



**HAL**  
open science

# La chirurgie digestive oncologique aidée par la fluorescence

Gabriele Barabino

► **To cite this version:**

Gabriele Barabino. La chirurgie digestive oncologique aidée par la fluorescence. Chirurgie. Université Jean Monnet - Saint-Etienne, 2015. Français. NNT : 2015STET006T . tel-01547170

**HAL Id: tel-01547170**

**<https://theses.hal.science/tel-01547170>**

Submitted on 26 Jun 2017

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



## THÈSE DE DOCTORAT

Présentée par

Gabriele BARABINO

Pour obtenir le grade de Docteur en Sciences, Ingénierie et Santé, ED SIS 488

## LA CHIRURGIE DIGESTIVE ONCOLOGIQUE AIDÉE PAR LA FLUORESCENCE

Soutenance prévue à Saint Etienne, Faculté de Médecine, le 22 octobre 2015

### Membres du jury

Rapporteurs :	Olivier GLEHEN	Professeur, Université de Lyon
	Olivier TILLEMENT	Professeur, Université de Lyon
Examineurs :	Jean Luc COLL	Directeur Recherche, INSERM, Grenoble
	Denis PEZET	Professeur, Université de Clermont-Ferrand
	Jack PORCHERON	Professeur, Université de Saint-Etienne
	Jérémie POURCHEZ	Maître de Recherche, ENSMSE, Saint-Etienne
Directeur :	Michèle COTTIER	Professeur, Université de Saint-Etienne
Co-encadrant :	Valérie FOREST	Maître Assistante, ENSMSE, Saint-Etienne



ABREVIATIONS .....	5
1. INTRODUCTION .....	6
2. CANCER COLORECTAL .....	8
2.1 Epidémiologie .....	8
2.2 Histoire naturelle de la maladie .....	9
3. METASTASES HEPATIQUES D'ORIGINE COLORECTALE .....	13
3.1 Épidémiologie des métastases hépatiques du CCR .....	13
3.2 Chirurgie des métastases hépatiques du CCR.....	13
3.2.1 Marges de résection en chirurgie hépatique .....	15
3.2.2 Etendue de l'exérèse.....	16
3.2.3 Procédures per opératoires et augmentation de la résécabilité.....	18
3.2.3.1 Hépatectomie en 2 temps avec ligature veine porte droite.....	18
3.2.3.2 Destruction par radiofréquence/microondes.....	19
3.2.4 Echographie péri opératoire des métastases hépatiques .....	21
4. CARCINOSE PERITONEALE D'ORIGINE COLORECTALE .....	27
4.1 Epidémiologie de la carcinose péritonéale du CCR.....	27
4.2 Limites du diagnostic de la carcinose péritonéale .....	27
4.3 Association chirurgie de cytoréduction et chimiothérapie intra péritonéale péri opératoire .....	31
4.4 Chirurgie de la carcinose péritonéale .....	34
5. FLUORESCENCE .....	37
5.1 Vert d'Indocyanine (ICG).....	38
5.1.1 Effet "Enhanced Permeability and Retention" (EPR) de l'ICG .....	45
5.1.2 Utilisation de l'ICG en chirurgie oncologique .....	47
5.2 Sonde NEAR INFRARED (NIR) .....	51
6. TRAVAIL EXPERIMENTAL.....	55
6.1 Adaptation de la caméra NIR au bloc opératoire et amélioration de la détection des métastases hépatiques .....	56

6.2 Démonstration de faisabilité sur la carcinose péritonéale .....	68
Article : Improving Surgical Resection of Metastatic Liver Tumours with Near Infra-Red Optical-Guided Fluorescence Imaging .....	77
Article : Intraoperative Near-Infrared Fluorescence Imaging Using Indocyanine Green in Colorectal Carcinomatosis Surgery: Proof of Concept.....	90
Article: Affinity of indocyanine green (ICG) in the detection of colorectal peritoneal carcinomatosis: the role of enhanced permeability and retention effect. ....	112
7 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....	126
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	128

## ABREVIATIONS

AMLA	Dégénérescence Maculaire
CCR	Cancer Colo Rectal
CHC	Carcinome Hépatocellulaire
CHIP	Chimio Hyperthermie Intra Péritonéale
CIPPI	Chimiothérapie Intra Péritonéale Post opératoire Immédiate
CP	Carcinose Péritonéale
CPP	Comité de Protection des Personnes
ECHO	Echographie de Contraste
EPR	Enhanced Permeability and Retention
ICG	Vert d'Indocyanine
MHCR	Métastases Hépatiques du Cancer Colo Rectal
NIR	Near Infra Red
RF	Radio Fréquence
PCI	Peritoneal Cancer Index
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

# La chirurgie digestive oncologique aidée par la fluorescence

## 1. INTRODUCTION

*« La chirurgie demande œil d'aigle, cœur de lion, et main de femme »*

Proverbe anglais (1856) Charles Cahier

La chirurgie est l'un des plus anciens arts médicaux. Le chirurgien doit pratiquer un ensemble de gestes manuels et instrumentaux réalisés sur et dans un être humain vivant à des fins thérapeutiques. Son efficacité a été très longtemps limitée par quatre facteurs :

- l'ignorance de l'anatomie et de la physiologie ;
- l'hémorragie;
- la douleur ;
- l'infection.

Grâce aux évolutions des techniques et des connaissances, nous avons pu dépasser toutes ces limites, mais aujourd'hui la chirurgie doit faire face à une nouvelle limite difficilement franchissable : celle du chirurgien lui même.

La chirurgie oncologique effectivement est aujourd'hui limitée par la qualité de la chirurgie et la capacité du chirurgien à pratiquer une résection complète de la maladie.

Dans les cancers digestifs dits résécables, la chirurgie est encore le seul traitement à visée curative efficace.

Néanmoins, la résection complète du tissu tumoral, la préservation des tissus sains pendant l'intervention et la détection des métastases macro et microscopiques, représentent un enjeu majeur qui influence le pronostic et la

survie du patient.

L'évolution rapide des technologies en imagerie de fluorescence a conduit à des résultats précliniques prometteurs et les premiers essais cliniques utilisant des traceurs fluorescents non spécifiques confirment déjà le potentiel de ces nouvelles techniques en chirurgie oncologique.

Le diagnostic de plus en plus précoce des tumeurs et le développement de thérapies ciblées sont des axes majeurs de recherche en cancérologie.

Le but de notre travail a été d'appliquer une technique de fluorescence comme aide à la chirurgie du cancer colorectal, primitif et métastatique. Pour cela, nous avons validé expérimentalement l'utilisation d'un traceur fluorescent, le vert d'Indocyanine, et d'une caméra NIR. Nous avons ensuite montré en clinique la faisabilité de l'association fluorophore-camera NIR dans la détection des lésions cancéreuses.

## **2. CANCER COLORECTAL**

Le cancer colorectal (CCR) est un cancer siégeant dans la région du côlon et du rectum caractérisé par la formation d'adénocarcinomes. La tumeur pénètre alors en profondeur et peut atteindre successivement les différentes couches de la muqueuse colique jusqu'au péritoine qui l'enveloppe, puis les ganglions lymphatiques.

Ce type de cancer a une incidence élevée en France. Le vieillissement de la population, l'amélioration des techniques de dépistage, mais aussi les modifications du mode de vie comme, par exemple, l'augmentation du niveau de sédentarité non compensée par une baisse des apports caloriques ont favorisé une augmentation de l'incidence de ce cancer à partir des années 80. En 2011, le CCR se situe au troisième rang de l'ensemble des cancers.

### **2.1 Epidémiologie**

Avec environ 40.500 nouveaux cas estimés en 2011 dont 53% survenant chez l'homme, le CCR se situe au troisième rang des cancers les plus fréquents après le cancer de la prostate (71.000 nouveaux cas) et le cancer du sein (53.000) [1].

Chez l'homme, le CCR se situe au troisième rang des cancers avec 21.500 nouveaux cas estimés en 2011, derrière le cancer de la prostate (71.000) et le cancer du poumon (27.500). Il représente 10.4% de l'ensemble des cancers. L'incidence standardisée à la population mondiale est de 14.4 décès pour 100.000 [1].

Chez la femme, il se situe au deuxième rang (19.000 cas) derrière le cancer du sein (53.000). Il représente 12% de l'ensemble des cancers. L'incidence standardisée à la population mondiale est de 8.3 décès pour 100.000 [1].

Sur la période 2004-2008, en moyenne 16.526 décès par CCR (8.759

hommes et 7.767 femmes) ont été observés chaque année [1].

L'âge médian au décès est de 75 ans chez l'homme et 80 ans chez la femme [1,2]. Selon l'étude de survie menée par le « réseau Francim » en collaboration avec les Hospices civils de Lyon, les taux de survie relatifs à 1 et 5 ans des patients atteints de cancer colorectal diagnostiqués entre 1989 et 1997 sont respectivement de 79 % et 56 % (respectivement 79 % et 57 % chez la femme et 79 % et 55 % chez l'homme) [1].

La survie relative à 5 ans diminue avec l'âge, passant de 63 % chez les 15-44 ans à 51 % chez les 75 ans et plus. Le pronostic est étroitement lié au stade de développement de la maladie au moment du diagnostic. Selon les données américaines, le taux de survie à 5 ans des patients diagnostiqués en 1999-2005 est de 90.8 % pour le stade local contre 69.5 % pour le stade régional (envahissement ganglionnaire) et 11.3 % à pour le stade métastatique [2]. La survie relative à 5 ans en France est l'une des meilleures de l'Union européenne pour cette localisation.

Selon l'étude Eurocare 4, le taux estimé en France au cours de la période 1995-1999 dépasse la moyenne estimée dans 23 pays européens (57 % vs 53.5 %) [3]. Par ailleurs, selon les estimations de survie à 5 ans de l'étude mondiale CONCORD, la France se place au deuxième rang mondial chez la femme et au cinquième rang chez l'homme [4].

## **2.2 Histoire naturelle de la maladie**

Le CCR se développe à partir d'un adénome (60 à 80 % des cas), généralement sous la forme d'un polype ou plus rarement sous une forme plane, plus difficile à détecter. Le risque de transformation d'un adénome en cancer varie en fonction de la taille, de l'importance de la composante villositaire au sein de l'adénome et du degré de dysplasie (examen anatomo-pathologique). La transformation se fait sur quelques mois à plusieurs années.

La plupart des cancers du colon sont des adénocarcinomes (97% des cas), on distingue :

- Les adénocarcinomes bien différenciés ou moyennement différenciés, les plus fréquents;
- Les adénocarcinomes peu différenciés (15% des cas) de pronostic plus péjoratif;
- L'adénocarcinome mucineux ou colloïde (5% des cas) constitué de plages de mucus contenant des tubes glandulaires ou des cellules isolées en bague à chatons;
- Les lymphomes et les sarcomes, les tumeurs endocrines représentent moins de 3% des tumeurs malignes primitives du colon et du rectum.

L'existence d'une dissémination métastatique (M) est un facteur pronostique péjoratif important. Chez les patients sans diffusion métastatique, les facteurs histologiques pronostiques déterminants sont le niveau d'invasion de la tumeur dans la paroi (T), l'extension ganglionnaire (N) et le caractère radical ou non de la résection (R). Ces facteurs pronostiques sont indépendants. Ils conditionnent le risque ultérieur de récurrence locale et d'évolution métastatique.

L'invasion tumorale peut être limitée à la muqueuse (Tis) sur des pièces de polypectomie; le carcinome peut devenir invasif dépassant la musculaire-muqueuse pour infiltrer la sous-muqueuse (T1); atteindre la musculature (T2); ou la dépasser pour atteindre la sous-séreuse, ou le tissu péri-colique non péritonisé, ou le tissu péri-rectal encore appelé méso-rectum (T3); ou perforer le péritoine viscéral et/ou envahir les organes de voisinage (T4). Cette extension aux organes de voisinage se fait :

- Pour les cancers du bas et du moyen rectum : vers la vessie, le vagin et l'utérus, ou la prostate et les vésicules séminales, le sacrum;
- Pour les cancers du haut rectum et du colon: vers le grêle ou la paroi abdominale, ou en arrière vers les organes rétro péritonéaux (reins, uretères, duodénum, pancréas), ou vers l'estomac, la vésicule biliaire, le foie...

L'extension ganglionnaire est un élément clé du pronostic et de la décision thérapeutique, depuis la démonstration de l'efficacité de la chimiothérapie adjuvante dans les cancers du colon avec un envahissement ganglionnaire (pN+). Il est essentiel de répondre avec le plus haut degré de certitude à la présence ou l'absence de ganglions envahis. Cette probabilité augmente avec le nombre de ganglions prélevés et examinés en anatomo-pathologie. Le nombre minimum de ganglions à examiner est de 8 à 12 (8 pour la Conférence de Consensus Française, 12 selon les recommandations internationales). Plusieurs études montrent qu'à stade égal, le pronostic est plus mauvais pour les patients ayant eu un faible nombre de ganglions examinés. Le nombre de ganglions envahis a lui aussi une valeur pronostique : le pronostic est plus péjoratif si leur nombre dépasse 3 (N2 dans la classification TNM 1997).

L'extension métastatique est fréquente: 25% des patients au moment du diagnostic (métastases synchrones), 30% au cours du suivi (métastases métachrones). Elle résulte de la dissémination veineuse et/ou lymphatique. Par ordre de fréquence, les métastases viscérales siègent dans le foie, les poumons, le péritoine, plus rarement les os, le cerveau. La fréquence de l'atteinte hépatique (80% des patients métastatiques) s'explique par le drainage veineux portal. L'invasion des veines extra-murales intestinales (vasa vasorum) est un facteur prédictif de métastases hépatiques [5].

*En raison de l'incidence du cancer colorectal dans la population, le chirurgien digestif oncologique, chaque jour, est confronté à cette pathologie, souvent métastatique.*

*Face à des métastases hépatiques ou péritonéales résécables, seule une chirurgie optimale peut permettre une longue survie, voir une guérison.*

### **3. METASTASES HEPATIQUES D'ORIGINE COLORECTALE**

#### **3.1 Épidémiologie des métastases hépatiques du CCR**

Approximativement 20% des patients ayant un CCR ont des métastases hépatiques lors du diagnostic (synchrones) [6]; 15% des patients porteurs de CCR ont une atteinte hépatique métachrone (plus de 6 mois de distance du diagnostic de la tumeur primitive).

Si les lésions hépatiques sont jugées résécables après un bilan préopératoire exhaustif, seul le traitement chirurgical de la tumeur colorectale et des lésions hépatiques sera associé à une survie prolongée [7-11].

#### **3.2 Chirurgie des métastases hépatiques du CCR**

La prise en charge des métastases hépatiques du cancer colorectal (MHCR), nécessite une approche multidisciplinaire entre : chirurgien (Fig. 1), oncologue, gastroentérologue, radiologue et anatomopathologiste.

La prise en charge du cancer rectal métastatique se différencie de celle du cancer colique métastatique par la prise en charge différente des tumeurs primitives. Les cancers du bas et moyen rectum nécessitent une radiothérapie qui doit être pris en compte dans la chronologie du traitement chirurgical des métastases hépatiques.



**Fig. 1.** Hépatectomie droite par voie laparotomique pour des métastases d'un cancer du colon droit, tranche de résection (images bloc opératoire Dr. BARABINO – Pr. PORCHERON – Dr. CUILLERON).

À côté des facteurs pronostiques classiques, le traitement de cette pathologie doit prendre en compte les facteurs prédictifs moléculaires émergents grâce au développement de la recherche oncogénétique. Même si le progrès de la chimiothérapie a permis de prolonger la survie des patients ayant un cancer colorectal métastatique, la chirurgie reste le seul traitement qui peut offrir une chance de guérison. La résécabilité est un objectif fondamental, notamment en cas de métastases hépatiques multiples et bilatérales. Elle peut être obtenue grâce à l'apport de la chimiothérapie avec biothérapies, qui permet d'obtenir des taux de réponse de 60 à 70 % [12].

La résécabilité peut être aussi augmentée par d'autres moyens qui s'intègrent dans l'approche multimodale, tels que l'embolisation portale, l'hépatectomie en deux temps et l'association des procédures d'ablation thermique radiologiques.

La prise en charge des métastases hépatiques synchrones avec la tumeur primitive en place représente un vrai défi thérapeutique pour les cliniciens, en particulier pour les cancers du bas et moyen rectum pour lesquels se rajoute la nécessité d'une radiothérapie pelvienne néo-adjuvante. La nécessité de traiter dans

un laps de temps souvent court les sites métastatiques rendus résécables par la chimiothérapie complique la stratégie thérapeutique. Il n'existe pas de consensus pour ces situations complexes, ce qui impose une stratégie intégrant la radiothérapie, la chimiothérapie et une chirurgie d'exérèse en un ou plusieurs temps. Il s'agit d'un traitement « à la carte » proposé au cours d'une réunion pluridisciplinaire [13].

### 3.2.1 Marges de résection en chirurgie hépatique

L'existence d'une marge de sécurité envahie lors d'une chirurgie des MHCR était reconnue comme un équivalent d'intervention palliative : dans les études la survie des patients ayant eu une chirurgie avec des marges macroscopiquement envahies par la tumeur (R2) était identique à celle des patients non opérés (0% à 3 ans) [14]. Une marge de 1 cm a longtemps été recommandée [12]. Mais ce seuil diminue et le caractère strictement palliatif des résections R2 est discuté. Un travail de l'équipe de Makuuchi [15], a associé une étude histologique avec analyse génétique (étude des mutations Ki-ras et p53 au niveau de la tumeur, du tissu péri tumoral et du pédicule glissonien) et une étude pronostique, chez 58 patients présentant 62 MHCR.

Des micros métastases ont été retrouvées: en périphérie des MHCR dans 4 cas sur 199 prélèvements (2%) et étaient situées au maximum à 4 mm; dans les pédicules glissoniens péri tumoraux dans 14,3% (sur 21 prélèvements) et étaient situées au maximum à 5 mm. Le pourcentage de récurrence locale passait de 20% à 6% selon que la marge était supérieure ou inférieure à 2 mm. Enfin la marge n'apparaissait pas dans cette étude comme un paramètre lié à la survie. Au total, les micros métastases sont rares en périphérie des MHCR à la différence de l'hépatocarcinome (HCC), et sont limitées à 2 mm, distance de sécurité qui assure un taux de récurrence locale acceptable de l'ordre de 6%.

Elias et al. [16] ont rapporté les résultats en termes de survie chez 136 patients ayant eu une résection R0 pour MHCR mais avec une marge < 10 mm (30 avaient une marge de 0 mm). La survie globale à 5 ans de ces patients était de

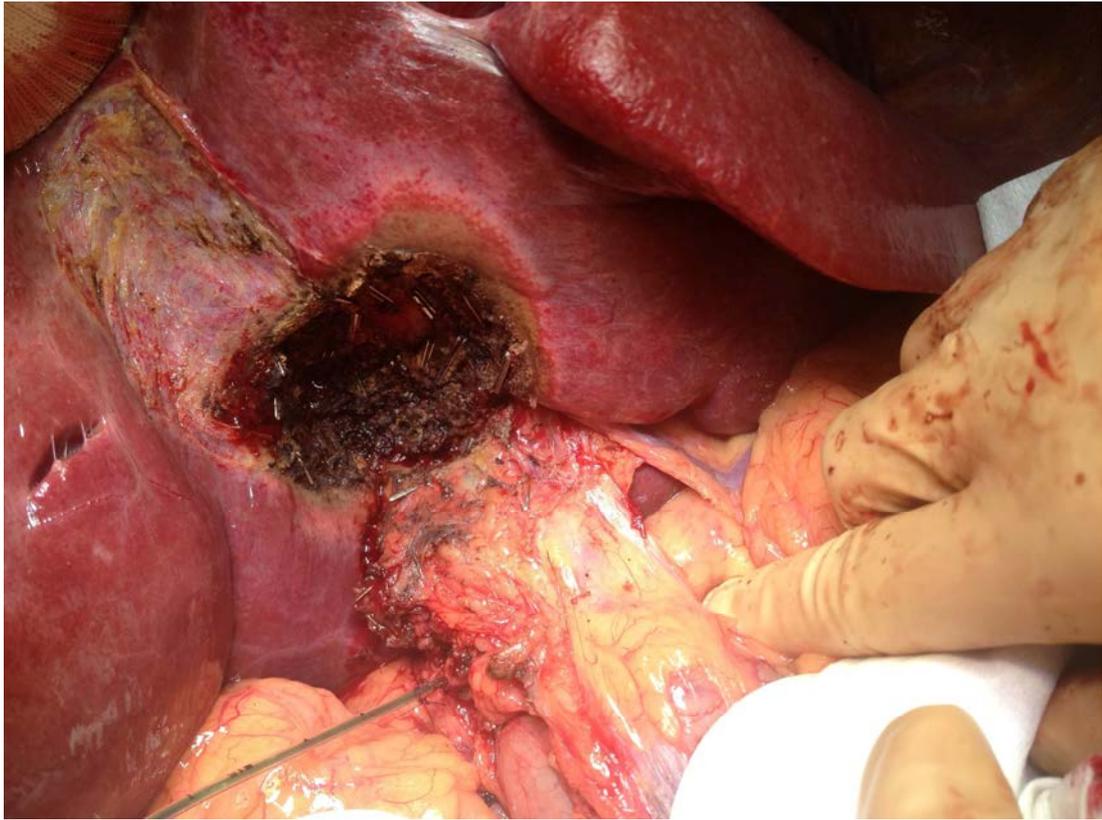
27.8% et la survie sans récurrence de 22.9%. La marge n'influait pas la survie.

Une étude rétrospective multicentrique [17] portant sur 557 patients a analysé la relation entre la marge de résection chirurgicale et la survie et le taux de récurrence. Le suivi moyen a été de 29 mois et 40.4% des patients ont présenté une récurrence. Les patients avec une marge de résection positive avaient un taux de récurrence plus élevé (51.1% vs 38.6%,  $p=0.04$ ). En revanche, il n'y avait pas de différence significative que la marge soit de 1 à 4 mm, de 5 à 9 mm ou supérieure à 1 cm (respectivement 38.7%, 41.2%, 39.2%) en termes de récurrence tumorale. En terme de survie à 5 ans, les patients avec une marge positive avaient une survie à 5 ans de 17.1% versus 63.8% pour les patients avec marge négative ( $p=0.01$ ). Aucune différence n'a été observée quelle que soit la largeur de la marge lorsque celle-ci est négative. Ces résultats ont été confirmés par Hamady et al. [18].

Une récente analyse multi variée a suggéré qu'une marge de plus de 10 mm était un facteur indépendant de survie mais les auteurs de cette étude portant sur plus de 1000 patients, concluaient aussi qu'une marge inférieure à 10 mm ne constituait pas pour autant une contre-indication à la résection [19]. Enfin, chez les patients ayant eu une chirurgie avec des marges microscopiquement envahies (R1), des survies à 5 ans de 15 à 20% ont été décrites dans des séries récentes [20].

### 3.2.2 Etendue de l'exérèse

La réalisation de résections anatomiques ou non anatomiques, lorsque le choix est possible, a été depuis longtemps discutée. Des publications [21, 22, 23] montrent que la résection hépatique atypique, wedge ou métastasectomie (Fig. 2), augmente le risque de marges positives et par conséquent diminue la survie à long terme. Ces études ont analysé en uni varié et multivariée l'influence du type de résection sur le pronostic.



**Fig. 2.** Tumorectomie d'une métastase hépatique localisée en regard de la plaque hilare du pédicule hépatique. Il s'agit d'un geste comportant des risques majeurs de blessures de la vascularisation du foie et de la voie biliaire intra-hépatique (images bloc opératoire Dr. BARABINO – Pr. PORCHERON – Dr. CUILLERON).

L'étude rétrospective de Scheele J et al. [21] a montré que le caractère non anatomique de la résection hépatique était, après analyse multivariée, un facteur influençant négativement la survie globale et sans récurrence. L'étude rétrospective de DeMatteo et al. [22] retrouvait un taux de marge de résection R1 supérieur (16% vs. 2%), et une survie inférieure (38 mois vs. 53 mois) dans le groupe résection limitée. L'étude multicentrique rétrospective de Zorzi et al. [23], a comparé les marges de résection chez 253 patients consécutifs réséqués pour MHCR. Le taux de marge positive (8%) n'était pas significativement différent entre les résections limitées et les résections anatomiques. Les résultats étaient similaires concernant la récurrence tumorale et la survie à 5 ans (61% vs. 60%). Les conclusions étaient que la résection anatomique n'était pas supérieure à la résection atypique en termes de récurrence tumorale. L'absence de supériorité en termes de marge positive et de

survie après résection anatomique ou résection hépatique majeure a été retrouvée dans d'autres séries [24].

### 3.2.3 Procédures per opératoires et augmentation de la résécabilité

#### 3.2.3.1 Hépatectomie en 2 temps avec ligature veine porte droite

Lorsque qu'il existe des MHCR bilobaires, en particulier synchrones avec la tumeur primitive en place, une éventuelle hépatectomie droite est envisageable après « nettoyage » oncologique du foie gauche (Fig. 3) sous condition que la masse hépatique restante soit suffisante. Dans le cas contraire, une ligature de la veine porte droite peut être proposée en même temps que le geste colique et que le nettoyage du foie gauche. Cette stratégie d'embolisation per-opératoire est en compétition avec l'embolisation portale radiologique [25].



**Fig. 3.** Metastasectomies multiples du foie gauche et embolisation portale droite per-opératoire lors du premier temps opératoire d'une hépatectomie en deux temps (images bloc opératoire Dr. BARABINO – Pr. PORCHERON – Dr. CUILLERON).

Une série rétrospective récente [26] portant sur 35 patients a montré qu'il n'y avait pas de différence significative en terme d'hypertrophie du parenchyme résiduel ( $35\pm 38$  vs.  $38\pm 26\%$ ) et de morbi-mortalité entre un groupe de patients (n=18) ayant eu une embolisation portale radiologique et un groupe (n=17) ayant eu une ligature portale dans le cadre d'une chirurgie en 2 temps. Un autre travail récent [27] effectué chez le porc (n=25) avec analyse angiographique et histologique a également montré que les 2 techniques permettaient d'induire une hypertrophie parenchymateuse. En revanche, la ligature portale per-opératoire avec embolisation (Fig. 4) semble avoir un effet limité par le développement d'une collatéralité veineuse, qui est absent après embolisation portale radiologique.



**Fig. 4.** CT SCANNER post embolisation portale droite per-opératoire lors du premier temps opératoire d'une hépatectomie en deux temps (images Dr. BARABINO – Pr. PORCHERON – Dr. CUIILLERON).

### *3.2.3.2 Destruction par radiofréquence/microondes*

Initialement, l'adjonction d'un traitement de destruction locale par radiofréquence (RF)/microondes à une hépatectomie pour détruire une ou deux MHCR, de petite taille, dans le foie restant, a représenté la principale indication de

la destruction focale. Elias et al. [28] ont montré que des lésions non résécables devenaient traitables complètement par cette association. La simplicité du geste et de ses suites et l'épargne hépatique obtenue ont mené certaines équipes à remplacer, en cas de MHCR multiples, l'exérèse hépatique par la RF [29]. Le même raisonnement a été tenu chez les patients ayant un CHC, la RF percutanée ayant remplacé l'exérèse [30]. La technique classique est celle décrite pour le CHC : l'aiguille de radiofréquence est mise en place sous contrôle échographique. Une fois positionnées, les électrodes sont déployées pour permettre l'ablation tumorale. L'ablation dure environ 20 minutes : cinq minutes pour atteindre la température idéale de la procédure (95°C), quinze minutes de traitement et une minute de refroidissement. La visualisation de la destruction est possible en temps réel sous contrôle échographique. On observe une sphère de coagulation de 2 cm environ. La procédure est terminée quand la lésion tumorale est remplacée par une zone hyper échogène. Le type d'aiguille (droite ou parapluie) n'influence pas la morbidité et les résultats carcinologiques [31].

Les limites de la RF sont : la présence d'une lésion iso échogène, la proximité d'un gros vaisseau (moindre efficacité), la proximité des voies biliaires (si moins de 0,5 cm des voies biliaires : risque de sténose ischémique), les antécédents de chirurgie biliaire comme une anastomose bilio-digestive ou de sphinctérotomie endoscopique (risque d'abcès), le nombre et la taille des lésions [32]. Enfin, il a été suggéré qu'une zone de parenchyme traitée par RF située sur la tranche d'hépatectomie et pouvant nécessiter pour son exérèse une résection hépatique compliquée/ou majeure peut être conservée, et la résection considérée comme R0 [33] (Fig. 5).



**Fig. 5.** A l'aide des microondes, réalisation de la tranche de section hépatique lors d'une hépatectomie gauche (images bloc opératoire Dr. BARABINO – Pr. PORCHERON – Dr. CUILLERON).

### 3.2.4 Echographie péri opératoire des métastases hépatiques

La chirurgie hépatique moderne est une chirurgie adaptée aux lésions à traiter réalisant des exérèses limitées du parenchyme non malade tout en enlevant, avec une zone de sécurité satisfaisante, la totalité des lésions. Ces exérèses pénètrent profondément dans le parenchyme hépatique, en traversant des zones vasculaires, ce qui nécessite une bonne connaissance de l'anatomie réelle du patient [34, 35].

Quelque soit la nature de la tumeur et le type de l'intervention, l'échographie est réalisée dès l'incision (Fig. 6), afin de vérifier s'il n'existe pas une contre-indication au geste envisagé. Elle est complétée, dès que le foie est mobilisé, afin que la totalité du parenchyme hépatique soit étudié le mieux possible. Afin de suivre la progression de l'hépatectomie et particulièrement de vérifier la bonne

position de la tranche de section par rapport à la lésion et aux vaisseaux, elle est de nouveau faite à chaque fois que cela paraît nécessaire [36].



**Fig. 6.** Echographie per-opératoire avant de réaliser le geste de microondes sur la métastase hépatique du segment IV (images bloc opératoire Dr. BARABINO – Pr. PORCHERON – Dr. CUILLERON).

Dans les métastases hépatiques, la détection des petits nodules méconnus est fondamentale pour la décision des exérèses. De plus en plus, les résections hépatiques sont limitées car elles présentent moins de risque d'insuffisance hépatique ; elles permettent la réalisation d'hépatectomies itératives en cas de récurrence. En dehors des tumorectomies qui présentent un risque majeur de récurrence, les résultats des hépatectomies itératives sont identiques à ceux des exérèses larges [37]. L'échographie per-opératoire modifie la stratégie chirurgicale en permettant de réaliser des segmentectomies réglées en fonction de la localisation des lésions vis-à-vis des pédicules glissonniens. Lorsque la tumeur est petite et centrale, au lieu d'une exérèse difficile, il est possible de réaliser une radiofréquence ou microondes de la tumeur en introduisant, sous écho-guidage, au sein du nodule tumoral, l'aiguille coaxiale [37].

Des publications [38-41] montrent qu'une exploration systématique du foie

apporterait de nombreuses informations à l'opérateur, et pourrait mettre en évidence au moins une lésion hépatique secondaire non identifiée sur le bilan d'imagerie préopératoire chez 10 à 25.6% des patients. Il en résulterait un changement de stratégie jusque dans 72% des cas [38-41]. Les séries précédemment décrites et publiées possèdent une hétérogénéité dans le bilan iconographique préopératoire, en n'incluant pas systématiquement de TDM ou d'IRM notamment d'IRM de diffusion.

Tamandl [40] conclut qu'un bilan d'imagerie pré-opératoire adéquate, associé à une réflexion pluridisciplinaire rend la probabilité de détection de lésions hépatiques additionnelles en per-opératoire très faible, et ceci également chez des patients ayant bénéficié d'une chimiothérapie pré-opératoire prolongée. Chez 8.2% des patients, des lésions supplémentaires ont été mises en évidence, toujours sous-capsulaire et d'un diamètre inférieur à 1 cm. Wagnetz [41] a retrouvé une modification dans la stratégie liée à la seule échographie per opératoire dans 2.7 % des cas. L'auteur précise que l'échographie garde un rôle d'importance s'il persiste un doute après la réalisation d'exams d'imageries multi-planaires en coupe fine.

