conference on Fluorescence Guided Surgery: Coral Gables Miami, Florida, February 14-16, 2015)</u>	Keynote	Fluorescence enhanced reality to assess anastomotic perfusion ON SURVIVAL MODEL

2016	<u>Third International Conference on Fluorescence Guided Surgery: Boca Raton, Florida, February 4<sup>th</sup></u>	Invited oral presentations	WHY USE NIR GUIDED SURGERY?
2016	<u>SPIE PHOTONICS BIOS San Francisco 14-18 February</u>	Invited speaker	Fluorescence-based enhanced reality (FLER) for real-time estimation of bowel perfusion in minimally-invasive surgery.

## PUBLICATIONS

### Original articles

- 1. Metabolism-Guided Bowel Resection: Potential Role and Accuracy of Instant Capillary Lactates to Identify the Optimal Resection Site**  
**Diana M**, Noll E, Diemunsch P, Moussallieh FM, Namer IJ, Charles AL, Lindner V, Agnus V, Geny B, Marescaux J. *Surg Innov* 2015;22:453-61
- 2. Functional Capillary Density for in Vivo Estimation of Intestinal Perfusion using Real-Time Confocal Endomicroscopy**  
Schiraldi L, Marchegiani F, **Diana M**, Lindner V, Noll E, Diemunsch P, Marescaux J. *J Cytol Histol* 2015;6:334. doi:10.4172/2157-7099.1000334
- 3. Enhanced-reality video fluorescence: a real-time assessment of intestinal viability**  
**Diana M**, Noll E, Diemunsch P, Dallemagne B, Benahmed MA, Agnus V, Soler L, Barry B, Namer IJ, Demartines N, Charles AL, Geny B, Marescaux J. *Ann Surg.* 2014 Apr;259(4):700-7.
- 4. Probe-based confocal laser endomicroscopy and fluorescence-based enhanced reality for real-time assessment of intestinal microcirculation in a porcine model of sigmoid ischemia**  
**Diana M**, Dallemagne B, Chung H, Nagao Y, Halvax P, Agnus V, Soler L, Lindner V, Demartines N, Diemunsch P, Geny B, Swanström L, Marescaux J *Surg Endosc* 2014;28:3224-33.
- 5. Real-time navigation by fluorescence-based enhanced reality for precise estimation of future anastomotic site in digestive surgery**  
**Diana M**, Halvax P, Dallemagne B, Nagao Y, Diemunsch P, Charles AL, Agnus V, Soler L, Demartines N, Lindner V, Geny B, Marescaux J. *Surg Endosc* 2014;28:3108-18.

**6. Enhanced Reality Fluorescence Videography to Assess Bowel Perfusion: The Cybernetic Eye**

**Diana M**, Noll E, Agnus V, Liu YY, Kong SH, Lègner A, Diemunsch P, Marescaux J.  
Ann Surg. 2015 May 27.

**7. Intraoperative fluorescence-based enhanced reality laparoscopic real-time imaging to assess bowel perfusion at the anastomotic site in an experimental model.**

**Diana M**, Agnus V, Halvax P, Liu YY, Dallemagne B, Schlagowski AI, Geny B, Diemunsch P, Lindner V, Marescaux J. Br J Surg. 2015 Jan;102 (2):e169-76

**8. Precision real-time evaluation of bowel perfusion. Accuracy of confocal endomicroscopy assessment of stoma in a controlled hemorrhagic shock model**

**Diana M**, Noll E, Charles AL, Diemunsch P, Geny B, Liu YY, Marchegiani F, Schiraldi L, Agnus V, Lindner V, Swanström L, Dallemagne B, Marescaux J

(Abstract SUBMITTED TO EAES, paper to be submitted to Surgical Endoscopy. NOT included in this thesis)

**Book Chapter**

**Real-time assessment of intestinal perfusion by Fluorescence-based Enhanced Reality**

**Diana M**, Agnus V, Marescaux J Chapter 31 in: *Concepts and Applications of Fluorescence Imaging for Surgeons*. Editors Fernando Dip, Takeaki Ishizawa, Norihiro Kokudo, Raoul Rosenthal. Publisher: Springer International Publishing Switzerland 2015

**Proceedings**

**Fluorescence-Based Enhanced Reality for Colorectal Endoscopic Surgery**

F. Selka, V. Agnus, S. Nicolau, A. Bessaid, L. Soler, J. Marescaux, **M. Diana**

Biomedical Image Registration 2014; 8545 114-123



## **Ringraziamenti/Remerciements/Acknowledgements**

Il primo ringraziamento va a mia moglie Francesca, splendida compagna che mi ha permesso di seguire i miei sogni e mi ha seguito nel mio girovagare, anche quando sembrava lo facessi per una specie di irresponsabile capriccio. Grazie, amore mio, per la tua pazienza e presenza e per le meravigliose principesse Rossella Ade e Giulietta Partenope.

