



UNIVERSITE DE BOURGOGNE

UFR Médecine

THESE

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'université de Bourgogne

Discipline : Médecine

Soutenue par Pierre-Benoît PAGÈS

Le 3 juillet 2014

***TECHNIQUE DE PERFUSION PULMONAIRE
ISOLEE DE CHIMIOOTHERAPIE CHEZ LE PORC***

**Centre de Recherche INSERM 866
Lipides, Nutrition, Cancer
Equipe AVENIR**

**Directeur de Recherche :
Pr Alain Bernard
Co-encadrants :
Pr François Ghiringhelli
Dr Olivier Bouchot**

Jury :

**Thomas, Pascal-Alexandre, PU-PH
Dahan, Marcel, PU-PH,
Vénissac Nicolas, PU-PH
Chauffert Bruno, PU-PH
Ortega-Deballon Pablo, PU-PH
Ghiringhelli François, PU-PH**

**Président
Rapporteur
Rapporteur
Comité de suivi
Comité de suivi**



UNIVERSITE DE BOURGOGNE

UFR Médecine

THESE

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'université de Bourgogne

Discipline : Médecine

Soutenue par Pierre-Benoît PAGÈS

Le 3 juillet 2014

***TECHNIQUE DE PERFUSION PULMONAIRE
ISOLEE DE CHIMIOOTHERAPIE CHEZ LE PORC***

**Centre de Recherche INSERM 866
Lipides, Nutrition, Cancer
Equipe AVENIR**

**Directeur de Recherche :
Pr Alain Bernard
Co-encadrants :
Pr François Ghiringhelli
Dr Olivier Bouchot**

Jury :

**Thomas, Pascal-Alexandre, PU-PH
Dahan, Marcel, PU-PH,
Vénissac Nicolas, PU-PH
Chauffert Bruno, PU-PH
Ortega-Deballon Pablo, PU-PH
Ghiringhelli François, PU-PH**

**Président
Rapporteur
Rapporteur
Comité de suivi
Comité de suivi**

JURY

Thomas, Pascal-Alexandre, PU-PH, chirurgien thoracique, Université de la Méditerranée

Dahan, Marcel, PU-PH, chirurgien thoracique, Université de Toulouse

Vénissac Nicolas, PU-PH, chirurgien thoracique, Université de Nice

Chauffert Bruno, PU-PH, oncologue, Université de Picardie

Ortega-Deballon Pablo, PU-PH, chirurgien viscéral, Université de Bourgogne

Ghiringhelli François, PU-PH, oncologue, Université de Bourgogne

RESUME

Introduction : La perfusion pulmonaire isolée (PPI) est une technique expérimentale dont l'objectif est d'administrer de fortes doses de chimiothérapie dans le poumon sans effets secondaires systémiques. Cette thèse s'est déroulée en trois étapes : première étape, déterminer in vitro la chimiothérapie la plus efficace en 30 minutes sur les cellules de cancers colo-rectaux (CCR). Deuxième étape, mettre au point la technique de PPI chez le porc. Troisième étape, mener une étude d'escalade de dose de chimiothérapie chez le porc en PPI.

Méthodes : Première étape, des tests de cytotoxicité in vitro ont été menés sur un panel de cellules d'adénocarcinome colique humain avec les drogues de chimiothérapie les plus efficaces dans les essais cliniques. Deuxième étape, des porcs étaient traités par perfusion de chimiothérapie dans le poumon gauche isolé de la circulation générale pendant 30 minutes puis maintenus en vie pendant un mois. Troisième étape, les doses de chimiothérapie injectées étaient augmentées par palier jusqu'à obtenir une toxicité aigüe ou le décès des animaux.

Résultats : La gemcitabine (GEM) fut la drogue ayant la plus grande efficacité anti-tumorale pour un traitement de 30 min. La PPI de GEM permit d'obtenir des concentrations élevées de GEM dans le parenchyme pulmonaire et la survie des animaux pendant un mois. Il n'existait pas de fuites systémiques de GEM. L'augmentation des doses de GEM permis de déterminer la dose maximale toxique à 320 mg et la toxicité limitant la dose à 640 mg.

Conclusions : La technique de PPI avec la GEM est une technique sûre et reproductible permettant d'obtenir de fortes concentrations de GEM dans le parenchyme pulmonaire.

Mots-Clefs : Chimiothérapie, organe isolé, métastases, cancer colorectaux, gemcitabine, dose maximale toxique.