L'utilité de l'échographie plus contraste dans la cartographie des lésions et des éléments vasculaires ou bilieux permettant la sécurisation du geste est également soulignée par cette équipe.

Contrairement à ces deux auteurs, Hata [38] précise que l'inspection, la palpation et l'échographie gardent un rôle indispensable dans la stratégie opératoire et la détection de nouveaux nodules. Pour 254 patients sélectionnés en vue d'un geste de résection hépatique, 65 (24.1%) s'étaient vus détecter de nouvelles lésions lors de l'exploration per opératoire avec un changement de stratégie chirurgicale dans 47 cas (18.5%). La plupart des patients ayant bénéficié d'une tumorectomie additionnelle. Malheureusement l'IRM hépatique n'était pas réalisée en routine dans cette série.

Ferrero [39] constatait un changement de stratégie lors de l'intervention dans 26.4% des cas de sa série, soit 140 patients. Seuls 51% des patients avaient bénéficié d'une IRM hépatique dans leur bilan lésionnel.

D'autres auteurs ont publié des séries dans lesquelles la TDM abdominale est considérée comme étant le Gold standard [42,43].

De nos jours, la TDM a gagné en sensibilité grâce à l'utilisation d'appareils multi hélices. L'imagerie par résonance magnétique a bénéficié de l'apparition d'agents de contrastes et de séquences de diffusion. De nombreuses études se sont intéressées à la sensibilité et à la spécificité de ces examens pour la détection des métastases hépatiques des cancers colo rectaux. Kuleman **[44]** retrouvait une sensibilité de 88% pour l'IRM contre 65% pour le scanner abdominal chez des patients présentant des foies stéatosiques dans les suites d'une chimiothérapie néo adjuvante, cette différence restait significative dans la détection des lésions de petite taille. Van Kessel **[45]** dans une méta-analyse décrivait une sensibilité de 84.5% (69.7% - 94%) pour l'IRM, contre 69.9 % (65.6% - 73.2%) pour la tomodensitométrie abdominale. Il en résulte que l'IRM hépatique semble être le meilleur examen dans le staging pré-opératoire des patients présentant des métastases hépatique de cancers colorectaux.

Selon Niekel **[46]**, dans une méta-analyse de 2010, sur une analyse par patient, la sensibilité moyenne de la tomodensitométrie, de l'IRM hépatique, du PET FDG était de respectivement 81.2%, 93.4%, et 94.2%; la sensibilité du scanner était significativement moins bonne que celle du PET FDG ( $p = 0.025$ ), les spécificités comparables.

Plusieurs études ont montré que la précision de l'imagerie multi-planaire en coupe fine diminuait avec les lésions de taille inférieure à 15 mm **[47]**, la plupart des lésions supplémentaires découvertes en per opératoire étaient millimétriques et nécessitaient un geste de résection non anatomique supplémentaire.

Certains auteurs se sont intéressés aux facteurs de risque de découverte per opératoire de lésions hépatiques potentiellement secondaires supplémentaires d'un adénocarcinome colorectal. Des lésions synchrones, bi lobaires, supérieures à 3 chez des patients au BMI supérieur à 30 avec délai entre la dernière imagerie et la chirurgie supérieur à 18 jours sont des facteurs de risque de découverte de lésions supplémentaires dans la littérature **[48,49]**. La découverte per-opératoire de lésions additionnelles est corrélée pour Tamandl à une moins bonne survie sans récurrence (5.3 mois vs 13.4 mois,  $p < 0.001$ ) **[40]**.

Les résultats de l'échographie de contraste per-opératoire sont controversés. Schultz et al **[50]** a identifié 8% de lésions tumorales confirmées par

l'histologie en plus (n=31) avec la seule échographie de contraste. Ces résultats ne sont pas confirmés par Ferrero [39] et Torzilli [51].

En conclusion, tous ces éléments bibliographiques nous montrent que, même devant l'amélioration continue de la sensibilité et de la spécificité des examens radiologiques, en per-opératoire, il est nécessaire de trouver et de développer des outils performants de détection des lésions cancéreuses non visibles pour le chirurgien qui recherche la résection oncologique la plus parfaite.

*Le chirurgien hépatique a aujourd'hui de nombreux outils pré-opératoires afin de connaître l'anatomie et la topographie complète et précise des métastases hépatiques résécables.*

*En per-opératoire, les outils sont plus limités : l'expérience et la capacité du chirurgien deviennent des éléments fondamentaux.*

*La précision oncologique dans la marge de résection est un élément indispensable afin d'améliorer la survie sans récurrence.*

## **4. CARCINOSE PERITONEALE D'ORIGINE COLORECTALE**

### **4.1 Epidémiologie de la carcinose péritonéale du CCR**

Comme les métastases hépatiques isolées, les carcinoses péritonéales (CP) correspondent à l'atteinte métastatique du péritoine, considéré actuellement comme un organe à part entière. La dissémination péritonéale et intra-abdominale d'un cancer colorectal peut atteindre 30-40% de patients [52] [53]. L'histoire naturelle de la maladie est toujours fatale, avec une médiane de survie de 6 mois [54].

Depuis le début des années 1990, plusieurs équipes spécialisées ont mené des études de phases I et II pour évaluer l'intérêt de l'association d'une chimiothérapie intra-péritonéale avec hyperthermie à une chirurgie de cytoréduction dans la prise en charge thérapeutique de cette pathologie.

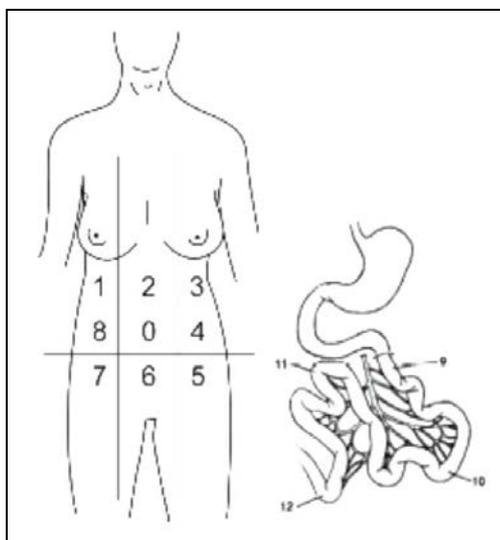
Seule une cytoréduction chirurgicale complète associée à une chimiothérapie intra péritonéale immédiate  $\pm$  hyperthermie permet d'obtenir une survie à 5 ans entre 30 et 48% [55].

### **4.2 Limites du diagnostic de la carcinose péritonéale**

Le diagnostic de la carcinose péritonéale d'origine colorectale est pré-opératoire et/ou per-opératoire.

L'un des problèmes majeurs rencontré dans la sélection des indications est l'évaluation de l'étendue de la carcinose, très difficile à apprécier sans exploration chirurgicale, malgré les progrès de l'imagerie. L'évaluation quantitative des carcinoses péritonéales est un indicateur pronostique fondamental qui a conduit la plupart des équipes spécialisées dans le traitement des CP, à établir des classifications et des scores. Le «Peritoneal Cancer Index» (PCI) de Sugarbaker est un outil d'évaluation quantitative précis pour les carcinoses d'origine digestive. Il

est établi en fonction de la distribution des nodules tumoraux et de leur taille [56,57]. La cavité péritonéale est divisée en neuf cadrans et quatre régions pour le grêle, soit 13 régions au total (Fig. 7).



**Fig. 7.** Peritoneal Cancer Index de Sugarbaker (PCI) ou index péritonéal.

Ce score est calculé en notant, de 0 à 3, chacune des 13 régions et peut donc aller de 1 à 39. La note 0 correspond à l'absence de toute lésion macroscopique ; 1 : à des lésions ne dépassant pas 5 mm ; 2 : à des lésions allant de 5 mm à 5 cm ; et 3 à des lésions dépassant 5 cm. À l'inverse, la classification française de Gilly [57] qui comprend quatre stades selon la taille des granulations péritonéales et leur localisation (Tableau 1), a montré son intérêt pronostique et a été validée au sein de l'étude multicentrique, EVOCAPE 1 [53].

	Avant chirurgie*	Après chirurgie**
<b>Stade 0</b> : pas de lésion (cytologie positive)		
<b>Stade 1</b> : lésions < 0,5 cm, et localisées dans une partie de l'abdomen		
<b>Stade 2</b> : lésions < 0,5 cm, et diffuses		
<b>Stade 3</b> : lésions entre 0,5 et 2 cm		
<b>Stade 4</b> : lésions > 2 cm		

\*Colonne à remplir par le chirurgien, avant toute résection.

\*\*Colonne à remplir par le chirurgien, en fin d'intervention.

**Tableau 1.** Classification de Gilly afin d'évaluer l'extension de la carcinose en peri-opératoire.

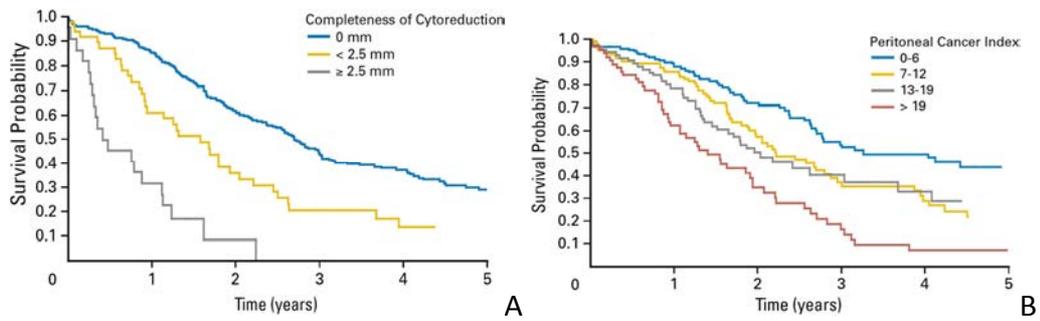
Enfin, la Japanese Research Society for Gastric Cancer a rapporté une classification des CP d'origine gastrique [58]: P0 correspond à l'absence de carcinose macroscopique ; P1 correspond à la présence de nodules péritonéaux sur le péritoine adjacent à l'estomac (sous le côlon transverse, grand épiploon) ; P2 correspond à quelques nodules péritonéaux à distance et aux métastases ovariennes ; P3 correspond à des nodules péritonéaux disséminés. L'évaluation de la taille des résidus tumoraux en fin de chirurgie est fondamentale, et est réalisée par le RR score ou le CC score (Tableau 2).

CC score de Sugarbaker	RR score
CC 0 : pas de nodule tumoral résiduel	R0 : pas de nodule tumoral résiduel, cytologie négative et marge de résection négative
CC 1 : nodules tumoraux < 0,25 cm	R1 : pas de nodule tumoral résiduel, cytologie positive ou marge de résection positive
CC 2 : nodules tumoraux de 0,25 à 2,5 cm	R2a : nodules tumoraux < 0,5 cm
CC 3 : nodules tumoraux > 2,5 cm	R2b : nodules tumoraux de 0,5 cm à 2 cm
	R2c : nodules tumoraux > 2 cm

L'évaluation de la taille des résidus tumoraux en fin de chirurgie est fondamentale, et est réalisée par le RR score ou le CC score.

**Tableau 2.** Evaluation de la taille des résidus tumoraux à la fin de la résection chirurgicale.

Les meilleurs résultats sont obtenus chez les patients ayant bénéficié d'une chirurgie de réduction tumorale satisfaisante («downstaging procedure»). Cette cytoréduction macroscopiquement complète, ne laissant que des nodules inférieurs à 5 mm, est équivalente à une carcinose de stade 1 ou 2 dans la classification française de Gilly [59] [112] (Fig. 8).



(Maggiore M, Elias D. *Eur J Surg Oncol* 2010)

**Fig. 8.** La graphique A confirme la nécessité de pratiquer une résection la plus complète possible afin de permettre une survie satisfaisante à long terme. Le graphique B montre qu'un score PCI supérieur à 19 correspondant à une masse tumorale importante difficilement résécable est grevé d'une survie inférieure à 10% à 5 ans (B).

Dans le domaine de l'imagerie, le CT Scanner et le TEP Scanner représentent le gold standard. Dromain et al [60] ont comparé les résultats du TEP Scanner au CT Scanner à ceux découverts en per opératoire, montrant que la sensibilité du TEP Scanner est inférieure à celle du CT Scanner dans la détection de la carcinose péritonéale (57% vs 82%) et que les deux examens sous-estiment systématiquement l'étendue de la carcinose [60]. Quantitativement le PCI (index de carcinose péritonéale [61]) passait de 5.4 au CT Scanner à 10.2 lors de la chirurgie [56]. Sur la base de ces résultats et afin d'améliorer la détection précoce des CP, Elias et al [62] ont évalué l'efficacité de la réalisation d'une laparotomie systématique à 1 an chez des patients ayant un cancer colorectal à haut risque de récurrence péritonéale et chez qui les marqueurs tumoraux et la radiologie (CT Scanner et PET Scanner) étaient négatifs. Une CP à un stade précoce a ainsi pu être diagnostiquée chez 55% des patients lors de la chirurgie systématique (2<sup>nd</sup> look) confirmant le manque de sensibilité de l'imagerie actuelle [62].

Le diagnostic quantitatif de la masse tumorale initiale représente un facteur pronostic important de la maladie elle-même. Il conditionne la résécabilité de l'iceberg tumoral visible mais il influe aussi sur l'importance du contingent cellulaire qui a diffusé vers les tissus péri-tumoraux non résécables. C'est ce compartiment

résiduel post chirurgical que vise la CIP. Le traitement curatif est plus facilement obtenu pour des carcinomes sectoriels, extirpés soigneusement par le chirurgien avec une large collerette de tissu péri-tumoral plutôt que pour les carcinomes volumineux qui demandent des résections complexes péritonéales et viscérales, laissant nécessairement de nombreux résidus microscopiques, voire millimétriques en place. Le concept classique de résection R0 n'est plus adapté dans le cadre de la chirurgie péritonéale et il a été remplacé par celui de cytoréduction macroscopiquement complète (CC-0). De plus, le volume tumoral est aussi étroitement lié au potentiel métastatique lymphatique et viscéral qui conditionne la survie sans progression.

La diminution de la masse tumorale péritonéale est donc un objectif majeur d'une stratégie thérapeutique intégrant un traitement de la maladie péritonéale. L'aboutissement ultime de ce raisonnement serait de traiter des carcinomes au stade purement microscopique par des CHIP appelées « prophylactiques ». La validation de ce concept fait appel à la notion de ré-intervention programmée avec CHIP chez les patients présentant des facteurs de risque de carcinome comme une perforation, des métastases ovariennes ou un antécédent de résection de foyer de carcinome péritonéale [63].

Comme pour les métastases hépatiques, une chimio-biothérapie néo-adjuvante permettrait un "downstaging" de la carcinome et une diminution du risque métastatique. Même si l'efficacité d'une chimiothérapie sur une carcinome péritonéale est plus difficile à évaluer que dans le cas de métastases hépatiques, elle est un facteur pronostique positif de survie après cytoréduction complète et CHIP.

### **4.3 Association chirurgie de cytoréduction et chimiothérapie intra péritonéale péri opératoire**

La prise en charge des CP s'est profondément modifiée au cours des dix dernières années avec le développement des traitements loco-régionaux qui associent des techniques chirurgicales de cytoréduction avec des gestes de

péritonectomies à une chimiothérapie intra péritonéale per-opératoire : chimiothérapie intra péritonéale post-opératoire immédiate (CIPPI) et/ou CHIP chimio hyperthermie intra-péritonéale (CHIP). Considérée autrefois comme une évolution terminale des cancers colorectaux, une approche thérapeutique curative s'est développée. Plusieurs études prospectives et rétrospectives ont souligné l'intérêt de l'association d'une chirurgie de cytoréduction optimale avec une chimiothérapie intra péritonéale péri opératoire dans le traitement des CP colorectales en rapportant des médianes de survie nettement supérieures à la survie spontanée, atteignant 32 à 38 mois dans les séries les plus récentes [64-67]. Une survie à 2 ans de 64% [67] et à 5 ans de 54% [68] a été observée au sein d'études où la chirurgie de cytoréduction complète était de 85 à 100%.

Une étude randomisée de phase III [69] dans le traitement de CP d'origine colorectale a comparé l'association chirurgie de réduction-CHIP à la mitomycine C à un traitement chirurgie standard-chimiothérapie systémique. L'étude a été stoppée après 2 ans d'inclusion du fait d'un bénéfice significatif en terme de survie (médiane de survie de 22.4 vs 12.6 mois) en faveur de l'association chirurgie de cytoréduction et CHIP. La conception de cette étude ne permettait pas de déterminer si ce bénéfice était lié à la résection des lésions ou à la CHIP ou à la combinaison des deux traitements. Elle rapporte toutefois un bénéfice indiscutable de l'association chirurgie de cytoréduction et CHIP par rapport à une prise en charge palliative (chimiothérapie de type leucovorine-5-FU, chimiothérapie de référence du cancer colorectal métastatique au moment de l'élaboration de l'étude).

Une large étude multicentrique et rétrospective portant sur 506 patients [70] atteints de CP colorectales, tous traités par l'association d'une chirurgie de cytoréduction et d'une chimiothérapie intra péritonéale péri opératoire (CHIP, CIPPI ou leur association) rapporte pour des patients traités par chirurgie de cytoréduction complète, une médiane de survie de 32 mois, qui rejoint les résultats obtenus par la chirurgie dans le traitement des métastases hépatiques. Cette étude a permis, sur une large population, d'identifier plusieurs facteurs pronostiques permettant de mieux sélectionner ce type de procédure. En analyse multi-variée

plusieurs facteurs pronostiques indépendants de meilleure survie ont été identifiés : la cytoréduction complète des lésions (OR 0.71 ;  $p < 0.001$ ), l'extension limitée de la carcinose (OR 0.51 ;  $p < 0.001$ ), l'âge inférieur à 65 ans (OR 0.51 ;  $p < 0.002$ ), une atteinte ganglionnaire limitée ( $p < 0.002$ ), la possibilité de ré-intervenir pour une seconde cytoréduction (OR 1.1 ;  $p < 0.001$ ), la réalisation d'une chimiothérapie systémique néo adjuvante ( $p < 0.01$ ) ou adjuvante (OR 0.26 ;  $p < 0.04$ ).

Une étude randomisée à propos de 35 patients, publiée par Elias et al. [71], a comparé, après chirurgie de cytoréduction complète, une chimiothérapie systémique à la CIPPI. Du fait de l'arrêt précoce de l'étude pour non inclusion et de l'effectif relativement faible, la survie des 2 groupes n'a pu être comparée. La survie à 2 ans était de 60% pour l'ensemble de cette population traitée par une cytoréduction complète des lésions de carcinose, taux de survie bien au delà du taux de survie spontanée dans cette pathologie.

Il n'y a cependant aucune étude à ce jour comparant la cytoréduction complète des lésions de carcinose suivie soit d'une chimiothérapie systémique soit d'une chimiothérapie intra péritonéale péri ou post-opératoire immédiate. L'association d'une chirurgie de cytoréduction et d'une chimiothérapie intra péritonéale péri opératoire est une procédure thérapeutique lourde et complexe. Elle expose le patient à un risque de mortalité et de morbidité post opératoire élevé (respectivement de 0 à 18% et de 16 à 65%). Ces taux sont en nette régression avec l'expérience croissante des équipes spécialisées dans la prise en charge des CP. Des études [61, 62, 68, 70] ayant inclus plus de 200 patients et ayant spécifiquement analysé la toxicité des procédures, ont montré que les taux de mortalité n'excédaient pas 3% et les taux de morbidité 24%. Ce type de traitement ne peut donc s'adresser qu'à des patients soigneusement sélectionnés par une prise en charge dans des centres experts dans le traitement des carcinoses péritonéales.

En 2007, sous l'impulsion des résultats obtenus, 15 centres hospitaliers et centres régionaux de lutte contre le cancer étaient à même de proposer une procédure associant chirurgie de cytoréduction et CHIP.

#### **4.4 Chirurgie de la carcinose péritonéale**

Le développement des traitements locorégionaux et d'une approche thérapeutique à visée curative des CP doit conduire à modifier la stratégie chirurgicale, notamment devant la découverte per-opératoire d'une CP. Le pronostic d'une CP colorectale dépend de l'extension et de la distribution de la CP et de sa potentielle résécabilité [72]. Il apparaît donc indispensable aujourd'hui d'obtenir une description per-opératoire précise de l'extension et de la distribution de la CP.

En cas de découverte per-opératoire d'une CP, la description précise de la distribution et de l'extension de la carcinose est primordiale pour permettre aux centres experts de mieux évaluer sa résécabilité, en particulier si une stratégie à visée curative peut être envisagée. Une liste de 5 critères, à noter dans un compte-rendu opératoire, en cas de CP, a été validée par les centres experts français (Journée Nationale du Traitement des carcinoses par chirurgie et chimiothérapies intra-péritonéales, Hôpital St Louis, Mai 2007) (Grade C):

- Une description de la carcinose, quadrant par quadrant, prouvée par une biopsie
- La présence ou non d'une ascite
- Des photographies ou un enregistrement vidéo
- La description de l'atteinte de l'intestin grêle et la présence ou non d'une rétraction du mésentère
- L'atteinte de la coupole droite et son caractère mobile ou non

Le principal facteur pronostique rapporté par les études ayant évalué une stratégie thérapeutique curative pour les CP colorectales est la radicalité de la chirurgie de cytoréduction [70]. Des médianes de survie de plus de 30 mois n'ont été obtenues que lorsque la chirurgie de cytoréduction permettait une exérèse complète des lésions macroscopiques. Toutefois des survies prolongées (> 20 mois)

ont été rapportées lorsque la taille des nodules résiduels n'excédait pas 2,5 mm, en association à une chimiothérapie intra péritonéale per-opératoire [70]. L'évaluation de la taille des nodules tumoraux résiduels à l'issue de la chirurgie de cytoréduction est donc fondamentale. Elle pourra se faire selon des scores retenus par des conférences de consensus internationales (Milan 2006 [73], San Diego 2006 [59]) comme outils de référence dans la description quantitative des nodules tumoraux résiduels après chirurgie de cytoréduction.

La conférence de consensus de Milan [73] a utilisé la technique de Delphes pour aboutir à un consensus entre 117 experts de 17 pays formant 6 groupes de travail. La conférence de consensus de San Diego [59] a permis d'établir un score pronostic des CP.

Selon ces conférences de consensus [59,73] : en cas de stratégie thérapeutique à visée curative, la chirurgie de cytoréduction consiste en l'exérèse complète des lésions de carcinose visibles, par des gestes de péritonectomies ou des résections d'organes. Comme pour le traitement des cancers ovariens, il est recommandé de réaliser une omentectomie totale systématique [74]. Il est recommandé de réaliser des gestes de péritonectomies orientés par la distribution des nodules de carcinose. La réalisation de péritonectomies pariétales systématiques n'est pas indiquée. En cas de stratégie thérapeutique à visée palliative, le geste chirurgical doit être symptomatique et le plus simple possible (traitement de l'occlusion résistante à un traitement médical, d'une perforation digestive: stomies, dérivation).

*La qualité de la résection chirurgicale de la carcinose péritonéale est corrélée à la vision du chirurgien en per-opératoire afin de réséquer de façon optimale le cancer avec épargne du tissu sain.*

*C'est pour cette raison que nous nous sommes intéressés à la mise au point d'outils capables d'améliorer la résection chirurgicale des métastases hépatiques et de la carcinose péritonéale d'origine colorectale.*

*Après une recherche bibliographique approfondie, nous avons choisi le vert d'indocyanine et la fluorescence de ce médicament, comme élément intensificateur de la vision du chirurgien en per-opératoire.*

## **5. FLUORESCENCE**

Dès les années 2000, la recherche en imagerie médicale s'est dirigée vers l'imagerie moléculaire, dont l'objectif est de visualiser, directement dans le vivant, des processus biologiques en action au niveau cellulaire. Initialement, ces mécanismes ont été étudiés en microscopie de fluorescence et leur transfert à l'imagerie in vivo a permis de faire émerger cette technique parmi les autres approches plus classiques, telles que le PET scanner ou l'IRM. Quand un produit de contraste est utilisé en imagerie médicale, celui-ci circule dans le système vasculaire ou s'accumule dans une zone déterminée par extravasation au niveau des vaisseaux néo-tumoraux. La qualité de l'image obtenue dépend directement de la quantité de produit injecté et du temps d'intégration utilisé pour la mesure. Au contraire, les molécules de traceur qui restent en circulation et qui ne sont pas fixées sur leur cible peuvent générer du bruit de fond. Cette constatation simple permet de comprendre pourquoi l'imagerie moléculaire nécessite d'une part des systèmes d'imagerie ayant une bonne sensibilité et une limite de détection très basse, et d'autre part des traceurs émettant un signal puissant et s'atténuant peu entre leur zone d'émission et le détecteur. Face à ces contraintes, la technique de prédilection de l'imagerie moléculaire pour l'imagerie corps entier est naturellement l'imagerie PET.

À l'inverse, quand on envisage des examens locaux ou en surface, les techniques d'imagerie de fluorescence, qui ont fait leur preuve en microscopie, reprennent de l'intérêt. Elles sont relativement simples à mettre en œuvre et surtout moins coûteuses que les techniques classiques d'imagerie nucléaire. Les principaux points qui vont limiter la sensibilité de ces méthodes de mesure optique sont d'une part l'atténuation et la diffusion de la lumière lors de la traversée des tissus, qui va réduire la proportion de lumière émise par le traceur atteignant le détecteur, et d'autre part la fluorescence propre aux tissus biologiques, qui va générer un signal lumineux comparable à celui du traceur et perturber la mesure.

En traversant les tissus biologiques, la lumière est essentiellement atténuée par l'hémoglobine et l'eau. L'hémoglobine atténue très fortement toutes les

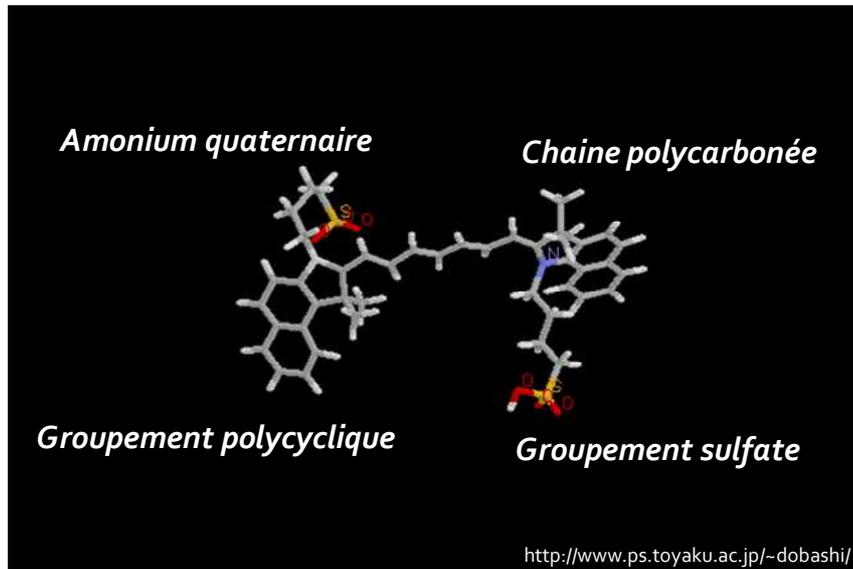
longueurs d'ondes inférieures à 650-700 nm (tout le spectre visible sauf le rouge profond). L'eau est transparente pour le visible et le très proche infrarouge, mais atténue très fortement les longueurs d'onde supérieures à 900 nm. Il existe donc une bande de longueurs d'onde à la limite entre le rouge profond et le proche infrarouge (650-900 nm) où la transparence des tissus est maximale. C'est une des raisons pour lesquelles le domaine de développement des marqueurs fluorescents dans le proche infrarouge est en très forte croissance. Seules les structures lumineuses en surface ou très proches de la surface pourront être vues avec une bonne résolution [75].

Les tissus biologiques ont une fluorescence naturelle. Pour effectuer une mesure avec un marqueur, la fluorescence du marqueur doit être prépondérante par rapport à la fluorescence propre des tissus. Des études menées sur la fluorescence des tissus biologiques ont montré que celle-ci était maximale dans le spectre visible et devenait quasiment négligeable dans le proche infrarouge [76]. Le domaine de prédilection de la fluorescence in vivo est donc la mesure de structures en surface ou juste sous la surface, avec des traceurs qui absorbent et émettent dans la bande de longueur d'onde 650-900 nm. Du point de vue de l'instrumentation, il faut assurer la plus grande compatibilité possible entre l'utilisation de la fluorescence et l'acte chirurgical. Ces instruments ne doivent pas encombrer le champ opératoire et doivent être compatibles avec son éclairage par une lumière ayant une température et un indice de rendu des couleurs comparables à ce qui est fourni par les lumières du bloc opératoire.

Depuis trois ans, à la lumière de ces données et des données de la littérature, nous avons choisi le vert d'Indocyanine comme fluorophore pour la détection du cancer colorectal.

### **5.1 Vert d'Indocyanine (ICG)**

L'ICG est une molécule de 775 daltons formée de motifs polycycliques hydrophobes, d'une chaîne polycarbonée et de groupements sulfates hydrophiles, ce qui confère à cette molécule la propriété d'être amphiphile (Fig. 9) [76].



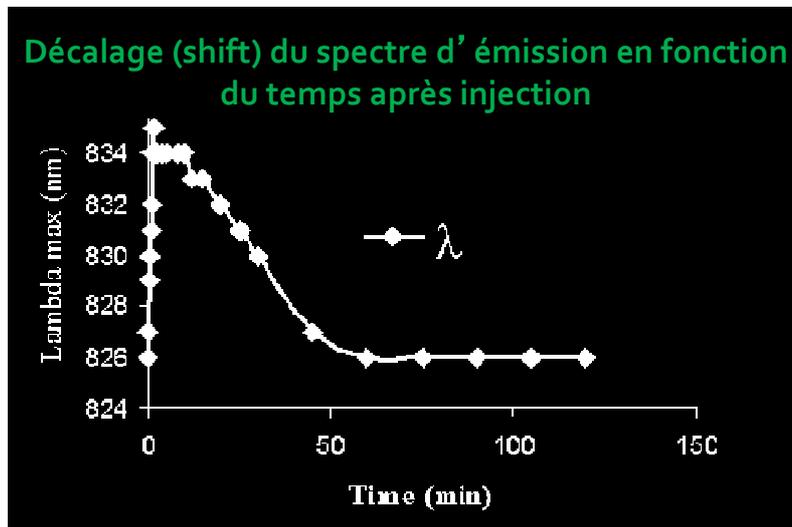
**Fig. 9.** La formule de l'ICG, Sodium 4-[2-[(1E,3E,5E,7Z)-7-[1,1-diméthyl-3-(4-sulfonatobutyl)benzol[e]indol-2-ylidene]hepta-1,3,5-trienyl]-1,1-diméthylbenzo[e]indol-3-ium-3-yl]butane-1-sulfonate.

En solution plasmatique, sa concentration décroît de façon exponentielle en deux phases, avec une phase rapide ( $t_{1/2}$  : 2 à 4 min) et une phase lente ( $t_{1/2}$  : environ 1 heure) [76].