Poi a mia madre Rosa, detta “bocciuolo”, a mio padre Antonio, e alla mia super sorella Adele : sono andato via 28 anni fa, e, purtroppo, sempre piu’ lontano. Cito gli Almamegretta:

*‘a casa è addò tu tiene a quaccheduno/‘a casa è addò nun t’odia nisciuno*

*‘a casa po’ essere ‘o munno sano/ma ‘a casa mia ‘a tengo assaje luntano...*

*sciosce viento puortame ‘a forza pe’ guarda’ annanze quanno cagnarrà*

Un grand merci à mon ancien patron, chef du Service de Chirurgie du CHUV, à Lausanne, Monsieur le Professeur Demartines: cher Professeur, vous m’avez beaucoup appris, surtout la méthode scientifique et l’attitude « evidence-based » et antidogmatique. Vous êtes un exemple que je garde toujours à l’esprit.

Cher Professeur Marescaux, cela fait précisément 6 ans que j’ai rejoint l’IRCAD et j’espère vous exprimer ma gratitude au quotidien. Pour tout. Merci pour garder toute l’équipe dans un état constant de réel et concret émerveillement.

Cher Professeur Diemunsch, merci d’avoir accepté d’être directeur de ma thèse et pour vos conseils et suggestions, et pour m’avoir ouvert la voie des « lactates ». J’espère pouvoir continuer longtemps cette collaboration : cela semble bien parti, au vu des nombreux projets en cours...

Cher Professeur Geny, un grand merci à vous aussi, pour votre disponibilité et votre soutien tout le long de ce projet comme d'autres que j'ai eu l'opportunité de mener dans votre Equipe d'accueil. Vous avez un superbe team qui dialogue au quotidien avec la fascinante machinerie des mitochondries ! Merci à Anne-Laure Charles, à Isabel Schlagowski, et aussi à Isabelle et Fabienne !

Un remerciement tout particulier va au Professeur Luc Soler de la R&D de l'IRCAD et à Vincent Agnus, à l'origine du logiciel permettant la technique exposée dans la thèse et à Selka Faïçal, ayant travaillé sur la méthode de tracking.

Cher Eric (Noll), merci pour ton aide et tes conseils et pour les blagues autour de la barrière séparant les chirurgiens des anesthésistes ! On va collaborer encore beaucoup et sera toujours un plaisir.

Cher Professeur Dallemagne, j'ai commencé ce projet avec vous, merci pour votre soutien et vos remarques : votre attitude critique et pragmatique est un véritable exemple à suivre pour relever les défis.

Encore, je remercie le Professeur Izzie-Jacques Namer, les Dr. Malika Benhamed et François-Marie Moussalieh, de l'Institut de Biophysique de Hautepierre, pour la mesure du metabolome. Et encore un grand merci Véronique, pour l'analyse en aveugle de l'histopathologie et des images par confocale : j'ai toujours beaucoup de plaisir à travailler avec toi !

Un très grand merci aussi à Mourhad Bouhadjar, Gaël Fouré et Rodrigo Cararo, de la plateforme expérimentale de l'IHU : merci mes amis pour votre gentillesse et disponibilité mais surtout efficacité !

Encore, chers Alain, Benjamin et Nicholas, merci pour le soin que vous mettez dans le suivi des protocoles expérimentaux, durant toutes les phases : votre professionnalité est un atout fondamental !

Additionally, I have to thank a lot Dr Peter Solleder, Antje Hoppfs and Edin, from the Molecular Imaging department of Karl Storz for their kind support, as well as Pierre Chaumeny and Jean-Michel Kleiss, for being always so nice to me when organizing lab tests: your help has been crucial in this work! Thanks a lot

I have also to thank all the fellows that helped me with the experimental surgeries:

Peter Halvax, Seong-Ho Kong, Yu-Yin Liu, Yoshihiro Nagao, Hyunsoo Chung, Brian Barry, Luigi Schiraldi & Francesco Marchegiani. Thanks a lot guys! All the best!

Last but not least: I would like to express my sincere gratitude to the Professors

Frédéric Bretagnol, Eric Vibert, Sylvain Gioux and Luigi Boni for having accepted to be members of this jury.

**I hope having included almost all... if not, I apologize and thank you!**

## ANNEXES

PDF ARTICLE **Metabolism-Guided Bowel Resection: Potential Role and Accuracy of Instant Capillary Lactates to Identify the Optimal Resection Site**

PDF ARTICLE **Functional Capillary Density for in Vivo Estimation of Intestinal Perfusion using Real-Time Confocal Endomicroscopy**

PDF ARTICLE **Enhanced-reality video fluorescence: a real-time assessment of intestinal viability**

PDF ARTICLE **Probe-based confocal laser endomicroscopy and fluorescence-based enhanced reality for real-time assessment of intestinal microcirculation in a porcine model of sigmoid ischemia**

PDF ARTICLE **Real-time navigation by fluorescence-based enhanced reality for precise estimation of future anastomotic site in digestive surgery**

PDF ARTICLE **Enhanced Reality Fluorescence Videography to Assess Bowel Perfusion: The Cybernetic Eye**

PDF ARTICLE **Intraoperative fluorescence-based enhanced reality laparoscopic real-time imaging to assess bowel perfusion at the anastomotic site in an experimental model.**

PDF PROCEEDING WBIR **Fluorescence-Based Enhanced Reality for Colorectal Endoscopic Surgery**

PDF BOOK CHAPTER **Real-time assessment of intestinal perfusion by Fluorescence-based Enhanced Reality**

PDF CLINICAL TRIAL "PERFECT"

In the digital version

Video clip FLuorescence-based Enhanced Reality (narrated video)