L'ICG est un fluorophore dont le spectre d'absorption dépend de sa concentration et de la nature du solvant. En solution aqueuse, la molécule forme des polymères dont la proportion augmente avec la concentration, et plus la concentration augmente, plus le spectre d'absorption de l'ICG s'éloigne du spectre des infrarouges vers le visible. En solution plasmatique, l'ICG se lie aux protéines plasmatiques et induit un décalage de son spectre d'absorption de 25 nm vers les infrarouges, soit 805 nm. La liaison aux protéines plasmatiques gêne la formation des polymères et l'influence de la concentration sur le spectre d'absorption est alors moindre qu'en solution aqueuse [76].

Le spectre d'émission est à environ 835 nm en solution plasmatique, avec une variation de celui-ci en fonction du temps après injection intraveineuse. Cette

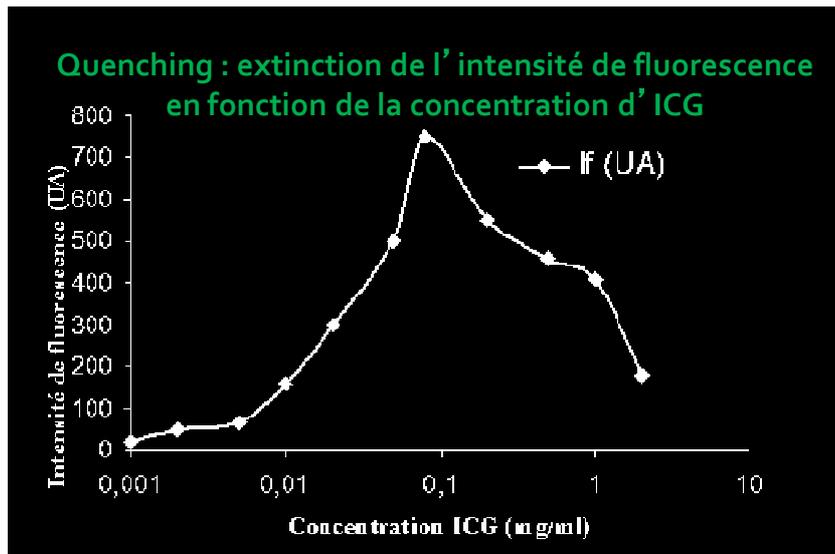
variation est une diminution de la longueur d'onde, s'expliquant par l'interaction de la molécule avec les structures phospholipidiques (phospholipides de l'endothélium vasculaire, phospholipides circulants) (Fig. 10).



<http://www.clinique-lambersart.fr>

**Fig. 10.** Graphique qui montre, en fonction du temps après injection, le décalage du spectre d'émission de l'ICG. Ce phénomène défini « shift » est corrélé à l'interaction du vert d'indocyanine avec les structures phospholipidiques circulantes.

Les rayonnements d'excitation et d'émission de l'ICG sont dans le proche infrarouge, ils ne sont donc pas ou peu absorbés par l'hémoglobine. Les structures contenant du sang ont alors une « transparence » pour les rayonnements infrarouges, comme décrit dans l'étude de Yannuzzi et al. montrant que même à travers une plage d'hémorragie rétinienne, la fluorescence de l'ICG dans les vaisseaux choroïdiens reste bien visible, contrairement à la fluorescéine [77]. L'intensité de la lumière de fluorescence infrarouge présente un caractère additif, c'est à dire que elle augmente avec l'épaisseur d'un tissu, ou la superposition de vaisseaux [78]. Cependant, ce phénomène est limité dès lors que la concentration en ICG dépasse 0.08 mg/ml, avec un effet inverse d'extinction de la fluorescence, appelé phénomène de « quenching » (Fig. 11).



<http://www.clinique-lambersart.fr>

**Fig. 11.** Graphique qui montre l'effet « quenching » de l'ICG. Ce phénomène définit l'extinction de l'intensité de la fluorescence en fonction de la concentration de l'ICG.

La diffusion de la lumière infrarouge au sein d'une solution plasmatique est influencée par la taille des particules en suspension. Deux modes de diffusion sont décrits selon la taille des particules. Pour les tailles de particules supérieures au micromètre, nous avons la « diffusion de Mie » qui a un rendement relativement faible ; cette diffusion est favorisée par la présence des éléments figurés du sang volumineux comme les hématies. Pour les tailles de particules inférieures à quelques dizaines de nanomètres, nous avons la « diffusion de Rayleigh » dont le rendement est plus élevé ; cette diffusion est favorisée par la présence des petites molécules plasmatiques. Le rendement de la fluorescence augmente avec la proportion de diffusion de Rayleigh, et diminue avec la proportion de diffusion de Mie. Le rendement de la fluorescence d'une solution sanguine est six fois inférieur à celui d'une solution plasmatique [79]. Des variations de l'hématocrite au sein des capillaires pourraient alors influencer l'intensité de la fluorescence [80].

Le rendement de fluorescence de l'ICG est 25 fois inférieur à celui de la fluorescéine sodique [81]. Cependant, on observe un confinement intra-vasculaire plus important que celui des molécules de fluorescéine. Les structures moléculaires

de l'ICG et de la fluorescéine sont très différentes, d'où des propriétés physico-chimiques différentes. La fluorescéine a une masse moléculaire plus petite, avec un faible coefficient de partage (peu lipophile). La fluorescéine a la propriété de diffuser à travers les membranes plasmiques. La masse moléculaire de l'ICG est deux fois plus importante, avec une nature très amphiphile. Cette dernière est généralement décrite comme confinée dans les vaisseaux mais pouvant diffuser (encore peu d'études sur la diffusion) avec une affinité pour les phospholipides démontrée [76].

Il y a deux caractéristiques biophysiques de l'ICG qui offrent des avantages potentiels par rapport à la fluorescéine. Tout d'abord, le pic d'absorption (805 nm) et le pic d'émission de fluorescence (835 nm), sont des longueurs d'onde dans le proche infrarouge, et une plus grande longueur d'onde donne une meilleure pénétration à travers les tissus adjacents [82-85]. Comparativement, la fluorescéine a un pic d'absorption à 490nm et un pic d'émission à 520nm. De plus, l'ICG est très lié aux protéines plasmiques (98%) et présente donc relativement moins d'extravasation dans les vaisseaux choroïdiens normaux et anormaux que la fluorescéine [85, 86].

L' INFRACYANINE® (ERB) est le produit commercialisé en France. Après injection intraveineuse, l'Infracyanine® se fixe totalement aux protéines plasmiques et demeure dans le compartiment intravasculaire, ce qui permet la détermination du débit sanguin cardiaque ou hépatique. Par ailleurs, l'absence de fuite du colorant à partir des vaisseaux choroïdiens permet leur visualisation par angiographie oculaire dans l'infrarouge. Ce chromogène est alors capté par les hépatocytes et son élimination se fait totalement par la voie biliaire sous forme inchangée, sans cycle entéro-hépatique. La demi-vie de l'infracyanine® injecté dans le sang chez le sujet sain est de  $3.4 \pm 0.7$  minutes. L'élimination est ralentie en cas de diminution de la masse hépatocytaire. Par ailleurs, en cas d'obstruction des voies biliaires, le colorant apparaît dans la circulation lymphatique du foie [87].

Ce médicament est à usage diagnostique uniquement. Les utilisations sont les suivantes :

- Etude des vaisseaux choroïdiens par angiographie oculaire en infrarouge, en particulier pour la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA), la myopie dégénérative et les autres causes de néo vascularisation choroïdienne : chorioretinopathie idiopathique centrale, œdème maculaire, maladies inflammatoires de la choroïde, dégénérescences familiales et héréditaires et tumeurs choroïdiennes.
- Détermination du débit sanguin hépatique et de la réserve fonctionnelle hépatique par des tests de clairance.
- Mesure du volume sanguin circulant et du débit cardiaque ; la détermination non invasive est particulièrement recommandée chez le nouveau-né, le nourrisson et le patient en unité de soin intensif.

La voie d'administration est intraveineuse. Les solutés de chlorure de sodium sont contre-indiqués à cause de la floculation de la solution, nécessitant l'utilisation de solution glucosée.

Chez l'adulte, la dose totale injectée ne doit pas dépasser 0.5 mg/kg.

Pour l'étude des vaisseaux choroïdiens par angiographie oculaire en infrarouge [88]:

- La dose administrée par patient dépend des caractéristiques du matériel utilisé: lumière d'excitation, filtres, système de détection. Cette dose est calculée à partir du poids du patient à raison de 0.25 à 0.5 mg/kg : en moyenne 0.35 mg/kg.

Les doses sont généralement les suivantes :

- *angiographie numérisée avec détection par caméra infrarouge* : 25 mg (10 ml) d'infracyanine pour un patient de 70 kg.
- *ophtalmoscope à balayage laser* : 12.5 mg (5 ml) d'infracyanine pour un patient de 70 kg.
- Un volume de 4 ml de cette solution est injecté en bolus (en 5 secondes) pour réaliser le temps précoce de l'angiographie (0-6 minutes). A la 6ème minute,

injecter lentement le reste de la seringue. Un très faible volume de solution (0.1 ml ou moins) peut être injecté au temps tardif (20ème minute) pour le repérage des lésions par rapport aux structures vasculaires.

Pour l'étude du débit sanguin hépatique [89] :

- Perfusion continue de 0.25 mg/min/m<sup>2</sup> de surface corporelle.
- Détermination de la réserve fonctionnelle hépatique : 0.5 mg/kg du poids en injection unique.
- La concentration plasmatique du colorant est calculée à intervalles réguliers soit directement à l'aide d'un lecteur de densité optique, soit après prélèvements de sang répétés dans les 20 minutes après l'injection unique d'infracyanine. Le pourcentage d'épuration ou de rétention du colorant est ensuite déterminé.

Pour la mesure du volume sanguin circulant et du débit cardiaque [90, 91]:

- *Adulte* : de 5 mg (soit 2 ml d'une solution à 2.5 mg/ml) jusqu'à 20 mg (soit 8 ml d'une solution à 2.5 mg/ml).
- *Enfant* : 2,5 mg (soit 1 ml d'une solution à 2.5 mg/ml).
- *Nourrisson* : 0.2 mg/kg de poids.
- Deux méthodes sont possibles : la méthode de référence implique 5 prélèvements artériels chez l'adulte et 3 prélèvements artériels chez l'enfant. La méthode non invasive utilise un spectrophotomètre pulsé et des capteurs transcutanés.

Concernant la grossesse:

Il n'y a pas de donnée fiable de tératogénèse chez l'animal. En clinique, il n'existe pas actuellement de donnée suffisamment pertinente pour évaluer un éventuel effet malformatif ou foeto-toxique de l'infracyanine lorsqu'il est administré pendant la grossesse. En conséquence, l'utilisation d'infracyanine est déconseillée pendant la grossesse. En l'absence de donnée, l'utilisation est aussi déconseillée pendant l'allaitement.

La plupart des effets indésirables signalés sont transitoires :

- *Effets peu fréquents* : nausées transitoires, voire vomissements,
- *Effets rares* : malaise, bouffées de chaleur, hypersudation, réactions cutanées (rash cutané, urticaire ou prurit isolé).
- *Effets très rares* : œdème de Quincke, choc de type anaphylactique après administration de vert d'indocyanine seule ou après administration concomitante de vert d'indocyanine et de fluorescéine.

Une coloration passagère des téguments est observée en cas d'injection para-veineuse accidentelle.

L'ICG est donc une molécule dont l'administration à l'homme a déjà été explorée, sans effet secondaire important décrit.

#### **5.1.1 Effet “Enhanced Permeability and Retention” (EPR) de l'ICG**

L'ICG présente une affinité pour les tissus tumoraux et péri-tumoraux liée à des caractéristiques histologiques micro-vasculaires permettant un dépôt localisé et spécifique appelé effet EPR (Fig. 12). L'effet EPR est la rétention de molécules au sein du tissu tumoral, du fait d'une porosité anormale des néo-vaisseaux péri-tumoraux. Cet état de perméabilité vasculaire pathologiquement accrue laisse s'extravaser passivement des molécules de l'ordre de 10 à 100 nm, qui s'accumulent et sont retenues dans l'espace péri-vasculaire [92].

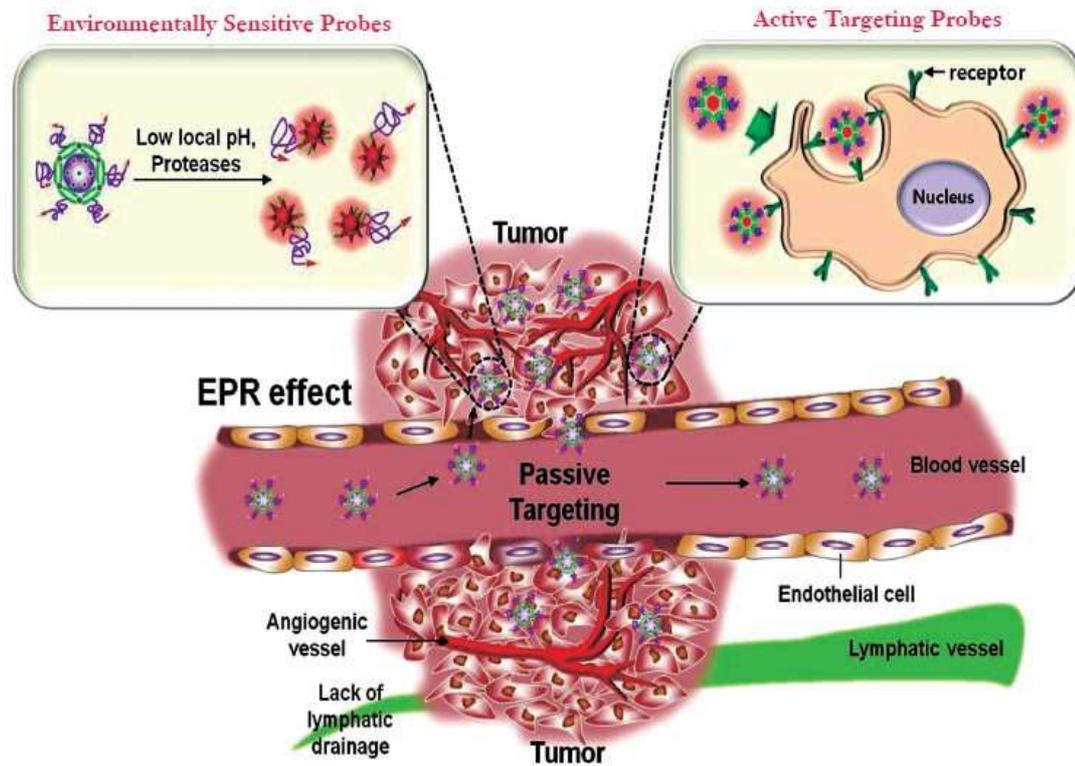


Image de l'article de Park. K. Quant Image Med Surg 2012

**Fig. 12.** Le ciblage passif et actif des particules dans le diagnostic du cancer. Le ciblage passif de la tumeur est obtenu par extravasation de particules par augmentation de la perméabilité du système vasculaire tumoral et le drainage lymphatique inefficace (effet EPR). Le ciblage actif de la tumeur peut être obtenu par fonctionnalisation de nanoparticules avec des ligands de ciblage (anticorps) qui favorisent la reconnaissance spécifique de la cellule et de la liaison (Image de l'article de Park. K. Quant Image Med Surg 2012 [93]).

Les études histologiques montrent que, dans un tissu sain, l'endothélium vasculaire est dit jointif, c'est-à-dire que les jonctions intercellulaires sont serrées, ce qui empêche les molécules d'ICG de pénétrer dans ce tissu. Inversement, au niveau des tissus néoplasiques, on observe une réaction inflammatoire, caractérisée par l'arrivée de macrophages et une libération de toute une série de cytokines, qui induisent une augmentation de la perméabilité vasculaire. Mécaniquement, cette augmentation de perméabilité va permettre aux particules de pénétrer dans le tissu tumoral par diffusion. Il y aura donc une pénétration ciblée au niveau de la tumeur, en raison de la réaction inflammatoire [94].

### 5.1.2 Utilisation de l'ICG en chirurgie oncologique

L'ICG est aujourd'hui utilisé dans des domaines de la chirurgie oncologique où la détection de la fluorescence de l'ICG à l'aide d'une sonde NIR peut améliorer la sensibilité et la spécificité du geste chirurgical.

Actuellement, les domaines de la chirurgie oncologique intéressés par l'utilisation de l'ICG et d'une sonde NIR sont, la détection du ganglion sentinelle, l'évaluation du lymphœdème, la détection de la microcirculation de « free flaps » dans la chirurgie reconstructrice et la détection de lésions tumorales hépatiques.

La détection du ganglion sentinelle a été l'une des principales applications de l'ICG dans les études, y compris par voie coelioscopique dans le traitement du cancer gastrique débutant et la gastrectomie [95-97]. Harada et al. ont comparé la cartographie du ganglion sentinelle pour le cancer colorectal de façon conventionnelle et coelioscopique basée sur ICG et ont conclu que celui-ci était supérieur au premier [98]. Miyashiro et al. ont récemment appliqué un prototype coelioscopique basé sur l'ICG pour détecter des ganglions sentinelles dans la chirurgie du cancer gastrique [99]. Jeong et al. ont mis au point une nouvelle procédure par coelioscopie de dissection des ganglions lymphatiques sentinelles de l'estomac avec marquage ICG à l'aide d'un modèle de cochon [100]. Hirche et al. ont montré l'intérêt de la détection du ganglion sentinelle pour biopsie dans le cancer du colon. La fluorescence ICG montrait 9 ganglions sentinelles pathologiques sur 11 prouvés histologiquement, soit une sensibilité de 82% [101].

Une étude de 2008, publiée par Aoki et al. montrait chez des patients ayant eu une injection d'ICG les jours précédant une hépatectomie pour carcinome hépatocellulaire (CHC) ou métastases de CCR pour évaluer leur fonction hépatique, que les lésions hépatiques présentaient en per-opératoire une fluorescence intense [102].

En 2009, Gotoh K. et al. ont publié un article sur l'apport diagnostique per-opératoire de l'imagerie en fluorescence par ICG, chez dix patients porteurs d'un CHC unique opéré. Ils ont montré que sur les dix lésions, toutes ont été réséquées

en marge saine, grâce à une identification claire de la limite entre tissu tumoral et tissu sain. De plus, chez 4 des 10 patients, d'autres lésions filles de CHC ont été détectées par la fluorescence de l'ICG en per-opératoire, alors que les imageries pré-opératoire conventionnelles et l'échographie per-opératoire ne les avaient pas diagnostiquées. Ils concluent alors que cette technique d'imagerie de fluorescence simple et sûre est considérée comme un outil prometteur pour l'imagerie per-opératoire et d'autres travaux cliniques pour le CHC [103].

En 2009, Ishizawa et al. [104], ont étudié l'intérêt diagnostique de l'ICG et de la sonde NIR en per-opératoire sur des lésions tumorales hépatiques après une injection du fluorophore quelques jours avant l'intervention. Dans leur étude tous les CHC et les métastases hépatiques de CCR diagnostiquées en préopératoire avec l'imagerie conventionnelle ont été identifiés par l'ICG. Au microscope, la fluorescence a été confirmée dans le cytoplasme des cellules de CHC et dans le parenchyme hépatique non tumoral qui entoure les CHC peu différenciés et les métastases de CCR. Ils ont décrit, d'une part différents types d'images de fluorescence selon la différenciation cellulaire du CHC et d'autre part les images de métastases de CCR (Fig. 13). Ces résultats suggèrent que dans les CHC bien à moyennement différenciés, le tissu tumoral conserve une bonne vascularisation portale (néo-vaisseaux), malgré une destruction de la fonction d'excrétion biliaire, donc une fluorescence du tissu tumoral. Alors que dans les CHC peu différenciés et les métastases de CCR, à la néo-vascularisation plus pauvre, le tissu non tumoral périphérique présente des anomalies d'excrétion biliaire par compression tumorale, donc une fluorescence de la périphérie tumorale. Le contraste de fluorescence de la tumeur ou de la marge tumorale par rapport au parenchyme hépatique sain était significativement meilleur chez les patients ayant bénéficié d'une injection de l'ICG plus de 24 heures avant l'intervention. Aucune des tumeurs localisées à plus de 8 mm de profondeur par rapport à la surface hépatique n'était détectée par fluorescence. Un cas intéressant a été rapporté, montrant une persistance de fluorescence sur les marges du parenchyme hépatique restant après métastasectomie, ce qui a permis de réaliser une résection complémentaire pour être en marge saine. L'anatomopathologie confirmait la présence de cancer sur la

résection complémentaire. D'autres part, cinq CHC débutants ont été diagnostiqués en per-opératoire par fluorescence, précédemment non décrits par l'imagerie conventionnelle ni l'échographie per-opératoire. Ceci montre la grande sensibilité de la détection par fluorescence de petites lésions non vues par les techniques d'imagerie courante [104].

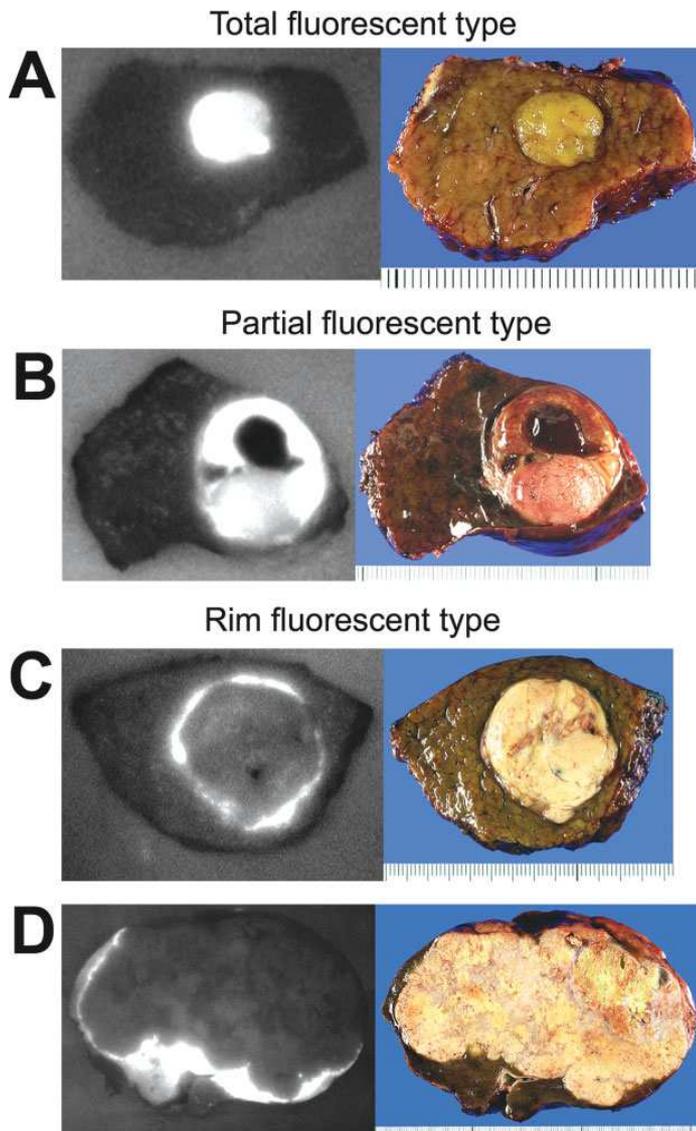


Image de l'article d'Ishizawa et al. Cancer 2009

**Fig. 13.** Pattern fluorescent de cancers hépatiques, prélèvements chirurgicaux (à gauche) et leurs images en couleur (à droite). (A) Type de fluorescence complète; carcinome hépatocellulaire, 7 mm de diamètre. (B) Type de fluorescence partielle; hépatocarcinome modérément différencié avec des composants bien différenciés et une nécrose hémorragique à la moitié supérieure de la tumeur, de 36 mm de diamètre. Type de fluorescente (C) Rim; peu différencié HCC, 30 mm de diamètre. Type de fluorescente (D) Rim; la métastase de carcinome du côlon, de 130 mm de diamètre.

En 2010, Uchiyama et al. **[105]** rappellent que l'échographie per-opératoire associée à la palpation bimanuelle du foie a longtemps été considérée comme le « gold standard » de l'évaluation per-opératoire des lésions hépatiques. Ils ont alors testé un outil diagnostique per-opératoire de métastases hépatique de CCR combinant l'échographie de contraste (ECHO) et la fluorescence ICG comparé aux examens d'imagerie diagnostique préopératoires combinant TDM injecté et IRM avec injection de gadolinium. Les résultats montrent que sur 51 lésions malignes, 46 avaient été diagnostiquées par le couple TDM/IRM et que 5 supplémentaires avaient été diagnostiquées en per-opératoire par le couples ECHO/ICG (3 par l'ECHO et 2 par l'ICG). Les couples TDM/IRM et ECHO/ICG ont une sensibilité de 88,5% et 98,1% respectivement ( $p=0,05$ ), et une spécificité de 85,2% et 94,4% respectivement. L'intérêt diagnostique du couple ECHO/ICG est donc évident, et par extrapolation, celui de l'ICG seul l'est aussi. La fluorescence des lésions était topographiquement variable, avec des lésions qui étaient totalement fluorescentes, d'autres partiellement, et enfin la majorité présentait une périphérie tumorale fluorescente, comme déjà montré par Ishizawa et al. **[104]**.

En outre, l'utilisation de systèmes d'imagerie en fluorescence couplés à la coelioscopie sera un outil indispensable pour identifier les cancers du foie au cours d'une chirurgie dans laquelle les chirurgiens ne peuvent pas palper la surface du foie **[106, 107]**. L'imagerie optique en fluorescence dans le proche infrarouge avec l'ICG peut aider à résoudre ce problème en per-opératoire. Pour cela, il est nécessaire d'injecter l'ICG par voie systémique, la veille de l'opération.

Kobayashi et al. **[108]** ont présenté en 2011 lors du World Molecular Imaging Congress (WMIC) une étude in vivo sur la souris sur la détection de la carcinose péritonéale d'origine ovarienne à l'aide de la sonde NIR et l'injection d'ICG. Les résultats montrent une amélioration significative ( $p<0,001$ ) de la détection de la carcinose péritonéale à partir de la 6<sup>ème</sup> heure post-injection intraveineuse d'ICG, comparé à un agent fluorescent control IR800-Albumine. Ils montrent un bien meilleur contraste entre tissu tumoral et tissu sain avec l'ICG, grâce à l'effet EPR mais aussi grâce à la clairance vasculaire rapide de l'ICG.

## 5.2 Sonde NEAR INFRARED (NIR)

Nous savons que la fluorescence est une émission lumineuse provoquée par l'excitation d'une molécule (généralement par absorption d'un photon) immédiatement suivie d'une émission spontanée.

Lors d'une intervention chirurgicale, nous avons donc besoin d'une caméra capable d' "exciter" le fluorophore spécifique et ensuite de "capter" la fluorescence émise par le fluorophore même.

Nous avons développé et utilisé une caméra produite par la société de Grenoble FLUOPTICS. Il s'agit d'une caméra NIR miniaturisée (Fluostick™) (Fig. 14) pour la chirurgie oncologique [109].

Le Fluostick™ est un système d'imagerie de petit diamètre, destiné à l'imagerie de fluorescence per opératoire pour des fluorophores ayant un maximum d'absorption vers 770 nm et un maximum d'émission vers 820nm. Cet instrument est particulièrement indiqué pour l'utilisation avec le vert d'indocyanine.

Le système est conçu en deux parties, un boîtier de contrôle qui est relié d'une part au PC de contrôle par un câble USB et une tête optique qui est reliée au boîtier de contrôle par un câble de 4 m de long.

Le système est développé dans le respect de la directive 2007/47/CE, il est accompagné d'une étude de risque, validée suivant la norme ISO 14971. Le logiciel du système est développé en C++ et dans le respect de la norme EN62304.

Le système Fluostick™ est composé:

- D'une valise de stockage
- Un manuel utilisateur
- Un boîtier de contrôle contenant le module de contrôle des LEDs et la source laser. Le boîtier de contrôle est relié au PC par un câble RJ45 (liaison Ethernet)
- Une tête optique avec un cordon de 4 m de long. Cette tête peut être déconnectée du boîtier de contrôle. La tête optique contient la CCD, la LED d'éclairage blanc et le canon laser avec son diffuseur. L'éclairage laser est

transmis par fibre optique du boîtier de contrôle à la tête optique. La tête optique est IP54 conformément à la norme IEC 60529. La tête optique à une section de 3,4 cm x 2,4 cm, une longueur de 15 cm et un poids de 300 g. La source laser émise par la tête optique est de classe 1 :

- Un câble RJ45 (connexion entre le boîtier de contrôle et le PC)
- Un câble d'alimentation pour le boîtier de contrôle
- Un logiciel de contrôle qui commande la caméra l'excitation laser et l'illumination en lumière blanche. Ce logiciel permet d'acquérir des images, des séquences d'images et d'enregistrer des vidéos. Le logiciel est compatible Windows XP et Windows 7.



**Fig. 14.** La sonde NIR pour la chirurgie oncologique Fluostick™ (image à partir de [www.fluoptics.com](http://www.fluoptics.com)).

Pour la chirurgie, le système devra être utilisé avec des enveloppes stériles à usage unique dédiées. Ces enveloppes stériles ont une fenêtre optique compatible avec l'imagerie en proche infrarouge et ont une longueur de 2,5 m.

Le système étant en cours de développement, les caractéristiques suivantes sont données à titre indicatif :

- Champ image : 4 cm x 3 cm
- Résolution géométrique 70  $\mu\text{m}$  soit 7 pl/mm
- Longueur d'onde d'excitation 750 nm
- Niveau d'éclairement à 750 nm à 10 cm 15 mW/cm<sup>2</sup>
- Niveau d'éclairement en lumière blanche 3000 Lux

*La technique de fluorescence que nous développons est une technique de diagnostic qui, en permettant la visualisation des cellules tumorales en per-opératoire, va modifier le protocole thérapeutique per et parfois post-opératoire.*

## 6. TRAVAIL EXPERIMENTAL

L'objectif de ce travail était d'améliorer la capacité du chirurgien à différencier les tissus sains par rapport aux tissus cancéreux afin de permettre une résection oncologique complète et améliorer la survie des patients.

Dans une première partie, nous avons étudié la bibliographie de la chirurgie digestive oncologique afin de rechercher de nouveaux outils adaptés à notre objectif. La fluorescence liée au vert d'Indocyanine a attiré notre attention.

Le vert d'Indocyanine est utilisé par voie intraveineuse depuis 30 ans chez des patients pour l'évaluation des débits cardiaque et hépatique, de la fonction hépatique et pour l'exploration des vaisseaux choroïdiens. Ce produit, qui présente une émission de la fluorescence autour de 800 nm, a été utilisé récemment dans le domaine de la chirurgie oncologique. En réalité, aujourd'hui nous pouvons exploiter complètement ces caractéristiques fluorescentes grâce à l'avancée des technologies surtout dans le domaine des caméras proches de l'infrarouge.

Différentes publications internationales ont montré l'intérêt de l'utilisation de l'ICG pour la détection du ganglion sentinelle, dans la chirurgie hépatique des tumeurs de type hépatocarcinome et des métastases hépatiques d'origine colorectale. L'ICG présente une affinité pour les tissus tumoraux et péri-tumoraux liée à des caractéristiques histologiques micro-vasculaires permettant un dépôt localisé et spécifique (effet EPR = Enhance Permeability and Retention).

La détection des dépôts d'ICG est possible aujourd'hui grâce à l'utilisation d'appareils d'imagerie en fluorescence proche de l'infrarouge qui permettent de visualiser la fluorescence dans un spectre compris entre 700 et 850 nm, pour des objets de dimensions supérieures à 0.15 mm. Grâce à cette caractéristique, la localisation de la carcinose péritonéale à l'aide d'une sonde NIR lors d'une chirurgie de résection pourrait être grandement facilitée.

## 6.1 Adaptation de la caméra NIR au bloc opératoire et amélioration de la détection des métastases hépatiques

Lors de l'année de mobilité à l'Institut Albert Bonniot (INSERM/UJF U823) dans l'équipe de JL COLL, nous avons mis au point la caméra NIR sur un modèle murin. Nous avons réalisé des essais précliniques sur un modèle de carcinose péritonéale chez la souris (Fig. 15). Ces essais montrent que le chirurgien détecte et enlève 2 fois plus de métastases lorsqu'il opère assisté par l'infrarouge et ce avec un temps divisé par 2.

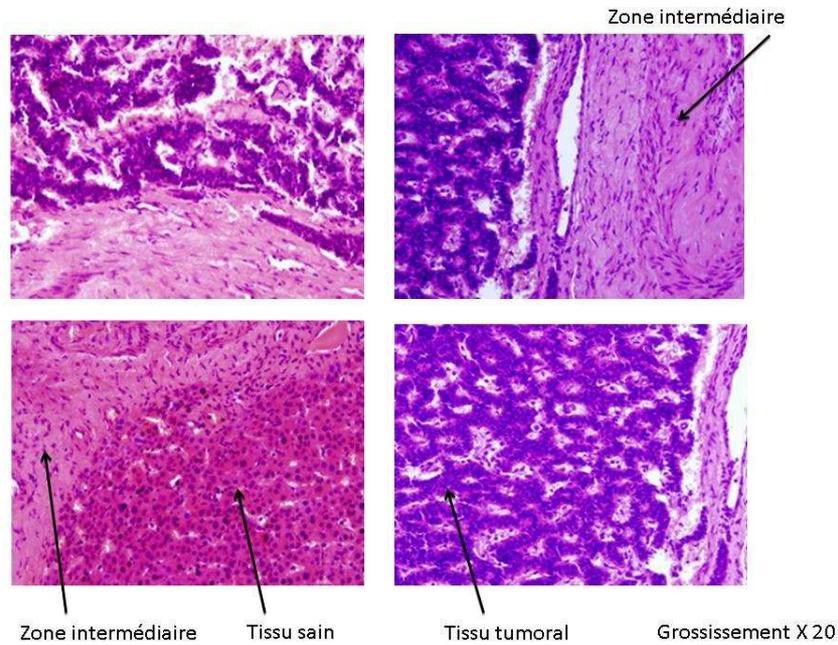


**Fig. 15.** Dissection anatomique de souris (estomac, intestin grêle et colon) lors des essais de fluorescence (JL COLL, Institut Albert Bonniot).

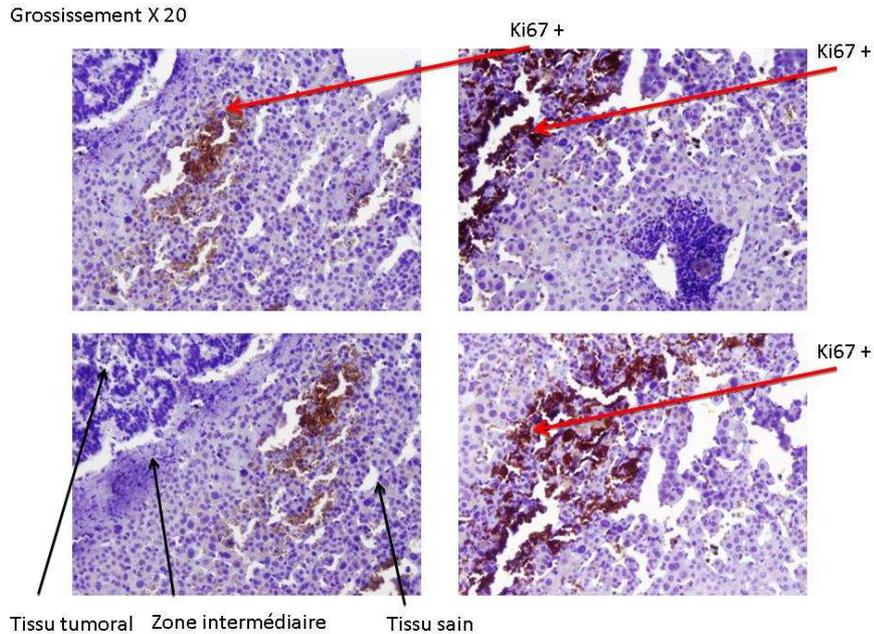
Nous avons pratiqués des examens microscopiques (Fig. 16 et Fig. 17) sur du tissu hépatique tumoral prélevé chez des patients ayant reçu une injection de ICG comme test de la fonction hépatique avant résection majeure.

L'analyse microscopique des pièces chirurgicales nous a permis de comprendre les raisons anatomiques et microscopiques de l'accumulation de l'ICG

en périphérie des métastases hépatiques. Cette couronne fluorescente a été décrite comme « rim fluorescent type » par Ishizawa et al. [104]. Ceci nous a permis d'optimiser la qualité de la caméra et de nos protocoles avant l'utilisation en clinique.



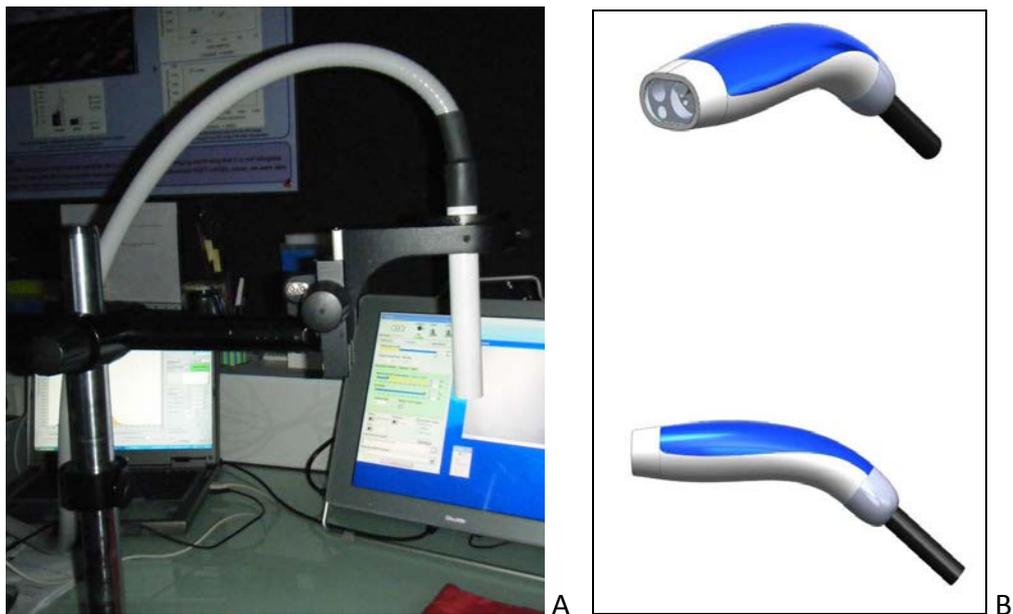
**Fig. 16.** Examen microscopique (20X) après coloration à l'hématoxyline-éosine de tissus humains (foie avec lésion tumorale type métastase hépatique d'origine colorectal). Analyse structurale de la zone intermédiaire origine de la couronne fluorescente et de l'accumulation de l'ICG (image G.BARABINO, M. KERAMIDAS, JL COLL).



**Fig. 17.** Examen microscopique (20X) après coloration à l'hématoxyline-éosine et Ki67 de tissus humains (foie avec lésion tumorale type métastase hépatique d'origine colorectal). Analyse du grade de prolifération cellulaire de la zone intermédiaire, origine de la couronne fluorescente et de l'accumulation de l'ICG (image G.BARABINO, M. KERAMIDAS, JL COLL).

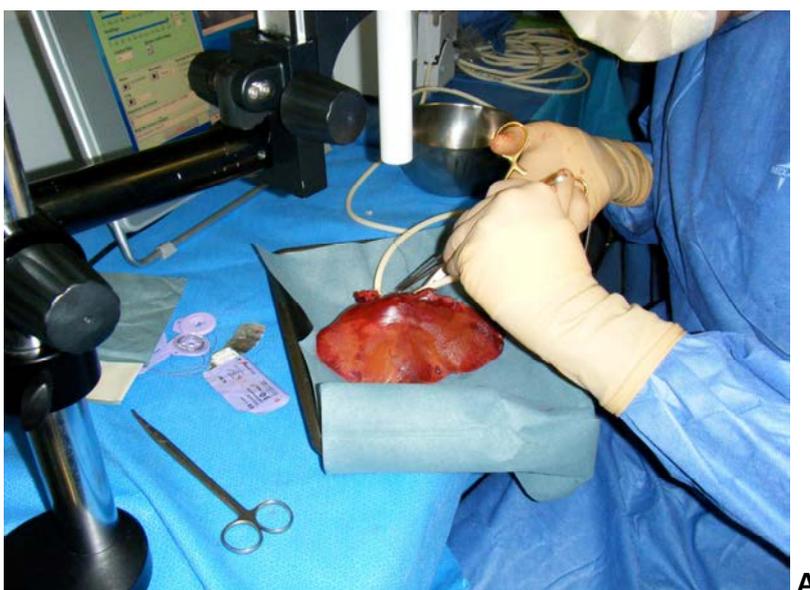
Cette zone anatomique « intermédiaire » entre le tissu tumoral et le tissu sain présente des modifications morphologiques avec des signes de compression, une déstructuration vasculaire et biliaire qui peut expliquer l'extravasation et l'accumulation de l'ICG. Dans le même temps, nous retrouvons une prolifération de cellules stromales spécifique d'un environnement peritumorale [110,111].

En parallèle avec la start-up FLUOPTICS et le CEA de Grenoble, nous avons mis au point la caméra NIR Fluostick™ (Fig. 18), une évolution de l'appareil Fluobeam™. La possibilité de travailler avec les ingénieurs qui ont développé l'instrument, nous a permis d'acquérir une connaissance du matériel que nous avons utilisé lors de nos essais cliniques.



**Fig. 18.** A) Le premier prototype de Fluostick utilisé lors des essais murins. B) La maquette en 3D de la caméra de FLUOPTICS™ avant d'envisager la production finale. Cette maquette nous a permis de vérifier la maniabilité de l'outil pour un confort d'utilisation optimal par le chirurgien lors d'une utilisation au bloc opératoire (Images JL COLL - FLUOPTICS, Grenoble).

Nous avons démarré les essais cliniques sur les métastases hépatiques du cancer colorectal. Les premiers essais étaient sur des pièces d'hépatectomie « ex-vivo » avec perfusion isolé anatomique par la veine porte (Fig. 19 et 20).





**Fig. 19.** A) Sur une pièce de lobectomie hépatique gauche, canulation de la veine porte gauche afin de permettre la perfusion de ICG et l'analyse (B) avec un prototype de sonde NIR de FLUOPTICS comparée à la sonde standard FLUOBEAM (Image G. BARABINO, J. PORCHERON, JL. COLL).



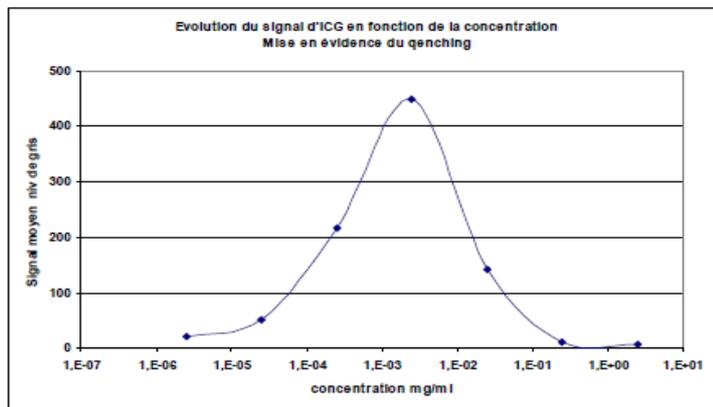
**Fig. 20.** Le prototype de la caméra NIR avec les premières images en temps réel fluorescentes au bloc opératoire lors de la perfusion d'ICG.

L'objectif de cette expérimentation était d'évaluer l'apport de l'imagerie de fluorescence NIR dans le repérage des tissus tumoraux hépatiques.

Dans un premier temps nous avons évalué les performances de la caméra NIR en fonction de la quantité de l'ICG, afin de pratiquer un échantillonnage de référence (Fig. 21).

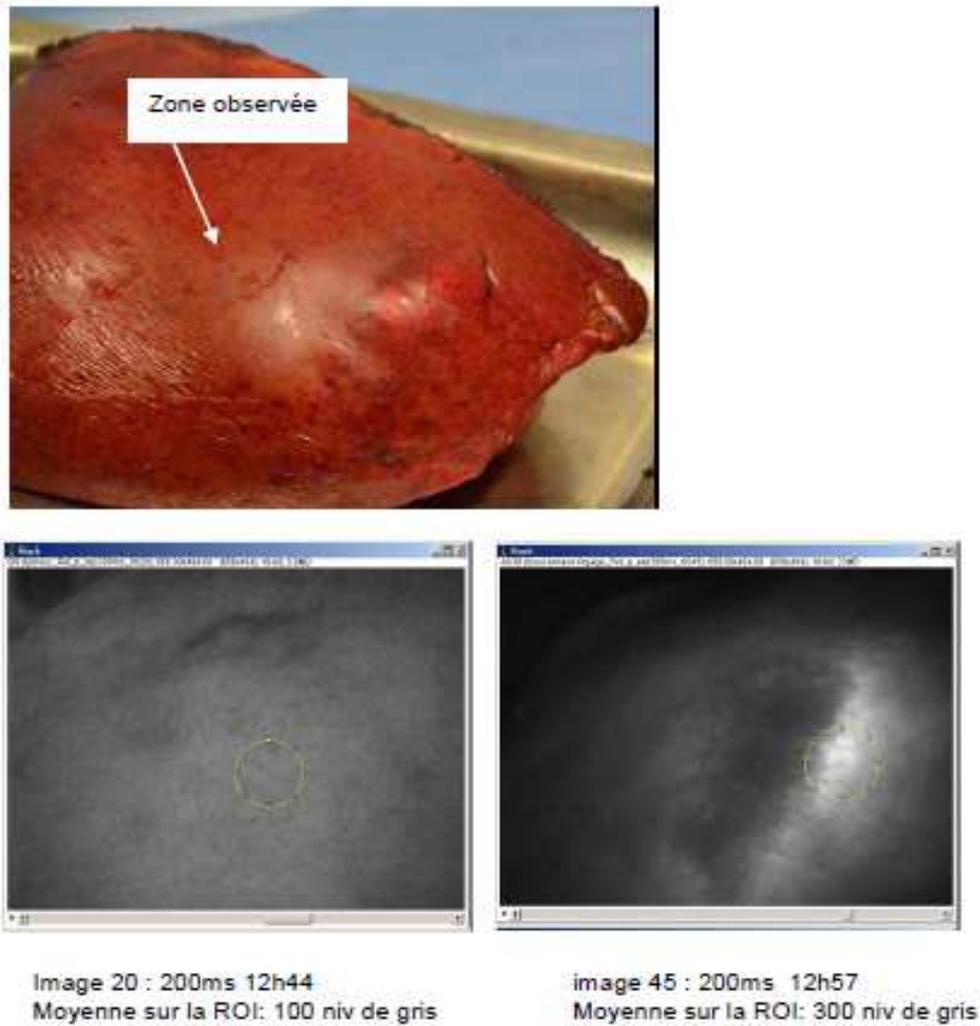
**Signal de l'ICG en fonction de la concentration.**

Mesure sur gouttes



**Fig. 21.** Signal de fluorescence de l'ICG (gouttes) en fonction de la concentration (analyse G. BARABINO, M. BERGER, JG. COTARD, JL. COLL).

Après perfusion hépatique par l'ICG, avec la caméra NIR nous avons observé à différents temps les tissus afin de définir les caractéristiques de la lésion et son comportement vis-à-vis de l'ICG. Une phase de rinçage nous a permis aussi d'apprécier la couronne fluorescente bien présente autour de la métastase hépatique (Fig. 22, 23, 24,25).



L'image 20 a été acquise avant l'étape de rinçage  
L'image 45 a été acquise 13 mn plus tard en fin de rinçage

Le rinçage semble avoir un effet sur le signal d'autofluorescence de la tumeur.

Sur la première série d'images le signal est x8  
Sur la seconde série d'image, le signal est x3

**Fig. 22.** Images de la lésion hépatique en autofluorescence et après injection d'ICG. La couronne de fluorescence est visible à la surface du foie (analyse G. BARABINO, M. BERGER, JG. COTARD, JL. COLL).

**Injection de l'eau glucosée 5%/ICG 2.5mg/500ml soit  $5 \cdot 10^{-3}$  mg/ml.**



Image 52 lumière blanche



Image 53 : 50ms 13h02

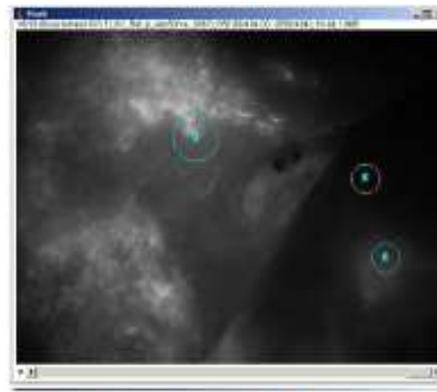
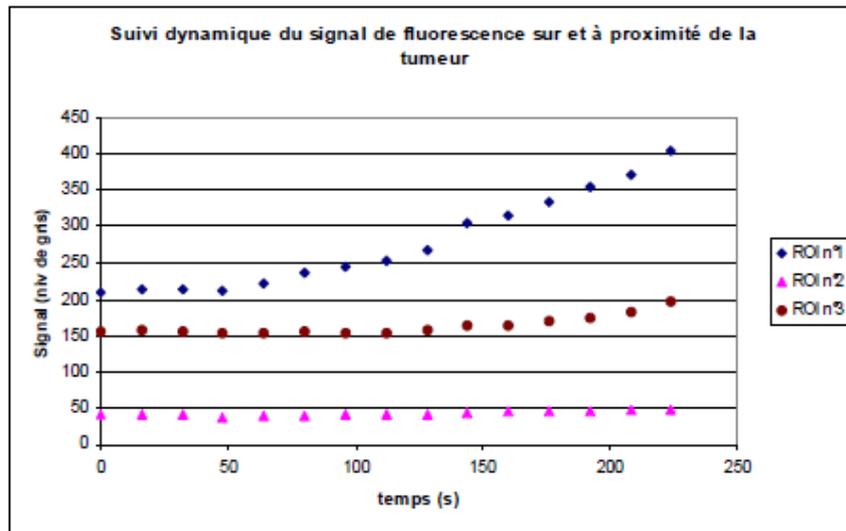


image 67 : 50ms 13h08



Image 52+67 superposées, fluo en fausse couleur

**Fig. 23.** Après rinçage, la fluorescence persiste et elle devienne plus évidente grâce au différentiel entre le fond (noir) et les zones avec l'ICG (diminution du bruit de fond) (analyse G. BARABINO, M. BERGER, JG. COTARD, JL. COLL).



En 4 minutes le signal de la tumeur principale (n° 1) double, la dynamique est plus lente sur la zone n°3, le fond reste constant (n°2)

### Second rinçage.

La même zone a été observée pendant les 4 premières minutes du rinçage (images 130 à 166) Nous n'observons pas de décroissance de la fluorescence.

Fig. 24. Suivi dynamique de l'intensité de la fluorescence dans la couronne peritumorale en fonction du temps d'injection et du rinçage (analyse G. BARABINO, M. BERGER, JG. COTARD, JL. COLL).

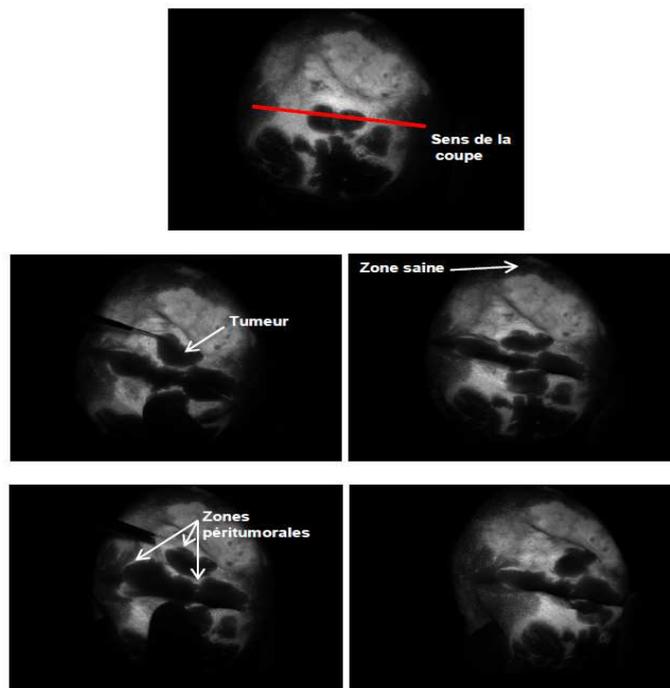


Fig. 25. Images de l'essai sur pièce ex-vivo après ouverture de la lésion tumorale (analyse G. BARABINO, M. BERGER, JG. COTARD, JL. COLL).

Les études scientifiques menées jusqu'à ce jour ne se sont intéressés qu'à l'utilisation de l'ICG et de sondes NIR pour la détection des lésions métastatiques à la surface du foie et pour le repérage des segments hépatiques grâce à la fluorescence des voies biliaires.

Notre idée était d'améliorer la pratique clinique par une amplification de la vision chirurgicale.

Après l'injection de l'ICG, les métastases hépatiques présentent une couronne de fluorescence de 1 à 2 mm. Au cours de la résection hépatique, cette couronne de fluorescence est détectée par la caméra NIR. Cette nouvelle marge fluorescente nous permet d'élargir la résection hépatique pour éviter les résections R1 dans certaines hépatectomies complexes. D'autre part, grâce à cette fluorescence, sur la tranche de section nous pouvons découvrir de nouvelles lésions non mises en évidence par les examens radiologique pré ou peri-opératoires (Fig. 26).

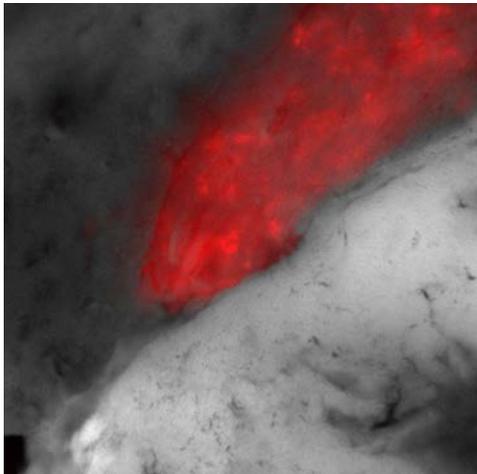


**Fig. 26.** Images de l'essai sur pièce ex-vivo d'une métastase hépatique d'origine colorectale au niveau du segment VIII. Les zones tumorales qui affleurent à la surface du foie sont en noir. Le patient avait reçu l'injection d'ICG 24h avant la chirurgie (analyse G. BARABINO, M. BERGER, JG. COTARD, JL. COLL).

Des prélèvements macroscopiques sur pièce étaient analysés avec la sonde NIR (Fig. 27) et ensuite au laboratoire de l'équipe de JL COLL à l'aide du « Macrofluor » (Fig. 28) avec une confirmation de la couronne de fluorescence peritumorale.

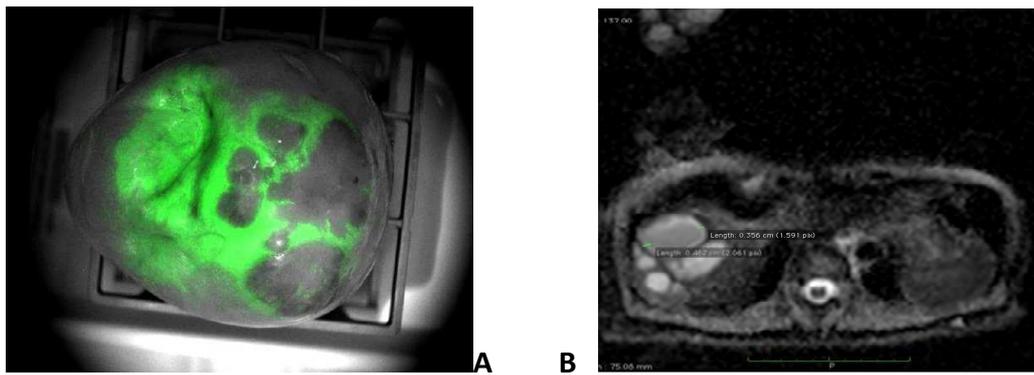


**Fig. 27.** Biopsie macroscopique de l'essai sur pièce ex-vivo d'une métastase hépatique d'origine colorectale au niveau du segment VIII avec mise en évidence de la « rim fluorescence » avec la sonde NIR. Le patient avait reçu l'injection d'ICG 24h avant la chirurgie (analyse G. BARABINO, M. BERGER, JG. COTARD, JL. COLL).



**Fig. 28.** Image au Macrofluor 700nm de la biopsie précédente (analyse G. BARABINO, JL. COLL).

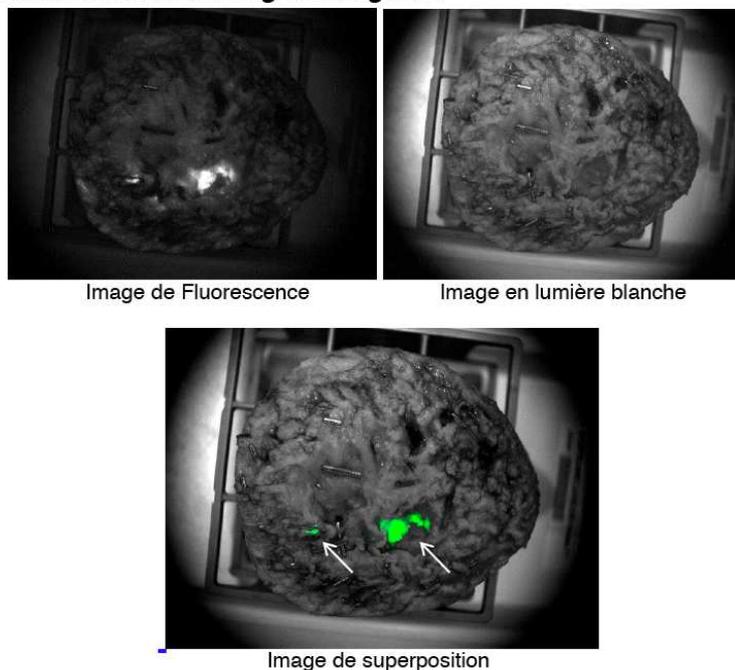
Lors de cet essai, nous avons aussi mis en évidence le rapport étroit entre la distribution de l'ICG au niveau du foie et les images de IRM en diffusion et vasculaires (Fig. 29).



**Fig. 29.** Image en fluorescence en superposition (A) d'une métastase hépatique du segment VII – VIII comparée à l'image pré-opératoire de l'IRM avec séquence de diffusion b800 (B).

L'élément plus important de cet essai sur le foie, a été l'utilisation de la fluorescence de l'ICG pour améliorer les marges de résection. Grâce à cette couronne de fluorescence au niveau du tissu péri-tumorale, le chirurgien avec la caméra NIR peut modifier sa tranche de résection et ses marges lors d'une hépatectomie (Fig. 30).

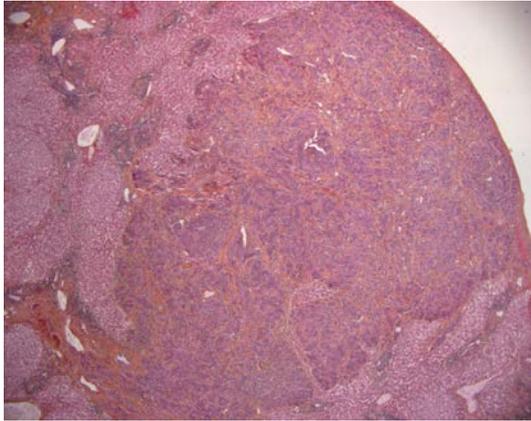
**Observation de la marge chirurgicale.**



On observe deux zones fluorescentes sur la marge chirurgicale (flèches).

**Fig. 30.** Images en fluorescence de la marge chirurgicale avec des zones de tissu positif et fluorescent. L'analyse microscopique a confirmé une résection complète mais avec des marges R1.

Cette démonstration a été confirmée ensuite avec l'analyse microscopique des zones fluorescentes avec découverte d'une marge de résection R1 (Fig. 31).



**Fig. 31.** Image prise en microscopie optique (10X) après coloration à l'hématoxyline-éosine au niveau de la zone de fluorescence sur la tranche de résection hépatique.

En conclusion, l'utilisation de l'ICG associée aux nouvelles caméras NIR nous permet de proposer une technique innovante capable d'augmenter le pourcentage de résections R0 lors d'hépatectomies complexes.

## 6.2 Démonstration de faisabilité sur la carcinose péritonéale

Nous avons appliqué cette technique « association ICG – caméra infra rouge » dans la carcinose péritonéale d'origine colorectale. Cette maladie, comme nous l'avons déjà décrite dans les chapitres précédents, considérée incurable jusque dans les années 90 est devenue une maladie métastatique au même titre que la localisation métastatique hépatique. Malgré les améliorations chirurgicales comme les péritonectomies et les chimiothérapies, la carcinose péritonéale reste une maladie agressive nécessitant une résection chirurgicale la plus complète

possible. En per-opératoire, le chirurgien rencontre de nombreuses difficultés ; en premier lieu, il doit “retrouver” toutes les lésions cancéreuses, y compris celles millimétriques, avec une exploration de toute la cavité abdominale. La surface du péritoine étant supérieure à 2 m<sup>2</sup>, la tâche s’avère difficile. D’autant plus, qu’il peut s’y associer des localisations tumorales intra-péritonéales “inextirpables” empêchant une résection anatomique complète.

Devant une carcinose péritonéale, le chirurgien doit actuellement respecter 2 principes carcinologiques :

- La nécessité de réséquer le plus possible de masse tumorale (complètement ou avec une quantité résiduelle inférieure à 2 mm de diamètre) **[112]**.
- Ne pas pratiquer de chirurgie de résection en cas d’une maladie extrêmement répandue (score PCI supérieure à 14-16) pour le risque trop important de récurrence **[112]**.

Finalement ces deux principes reviennent sur le concept de résection complète de la maladie afin de permettre une survie sans récurrence de la maladie.

Notre idée était de répondre à la question suivante: y-a-t-il un intérêt à utiliser le vert d’Indocyanine dans la carcinose péritonéale?

Pour répondre à cette question nous avons validé une étude régionale CHU Promoteur monocentrique en aveugle évaluant la détection ex-vivo des cellules cancéreuses sous fluorescence (sonde NIR) comparativement à l’analyse anatomopathologique chez des patients opérés pour une carcinose péritonéale d’origine colorectale, après injection systémique de 0,25 mg/Kg d’ICG 24h avant l’intervention chirurgicale.

Le protocole a été validé par le CPP régional (n 130024A-2012). Initialement, afin d’obtenir la spécificité de la procédure, notre protocole devait inclure des péritonectomies de quelques centimètres carrés au pourtour des lésions de carcinose macroscopiquement visible; du fait qu’il s’agissait d’une toute nouvelle technique nous n’avons pas eu l’accord de modification du geste chirurgical par le CPP et la DRCI.

L'essai a été enregistré sur [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov) (NCT 01982227). L'inclusion des patients a débuté en Avril 2013 et elle s'est terminée en septembre 2014.

L'étude proposée ici est une étude pilote de faisabilité et tolérance pour laquelle le taux d'échec de l'ensemble de la procédure évaluée par le critère de jugement principal n'est pas connu. Il n'est donc pas possible d'effectuer à priori un calcul d'effectif. Nous avons alors décidé de mener notre étude sur un effectif de 10 patients.

La sélection des patients a été réalisée lors des consultations spécialisées de chirurgie et/ou d'oncologie digestive. Les noms et coordonnées des personnes intéressées pour participer à l'étude ont été recueillis. Ces personnes ont ensuite été contactées par téléphone ou vu lors de la première consultation par l'assistant de recherche clinique afin de leur donner les informations principales et de vérifier à priori la présence des critères d'inclusion et l'absence de critères d'exclusion. Les lettres d'information et les formulaires de consentement leur ont été envoyés par courrier ou remis en main propre lors de la première consultation. Un délai de réflexion de deux semaines leur a été laissé pour décider si elles souhaitent participer ou non à l'étude. Si elles acceptaient d'y participer suite au contact téléphonique, elles contactaient le secrétariat du service de chirurgie pour fixer un rendez-vous pour la visite d'inclusion, ou si elles acceptaient dès la première consultation, la personne était incluse d'emblée.

Les critères d'inclusion étaient:

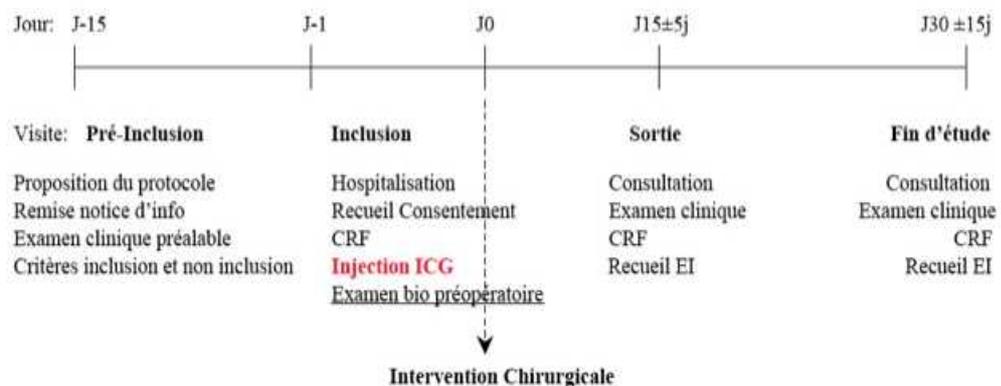
- Patient affilié ou ayant droit à un régime de sécurité sociale
- Patient porteur d'un cancer colorectal évolutif au niveau intra-abdominal qui nécessite une chirurgie de résection +/- CHIP
- Agé de 18 ans à 70 ans inclus
- Absence de contre-indication opératoire
- Signature du formulaire d'information et de consentement par le patient ou, s'il est sous tutelle, par les parents ou le tuteur

Les critères d'exclusion étaient:

- Age inférieur à 18 ans ou supérieur à 70 ans
- Femme enceinte ; un test de grossesse urinaire ou sanguin sera réalisé dans les 72h avant l'intervention chirurgicale
- Contre-indication à la chirurgie
- Diagnostic non confirmé d'adénocarcinome colorectal
- Personnes majeures faisant l'objet de protection légale ou hors d'état d'exprimer leur consentement

Le patient rentrait dans le service de chirurgie digestive et oncologique (Pr. J. Porcheron, Bâtiment C, 4<sup>ème</sup> étage, CHU Saint Etienne) 24h avant l'heure prévue de la chirurgie. L'équipe soignante prenait en charge les examens biologiques préopératoires avec pose d'une voie veineuse périphérique et injectait la quantité prévue d'ICG (0.25 mg/Kg) en présence d'un médecin (chirurgien et/ou anesthésiste) (Fig. 32).

La lettre d'information et le formulaire de consentement était remplis et signés par le chirurgien et le patient à son entrée dans le service.



Abréviation : CRF = remplissage du cahier d'observation ("Case Report Form")

**Fig. 32.** Schéma du protocole patient de la pré-inclusion jusqu'à la fin d'étude.

Le lendemain, au bloc opératoire, après ouverture de la cavité abdominale mais avant le geste chirurgical de résection, un membre de l'équipe non impliqué directement dans la résection chirurgicale a réalisé des photos de la cavité

abdominale avec la sonde Fluostick™ pour l'évaluation du score PCI sous fluorescence (Fig. 33 et 34).



**Fig. 33.** Exploration chirurgicale de la cavité abdominale afin d'évaluer le score PCI chirurgicale (Images Bloc opératoire G. BARABINO – J. PORCHERON).



**Fig. 34.** Exploration à l'aide de la sonde NIR de la cavité abdominale afin d'évaluer le score PCI

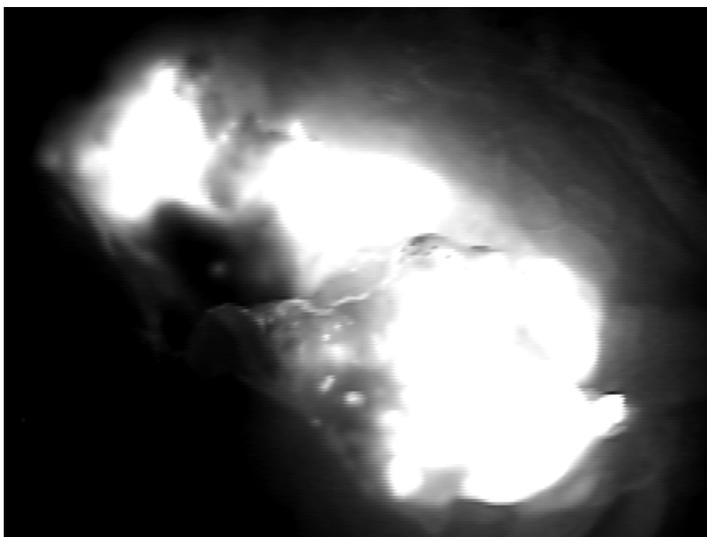
fluorescent pré résection chirurgicale (Images Bloc opératoire G. BARABINO – J. PORCHERON).

Chaque région abdominale était photographiée quatre fois pour couvrir convenablement la zone d'intérêt. D'autre part, le chirurgien établissait le score PCI macroscopiquement comme il est fait habituellement. La même procédure a été pratiquée une fois la chirurgie de résection terminée, sans et avec la sonde NIR. Les données de PCI sous fluorescence n'étaient pas communiquées au chirurgien opérateur.

Les pièces de résection ont été analysées « *ex-vivo* » au bloc opératoire à l'aide de la sonde NIR avec prise de photos, avant d'être envoyées pour l'examen anatomo-pathologique définitif (Fig. 35 et 36).

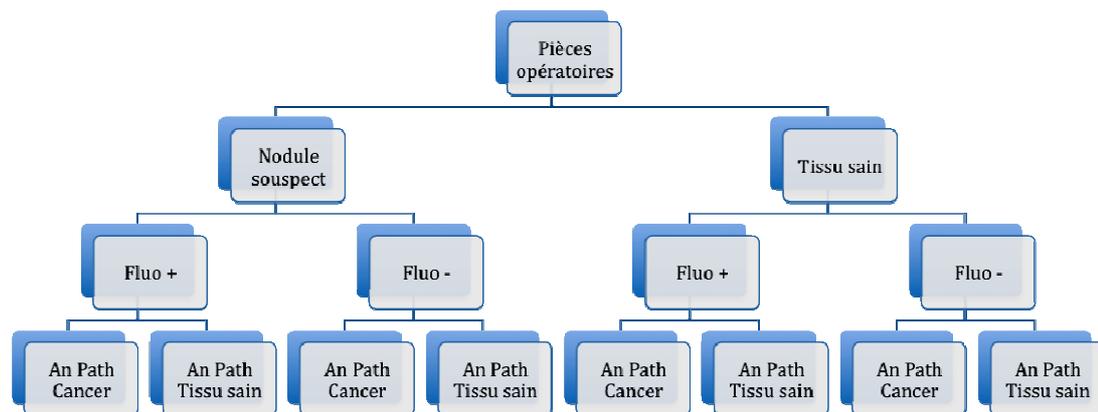


**Fig. 35.** Nodule de carcinose péritonéale d'origine colorectale en vision optique au niveau du grand épiploon (Images Bloc opératoire G. BARABINO – J. PORCHERON).



**Fig. 36.** Le même nodule de carcinose péritonéale d'origine colorectale en vision fluorescente au niveau du grand épiploon (Images bloc opératoire G. BARABINO – J. PORCHERON).

Les pièces de résections ont été classées en suspectes ou saines (macroscopiquement), puis fluorescentes ou non à l'observation par sonde NIR, puis en lésions tumorales ou non à l'examen anatomo-pathologique (Fig. 37).



**Fig. 37.** Schémas du protocole qui a été utilisé pour l'analyse des pièces « ex-vivo ».

Le suivi a comporté une visite avant la sortie de l'hôpital pour évaluer les éventuels effets secondaires liés à l'injection de l'ICG et à la chirurgie, et une visite post-opératoire 1 mois après la chirurgie, pour recueil des éventuels effets secondaires à distance de la chirurgie.

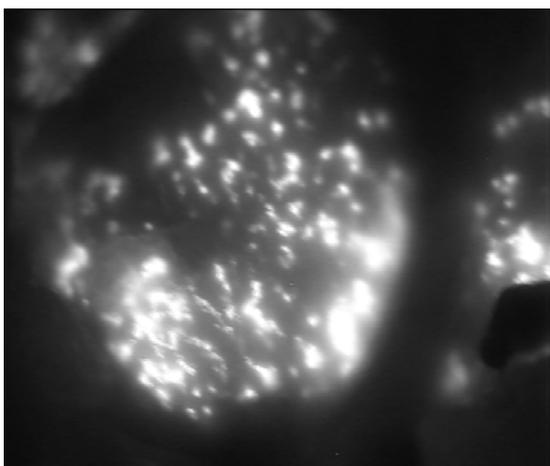
La durée de participation à l'étude pour chaque patient était d'environ 2 mois.

Au cours de ce travail, nous avons voulu comprendre le mode de diffusion (effet EPR) de l'ICG dans les ilots tumoraux. La question était de savoir si les traitements néo-adjuvants préopératoires pouvaient influencer cet effet EPR. Au cours des essais, notre attention a été attiré par la perte de la sensibilité de détection de la fluorescence chez les patients ayant reçu un traitement par Bevacizumab Cet anticorps monoclonal dirigé contre le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) diminue la néo-vascularisation tumoral.

Nous avons réalisé une analyse en sous-groupe de patients avec et sans traitement par Bevacizumab. La sensibilité de la fluorescence pour la carcinose péritonéale était supérieure dans le group sans Bevacizumab comparé à celui avec, respectivement 76.3% et 65%. Le taux de faux négatifs était plus important dans le groupe avec Bevacizumab (53.8% versus 42.9%). Ces résultats, non statistiquement significatifs, donnent une « tendance » dans le sens de notre hypothèse qui nous incite à poursuivre cette recherche.

Cette étude a mis en évidence plusieurs éléments :

- L'ICG montre une bonne sensibilité (75%) aux lésions tumorales péritonéales d'origine colorectale, même si les tumeurs sont de petite taille (Fig.38);



**Fig. 38.** Forme miliaire de carcinose péritonéale d'origine colorectale en vision fluorescente au niveau de la coupole diaphragmatique droite : chaque point lumineux correspond à des lésions d'alentour 1-2 mm de diamètre (Images bloc opératoire G. BARABINO – J. PORCHERON).

- Le fait d'avoir un nombre important de pièces opératoires de diamètre différent (souvent supérieurs à 2 cm de diamètre), peut expliquer l'insuffisante spécificité de la procédure (60%). Nous avons envoyé en anatomo-pathologie ces pièces en aveugle par apport aux points fluorescents. Ces pièces de plus de deux centimètres de diamètre en moyenne, ont été sectionnées en une seule coupe par les anatomo-pathologistes après vision macroscopique. Cette unique tranche

de section n'a probablement pas intéressé les petites zones de fluorescence satellites. La sonde NIR détectant des lésions inférieures à 2 mm, il est fort probable que des pièces définies négatives pouvaient, en réalité, présenter des îlots tumoraux non inclus dans la tranche de section. Il s'agit d'un biais qui nous a été imposé par le CPP lors de la validation de l'étude afin de permettre une analyse en aveugle. Nous n'avons pas pu répondre à cette question, car nous n'avons pas à Saint Etienne un accès facile au microscope confocale qui aurait permis une analyse des pièces ex-vivo en NIR. Nous aurions dû marquer sur chaque pièce tous les points fluorescents et réaliser un examen anatomopathologique, ce qui était hors protocole.

- La capacité de l'ICG de détecter une tumeur se base comme nous avons vu sur l'effet EPR: toutes les chimiothérapies qui agissent sur la néo-vascularisation (comme le Bevacizumab) des tumeurs modifient la capacité de l'ICG de se fixer dans les tissus extracellulaires des tumeurs.
- L'étude a pu terminer sans complications ou réactions adverses pour les patients, avec des résultats de faisabilité très satisfaisants.

Trois publications scientifiques lors de ma thèse de science ont été soumises dans des revues internationales.

## **Article : Improving Surgical Resection of Metastatic Liver Tumours with Near Infra-Red Optical-Guided Fluorescence Imaging**

Gabriele Barabino<sup>1,2,3</sup>, Jack Porcheron<sup>2</sup>, Michèle Cottier<sup>1</sup>, Muriel Cuilleron<sup>4</sup>, Jean-Guillaume Coutard<sup>5</sup>, Michel Berger<sup>5</sup>, Serge Molliex<sup>6</sup>, Brigitte Beauchesne<sup>6</sup>, Jean Marc Phelip<sup>1</sup>, Alexei Grichine<sup>3</sup> and Jean-Luc Coll<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Université Jean Monnet 42023 Saint Etienne, France – LINA EA 4624

<sup>2</sup> Oncological and Digestive Surgery, Saint Etienne University Hospital, 42000 Saint Etienne, France

<sup>3</sup>INSERM-UJF U823, Institut Albert Bonniot, 38706 Grenoble, France

<sup>4</sup>Radiology Department, Saint Etienne University Hospital, 42000 Saint Etienne, France

<sup>5</sup>CEA, LETI, MINATEC CAMPUS, 17 rue des martyrs 38054 Grenoble cedex 9, France

<sup>6</sup>Anaesthesiology Department, Saint Etienne University Hospital, 42000 Saint Etienne, France

Corresponding Author:

Gabriele Barabino MD, PhD

Oncological and Digestive Surgery, Saint Etienne University Hospital, 42000 Saint Etienne, France

g.barabino77@gmail.com

+33.(0)6.89.41.23.29

## **ABSTRACT**

**Objective:** The aim of this study was to investigate the feasibility and the future clinical applications of liver surgery of metastatic cancer guided by Near Infra-Red (NIR) fluorescence to improve margin resection.

**Summary Background Data:** A subset of select patients with metastatic hepatic tumours can be cured by surgery. The limit to long-term and disease free survival is related to the quality of surgery with a resection defined “R0” (complete removal of all tumor with microscopic examination of margins without tumor cells). Although intraoperative ultrasonography can evaluate the surgical margins, surgeons need a new tool to perfect the surgical outcome.

**Methods:** A preliminary study was performed on three patients. We used NIR imaging post-operatively “ex-vivo” on the resected liver tissue. Liver tumours were labelled by a preoperatively patient’s intravenous injection of Indocyanine Green (ICG), a near infra-red fluorescent agent (24h before surgery, 0.25mg/kg i.v.). Fluorescent images were obtained by a miniaturized fluorescence imaging system (FluoStic®, FLUOPTICS, Grenoble, France).

**Results:** After liver resection, the three surgical specimens were sliced into 10mm sections in the operating room and analysed with the FluoStic®. All metastatic tumors presented rim-type fluorescence. Two specimens were not a complete rim-fluorescence. The pathologist confirmed the R1 margins (microscopic residual resection) although ultrasonographic analysis seemed to be R0.

**Conclusions:** Surgical liver resection guided by Near Infra-Red fluorescence after really helps to detect potential uncertain anatomic areas that are missed by preoperative imaging and ultrasonography during surgery. These preliminary results have to be confirmed through a larger prospective patient series.

## **INTRODUCTION**

Liver surgical resection, if feasible, results in a survival benefit for patients with metastatic hepatic tumours (from colorectal or neuroendocrine carcinoma)<sup>1</sup>. Long-term outcome is directly linked to the complete removal of all tumours with a microscopic examination of the margins showing no tumour cells (definition of “R0” surgical resection).

Pre-operative contrast CT<sup>2</sup> (computed tomography), MRI<sup>3</sup> (magnetic resonance imaging) are currently used for diagnosis and the guidance of resection. However, translating these images to the operation field is extremely difficult for oncological surgeons. Visual appearance, palpation and intraoperative ultrasonography<sup>4</sup> are the only available characteristics for discriminating between tumour and normal tissue and consequently for determining the adequate tumour-free margin during surgery.

The development of near-infrared (NIR) imaging devices and fluorophores has led to a revolution in optical imaging<sup>5</sup> and surgical oncology. Only one NIR probe, Indocyanine Green (ICG) has been approved. It is a water-soluble anionic probe with excitation and emission wavelengths in serum at 778 and 830 nm respectively<sup>6</sup>. ICG is normally used for the measurement of hepatic function<sup>7</sup>.

Following intravenous injection, ICG binds to plasma proteins and is rapidly taken up and eliminated from the bloodstream (half-life 3-4 min)<sup>8,9</sup>. It is secreted unmetabolised into the bile and will not bind to normal liver tissue<sup>10</sup>. However, in pathological situations such as cancer, ICG immediately leaks out of the bloodstream and binds almost irreversibly to the periphery of the leaky blood vessels<sup>11</sup>. Three major domains where NIR-guided ICG fluorophores have appeared most promising are: sentinel lymph node detection in different cancer, evaluation of lymphedema and assessment of microvascular circulation of free flaps in reconstructive surgery<sup>12</sup>. The application in intra-operative image-guided hepatic surgery as described for the identification of cancerous liver lesions<sup>11,13,14</sup>.

The liver metastasis could be identified by fluorescence imaging through

visualization of the ICG that is retained in the surrounding liver tissues after preoperative intravenous injection. We speculated that this novel methodology for use of an NIR-guided system with ICG could be safely applied to determine the border between normal and malignant liver tissues during hepatic resection as an intraoperative imaging technique.

## **METHODS**

### ***Patients***

This study was prospectively designed and approved by the Institutional Ethics Review Board of the University of Saint Etienne Hospital (France). Three patients were treated between February 2012 and June 2012 (Table 1). Preoperatively, informed consent was obtained from the patients. The inclusion criteria were a histopathological diagnosis of metastatic hepatic cancer with liver tumour staging performed with contrast agent-enhanced CT and conventional diffusion-weighted MRI with arterial contrast enhancement. The exclusion criteria comprised previous operations and/or radiation, a definite liver tumour diagnosed preoperatively, pregnancy, and age less than 18 years.

Patients #1 and #2 underwent an operation for liver metastasis of an endocrine tumour and a primary meningioma, respectively, while patient #3 had liver metastasis from colon cancer.

All patients received 0.25 mg/Kg ICG intravenously as fluorescence source 24 h before liver surgery. Preoperative liver function test was performed (ICG retention rate at 15 min, ICGR15)<sup>12</sup>. Liver tumour resection was performed according to the current oncological guidelines. During surgery, the liver was evaluated by visual inspection, manual palpation, and intraoperative ultrasonography.

After the resection, the surgical specimens were sliced into approximately 10-mm sections in the operating room. All of the cut surfaces were investigated using NIR fluorescence imaging system. Any fluorescent tissues larger than 5 mm in diameter

were marked with needles in order to be examined by pathologists.

### ***Near-Infrared Imaging Fluorescence System***

Fluorescent images of the liver metastasis were obtained by a commercially available fluorescence imaging system (FluoSTIC, FLUOPTICS, Grenoble, France)<sup>15</sup>. It is made of a miniature high-quality consumer-grade lipstick camera for collecting fluorescent light (CM-030GE-RH<sup>®</sup>, Jai, Denmark). The camera resolution is 656 x 494 pixels, with a 10-bit dynamic range and an exposure time adjustable from 32.5  $\mu$ s to 2 s. We used a Subminiature A (SMA)-coupled 500 mW, 740 nm laser diode from Power Technology (model #IQ1A<sup>®</sup>) as NIR light source and an SMA-coupled 7 mW cold (5600 K) white LED from Thorlabs (model #MCWHF1<sup>®</sup>). The filtration scheme of the FluoSTIC accommodates an excitation filter centred at 740 nm that excites ICG with 40% efficiency and an emission filter from 772 to 857 nm that collects most ICG-emitted photons. All filters were interference filters purchased from Chroma (Bellows Falls<sup>®</sup>, VT). A novel custom circular optical fibre array for illumination that combines both white light and NIR excitation has been developed<sup>12</sup>. The optical fibre illuminates a 40 mm x 30 mm field of view at a 126 mm working distance with 10 mW/cm<sup>2</sup> of NIR excitation light and 1000 lux of white light. The system resolution was measured to be 70  $\mu$ m, and the depth of field was 20 mm. Custom software was written in LabVIEW (National Instruments<sup>®</sup>, Austin, TX) and run on a Pentium 4 computer.

### ***Near-Infrared Confocal Microscopy***

For the microscopic examination of the ICG distribution in the tissue slices and just below the surface of the whole resected tissue pieces, we used a home-modified confocal and two-photon microscope (LSM 710 NLO<sup>®</sup>, Carl Zeiss) with the inverted Axio Observer stage and 40x/1.2 C-Apochromat water immersion objective (working distance 220  $\mu$ m). Indeed, the commercially available confocal microscopes lack excitation sources above 635 nm, while the optical detection path

of the conventional two-photon systems is tailored only for the visible spectral range. Here, we used the standard Ti:Sa laser (Ultra II Chameleon®, Coherent) tuned to 690 nm as the source of monophoton excitation, and we implemented the original “reverse” filter configuration in the confocal head of the LSM 710 with the specially designed long-pass LP700 dichroic beam splitter replacing the usual short-pass KP690 filter. The filter was installed in the MBS filter wheel of the In-Vis channel of the LSM 710, and detection in confocal mode was assured by the PMT2 of the QUASAR detector, which had a detection spectral range up to 758 nm.

The sensitivity for ICG was found to be satisfying due to the optimal excitation wavelength, the wide fluorescence emission spectrum of ICG that overlapped the detection range and the efficient cut-off of the parasite laser reflexions. No pronounced photo-bleaching effects were detected during image acquisition. The sequential confocal acquisition of tissue autofluorescence (488 nm excitation and 505-600 nm detection) and in some cases of cell nuclei (Hoechst labelled DNA, 405 nm excitation and 420-480 nm detection) allowed better identification of the cancerous and healthy tissue structures and demonstrated the intracellular cytoplasmic accumulation of ICG. The spectral cross-talk of autofluorescence in the ICG detection channel was negligible, and the control tissues without ICG produced no signal in this channel.

## **RESULTS**

Post-operative “ex-vivo” imaging observed that liver metastases as adenocarcinomas (ADKs) are not stained by ICG but that the surrounding parenchymal tissues directly in contact with the tumours are intensively labelled because of biliary excretion disorders in the surrounding noncancerous liver tissues that are compressed by the tumour (Fig. 1A-1B). This fluorescence pattern “rim-type” is in agreement with previously described results<sup>11</sup>.

In two patients, the margins of surgical specimens presented an area that was positively stained by ICG (Fig. 2). The pathologists, after a optical and NIR confocal

microscopy analysis, demonstrated that the fluorescence of ICG was retained in the cytoplasm and pseudoglands in the non-cancerous liver parenchyma surrounding the metastasis showing rim-type fluorescence (Fig. 3). Even after tumor removal, the lower level of fluorescence in the tumor as compared to liver parenchyma contributed to better resolution of the demarcation line between the tumor and normal parenchyma. The surgeon during surgical resection, depending on the detection of fluorescence with NIR caméra, could change its cut surface to move away from the tumor and have a complete surgical resection.

This indicates that intraoperative ultrasonography did not clearly delineate the tumour margins in these patients. Fluorescence imaging could have improved the surgical resection in this patient.

In patient #2, pre-operative radiological imaging indicated the presence of only one colorectal metastasis. Using fluorescence imaging, we again demonstrated that R0 resection was not obtained using intra-operative ultrasonography, similar to patient #1. Furthermore, an additional strong fluorescence signal was detected that indicated the presence of another unpredicted metastasis (Fig. 4).

## **DISCUSSION**

Real-time liver cancer identification using fluorescence probes currently represents one of the most active research fields. Originally, Ishizawa et al. developed fluorescence cholangiography using ICG during open surgery<sup>16</sup>, and then during laparoscopic surgery<sup>17</sup>. In 2009 they used ICG preoperatively in a routine liver test, after which a prototype ICG fluorescence imager was used to detect hepatocellular carcinoma intraoperatively during a hepatectomy<sup>11</sup>. Two clinical studies revealed that real-time ICG fluorescence imaging enabled the highly sensitive identification of small, grossly unidentifiable liver cancers<sup>11,18</sup>. Currently, navigation using indocyanine green fluorescence imaging is considered to be a promising tool for clinical exploration for hepatocellular carcinoma and for routine intraoperative imaging during hepatic resection to detect small cancers<sup>19</sup>.

The ICG-guided method was shown to combine the advantages of both the dye and radiocolloid methods and allowed real-time margin resection. If adequate imaging resolution can be achieved, intra-operative tumour visualisation may improve radical resection without causing unnecessary damage to healthy tissue and has the potential to more accurately assess tumour margins during surgery<sup>5</sup>.

Our study showed that the ICG in hepatic metastases (adenocarcinoma) accumulates with a rim-pattern. Using this fluorescence around the tumor, the surgeon during resection can move away from the tumor and allow for R0 surgical resection.

However, some drawbacks of this study remain. Only a limited number of cases were included in this study. Secondary, further study with a larger number of cases is needed to confirm whether the ICG rim-pattern accumulation is caused only by biliary congestion caused by tumor compression or whether it is also associated with hepatic microenvironmental changes due to cancer progression. Nevertheless, the method was shown to be feasible and safe, which justifies further analyses in larger series to definitively determine the potential of ICG-guided liver resection.

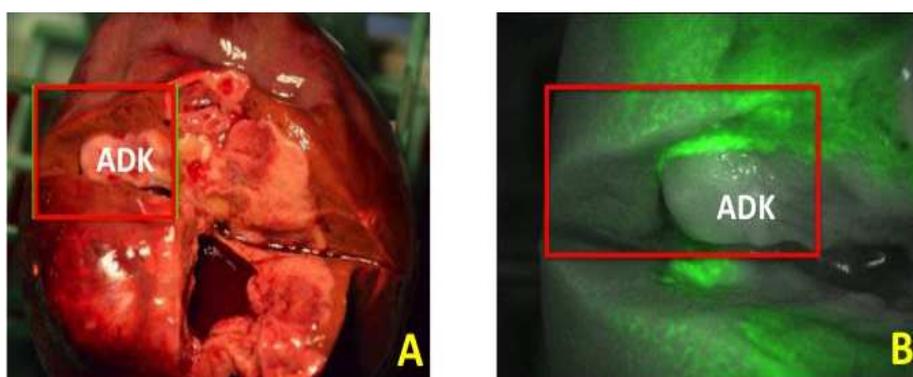
In conclusion, our results suggest that this combination of NIR camera and ICG staining is a safe and effective procedure for discrimination of the border between normal and malignant metastatic liver tissues during surgery. We believe that this system will ultimately contribute to improvements in liver surgery to achieve better oncological outcomes.

#### **CONFLICTS OF INTEREST**

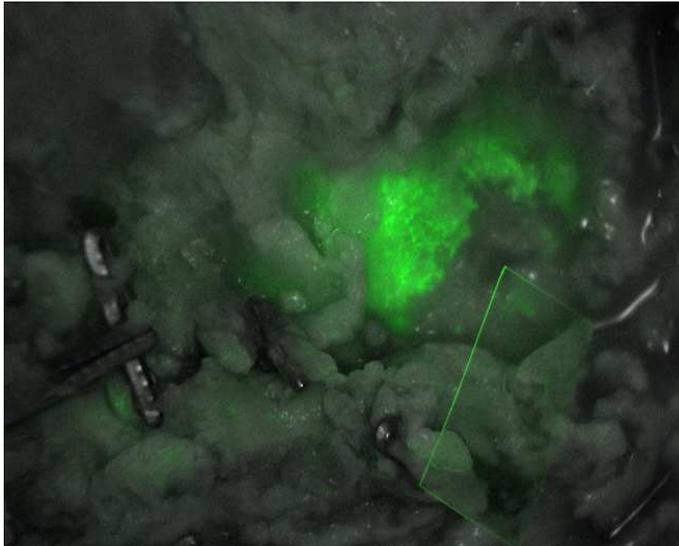
All authors have disclosed any financial and personal relationships with other people or organisations that could have inappropriately influenced (biased) their work.

**Table 1** Characteristics of the 3 patients

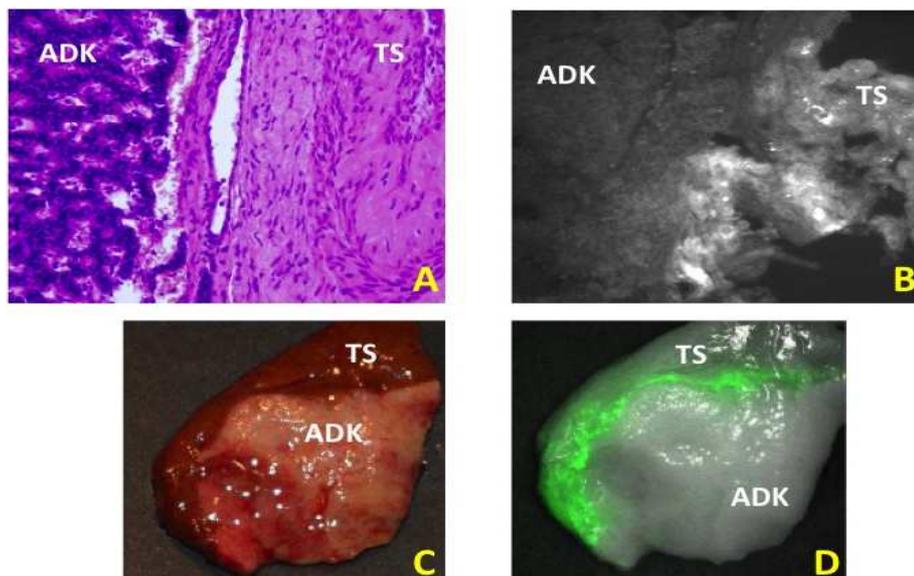
<i>Patient 1</i>	
Age	50 years
Gender	F
Hystology	Neuroendocrine metastasis
Localisation	VII – VIII liver segments
Preoperative chemotherapy	YES
<i>Patient 2</i>	
Age	75 years
Gender	F
Hystology	Meningioma metastasis
Localisation	V – VI liver segments
Preoperative chemotherapy	YES
<i>Patient 3</i>	
Age	60 years
Gender	M
Hystology	Colorectal adenocarcinoma metastasis
Localisation	IV liver segment
Preoperative chemotherapy	YES



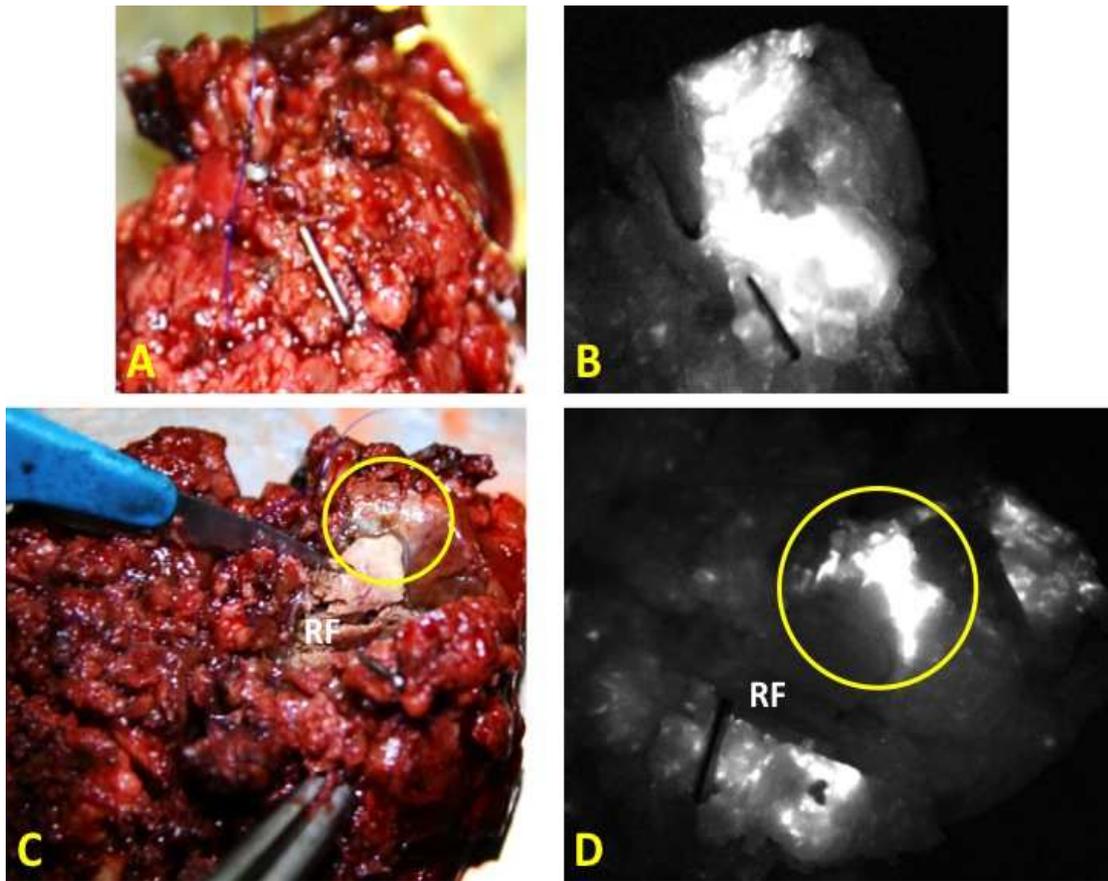
**Figure 1.** Clinical applications of ICG fluorescence imaging after liver resection. (A) “Ex-vivo” VII-VIII liver segments with necrotic and haemorrhagic endocrine metastasis (ADK). (B) “Ex-vivo” NIR fluorescence imaging (green) revealed a fluorescing rim around the tumour (ADK); this rim (2-5 mm) is present on the surrounding noncancerous liver tissues. The entire visible signal indicates the presence of a tumour underneath.



**Figure 2.** Clinical applications of ICG fluorescence imaging after liver resection. “Ex-vivo” endocrine liver metastasis (patient #1). The positive fluorescence signal (green) on the surgical margin corresponding at rim-pattern fluorescence.



**Figure 3.** Microscopic examinations. (A) Optical Microscopic examinations revealed a tumour (ADK) comprising poorly differentiated cancer cells with little cellular and structural atypia; in the right of the picture, the surrounding non-cancerous liver tissues (TS) are compressed by the tumour (H&E, originally 10x). (B) Near-infrared confocal microscopy confirmed the origin of the fluorescence in the surrounding non-cancerous liver tissue (TS) where the cellular density was increased as a result of compression by the tumour. (C) A cross-section of the resected liver specimen. Rim- pattern of the fluorescence imaging (D) in the normal tissue (TS) .



**Figure 4.** Clinical applications of ICG fluorescence imaging after liver resection. (A) NIR fluorescence imaging identified tumour tissue in the resected "ex-vivo" liver specimen of the colorectal liver metastasis. (B) The tumour tissue can be observed enclosing another and previously unexpected metastatic lesion. (C) NIR fluorescence imaging identified tumour recurrence on the resected colorectal liver metastasis that was previously treated with radiofrequency (RF) (D).

## REFERENCES

1. Choti MA, Sitzmann JV, Tiburi MF, et al. Trends in long-term survival following liver resection for hepatic colorectal metastases. *Ann Surg* 2002;235:759-66
2. Oliver JH, Baron RL. Helical biphasic contrast-enhanced CT of the liver: technique, indications, interpretation, and pitfalls. *Radiology* 1996;201:1-14
3. Schima W, Saini S, Echeverri JA, et al. Focal liver lesions: characterization with conventional spin-echo versus fast spin-echo T2-weighted MR imaging. *Radiology* 1997;202:389-93
4. Jarnagin WR, Bach AM, Winston CB, et al. What is the yield of intraoperative ultrasonography during partial hepatectomy for malignant disease? *J Am Coll Surg* 2001;192:577-83
5. Keereweer S, Kerrebijn JD, Van Driel PB, et al. Optical image-guided surgery—where do we stand? *Mol Imaging Biol* 2011;13:199-207
6. Gurfinkel M, Thompson AB, Ralston W, et al. Pharmacokinetics of ICG and HPPH-car for detection of normal and tumor tissue using fluorescence, near-infrared reflectance imaging: a case study. *Photochem Photobiol* 2000;72:94-102
7. Sakka SG. Assessing liver function. *Curr Opin Crit Care* 2007;13(2):207-14
8. Landsman ML, Kwant G, Mook GA, Zijlstra WG. Light-absorbing properties, stability, and spectral stabilization of indocyanine green. *J Appl Physiol* 1976;40:575-83
9. Cherrick GR, Stein SW, Leevy CM, Davidson CS. Indocyanine green: observations on its physical properties, plasma decay, and hepatic extraction. *J Clin Invest* 1960;39:592-600
10. Bjornsson OG, Murphy R, Chadwick VS. Physicochemical studies of indocyanine green (ICG): absorbance/concentration relationship, pH tolerance and assay precision in various solvents. *Experientia* 1982;38(12):1441-2
11. Ishizawa T, Fukushima N, Shibahara J, et al. Real-time identification of liver cancers by using indocyanine green fluorescent imaging. *Cancer* 2009;115:2491-2504
12. Polom K, Murawa D, Young-soo R, et al. Current trends and emerging future of indocyanine green usage in surgery and oncology. *Cancer* 2011;117(21):4812-22
13. Ishizawa T, Hasegawa K, Aoki T, et al. Neither multiple tumors no portal hypertension are surgical contraindication for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2008;134:1908-16
14. Makuuchi M, Kosuge T, Takayama T, et al. Surgery for small liver cancers. *Semin*

*Surg Oncol* 1993;9:298-304

15. Gioux S, Coutard JG, Berger M, et al. FluoSTIC : miniaturized fluorescence image-guided surgery system. *J Biomed Opt* 2012 Oct 1;17(10):106014
16. Ishizawa T, Tamura S, Masuda K, et al. Intraoperative fluorescent cholangiography using indocyanine green: a biliary road map for safe surgery. *J Am Coll Surg* 2008;208:e1-4
17. Ishizawa T, Bandai Y, Ijichi M, et al. Fluorescent cholangiography illuminating the biliary tree during laparoscopic cholecystectomy. *Br J Surg* 2010;97:1369-77
18. K. Gotoh, Yamada T, Ishikawa O, et al. A novel image-guided surgery of hepatocellular carcinoma by indocyanine green fluorescence imaging navigation. *Journal of Surgical Oncology* 2009;100(1):75–9
19. Ishizawa T, Masuda K, Urano Y, et al. Mechanistic background and clinical applications of indocyanine green fluorescence imaging of hepatocellular carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2014;21:440-8

## **Article : Intraoperative Near-Infrared Fluorescence Imaging Using Indocyanine Green in Colorectal Carcinomatosis Surgery: Proof of Concept.**

Gabriele Barabino<sup>1,2,3</sup>, Jean Philippe Klein<sup>1</sup>, Alexandre Filippello<sup>2</sup>, Jack Porcheron<sup>2</sup>, Muriel Cuilleron<sup>4</sup>, Jean-Guillaume Coutard<sup>5</sup>, Michel Berger<sup>5</sup>, Serge Molliex<sup>6</sup>, Brigitte Beauchesne<sup>6</sup>, Jean Marc Phelip<sup>1</sup>, Jeremie Pourchez<sup>7</sup>, Valerie Forest<sup>7</sup>, Alexei Grichine<sup>3</sup>, Jean-Luc Coll<sup>3</sup>, Michèle Cottier<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Université Jean Monnet 42023 Saint Etienne, France – LINA EA 4624

<sup>2</sup> Oncological and Digestive Surgery, Saint Etienne University Hospital, 42000 Saint Etienne, France

<sup>3</sup>INSERM-UJF U823, Institut Albert Bonniot, 38706 Grenoble, France

<sup>4</sup>Radiology Department, Saint Etienne University Hospital, 42000 Saint Etienne, France

<sup>5</sup>CEA, LETI, MINATEC CAMPUS, 17 rue des martyrs 38054 Grenoble cedex 9, France

<sup>6</sup>Anaesthesiology Department, Saint Etienne University Hospital, 42000 Saint Etienne, France

<sup>7</sup> ENSMSE Ecole des Mines, 42000 Saint Etienne, France

Corresponding Author:

Gabriele Barabino MD, PhD

Oncological and Digestive Surgery, Saint Etienne University Hospital, 42000 Saint Etienne, France

g.barabino77@gmail.com

+33.(0)6.89.41.23.29

## Abstract

**Objective:** This study assesses the value of using intraoperative near-Infrared fluorescence imaging and Indocyanine green to detect colorectal carcinomatosis during oncological surgery.

**Background:** In colorectal carcinomatosis cancer, two of the most important prognostic factors are completeness of staging and completeness of cytoreductive surgery. Therefore, intraoperative visualization of tumoral lesions is of great importance. Presently, intraoperative assessment of tumoral margins relies on palpation and visual inspection.

The recent introduction of Near Infrared fluorescence image guidance provides new opportunities for surgical roles, particularly in cancer surgery. Currently, Indocyanine Green and methylene blue are the only clinically available Near Infrared fluorescent probes, and clinical data to date focus more on Indocyanine Green. Clinical experience with Indocyanine Green for intraoperative Near Infrared fluorescence imaging is extensive and shows a favorable safety profile.

**Methods:** The study was a non-randomized, monocentric, pilot “ex-vivo” blinded clinical trial (NCT 01982227) validated by the ethical committee of University Hospital of Saint Etienne.

Ten patients with colorectal carcinomatosis cancer scheduled for cytoreductive surgery were included. Patients received 0.25 mg/kg of Indocyanine green intravenously 24 hours before surgery. An NIR fluorescence imaging system was used to detect “ex-vivo” NIR fluorescent lesions.

**Results:** There was no surgical mortality. Eight patients had HIPC. Each analysis was done blindly. In a total of 88 lesions analyzed, 58 were classified by a pathologist as cancerous and 30 as non-cancerous. Among the 58 positive lesions, 42 were correctly classified by the Intraoperative Near-Infrared Imaging Fluorescence System (true positive), with a sensitivity of 72.4% with a 95% IC from 59.1% to 83.3%. Among the 30 lesions confirmed as non-cancerous nodules by the pathologist, 18 were correctly classified by the Intraoperative Near-Infrared Imaging Fluorescence System (true negatives), with a specificity of 60.0% with a 95% IC from 40.6% to 77.3%. The median PCI overall score was 4.5 under

fluorescence with a first quartile and a 3rd quartile score of 4 and 12, respectively. In the surgeon's visual inspection, a median of 8.5 was found with a first quartile and a 3rd quartile score of 5 and 14, respectively. The difference between the two scores was not statistically significant ( $p = 0.44$ ).

**Conclusions:** Near Infrared fluorescence imaging is a promising technique for intraoperative tumor identification. Near Infrared fluorescent probes that specifically target tumor cells could aid the surgeon in determining resection margins and possibly reduce the risk of locoregional recurrence.

**Keywords:** colorectal peritoneal carcinomatosis, Indocyanine green, Intraoperative Near-Infrared Imaging Fluorescence System, surgery

## **INTRODUCTION**

Management of colorectal cancers is very challenging and time consuming, which may delay the final diagnosis, worsen the condition and affect the prognosis. More than half of patients with colorectal cancer already have visceral metastases (mainly liver) and peritoneal carcinomatosis (PC).

Today, peritoneal colorectal carcinomatosis is considered a "regional stage" of metastatic disease. Tumor implantation and growth may lead to invasion of any organ or structure that is covered by peritoneum. This peritoneal dissemination can occur in 30-40% of patients.<sup>1,2</sup> The natural progression of colorectal PC is always fatal, with a median survival rate of 6 months.<sup>3</sup> However, since the early 1990s, several teams have conducted phase I-II studies to assess the combination of intraperitoneal chemotherapy with hyperthermia (HIPC) and cytoreductive surgery (CRS) for treating this pathology. This combined therapy provides a 5-year survival of 30% to 48%.<sup>4-7</sup>

The diagnosis of PC in the initial tumor mass is an important prognostic factor of the disease itself. Curability is higher for limited carcinomatosis; it is carefully removed by the surgeon with wide peri-tumoral tissue. Bulky carcinomatosis requires complex visceral peritoneum resections that leave many microscopic and macroscopic residues. The classical concept of R0 resection (microscopically margin-negative resection)<sup>8</sup> is no longer appropriate in the context of peritoneal surgery and was replaced by CC-0 (macroscopically complete cytoreduction).<sup>9</sup> Moreover, the tumor volume is closely related to the potential for metastatic disease, which determines the progression-free survival rate. The decrease in peritoneal tumor mass is therefore a major goal of the therapeutic strategy for this condition.

The diagnosis of PC of colorectal origin is very difficult and can be done preoperatively or intraoperatively. Preoperatively, CT and PET scans are the gold standard. Dromain et al<sup>10</sup> compared the results of the PET scan to those of the CT scan for patients diagnosed intraoperatively and showed that the sensitivity of PET is lower than that of CT in the detection of peritoneal carcinomatosis (57% vs 82%) and that both examinations systematically underestimate the extent of illness.

The quantitative evaluation of PC is a fundamental prognostic factor. It has led most teams specialized in the treatment of PC to establish classifications and scores. The “Peritoneal Cancer Index” (PCI) of Sugarbaker is a tool for precise quantitative assessment of carcinomatosis of gastrointestinal tumor origin. It is based on the distribution of tumor nodules and their dimensions.<sup>9,11</sup> The PCI has had a significant influence on survival.

The peritoneal cavity is divided into nine regions and four dials for the total, 13 regions in total. The PCI is calculated by assigning a score, ranging from 0 to 3, to each of the 13 regions and summing them, so the PCI can range from 0 to 39. A score of 0 corresponds to the absence of any macroscopic lesion, 1 corresponds to lesions of not more than 5 mm, 2 corresponds to lesions from 5 mm to 5 cm and 3 corresponds to lesions more than 5 cm.

PCIs calculated from CT scans increased from 5 to 10 during surgery.<sup>9</sup> Based on these results and to improve the early detection of PC, Elias et al<sup>7</sup> evaluated the effectiveness of conducting a systematic laparotomy at 1 year in patients with colorectal cancer with high risk of peritoneal recurrence but negative tumor markers and radiological work-ups (CT scan and PET scan). Early stage PC has been diagnosed in 55% of patients during routine surgery (2nd look), confirming the unreliability of preoperative imaging.

The best outcomes in surgery are associated with successful debulking surgery (downstaging procedure), which allows a macroscopically complete cytoreduction, leaving only the nodules less than 5 mm, a carcinomatosis score of 1 in the PCI classification.<sup>1</sup>

The challenge for surgeons is to carry out the most complete surgical resection, requiring them to find the maximum number of cancerous lesions, some of which are not visible.

Current methods for detecting tumor lesions intraoperatively involve palpation and visual inspection. Visual inspection is difficult because of poor tissue contrast and spatial resolution. There is also no way to detect non-palpable lesions. Recently, fluorescence-based image-guided surgery (IGS) has shown great potential to

intraoperatively detect tumors. Near infrared (NIR) imaging in combination with NIR fluorescent contrast agents utilizes 700–900 nm wavelengths and is of particular interest because of the minimal autofluorescence from native tissue in this spectrum. This allows a high signal-to-background ratio. Furthermore, excitation at these wavelengths has excellent tissue penetration, providing a means to detect contrast material at depths of several millimeters within a tissue.<sup>13</sup> Several NIR IGS systems are already commercially available or have been examined in clinical settings.<sup>14,15</sup> Clinically, fluorescence-based IGS has been used to map sentinel lymph nodes of tumors arising from the breast, skin, gastrointestinal tract, lung, and other sites.<sup>16–18</sup> Furthermore, this technique has been used for intraoperative imaging of solid tumors using both non-specific agents (e.g., in hepatobiliary tumors and breast cancer)<sup>17</sup> and tumor-specific agents (e.g., in ovarian cancer).<sup>19</sup>

Several studies have utilized the FDA-approved exogenous NIR fluorophore, indocyanine green (ICG), to detect human tumor xenografts in mice<sup>20</sup> and spontaneous tumors in companion canines.<sup>20</sup> It has also been used in human trials involving the detection of solid tumors and sentinel lymph nodes.<sup>16,17</sup> ICG has been shown to have limitations in distinguishing between malignant, benign and inflammatory tissue.<sup>21,22</sup> The current use of ICG in tumor detection and demarcation is limited because ICG cannot be conjugated to tumor-specific targets, making ICG a non-targeted probe.<sup>17</sup> Although limited, it remains a highly specific and sensitive marker for colorectal cancer and liver metastases.<sup>14,16,17</sup>

In 2009, Gotoh et al. discovered that due to limited penetration of the NIR fluorescent signal, intraoperative detection of deeper tumors is reported at a maximum detection depth of 8 mm in the liver. This study also showed that NIR fluorescence imaging could detect new, small superficial lesions undetectable by intraoperative ultrasonography or visual inspection.<sup>23</sup>

Based on these scientific elements, we performed a prospective, non-randomized, blind single-center study evaluating the ex vivo detection of peritoneal carcinomatosis with fluorescence (NIR probe) compared to histological analysis in patients with peritoneal carcinomatosis of colorectal origin after intravenous injection of 0.25 mg/kg ICG, 24 hours before surgery.

Our secondary objective was a blinded experiment to compare the PCI index obtained with fluorescence with that obtained without fluorescence at the time of surgery.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Study Design**

The study was a non-randomized, single center, pilot “*ex-vivo*” blinded clinical trial (NCT 01982227) to evaluate the performance of fluorescence (NIR probe) in the detection of malignant cells from surgical specimens of peritoneal colorectal carcinomatosis compared to histological analysis. It was validated by the ethical committee of University Hospital of Saint Etienne (130024A-2012).

### **Patient Eligibility**

From April 2013 to September 2014, eligible patients were registered for participation at Saint Etienne University Hospital.

Patient selection was performed during a specialized surgical digestive oncological consultation. All patients provided written informed consent before entering the trial. The inclusion criteria were as follows: patient with colorectal cancer carcinomatosis that requires resection surgery +/- intraperitoneal chemotherapy; age 18 to 70 years; and legal competence.

The exclusion criteria were as follows: age less than 18 or greater than 70 years; ongoing pregnancy (a urine or blood pregnancy test was performed within 72 hours before surgery); contraindication to surgery; unconfirmed diagnosis of colorectal adenocarcinoma; and no written informed consent signed.

### **Intraoperative Near-Infrared Imaging Fluorescence System**

Intraoperative NIR technology relies on the availability of an imaging system and

imaging contrast agent to visualize the primitive cancer and metastatic lesions during surgery. Based on the tissue penetration depth, a high signal-to-background ratio (SBR) is required. The NIR range is between 700 and 900 nm, a range at which light absorption and scattering by tissue are relatively low. In our study, fluorescent images were obtained by a commercially available fluorescence imaging system (FluoSTIC, FLUOPTICS, Grenoble, France).<sup>24</sup> It is made of a miniature, high-quality, consumer-grade lipstick camera for collecting fluorescent light (CM-030GE-RH®, Jai, Denmark). The camera resolution is 656 x 494 pixels, with a 10-bit dynamic range and an exposure time adjustable from 32.5  $\mu$ s to 2 s. The filtration scheme of the FluoSTIC accommodates an excitation filter centered at 740 nm that excites ICG with 40% efficiency and an emission filter from 772 to 857 nm that collects most ICG-emitted photons. A novel, custom circular optical fiber array for illumination that combines both white light and NIR excitation was developed<sup>23</sup>. The optical fiber illuminates a 40 mm x 30 mm field of view at a 126 mm working distance with 10 mW/cm<sup>2</sup> of NIR excitation light and 1000 lux of white light. The system resolution was measured to be 70  $\mu$ m, and the depth of field was 20 mm. Custom software was written in LabVIEW (National Instruments®, Austin, TX) and run on a Pentium 4 computer.

### **Tracer preparation**

ICG was prepared in the hospital in the patient's room following the preparation instructions of the institutional pharmacist. ICG (NFRACYANINE® 25 mg/10 mL, purchased from SERB, France) was diluted in 10 cc of sterile water for injection to yield a 2.5 mg/mL (3.2 mM) stock solution.

### **ICG Protocol**

At the moment of hospitalization, 24 hours before surgery, the patient received a 0.25 mg/kg injection of ICG (peripheral vein) followed by a bowel preparation. After laparotomy and exploration of the abdominal cavity by the surgeon, the exterior experimenter (anesthetist of the operating room) analyzed the abdominal cavity

using the NIR caméra before and after the surgery to determine the "surgical" and "fluorescent" PCI scores (blind experiment for secondary endpoint).

All specimens resected by the surgeon, according to the standard surgical technique (tumor and non-tumor tissue), were analyzed « *ex vivo* » in the operating room with the NIR caméra before being sent to the pathology department for further analysis (first endpoint).

### **Data Collection and Analysis**

Regarding the population, all patients were analyzed. Patients included were considered in all criteria for which information was available and were considered missing for the other criteria.

The main objective was to evaluate blind the diagnostic performance of fluorescence (NIR probe) in the detection of malignant cells from colorectal PC surgical specimens compared to histological analysis. All analyzed specimens entered into the database were included in the statistical analysis.

The secondary objective was to compare the PCI score obtained with fluorescence (NIR probe) to that obtained without fluorescence at the time of surgery. For the secondary objective, all patients with available PCI scores were analyzed.

### **Statistical Analysis**

The statistical analysis was performed with Software SAS-Windows® version 9.3. No interim analysis was performed. The primary analysis was performed on all scanned specimens. Data were reported as the median (interquartile range). Categorical data were reported as counts (percentage). Sensitivity, specificity, positive predictive values and negative predictive values were correlated with the reported degree of cancer in the biopsy. Youden's test was used to determine differences between groups. The Youden's index is the difference between the true positive rate and the false positive rate.<sup>26</sup> Maximizing this index allows finding an optimal cut-off point from the ROC curve that is independent of prevalence.

In the final analysis, the tests were performed with a 5% significance threshold according to a bilateral procedure. Confidence intervals were estimated at 95%, according to a binomial distribution and an exact procedure.

## RESULTS

### Patients

Ten patients (7 men, 3 women) with a mean age of  $69 \pm 13.6$  years were included in the study. Each patient was evaluated for resectability of colorectal cancer carcinomatosis. All patients received pre-operative chemotherapy (100%), and 2 patients received radiotherapy (20%). Eight patients received biotherapy (four treated with bevacizumab and four with cetuximab). Patient demographics and tumor characteristics are shown in Table 1.

Demographics / Characteristics	
Mean age (SD)	69.2 (13.6)
Sex, n (%)	
Female	3 (30)
Male	7 (70)
Mean BMI ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ) (SD)	26.3 (6.1)
ASA score (American Society of Anesthesiologists), n (%)	
I	3 (30)
II	3 (30)
III	4 (40)
IV	0 (0)
Primary tumor location, n (%)	
Colon	8 (80)
Rectum	2 (20)
T stage, n (%)	
T3	5 (50)
T4	3 (30)

<i>Tx</i>	2 (20)
<i>N stage, n (%)</i>	
<i>N0</i>	5 (50)
<i>N1</i>	2 (20)
<i>N2</i>	3 (30)
<i>Chemotherapy, n (%)</i>	10 (100)
<i>Bevacizumab</i>	4 (40)
<i>Cetuximab</i>	4 (40)
<i>Radiotherapy, n (%)</i>	2 (20)

**Table 1.** Patient characteristic, tumour characteristics and pre-operative treatment.

### Surgery and pathology

Surgical results are summarized in Table 2. The median duration of surgery was 5.6 hours (4-6). There was no surgical mortality. Eight patients had HIPC (two ASA III patients had only cytoreductive surgery to limit post-operative morbidity).

During surgery, the median overall PCI score was 8.5, compared to the 4.5 calculated from the blind NIR fluorescence imaging data. No statistically significant difference was detected (Table 2).

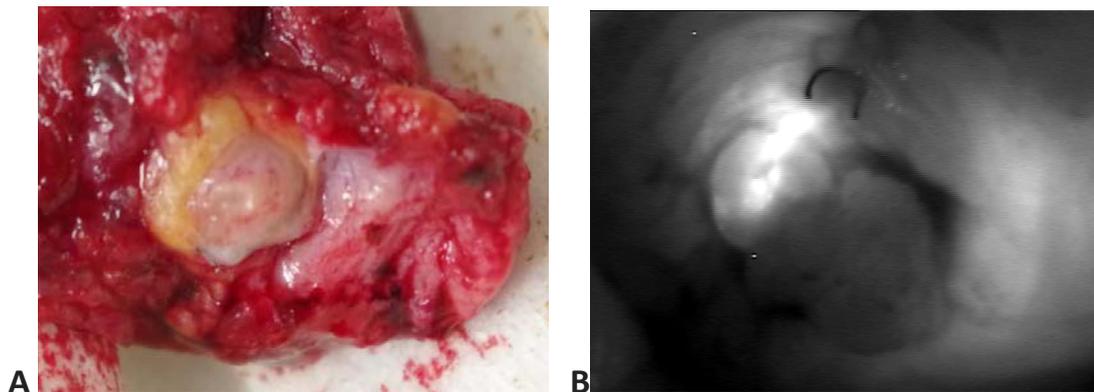
<b>Surgical data</b>	
<i>Median time of surgery (IQR)</i>	5.6 hours (4-6)
<i>HIPC, n (%)</i>	
<i>Yes</i>	8 (80)
<i>No</i>	2 (20)
<i>Median surgical PCI score before resection (IQR)</i>	8.5 (5-14)
<i>Median NIR fluorescent PCI score before resection (IQR)</i>	4.5 (4-12)
<i>Resection, n (%)</i>	

<i>Bowel</i>	9 (90)
<i>Liver</i>	4 (40)
<i>Spleen</i>	2 (20)

**Table 2.** Surgical data.

### NIR Fluorescence imaging

Each analysis was performed blindly. There were a total of 88 resected lesions; 58 were classified by the pathologist as cancerous and 30 as non-cancerous. Of the 58 positive lesions, 42 were correctly classified by the Intraoperative Near-Infrared Imaging Fluorescence System (true positive), representing a sensitivity of 72.4% with a 95% IC from 59.1% to 83.3% (Fig. 1).



**Fig. 1.** Identification of colorectal carcinomatosis metastases using NIR fluorescence imaging. A. Ex vivo imaging of carcinomatosis. B. Identification of the same carcinomatosis using NIR fluorescence imaging. The lesion was found histologically to be a metastasis of adenocarcinoma.

Of the 30 lesions confirmed as non-cancerous by the pathologist, 18 were correctly classified by the Intraoperative Near-Infrared Imaging Fluorescence System (true negatives), a specificity of 60.0% with a 95% IC from 40.6% to 77.3% (Table 3).

NIR fluorescence results	Cancerous (pathologist)	Non-cancerous (pathologist)	Total
<i>Positive</i>	42	12	54
<i>Negative</i>	16	18	34
<i>Total</i>	58	30	88
<i>Diagnostic performance</i>	Sensitivity: 72.4% [59.1; 83.3]	Specificity: 60.0% [40.6; 77.3]	

**Table 3.** NIR fluorescence imaging results.

The Youden's index was 0.324. The Youden's index ranges from 0 (the diagnostic method is not effective) to 1 (the method is perfect). The positive likelihood ratio was 1.81. This means that the NIR fluorescence results are 1.81 times more likely to present a positive test when the patient is sick than when the patient is not sick (positive likelihood ratio). The negative likelihood ratio was 0.46. Interpretation of ratios may be important for the use of fluorescence in PC.

The secondary endpoint was the PCI score with and without NIR imaging during surgery (Table 4). The median PCI overall score was 4.5 using fluorescence with a first quartile and a 3rd quartile of 4 and 12, respectively. When the surgeon inspected without NIR imaging, a median of 8.5 was found with a first quartile and a 3rd quartile of 5 and 14, respectively. The difference between the two scores was not statistically significant ( $p = 0.44$ ). No adverse reactions from the use of ICG or NIR fluorescence imaging were seen.

	NIR imaging PCI score	Surgeon's visual inspection PCI Score	P
<i>PCI score before surgery</i>	10 (100%)	10 (100%)	
<i>Mean (SD)</i>	9.0 (8.2)	10.5 (8.7)	0.44
<i>Median</i>	4.5	8.5	
<i>Q1 :Q3</i>	4.0 :12.0	5.0 :14.0	

Min : Max	3.0 :29.0	0.0 :28.0	
-----------	-----------	-----------	--

**Table 4.** Comparison of PCI overall scores before surgery for the surgeon's visual inspection vs NIR imaging with fluorescence.

## DISCUSSION

In this proof-of-concept study, we investigated the use of NIR fluorescence imaging with the clinically available, non-targeted fluorescent tracer ICG in colorectal carcinomatosis cancer patients who underwent a surgical staging procedure with cytoreductive surgery and/or HIPC.

Malignant metastatic lesions were present in 58 lesions. We found that 72.4% of these histologically proven malignant lesions were detectable using this technique; however, there was also a high false-positive rate of 40%.

In cytoreductive surgery, the goal is a complete resection of all sites with macroscopic disease—that is, to remove as much tumor as possible—obtaining a visually complete (no tumor visible after surgery) or optimal cytoreduction with residual tumor no larger than 2.5 mm. The amount of residual tumor is one of the most important prognostic factors for survival in advanced stage patients.<sup>4</sup>

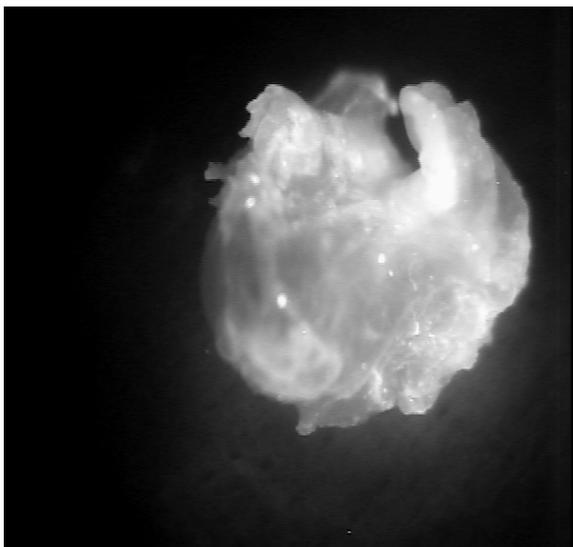
If the use of NIR fluorescence imaging leads to more accurate detection of carcinomatosis metastases, more patients could be optimally staged, possibly leading to better treatment and improved overall survival rates.

In the literature, there were no studies of peritoneal carcinomatosis of colorectal origin and ICG. Only recent reports focusing on intraoperative sentinel lymph node (SLN) mapping and hepatocarcinoma (HCC) detection have expanded the clinical application of ICG.<sup>27,28</sup> NIR fluorescence image-guided SLN mapping using ICG has been extensively used in oropharyngeal,<sup>29</sup> breast,<sup>30</sup> melanoma,<sup>31</sup> lung,<sup>32</sup> esophageal,<sup>33</sup> gastric,<sup>34</sup> cervical,<sup>35</sup> colorectal,<sup>36</sup> endometrial<sup>37</sup> and vulvar<sup>38</sup> cancer cases. The results demonstrate the feasibility of clinical application.

Before our proof-of-concept, there were no studies on the detection of colorectal carcinomatosis using ICG.

Our clinical study is based on the ability of ICG to detect different types of cancer, as shown by Ishizawa et al<sup>39</sup> in 2009. In that study, ICG was used at the dose of 0.5 mg/kg for routine liver function testing within 2 weeks of surgery to achieve highly sensitive identification of HCC through the visualization of non-cancerous liver parenchyma around the tumor. The results showed that intraoperative ICG fluorescence imaging was useful for detecting small, superficial HCCs and confirming that these lesions have been removed with sufficient surgical margins.

To not change the surgical resection in our feasibility study, we chose to analyze surgical specimens "ex vivo" in the operating room. One difficulty was in choosing the size of specimens to be analyzed by pathologists. We chose to leave them unaltered from surgical resection. This choice limited the sensitivity and specificity that we obtained. Additionally, the large number of specimens from each patient and the volume of tissue resected hampered the work of the pathologist. It turned out that the NIR probe was able to detect fluorescent lesions of approximately 1-2 mm (Fig. 2).



**Fig. 2.** Ex-vivo surgical specimen of colorectal PC. The diameter of the lesion is approximately 4 mm

For 5-6 cm specimens, such as the greater omentum, if the probe detected a millimeter lesion, the examiner in the operating room classified the specimen as positive. The pathologist had no landmarks corresponding to the location of possible fluorescent lesions and could easily classify it as a non-cancerous specimen.

Another possible explanation for the sensitivity and specificity not exceeding 75% could be the limits of the EPR effect of ICG. Due to tumor-induced angiogenesis, solid tumors exhibit leaky and immature vessels. Because of this, macromolecules are able to permeate through the vessels and into tumor tissue, where they are retained due to impaired lymph drainage.<sup>40</sup> ICG is not a macromolecule but behaves like one after binding to serum proteins. This, combined with the rapid clearance from the circulation, makes ICG a good probe for NIR fluorescence imaging of solid tumors. This theory has proven to be true for gastric and breast cancer as well.<sup>41,42</sup> The large number of false positives found in this study may be due to various reasons. It is known that the EPR effect is influenced by multiple factors, such as the presence of necrosis, tumor type, presence of vascular mediators such as bradykinin or prostaglandins, and size and location (including primary tumor vs metastasis) of the lesion. Moreover, reactive processes and cancer have similar pathophysiological pathways and vascular mediators. It has been shown that the EPR effect also occurs in inflammatory lesions.<sup>43</sup> This is consistent with some of the false-positive lesions identified in the current study—especially because the EPR effect in reactive tissue is most prominent hours after injection (coinciding with our imaging window).<sup>44</sup>

In our study, 4 patients received a biotherapy, Bevacizumab. Bevacizumab is a monoclonal antibody that binds to the VEGF and inhibits ligation with its receptors on the endothelial cell surfaces, inhibiting angiogenesis.<sup>45</sup> Using this antibody probably limited the ability of the ICG to reach cancerous lesions.

The limitations of our study are as follows: First, some surgical specimens were too large to be analyzed correctly by the pathologist. A second limitation was the

heterogeneity of preoperative chemotherapy and biotherapy. This likely changed the EPR effect of ICG. Third, we did not attain our subject accrual targets that would have allowed greater statistical power. Despite this, we were able to demonstrate that ICG can be used to detect colorectal PC.

## **CONCLUSIONS**

This is the first clinical trial demonstrating intraoperative detection of colorectal cancer carcinomatosis using NIR fluorescence imaging and ICG. Although this study is limited by the number of samples present, we demonstrated the feasibility and safety of the use of ICG and the NIR probe to detect PC. There were a high number of false positive lesions that can be explained by the lack of specificity of the EPR effect; however, the PCI score in fluorescence is comparable to the score given by the surgeon. This shows the potential of ICG as a tool in the exploration of the abdominal cavity. Overall, acceptable sensitivity justifies further investigation to demonstrate the efficacy of the use of ICG during colorectal PC surgery.

## **CONFLICTS OF INTEREST**

All authors have disclosed any financial and personal relationships with other people or organisations that could have inappropriately influenced (biased) their work.

## REFERENCES

1. Chu DZ, Lang NP, Thompson C, et al. Peritoneal carcinomatosis in non-gynecologic malignancy : a prospective study of prognostic factors. *Cancer*. 1989 ;63 :364-367.
2. Sadeghi B, Arvieux C, Glehen O, et al. Peritoneal carcinomatosis from non-gynecologic malignancies : results of EVOCAPE 1 multicentric prospective study. *Cancer*. 2000 ;88 :358-363.
3. Jayne DG, Fook S, Loi C et al. Peritoneal carcinomatosis from colorectal cancer. *Br J Surg*. 2002 ;89 :1545-1550.
4. Glehen O, Sugarbaker PH, Elias D et al. Cytoreductive surgery combined with perioperative intraperitoneal chemotherapy for the management of peritoneal carcinomatosis from colorectal cancer : a multi-institutional study. *J Clin Oncol*. 2004 ;22 :3284-3292.
5. Da Silva RG, Sugarbaker PH. Analysis of prognostic factors in seventy patients having a complete cytoreduction plus perioperative intraperitoneal chemotherapy for carcinomatosis from colorectal cancer. *J Am Coll Surg*. 2006 ;203 :878-886.
6. Verwaal VJ, Van Ruth S, Witkamp A, et al. Long-term survival of peritoneal carcinomatosis of colorectal origin. *Ann Surg Oncol*. 2005 ;12 :65-71.
7. Elias D, Raynard B, Farkhondeh F et al. Long-term survival of peritoneal carcinomatosis of colorectal origin. *Gastroenterol Clin Biol*. 2006 ;30 :1200-1204.
8. Hermanek P, Wittekind C. Residual tumor (R) classification and prognosis. *Semin Surg Oncol*. 1994;10:12–20.
9. Begossi G, Gonzalez-Moreno S, Ortega-Perez G, et al. Cytoreduction and intraperitoneal chemotherapy for the management of peritoneal carcinomatosis, sarcomatosis and mesothelioma. *Eur J Surg Oncol*. 2002;28:80-87.
10. Dromain C, Leboulleux S, Auperin A, et al. Staging of peritoneal

- carcinomatosis : enhanced CT vs. PET/CT. *Abdom Imaging*. 2008 ;33 :87-93.
11. Sugarbaker PH. Intraperitonéal chemotherapy and cytoreductive surgery for the prevention and treatment of peritoneal carcinomatosis and sarcomatosis. *Semin Surg Oncol*. 1998 ;14 :254-261.
  12. Esquivel J. Cytoreductive surgery for peritoneal malignancies development of standards of care for the community. *Surg Oncol Clin. N Am* 2007;16:653-666.
  13. Frangioni J. In vivo near-infrared fluorescence imaging. *Curr Opin Chem Biol*. 2003;7:626–634.
  14. Gioux S, Choi HS, Frangioni JV. Image-guided surgery using invisible near-infrared light: fundamentals of clinical translation. *Mol Imaging*. 2010;9:237–255.
  15. Troyan SL, Kianzad V, Gibbs-Strauss SL, et al. The FLARE intraoperative near-infrared fluorescence imaging system: a first-in-human clinical trial in breast cancer sentinel lymph node mapping. *Ann Surg Oncol*. 2009;16:2943–2952.
  16. Kim S, Lim YT, Soltesz EG, et al. Near-infrared fluorescent type II quantum dots for sentinel lymph node mapping. *Nat Biotechnol*. 2004;22:93–97.
  17. Schaafsma BE, Mieog JSD, Hutteman M, et al. The clinical use of indocyanine green as a near-infrared fluorescent contrast agent for image-guided oncologic surgery. *J Surg Oncol*. 2011;104:323–332.
  18. Van der Vorst JR, Schaafsma BE, Verbeek FP, et al. Near-infrared fluorescence sentinel lymph node mapping of the oral cavity in head and neck cancer patients. *Oral Oncol*. 2013;49:15–19.
  19. Van Dam GM, Themelis G, Crane LMA, et al. Intraoperative tumor-specific fluorescence imaging in ovarian cancer by folate receptor- $\alpha$  targeting: first in-human results. *Nat Med*. 2011;18:1315–1319.
  20. Altinoğlu EI, Russin TJ, Kaiser JM, et al. Near-infrared emitting fluorophore-doped calcium phosphate nanoparticles for in vivo imaging of human breast cancer. *ACS Nano*. 2008;2:2075–2084.

21. Holt D, Okusanya O, Judy R, et al. Intraoperative near-infrared imaging can distinguish cancer from normal tissue but not inflammation. *PLoS One*. 2014;9:e103342.
22. Shimizu S, Kamiike W, Hatanaka N, et al. New method for measuring ICG Rmax with a clearance meter. *World J Surg*. 1995;19:113–118.
23. Gotoh K, Yamada T, Ishikawa O, et al. A novel image-guided surgery of hepatocellular carcinoma by indocyanine green fluorescence imaging navigation. *J Surg Oncol*. 2009;100:75–79.
24. Gioux S, Coutard JG, Berger M, et al. FluoSTIC: miniaturized fluorescence image-guided surgery system. *J Biomed Opt*. 2012 Oct;17(10):109802.
25. Shimizu S, Kamiike W, Hatanaka N, Yoshida et al. New method for measuring ICG Rmax with a clearance meter. *World J Surg*. 1995;19:113–118.
26. Youden WJ. Index for rating diagnostic tests. *Cancer*. 1950;3: 32–35.
27. Polom K, Murawa D, Young-soo R, et al. Current trends and emerging future of indocyanine green usage in surgery and oncology. *Cancer*. 2011;117(21):4812-22.
28. Chongwei Chi, Yang Du, JinzuoYe et al. Intraoperative Imaging-Guided Cancer Surgery: From Current Fluorescence Molecular Imaging Methods to Future Multi-Modality Imaging Technology. *Theranostic*. 2014;4(11):1072-1084.
29. Van der Vorst JR, Schaafsma BE, Verbeek FPR, et al. Near-infrared fluorescence sentinel lymph node mapping of the oral cavity in head and neck cancer patients. *Oral Oncol*. 2013;49:15-19.
30. Hirche C, Murawa D, Mohr Z, Kneif S, Hunerbein M. ICG fluorescence-guided sentinel node biopsy for axillary nodal staging in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2010;121:373-378.
31. Gilmore DM, Khullar OV, Gioux S, et al. Effective low-dose escalation of indocyanine green for near-infrared fluorescent sentinel lymph node mapping in melanoma. *Ann Surg Oncol*. 2013;20:2357-2363.

32. Yamashita S, Tokuishi K, Miyawaki M, et al. Sentinel node navigation surgery by thoracoscopic fluorescence imaging system and molecular examination in non-small cell lung cancer. *Ann Surg Oncol*. 2012; 19: 728-733
33. Kubota K, Yoshida M, Kuroda J, et al. Application of the HyperEye Medical System for esophageal cancer surgery: a preliminary report. *Surg Today*. 2013;43:215-220.
34. Fujita T, Seshimo A, Kameoka S. Detection of Sentinel Nodes in Gastric Cancer by Indocyanine Green Fluorescence Imaging. *Hepatogastroenterology*. 2012;59:2213-2216.
35. Schaafsma BE, van der Vorst JR, Gaarenstroom KN, et al. Randomized comparison of near-infrared fluorescence lymphatic tracers for sentinel lymph node mapping of cervical cancer. *Gynecol Oncol*. 2012;127:126-130.
36. Hirche C, Mohr Z, Kneif S, et al. Ultrastaging of colon cancer by sentinel node biopsy using fluorescence navigation with indocyanine green. *Int J Colorectal Dis*. 2012;27:319-324.
37. Holloway RW, Bravo RAM, Rakowski JA, et al. Detection of sentinel lymph nodes in patients with endometrial cancer undergoing robotic-assisted staging: A comparison of colorimetric and fluorescence imaging. *Gynecol Oncol*. 2012;126:25-29.
38. Schaafsma BE, Verbeek FPR, Peters AAW, et al. Near-infrared fluorescence sentinel lymph node biopsy in vulvar cancer: a randomised comparison of lymphatic tracers. *BJOG*. 2013;120:758-764.
39. Ishizawa T, Fukushima N, Shibahara J, et al. Real-time identification of liver cancers by using indocyanine green fluorescent imaging. *Cancer*. 2009;115:2491–2504.
40. Maeda H, Wu J, Sawa T, Matsumura Y, Hori K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J Control Release*. 2000 ; 65:271–284.
41. Alacam B, Yazici B, Intes X, Nioka S, Chance B. Pharmacokinetic-rate images

of indocyanine green for breast tumors using near-infrared optical methods. *Phys Med Biol* 2008 ;53:837–859.

42. Kimura T, Muguruma N, Ito S, et al. Infrared fluorescence endoscopy for the diagnosis of superficial gastric tumors. *Gastrointest Endosc.* 2007 ;66:37–43.
43. Maeda H. The link between infection and cancer: tumor vasculature, free radicals, and drug delivery to tumors via the EPR effect. *Cancer Sci.* 2013 ;104:779–789.
44. Maeda H. Vascular permeability in cancer and infection as related to macromolecular drug delivery, with emphasis on the EPR effect for tumor-selective drug targeting. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2012 ;88:53–71.
45. Panoilia E, Schindler E, Samantas E, et al. A pharmacokinetic binding model for bevacizumab and VEGF165 in colorectal cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2015;75:791–803.

**Article: Affinity of indocyanine green (ICG) in the detection of colorectal peritoneal carcinomatosis: the role of enhanced permeability and retention effect.**

A Filippello<sup>1,2</sup> MD, JP Klein<sup>2</sup> MD, M Cottier<sup>2</sup> MD PhD, J Porcheron<sup>1</sup> MD PhD, M Cuilleron<sup>3</sup> MD, B Beauchesne<sup>4</sup> MD, J Pourchez<sup>5</sup> PhD, V Forest<sup>5</sup> PhD, JL Coll<sup>6</sup> PhD, G Barabino<sup>1,2</sup> MD PhD

<sup>1</sup> Digestive and Oncological Surgery, University Nord Hospital, Saint Etienne, France

<sup>2</sup> Jean Monnet University of Saint Etienne, EA 4624 LINA IFRESIS, Saint Etienne, France

<sup>3</sup> Radiology Departement, University Nord Hospital, Saint Etienne, France

<sup>4</sup> Anesthesiology Departement, University Nord Hospital, Saint Etienne, France

<sup>5</sup> ENSMSE Ecole des Mines, 42000 Saint Etienne, France

<sup>6</sup> Albert Bonniot Institut, INSERM U823, Grenoble, France

Corresponding Author:

Gabriele Barabino MD, PhD

Oncological and Digestive Surgery, Saint Etienne University Hospital, 42000 Saint Etienne, France

g.barabino77@gmail.com

+33.(0)6.89.41.23.29

**ABSTRACT**

Indocyanine green (ICG) is increasingly being used in digestive oncology. In colorectal cancer, ICG can be used to detect lymph node metastasis and hepatic metastasis on the surface of the liver. In peritoneal carcinomatosis, it was previously suspected that the diffusion of ICG in the tumour mass was due to the enhanced permeability and retention effect; however, this phenomenon has not been clearly demonstrated. Using Bevacizumab, an antibody directed against vascular endothelial growth factor that consequently inhibits neoangiogenesis, we sought to confirm the mode of ICG diffusion. We compared the fluorescence of peritoneal carcinomatosis nodules from patients who had previously received Bevacizumab during their oncologic treatment with those who did not receive this therapy. The sensitivity of the carcinomatosis nodule fluorescence was higher in the patients who did not receive Bevacizumab compared with those who received the drug (76,3% and 65,0%, respectively). The rate of false-negative results was higher in the Bevacizumab group than in the group that did not receive the drug (53,8% and 42,9%, respectively). Using Bevacizumab, we demonstrated that the enhanced permeability and retention effect causes indocyanine green accumulation in peritoneal carcinomatosis resulting from colorectal cancer.

## INTRODUCTION

As has previously been described for human hepatic metastasis [1],[2],[3],[4] and more recently for lymph node metastasis of colorectal cancer [5], indocyanine green (ICG) is a novel diagnostic tool that is used in oncologic applications, especially during surgical resection. In previous studies, ICG has permitted the diagnosis of new metastases in patients with negative results in their pre-operative images. Moreover, ICG can be applied in peritoneal carcinomatosis due to ovarian cancer in mice [6]. Currently, the potential curative treatment of peritoneal carcinomatosis resulting from colorectal cancer is complete cytoreductive surgery and hyperthermic peritoneal chemotherapy when resectability is possible. This process consists of the resection of all of the invaded peritoneum and visceral organs, excluding major hepatectomy or extended enterectomy, followed by warmed chemotherapy *in situ* [7][8][9][10]. To date, the ICG has not been used to detect peritoneal carcinomatosis due to colorectal cancer, but its feasibility has recently been presented in human ovarian cancer [11].

Fukushima *et al.* have demonstrated the extravasation of ICG under conditions of choroidal neovascularization [12]. This observation led to the characterization of a new process of diffusion, the “enhanced permeability and retention” (EPR) effect. This effect illustrates the affinity of ICG towards tumoural and near-tumoural tissue due to tumour neovascularization, which is known to result in a poor architecture with an abnormal basement membrane and fissures between endothelial cells [13]. Even if ICG is not a specific tumour binding molecule, Kosaka *et al.* have described the EPR effect as a physiopathological binding mechanism of ICG in peritoneal carcinomatosis through tumoural neovascularization [6].

In digestive oncology, biotherapies have been applied for several years. One of these therapies is Bevacizumab, a monoclonal antibody against vascular endothelial growth factor (VEGF), which is a key factor in neo-angiogenesis[14][15]. If Bevacizumab inhibits neo-angiogenesis, we thought that the EPR effect could be reduced or even eliminated. Consequently, patients treated with Bevacizumab would probably have a lower risk of presenting fluorescent peritoneal

carcinomatosis nodules, thus reducing the sensitivity and specificity of ICG. We hypothesised that the activity of Bevacizumab would abrogate the extravasation of ICG if the EPR effect were the mode of ICG diffusion in peritoneal carcinomatosis.

Therefore, we conducted a clinical study (NCT01982227) evaluating ICG in the diagnosis of peritoneal carcinomatosis due to colorectal cancer to demonstrate the mode of diffusion of ICG in peritoneal carcinomatosis based on the effect of Bevacizumab.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Indocyanine green (ICG)**

Indocyanine green is a fluorescent dye with an emission spectrum of approximately 835 nm in plasma that decreases to 826 nm one hour after intravenous injection due to interactions with phospholipidic plasma structures [16]. The emission and excitation values are in the near infra-red region of the spectrum and thus are not absorbed or are absorbed only marginally by haemoglobin [17]. Moreover, the infrared fluorescence has an additive characteristic. The intensity of fluorescence increases with the thickness of the structure or overlapping vessels [18]. However, this phenomenon is limited because when the concentration of ICG exceeds 0,05 mg/ml, an inverse effect characterised by the extinction of fluorescence (denoted as "quenching") is observed[16]. Intravenous injection of ICG has been applied for several decades in France for three authorised applications: the study of choroidal vascularization, measurement of cardiac flow and measurement of hepatic flow and hepatic function [19].

The EPR effect was initially demonstrated in the choroidal neovasculature [12] and was subsequently described in the tumour tissue for peritoneal carcinomatosis resulting from ovarian cancer [6][11]. ICG can diffuse through the tumour neovasculature and remain in the area of the tumour after vascular clearance [13].

**Near infrared caméra detection**

The detection of fluorescence was conducted with a near infrared detection probe known as Fluostick™ [20][21]. Fluostick™ is a miniaturised handheld real-time near infrared fluorescence imaging device for intraoperative use. Its main indications are blood flow visualisation, lymphatic flow visualisation, liver surgery, wound boundary assessment, thyroid surgery and tumour margin visualisation. This device was developed by Fluoptics, a French society based in Grenoble. It is capable of detecting radiation up to 800 nm for objects up to 0.15 mm with an excitation radiation of 750 nm. Depending on the analysed tissue, the maximum detection depth is 1 cm[22]. The front of the caméra contains a class 1 laser and a white LED light. The working distance is 5 to 12 cm with a focal plane depth of 1 cm. At a distance of 7 cm, the field of view is 3.2 x 2.4 cm. The image size is 720 x 576 pixels. The optical head weight is 250 g, and a sterile cover is available. The fluorescence images are visualised in real time on a laptop computer connected to the light source generator.

**Bevacizumab**

Angiogenesis is necessary for the proliferation and growth of normal cells and tissues during the foetal and neonatal period, as well as for the proliferation and growth of tumour cells. Several factors are involved in the regulation of angiogenesis. VEGF is one of the main growth factors involved in vessel formation [23]. Bevacizumab is a recombinant humanised IgG1 monoclonal antibody. It targets circulating VEGF or VEGF-A, a regulator of vasculogenesis and angiogenesis that is overexpressed in most human tumours. By blocking the binding of VEGF-A to its receptors (VEGFR-1 and VEGFR-2) on the surface of endothelial cells, bevacizumab inhibits tumour angiogenesis and growth [24]. Bevacizumab is used in addition to chemotherapy for metastatic colorectal cancer. In association with chemotherapy, XELIRI (capecitabine and irinotecan) or FOLFIRI (5-fluorouracil, leucovorin and irinotecan), Bevacizumab is effective for the first-line treatment of metastatic colorectal cancer [25]. Moreover, the combination of capecitabine and

oxaliplatin or capecitabine and irinotecan together with bevacizumab displays an efficacy similar to that of other bevacizumab-containing combination regimens[26]. The combination of FOLFIRI and Bevacizumab demonstrates a better median survival rate than FOLFIRI alone [27]. Bevacizumab has also been shown to be beneficial in terms of survival [28].

### **Surgical specimens**

During the clinical study (NCT01982227), we collected surgical specimens consisting of normal and tumour tissue. In accordance with our institutional review board, we did not resect fluorescent tissue that was not macroscopically suspicious and would not have been resected under normal circumstances. Each specimen was analysed with the Fluostick™ to determine the fluorescence of the normal tissue and tissue with suspected tumour.

The detection was conducted under *ex vivo* conditions. Fluorescence was noted and then compared with the histological assessment. A sub-group analysis was performed for the patients who received Bevacizumab to evaluate any differences in the fluorescence of the tumour specimens.

### **Statistical analysis**

The statistical analysis was performed with SAS-Windows® version 9.3. The tests were conducted at a threshold of 5% according to a bilateral procedure. The confidence intervals were estimated at 95% according to a binomial law and exact procedure. To compare the sensitivity of ICG in the two subgroups, the chi-square test was used. For specificity, Fisher's exact test was used because of the presence of one value less than 5.

**RESULTS**

During the clinical study (NCT01982227) and before the analysis of peritoneal carcinomatosis nodules, all of the patients received chemotherapy for their preoperative oncologic treatment. In the patient who had received Bevacizumab, 13 of the 20 tumoural nodules were fluorescent, representing a sensitivity of 65,0% with a 95% confidence interval ranging from 40,8% to 84,6% (Fig. 1). Among the 9 non-tumoural nodules, 6 were not fluorescent, representing a specificity of 66,7% with a 95% confidence interval ranging from 29,9% to 92,5%. The positive likelihood ratio was 1,95, and the negative likelihood ratio was 0,52. In the patient who had not received Bevacizumab, 29 of the 38 tumoural nodules were fluorescent, representing a sensitivity of 76,3% with a 95% confidence interval ranging from 59,8% to 88,6%. Among the 21 non-tumoural nodules, 12 were not fluorescent, representing a specificity of 57,1% with a 95% confidence interval ranging from 34,0% to 78,2%. The positive likelihood ratio was 1,78, and the negative likelihood ratio was 0,41 (Table 1).

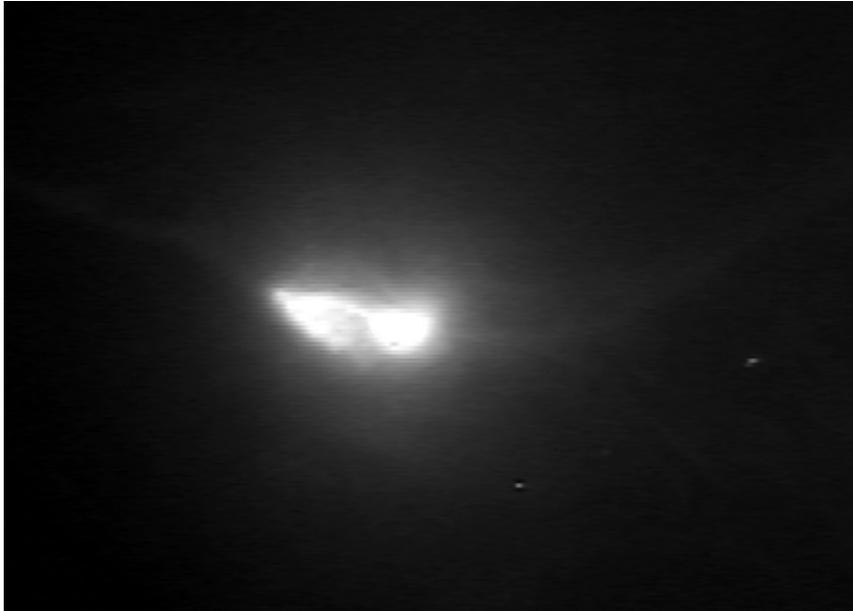


Fig. 1. Fluorescent nodules in peritoneal carcinomatosis

Table 1: Results

	Sensitivity (%) (p=0.54)	Specificity (%) (p=0.93)	Positive likelihood ratio	Negative likelihood ratio
Bevacizumab	65	66,7	1,95	0,52
No Bevacizumab	76,3	57,1	1,78	0,41

## DISCUSSION

It is currently well known that macromolecules often demonstrate EPR effects within the tumour tissue secondary to immature and leaky tumour vessels that result from tumour-induced angiogenesis [29],[30].

However, although ICG is a small molecule, it behaves like a large molecule after binding to serum proteins and demonstrates relatively rapid clearance from the blood circulation with normal hepatic function [6].

In 2011, Kosaka *et al.* presented results for ovarian peritoneal carcinomatosis in mouse models, showing that ICG possesses desirable properties for the real-time detection of tiny ovarian cancer peritoneal implants; ICG has both EPR effects and rapid clearance compared with a control macromolecular agent with theoretically superior EPR effects but a longer circulatory retention [6]. ICG possesses the properties to provide an EPR effect; however, this phenomenon has not been confirmed. The present findings provide support for this phenomenon based on the mode of action of Bevacizumab.

Recently, in a clinical study investigating ovarian cancer, Tummers *et al.* have demonstrated the feasibility of the detection of peritoneal metastasis using ICG. Moreover, they were able to identify 100% of the histologically proven malignant lesions; however, a high false-positive rate of 62% was observed [11].

The results obtained for the subgroup without Bevacizumab revealed an increase in sensitivity from 65,0% to 76,3%, but the difference of 11,3% was not significant ( $p=0,54$ ).

However, this difference is understandable on the basis of the mode of action of Bevacizumab. Bevacizumab binds to VEGF, which is a key factor during angiogenesis. Bevacizumab inhibits endothelial cell activity, vascular permeability-enhancing activity, and other angiogenic functions of VEGF [14],[15]. The neutralization of VEGF has two effects on tumour biology: prevention of neovasculature formation by limiting the blood supply and “normalization” of immature and abnormal blood vessels [31].

The potential ability of Bevacizumab to inhibit the formation of new tumoural vessels and decrease their numbers would explain the higher rate of false-negative results in the subgroup that received Bevacizumab compared with the subgroup that did not receive Bevacizumab (53,8% (7/13) versus 42,9% (9/21), respectively). However, this difference was not significant ( $p=0.79$ ). In addition, evidence was obtained for the occurrence of an EPR effect during the diffusion of ICG into peritoneal carcinomatosis nodules. Moreover, a higher specificity was detected in patients who received Bevacizumab compared with those who did not (66,7% versus 57,1%, respectively), but this difference was not significant ( $p=0.93$ ). The false-positive rate was reduced in the subgroup with versus without Bevacizumab, which could be explained by the diminution of the EPR effect in response to Bevacizumab. Indeed, we observed that some of the false-positive nodules presented either inflammation or necrotic tissue, which was probably tumoural before chemotherapy. Under those two conditions, the neovasculature was present in the absence of tumour tissue and explained the occurrence of false-positive findings.

## **CONCLUSIONS**

The present study presents findings supporting interest in the application of ICG to

detect human colorectal peritoneal carcinomatosis, as presented for ovarian cancer in mice and recently in humans. Moreover, we confirmed the EPR effect that was previously described for ICG. On the basis of the false-negative rate observed in patients who received Bevacizumab, our analysis provides important information validating the mechanism of ICG diffusion. Based on the present findings, we can establish that the EPR effect is probably the mode of ICG diffusion in solid tumours, excluding hepatic metastases, which respond via another mechanism characterised by an excess accumulation of ICG around the tumour. Despite the lack of specificity of ICG, the present findings provide insight to facilitate studies investigating the detection of many solid tumours.

#### **CONFLICTS OF INTEREST**

All authors have disclosed any financial and personal relationships with other people or organisations that could have inappropriately influenced (biased) their work.

## REFERENCES

1. Aoki T, Yasuda D, Shimizu Y, et al. Image-guided liver mapping using fluorescence navigation system with indocyanine green for anatomical hepatic resection. *World J Surg.* 2008;32: 1763–1767.
2. Ishizawa T, Fukushima N, Shibahara J, et al. Real-time identification of liver cancers by using indocyanine green fluorescent imaging. *Cancer.* 2009;115: 2491–2504.
3. Uchiyama K, Ueno M, Ozawa S, Kiriya S, Shigekawa Y, Yamaue H. Combined use of contrast-enhanced intraoperative ultrasonography and a fluorescence navigation system for identifying hepatic metastases. *World J Surg.* 2010;34: 2953–2959.
4. Van der Vorst JR, Schaafsma BE, Hutteman M, et al. Near-infrared fluorescence-guided resection of colorectal liver metastases. *Cancer.* 2013;119: 3411–3418.
5. Liberale G, Vankerckhove S, Galdon MG, Donckier V, Larsimont D, Bourgeois P. Fluorescence imaging after intraoperative intravenous injection of indocyanine green for detection of lymph node metastases in colorectal cancer. *Eur J Surg Oncol.*
6. Kosaka N, Mitsunaga M, Longmire MR, Choyke PL, Kobayashi H. Near infrared fluorescence-guided real-time endoscopic detection of peritoneal ovarian cancer nodules using intravenously injected indocyanine green. *Int J Cancer J Int Cancer.* 2011;129: 1671–1677.
7. Glehen O, Kwiatkowski F, Sugarbaker PH, et al. Cytoreductive surgery combined with perioperative intraperitoneal chemotherapy for the management of peritoneal carcinomatosis from colorectal cancer: a multi-institutional study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2004;22: 3284–3292.
8. Glehen O, Cotte E, Schreiber V, Sayag-Beaujard AC, Vignal J, Gilly FN. Intraperitoneal chemohyperthermia and attempted cytoreductive surgery in patients with peritoneal carcinomatosis of colorectal origin. *Br J Surg.* 2004;91:

747–754.

9. Verwaal VJ, Ruth S van, Bree E de, et al. Randomized Trial of Cytoreduction and Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy Versus Systemic Chemotherapy and Palliative Surgery in Patients With Peritoneal Carcinomatosis of Colorectal Cancer. *J Clin Oncol*. 2003;21: 3737–3743.

10. Elias D, Raynard B, Farkhondeh F, et al. Peritoneal carcinomatosis of colorectal origin. *Gastroentérologie Clin Biol*. 2006;30: 1200–1204.

11. Tummers QRJG, Hoogstins CES, Peters AAW, et al. The Value of Intraoperative Near-Infrared Fluorescence Imaging Based on Enhanced Permeability and Retention of Indocyanine Green: Feasibility and False-Positives in Ovarian Cancer. *PLoS One*. 2015;10: e0129766.

12. Fukushima I, Kusaka K, Takahashi K, et al. Comparison of indocyanine green and fluorescein angiography of choroidal neovascularization. *Jpn J Ophthalmol*. 1997;41: 284–296.

13. Ranganathan R, Madanmohan S, Kesavan A, et al. Nanomedicine: towards development of patient-friendly drug-delivery systems for oncological applications. *Int J Nanomedicine*. 2012;7: 1043–1060.

14. Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2005;23: 1011–1027.

15. Rosen LS. VEGF-targeted therapy: therapeutic potential and recent advances. *The Oncologist*. 2005;10: 382–391.

16. Desmettre T, Devoisselle JM, Soulie-Begu S, Mordon S. [Fluorescence properties and metabolic features of indocyanine green (ICG)]. *J Fr Ophthalmol*. 1999;22: 1003–1016.

17. Yannuzzi LA, Slakter JS, Sorenson JA, Guyer DR, Orlock DA. Digital indocyanine green videoangiography and choroidal neovascularization. *Retina Phila Pa*. 1992;12:

191–223.

18. Miller H, Miller B, Ryan SJ. The role of retinal pigment epithelium in the involution of subretinal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1986;27: 1644–1652.

19. Infracyanine®. Laboratoire SERB.

20. Dorval P, Mangeret N, Guillermet S, Righini CA, Barabino G, Rizo P, et al. The Fluostick, a real hand-held system for near-infrared fluorescence image-guided surgery. 2014. p. 89350F–89350F–7.

21. Dorval P, Atallah I, Barabino G, Henry M, Keramidas M, Stenard F, et al. Miniaturized Clinical Imaging Device for Optical Surgery. In: Dip FD, Ishizawa T, Kokudo N, Rosenthal RJ, editors. *Fluorescence Imaging for Surgeons*. Springer International Publishing; 2015. pp. 341–351.

22. Frangioni JV. In vivo near-infrared fluorescence imaging. *Curr Opin Chem Biol.* 2003;7: 626–634.

23. Pavlidis ET, Pavlidis TE. Role of bevacizumab in colorectal cancer growth and its adverse effects: A review. *World J Gastroenterol WJG.* 2013;19: 5051–5060.

24. Panoilia E, Schindler E, Samantas E, et al. A pharmacokinetic binding model for bevacizumab and VEGF165 in colorectal cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2015;75: 791–803.

25. Ducreux M, Adenis A, Pignon J-P, et al. Efficacy and safety of bevacizumab-based combination regimens in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer: final results from a randomised phase II study of bevacizumab plus 5-fluorouracil, leucovorin plus irinotecan versus bevacizumab plus capecitabine plus irinotecan (FNCLCC ACCORD 13/0503 study). *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. 2013;49: 1236–1245.

26. Schmiegel W, Reinacher-Schick A, Arnold D, Kubicka S, et al. Capecitabine/irinotecan or capecitabine/oxaliplatin in combination with

bevacizumab is effective and safe as first-line therapy for metastatic colorectal cancer: a randomized phase II study of the AIO colorectal study group. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO*. 2013;24: 1580–1587.

27. Fuchs CS, Marshall J, Barrueco J. Randomized, Controlled Trial of Irinotecan Plus Infusional, Bolus, or Oral Fluoropyrimidines in First-Line Treatment of Metastatic Colorectal Cancer: Updated Results From the BICC-C Study. *J Clin Oncol*. 2008;26: 689–690.

28. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2004;350: 2335–2342.

29. Maeda H, Matsumura Y. EPR effect based drug design and clinical outlook for enhanced cancer chemotherapy. *Adv Drug Deliv Rev*. 2011;63: 129–130.

30. Matsumura Y, Maeda H. A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer Chemotherapy: Mechanism of Tumorotropic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent Smancs. *Cancer Res*. 1986;46: 6387–6392.

31. Jain RK. Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy. *Nat Med*. 2001;7: 987–989.

## **7 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES**

Dans notre travail de thèse, nous nous sommes attachés à répondre à cette question : peut-t-on améliorer la résécabilité tumorale dans les métastases hépatiques et péritonéales ?

Pour cela nous nous sommes appuyés sur deux éléments : la fluorescence du vert d'indocyanine et sa détection par la caméra NIR. Dans un premier temps, après une mise au point en laboratoire, nous avons appliqué cette technique aux résections hépatiques. Nous avons montré que cette technique a un double intérêt : la détection des lésions tumorales et l'amélioration de la marge de résection oncologique. La question encore ouverte est le pourcentage de cellules cancéreuses ou précancéreuses présentes dans cette couronne fluorescente.

Dans un deuxième temps nous avons appliqué cette technique dans la carcinose péritonéale. Il s'agit d'une première étude de faisabilité car nous n'avons retrouvé aucune publication sur ce sujet. Nous avons pu montrer des similitudes avec l'étude sur le foie. La fluorescence de l'ICG permet de détecter des tumeurs du péritoine difficilement visibles à l'œil nu grâce à l'intensité et à la qualité de la fluorescence même.

Les perspectives sont centrées sur deux axes : l'agent fluorescent, le vert d'indocyanine, et les caméras NIR.

L'application du vert d'indocyanine dans la détection des lésions cancéreuses d'origine colorectale prendra une place de plus en plus importante. Nous pourrions imaginer une évolution de ce fluorophore, associé à des nanoparticules ou à des anticorps afin d'améliorer ultérieurement la sensibilité et la spécificité aux tissus cibles. Notre expérience dans le cadre du Master 2 sur la mise au point de nanoparticules et des anticorps fluorescents pour le marquage de cellules intestinales tumorales pourra aider au développement d'un « fluorophore hybride ».

Nous envisageons la mise en route d'un essai multicentrique sur l'ICG et la

carcinose péritonéale, d'origine colorectale et non, afin de pouvoir confirmer nos premiers résultats tout en corrigeant nos erreurs précédentes. L'analyse des pièces opératoires, toujours en aveugle, sera ciblée sur les zones fluorescentes et non fluorescentes même millimétriques afin de pouvoir avoir la réelle sensibilité et spécificité de la technique. L'analyse per-opératoire avec la caméra NIR se limitera à une zone cible (exemple, gouttière pariéto-colique gauche) avec des résections en cas de positivité de la fluorescence sans prendre un risque opératoire majeur pour le patient. Ces résultats sur un nombre important des patients pourront montrer de façon définitive l'utilité de l'ICG avant tous gestes de résection chirurgicale de carcinose péritonéale.

Concernant les caméras NIR, le travail de développement doit aller dans la direction du mini invasif (cœlioscopie et endoscopie). Ces caméras devront dans le futur permettre une vision des tissus en temps réel, en couleur et en fluorescence. La cœlioscopie avec caméra fluorescente va devenir un outil indispensable en chirurgie digestive.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Grosclaude P, Bossard N, Remontet L, et al. Survie des patients atteints de cancer en France : étude des registres du réseau Francim. Paris : *Springer- Verlag*, 2007. 406p.
2. Horner MJ, Ries LAG, Krapcho M, et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2006, National Cancer Institute. Bethesda, MD, [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2006/](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2006/), based on November 2008 SEER data submission, posted to the SEER web site, 2009.
3. Sant M, Allemani c, Santaquilani M, Knijn A, Marchesi F, Capocaccia R. the EURO CARE Working Group -4. Survival of cancer patients diagnosed in 1995-1999. Results and commentary. *Eur J cancer* 2009; 45(6) : 931-39.
4. Coleman MP, Quaresma M, Berrino F, et al. Cancer survival in five continents: a worldwide population-based study (CONCORD). *Lancet Oncol* 2008; 9(8) : 730-56.
5. Smith AJ, Driman DK, Spithoff K, et al. Guideline for optimization of colorectal cancer surgery and pathology. *J Surg Oncol* 2010;101(1):5-12.
6. Mella J, Biffin A, Radcliffe AG, et al. Population-based audit of colorectal cancer management in two UK health regions. Colorectal Cancer Working Group, Royal College of Surgeons of England Clinical Epidemiology and Audit Unit. *Br J Surg* 1997; 84(12):1731-6.
7. Yamamoto J, Shimada K, Kosuge T, et al. Factors influencing survival of patients undergoing hepatectomy for colorectal metastases. *Br J Surg* 1999; 86(3):332-7.
8. Ercolani G, Grazi GL, Ravaioli M, et al. Liver resection for multiple colorectal metastases: influence of parenchymal involvement and total tumor volume, vs number or location, on long-term survival. *Arch Surg* 2002; 137(10):1187-92.
9. Abdalla EK, Vauthey JN, Ellis LM, et al. Recurrence and outcomes following hepatic resection, radiofrequency ablation, and combined resection/ablation for colorectal liver metastases. *Ann Surg* 2004; 239(6):818-25; discussion 825-7.
10. Mann CD, Metcalfe MS, Leopardi LN, et al. The clinical risk score: emerging as a

- reliable preoperative prognostic index in hepatectomy for colorectal metastases. *Arch Surg* 2004; 139(11):1168-72.
11. Choti MA, Sitzmann JV, Tiburi MF, et al. Trends in long-term survival following liver resection for hepatic colorectal metastases. *Ann Surg* 2002; 235(6):759-66.
  12. Lazorthes F, Navarro F, Ychou M, Delpero JR, Rougier P; ANAES. Prise en charge thérapeutique des métastases hépatiques des cancers colo-rectaux. *Gastroenterol Clin Biol* 2003; 27: B7-B104.
  13. Adams R. Intraoperative ultrasound examination of the liver: techniques for liver resection and transplantation. In *Surgery of the liver, biliary tract, and pancreas*. LH Blumgart. Saunders Ed. Fourth Edition 2007 p 1484-524.
  14. Altendorf-Hofmann A, Scheele J. A critical review of the major indicators of prognosis after resection of hepatic metastases from colorectal carcinoma. *Surg Oncol Clin N Am* 2003 ;12:165-92.
  15. Kokudo N, Miki Y, Sugai S, et al. Genetic and histological assessment of surgical margins in resected liver metastases from colorectal carcinoma: minimum surgical margins for successful resection. *Arch Surg* 2002;137:833-40.
  16. Elias D, Cavalcanti A, Sabourin JC, Pignon JP, Ducreux M, Lasser P. Results of 136 curative hepatectomies with a safety margin of less than 10 mm for colorectal metastases. *J Surg Oncol* 1998;69:88-93.
  17. Pawlik TM, Scoggins CR, Zorzi D, et al. Effect of surgical margin status on survival and site of recurrence after hepatic resection for colorectal metastases. *Ann Surg* 2005;241:715-22.
  18. Hamady ZZ, Cameron IC, Wyatt J, Prasad RK, Toogood GJ, Lodge JP. Resection margin in patients undergoing hepatectomy for colorectal liver metastasis: a critical appraisal of the 1cm rule. *Eur J Surg Oncol* 2006;32:557-63.
  19. Are C, Gonen M, Zazzali K, et al. The impact of margins on outcome after hepatic resection for colorectal metastasis. *Ann Surg* 2007;246:295-300.
  20. Fong Y, Fortner J, Sun RL, Brennan MF, Blumgart LH. Clinical score for predicting recurrence after hepatic resection for metastatic colorectal cancer: analysis of 1001

consecutive cases. *Ann Surg* 1999;230:309-18.

21. Scheele J, Altendorf-Hofmann A, Stangl R, Schmidt K. Surgical resection of colorectal liver metastases: Gold standard for solitary and radically resectable lesions. *Swiss Surg* 1996; 4:4-17.
22. DeMatteo RP, Palese C, Jarnagin WR, Sun RL, Blumgart LH, Fong Y. Anatomic segmental hepatic resection is superior to wedge resection as an oncologic operation for colorectal liver metastases. *J Gastrointest Surg* 2000;4:178-84.
23. Zorzi D, Mullen JT, Abdalla EK, et al. Comparison between hepatic wedge resection and anatomic resection for colorectal liver metastases. *J Gastrointest Surg* 2006;10:86-94
24. Selzner N, Pestalozzi BC, Kadry Z, Selzner M, Wildermuth S, Clavien PA. Downstaging colorectal liver metastases by concomitant unilateral portal vein ligation and selective intra-arterial chemotherapy. *Br J Surg* 2006;93:587-92.
25. Aussilhou B, Lesurtel M, Sauvanet A, et al. Right portal vein ligation is as efficient as portal vein embolization to induce hypertrophy of the left liver remnant. *J Gastrointest Surg* 2008;12:297-303.
26. Wilms C, Mueller L, Lenk C, et al. Comparative study of portal vein embolization versus portal vein ligation for induction of hypertrophy of the future liver remnant using a mini-pig model. *Ann Surg* 2008;247:825-34.
27. Elias D, Baton O, Sideris L, et al. Hepatectomy plus intraoperative radiofrequency ablation and chemotherapy to treat technically unresectable multiple colorectal liver metastases. *J Surg Oncol* 2005; 90: 36-42.
28. Curley SA, Izzo F, Delrio P, et al. Radiofrequency ablation of unresectable primary and metastatic hepatic malignancies: results in 123 patients. *Ann Surg* 1999; 230: 1-8.
29. Giovannini M. Percutaneous treatment of hepatocellular carcinoma: what is the best technique? *Gastroenterol Clin Biol* 2007; 31: 347-53.
30. Shibata T, Shibata T, Maetani Y, Isoda H, Hiraoka M. Radiofrequency ablation for small hepatocellular carcinoma: prospective comparison of internally cooled

- electrode and expandable electrode. *Radiology* 2006; 238: 346-53.
31. Parikh AA, Curley SA, Fornage BD, Ellis LM. Radiofrequency ablation of hepatic metastases. *Semin Oncol* 2002; 29: 168-82.
  32. Elias D, Manganas D, Benizri E, et al. The trans-metastasis hepatectomy (through metastases previously ablated with radiofrequency): results of a 13-case study of colorectal cancer. *J Surg Oncol* 2006; 93: 8-12.
  33. M Makuuchi, H Hasegawa, S Yamasaki et al. The inferior right hepatic vein ultrasonic demonstration. *Radiology* 1983, 148, 213-17.
  34. D Castaing, J Emond, F Kunstlinger, H Bismuth. Utility of operative ultrasound in the surgery of liver tumors. *Ann Surg* 1986, 204, 600-5.
  35. H Bismuth, D Castaing, OJ Garden. Major hepatic resection under total vascular exclusion. *Ann Surg* 1989;210:13-9.
  36. N Nagasue, S Suehiro, Y Hiromufi. Intraoperative ultrasonography in the surgical treatment of hepatic tumours. *Acta Chir Scand* 1984, 150, 311-6.
  37. Hata S, Imamura H, Aoki T, et al. Value of visual inspection, bimanual palpation, and intraoperative ultrasonography during hepatic resection for liver metastases of colorectal carcinoma. *World J Surg* 2011 Dec; 35(12):2779–87.
  38. Ferrero A, Langella S, Giuliante F, et al. Intraoperative liver ultrasound still affects surgical strategy for patients with colorectal metastases in the modern era. *World J Surg* 2013 Nov;37(11):2655–63.
  39. Tamandl D, Herberger B, Gruenberger B, et al. Adequate preoperative staging rarely leads to a change of intraoperative strategy in patients undergoing surgery for colorectal cancer liver metastases. *Surgery* 2008 May;143(5):648–57.
  40. Wagnetz U, Atri M, Massey C, Wei AC, Metser U. Intraoperative ultrasound of the liver in primary and secondary hepatic malignancies: comparison with preoperative 1.5-T MRI and 64-MDCT. *Am J Roentgenol* 2011 Mar;196(3):562–8.
  41. Sietses C, Meijerink MR, Meijer S, van den Tol MP. The impact of intraoperative ultrasonography on the surgical treatment of patients with colorectal liver metastases. *Surg Endosc* 2010 Aug;24(8):1917–22.

42. Ellsmere J, Kane R, Grinbaum R, Edwards M, Schneider B, Jones D. Intraoperative ultrasonography during planned liver resections: why are we still performing it? *Surg Endosc* 2007 Aug;21(8):1280–3.
43. Kulemann V, Schima W, Tamandl D, Kaczirek K, Gruenberger T, Wrba F, et al. Preoperative detection of colorectal liver metastases in fatty liver: MDCT or MRI? *Eur J Radiol* 2011 Aug;79(2):e1–6.
44. Van Kessel CS, Buckens CFM, van den Bosch MAAJ, van Leeuwen MS, van Hillegersberg R, Verkooijen HM. Preoperative imaging of colorectal liver metastases after neoadjuvant chemotherapy: a meta-analysis. *Ann Surg Oncol* 2012 Sep;19(9):2805–13.
45. Niekel MC, Bipat S, Stoker J. Diagnostic imaging of colorectal liver metastases with CT, MR imaging, FDG PET, and/or FDG PET/CT: a meta-analysis of prospective studies including patients who have not previously undergone treatment. *Radiology* 2010 Dec;257(3):674–84.
46. Lordan JT, Stenson KM, Karanjia ND. The value of intraoperative ultrasound and preoperative imaging, individually and in combination, in liver resection for metastatic colorectal cancer. *Ann R Coll Surg Engl* 2011 Apr;93(3):246–9.
47. Ruzzenente A, Conci S, Iacono C, et al. Usefulness of contrast-enhanced intraoperative ultrasonography (CE-IOUS) in patients with colorectal liver metastases after preoperative chemotherapy. *J Gastrointest Surg* 2013 Feb;17(2):281–9.
48. Trillaud H, Bruel J-M, Valette P-J, et al. Characterization of focal liver lesions with SonoVue-enhanced sonography: international multicenter-study in comparison to CT and MRI. *World J Gastroenterol* 2009 Aug 14;15(30):3748–56.
49. Schulz A, Dormagen JB, Drolsum A, Bjørnbeth BA, Labori KJ, Kløw N-E. Impact of contrast-enhanced intraoperative ultrasound on operation strategy in case of colorectal liver metastasis. *Acta Radio*. 2012 Dec 1;53(10):1081–7.
50. Torzilli G. Advances in the surgical treatment of colorectal cancer liver metastases through ultrasound. *Surg Today* 2011 Sep;41(9):1184–9.
51. Chu DZ, Lang NP, Thompson C, et al. Peritoneal carcinomatosis in non-gynecologic

- malignancy: a prospective study of prognostic factors. *Cancer* 1989 ;63 :364-7.
52. Sadeghi B, Arvieux C, Glehen O, et al. Peritoneal carcinomatosis from non-gynecologic malignancies : results of EVOCAPE 1 multicentric prospective study. *Cancer* 2000 ;88 :358-363
53. Jayne DG, Fook S, Loi C et al. Peritoneal carcinomatosis from colorectal cancer. *Br J Surg* 2002 ;89 :1545-50.
54. Elias D, Raynard B, Farkhondeh F et al. Long-term survival of peritoneal carcinomatosis of colorectal origin. *Gastroenterol Clin Biol* 2006 ;30 :1200-4.
55. Begossi G, Gonzalez-Moreno S, Ortega-Perez G, et al. Cytoreduction and intraperitoneal chemotherapy for the management of peritoneal carcinomatosis, sarcomatosis and mesothelioma. *Eur J Surg Oncol* 2002;28:80-7.
56. Gilly FN, Cotte E, Brigand C, et al. Quantitative prognostic indices in peritoneal carcinomatosis. *Eur J Surg Oncol* 2006;32:597-601.
57. Yonemura Y, De Aretxabala X, Fujimura T, et al. Intraoperative chemohyperthermic peritoneal perfusion as an adjuvant to gastric cancer: final results of a randomized controlled study. *Hepatogastroenterology* 2001;48: 1776-82.
58. Esquivel J. Cytoreductive surgery for peritoneal malignancies development of standards of care for the community. *Surg Oncol Clin N Am* 2007;16:653-66.
59. Dromain C, Leboulleux S, Auperin A, et al. Staging of peritoneal carcinomatosis : enhanced CT vs. PET/CT. *Abdom Imaging* 2008 ;33 :87-93.
60. Sugarbaker PH. Intraperitoneal chemotherapy and cytoreductive surgery for the prevention and treatment of peritoneal carcinomatosis and sarcomatosis. *Semin Surg Oncol* 1998 ;14 :254-61.
61. Elias D, Goéré D, Di Pietroantonio D et al. Results of systematic second-look surgery in patients at high risk of developing colorectal peritoneal carcinomatosis. *Ann Surg* 2008 ;247 :445-50.
62. Lefevre JH, Elias DM. Cytoreductive surgery plus intraperitoneal chemohyperthermia in patients with colorectal cancer at high risk for local-regional recurrence. *Cancer J* 2009;15(3):200-3.

63. Da Silva RG, Sugarbaker PH. Analysis of prognostic factors in seventy patients having a complete cytoreduction plus perioperative intraperitoneal chemotherapy for carcinomatosis from colorectal cancer. *J Am Coll Surg* 2006; 203: 878-86.
64. Mahteme H, Hansson J, Berglund A, et al. Improved survival in patients with peritoneal metastases from colorectal cancer: a preliminary study. *Br J Cancer* 2004; 90: 403-7.
65. Kianmanesh R, Scaringi S, Sabate JM, et al. Iterative cytoreductive surgery associated with hyperthermic intraperitoneal chemotherapy for treatment of peritoneal carcinomatosis of colorectal origin with or without liver metastases. *Ann Surg* 2007; 245: 597-603.
66. Yan TD, Chu F, Links M, et al. Cytoreductive surgery and perioperative intraperitoneal chemotherapy for peritoneal carcinomatosis from colorectal carcinoma: non-mucinous tumour associated with an improved survival. *Eur J Surg Oncol* 2006; 32: 1119-24.
67. Elias D, Goere D, Blot F, et al. Optimization of hyperthermic intraperitoneal chemotherapy with oxaliplatin plus irinotecan at 43 degrees C after complete cytoreductive surgery: mortality and morbidity in 106 consecutive patients. *Ann Surg Oncol* 2007; 14: 1818-24.
68. Verwaal VJ, van Ruth S, de Bree E, et al. Randomized trial of cytoreduction and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy versus systemic chemotherapy and palliative surgery in patients with peritoneal carcinomatosis of colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2003; 21: 3737-43.
69. Glehen O KF, Sugarbaker PH, Elias D, et al. Cytoreductive surgery combined with perioperative intraperitoneal chemotherapy for the management of peritoneal carcinomatosis from colorectal cancer: a multi-institutional study. *J Clin Oncol* 2004; 22: 3284-92.
70. Elias D, Delperro JR, Sideris L, et al. Treatment of peritoneal carcinomatosis from colorectal cancer: impact of complete cytoreductive surgery and difficulties in conducting randomized trials. *Ann Surg Oncol* 2004; 11: 518-21.
71. Glehen O MF, Gilly FN. Peritoneal carcinomatosis from digestive tract cancer: new

- management by cytoreductive surgery and intraperitoneal chemohyperthermia. *Lancet Oncol* 2004; 5: 219-28.
72. Baratti D, Kusamura S, Deraco M. The Fifth International Workshop on Peritoneal Surface Malignancy (Milan, Italy, December 4-6, 2006): methodology of disease specific consensus. *J Surg Oncol* 2008; 98: 258-62.
73. Elias DM, Ouellet JF. Intraperitoneal chemohyperthermia: rationale, technique, indications, and results. *Surg Oncol Clin N Am* 2001; 10: 915-33.
74. Rizo P, Dinten JM, Texier I. *BIOFUTUR* 308 (3) 2010 35-37.
75. Razkin J et al. (2006) *Chem Med Chem* 1, 1069-72.
76. T Desmettre. D.U. angiographie & pathologies rétinienne Lariboisière, Centre d'Imagerie & de Laser 1998-1999.
77. Yannuzzi LA, Slakter JS, Sorenson JA, Guyer DR, Orlock DA. Digital indocyanine green videoangiography and choroidal neovascularization. *Retina* 1992; 12:191-223.
78. Miller H, Miller B, Ryan SJ. The role of retinal pigment epithelium in the involution of subretinal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis. Sci* 1993; 18:2720-9.
79. Scheider A, Voeth A, Kaboth A, Neuhauser L, Ger J. Fluorescence characteristics of indocyanine green in the normal choroid and in subretinal neovascular membranes. *Ophthalmol* 1992;1(1):7-11.
80. Van den Biesen PR, Jongsma FH, Tangelder GJ, Slaaf DW. Yield of fluorescence from indocyanine green in plasma and flowing blood. *Ann Biomed Eng* 1995 Jul-Aug;23(4):475-81.
81. Fox IJ, Wood EH. Indocyanine green: physical and physiologic properties. *Proc Staff Meet Mayo Clin* 1960 Dec 7;35:732-44.
82. Benson RC, Kues HA. Fluorescence properties of indocyanine green as related to angiography. *Phys Med Biol* 1978;23: 159-63.
83. Kogure K, David NJ, Yamanouchi U, Choromokos E. Infrared absorption angiography of the fundus circulation. *Arch Ophthalmol* 1970;83:204-14.

84. Flower RW, Hochheimer BF. A clinical technique and apparatus for simultaneous angiography of the separate retinal and choroidal circulations. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1973;12: 248-61.
85. Cherrick GR, Stein SW, Leevy CM, Davidson CS. Indocyanine green: Observations on its physical properties, plasma decay, and hepatic extraction. *J Clin Invest* 1960;39:592-600.
86. Laboratoires SERB 53, rue Villiers-de-l'Isle-Adam. 75020 Paris. AMM 3400936084179 (2003, RCP rév 14.11.2005).
87. Kang SW, Chung SE, Shin WJ, Lee JH. Polypoidal choroidal vasculopathy and late geographic hyperfluorescence on indocyanine green angiography. *Br J Ophthalmol* 2009;93:759–64.
88. Tanaka E, Chen FY, Flaumenhaft R, Graham GJ, Laurence RG, Frangioni JV. Real-time assessment of cardiac perfusion, coronary angiography, and acute intravascular thrombi using dual-channel near-infrared fluorescence imaging. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2009;138:133–40.
89. Deja M, Ahlers O, Macguill M, et al Changes in hepatic blood flow during whole body hyperthermia. *Int J Hyperthermia* 2010;26:95–100.
90. Sakka SG, Meier-Hellmann A. Non-invasive liver function monitoring by indocyanine green plasma disappearance rate in critically ill patients. *Int J Intensive Care* 2002; 9(2):66-72.
91. Ranganathan R, Madanmohan S, Kesavan A, et al. Nanomedicine : towards development of patient-friendly drug-delivery systems for oncological applications. *International Journal of Nanomedicine* 2012;7:1043-60.
92. Park. K. Polysaccharide-based near-infrared fluorescence nanoprobes for cancer diagnosis. *Quant Imaging Med Surg* 2012;2(2):106-13.
93. Peracchia M.T., Fattal E. Desmaele D., Besnard M., et al. Stealth (R) PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles for intravenous administration and splenic targeting. *J Control Release* 1999, 60 : 121-12.
94. H. L. Jun, W. R. Keun, M. -C. Kook et al. Feasibility of laparoscopic sentinel basin

- dissection for limited resection in early gastric cancer. *Journal of Surgical Oncology* 2008, vol. 98, no. 5, pp. 331–35.
95. Y.-J. Lee, W. S. Ha, S. T. Park, S. K. Choi, S. C. Hong, and J. W. Park. Which biopsy method is more suitable between a basin dissection and pick-up biopsy for sentinel nodes in laparoscopic sentinel-node navigation surgery (LSNNS) for gastric cancer? *Journal of Laparoendoscopic and Advanced Surgical Techniques* 2008 vol. 18no.3pp. 357–63.
96. Y. Tajima, K. Yamazaki, Y. Masuda et al. Sentinel node mapping guided by indocyanine green fluorescence imaging in gastric cancer. *Annals of Surgery* 2009. vol 249(1):58–62.
97. K. Harada, M. Miwa, T. Fukuyo, S. Watanabe, S. Enosawa, and T. Chiba. ICG fluorescence endoscope for visualization of the placental vascular network. *Minimally Invasive Therapy and Allied Technologies* 2009;18(1)1–5.
98. I. Miyashiro, K. Kishi, M. Yano et al. Laparoscopic detection of sentinel node in gastric cancer surgery by indocyanine green fluorescence imaging. *Surgical Endoscopy and Other Interventional Techniques* 2011; 25:5:1672–76.
99. S.-H. Jeong, Y.-J. Lee, E.-H. Lee et al. Gastric lymphatic basin dissection for sentinel node biopsy using hybrid natural orifice transluminan endoscopic surgery (NOTES) *Minimally Invasive Therapy & Allied Technologies* 2010; 19:5:299–303.
100. Hirche C, Mohr Z, Kneif S, Doniga S, Murawa D, Strik M, Hünerbein M. Ultrastaging of colon cancer by sentinel node biopsy using fluorescence navigation with indocyanine green. *Int J Colorectal Dis* 2011, 11 : 1306-11.
101. Aoki T, Yasuda D, Shimizu Y et al. Image-guided liver mapping using fluorescence navigation system with indocyanine green for anatomical hepatic resection. *World J Surg* 2008; 32: 1763–7.
102. K. Gotoh, T. Yamada, O. Ishikawa et al. A novel image guided surgery of hepatocellular carcinoma by indocyanine green fluorescence imaging navigation. *JSO* 2009;100(1):75–9.
103. Ishizawa T, Fukushima N, Shibahara J et al. Real time identification of liver cancers by using indocyanine green fluorescent imaging. *Cancer* 2009 ;115:2491–

- 2504.
104. Uchiyama K, Ueno M, Ozawa S, Kiriya S, Shigekawa Y, Yamaue H. Combined Use of Contrast-Enhanced Intraoperative Ultrasonography and a Fluorescence Navigation System for Identifying Hepatic Metastases. *World J Surg* (2010) 34:2953–59.
  105. Gagner M, Rheault M, Dubuc J. Laparoscopic partial hepatectomy for liver tumor. *Surg Endosc* 1992;6:97-8.
  106. Belli G, Fantini C, D’Agostino A, et al. Laparoscopic versus open liver resection for hepatocellular carcinoma in patients with histologically proven cirrhosis: short- and middle-term results. *Surg Endosc* 2007;21:2004-11.
  107. Kobayashi H, Mitsunaga M, Choyke P et al. Near infrared fluorescence-guided real-time endoscopic detection of peritoneal ovarian cancer nodules using intravenously injected indocyanine green. *WMIC* 2011.
  108. Gioux S, Coutard JG, Berger M, et al. FluoSTIC: miniaturized fluorescence image-guided surgery system. *J Biomed Opt* 2012 Oct;17(10):109802.
  109. Hutteman M, Mieog JS, van der Vorst JR, Dijkstra J, Kuppen PJ, et al. Intraoperative near-infrared fluorescence imaging of colorectal metastases targeting integrin alpha(v)beta(3) expression in a syngeneic rat model. *Eur J Surg Oncol*. 2011 37: 252–7.
  110. Hold D, Okusanya O, Judy R, et al. Intraoperative near-infrared imaging can distinguish cancer from normal tissue but not inflammation. *PLoS One* 2014 Jul 29;9(7):e103342.
  111. Maggiori L, Elias D. Curative treatment of colorectal peritoneal carcinomatosis: current status and future trends. *EJSO* 2010;36(7):599-603.