ABSTRACT

Introduction: The isolated lung perfusion (ILP) is an experimental technique which main objective is to deliver high dose of cytotoxic agent to the lung tissue without systemic exposure. The thesis took place in three stages: first stage, setting in vitro the chemotherapy the most efficient against colorectal cancer (CCR) cells in 30 min. Second stage, develop the ILP technique in a pig model. Third stage, lead a dose escalation study with chemotherapy by ILP.

Methods: First stage, efficacy of various cytotoxic molecules against a panel of human CCR cell lines was tested in vitro after a 30-minute exposure. Second stage, pigs were treated with chemotherapy delivered by ILP during 30 minutes and kept alive during a month. Third stage, chemotherapy doses were increase in order to obtain acute toxicity or death of animals.

Results: Gemcitabine (GEM) was the most efficient drug against CCR cells in 30 minutes. ILP with GEM permit to maintain high concentration in the lung parenchyma and pigs survival during one month. No systemic leaks were detected. Dose increase of GEM conduct to determine the maximal tolerated dose of GEM by ILP to 320 mg.

Conclusions: ILP with GEM is a safety and reproducible technique allowing high GEM concentrations in the lung tissue.

Key-words: Chemotherapy, isolated organ, metastasis, colorectal cancer, gemcitabine, maximal tolerated dose.

TABLE DES MATIERES

Introduction 21

I-HISTORIQUE DE LA TECHNIQUE :	24
Ia-Chez l'homme :	24
Ib-Chez l'animal :	29
II-OBJECTIFS :	37

Partie I :Expérimentations in vitro 39

I-MATERIELS ET METHODES :	40
Ia-Culture cellulaire :	40
Ib-Traitement des cellules :	40
Ic-Test de viabilité du tapis cellulaire :	41
Id-Chimiothérapies :	41
II-METHODE STATISTIQUE :	43
III-RESULTATS :	44
IV-DISCUSSION :	48

Partie II :Mise au point de la technique de perfusion pulmonaire isolée chez le porc 51

I-MATERIELS ET METHODES :	52
Ia-In Vivo :	52
Ib-In vitro :	60
II-METHODE STATISTIQUE :	63
III-RESULTATS:	64
IIIa-In vivo :	64
IIIb-In vitro :	67
IIIc-Problèmes rencontrés pendant la mise au point de la technique:	71
IV-DISCUSSION :	73

Partie III :Etude d'escalade de dose de chimiothérapie administrée par perfusion pulmonaire isolée chez le porc..... 77

I-MATERIELS ET METHODES :	78
Ia-In Vivo :	78
Ib-In vitro :	81

II-METHODE STATISTIQUE :	84
III-RESULTATS:	85
IIIa-In vivo :	85
IIIb_In vitro :	89
IIIc-Problèmes rencontrés pendant l'étude d'escalade de dose de chimiothérapie :	97
IV-DISCUSSION :	99
Conclusions & Perspectives:	105
Bibliographie :	109
Annexes:	119

LISTES DES FIGURES

Figure 1 : Technique de canulation permettant la perfusion des deux poumons.	25
Figure 2 : Technique de canulation pour la PPI sur un seul poumon d'après Burt et al. [23]	25
Figure 3 : Valeurs de concentrations responsables de l'inhibition de 50 % (IC50) de la croissance cellulaire des différentes chimiothérapies selon les lignées de CCR	44
Figure 4 : Test de viabilité cellulaire des différentes drogues de chimiothérapies sur les lignées de cellules de CCR. La viabilité est exprimée en % par rapport au témoin, les concentrations de chimiothérapie sont exprimées en µg/ml.....	46
Figure 5 : Test de viabilité cellulaire de l'association Gemcitabine-Raltitrexed sur les lignées de cellules de CCR.	46
Figure 6 : Test de viabilité de la Gemcitabine sur les différentes lignées de CCR en utilisant des macromolécules comme milieu de dilution.	47
Figure 7 : Animal en fin de PPI avec drainage thoracique en place	53
Figure 8 : Technique de canulation finale de la technique de PPI dans notre étude.....	55
Figure 9 : Vue peropératoire de la constitution de la bourse au prolène® 4.0 sur le tronc de l'APG préalablement disséqué.	56
Figure 10: Vue Peropératoire du tronc de l'APG après mise en place de la canule de perfusion artérielle et du cathéter de mesure de la pression artérielle.....	56
Figure 11: A- Pression de perfusion du poumon gauche isolé (mmHg) avec des macromolécules, 20µg/ml de GEM, 100 µg/ml de GEM pendant 30 min B- Débit de perfusion du poumon gauche isolé (ml/min) avec des macromolécules (580 ± 178,88 ml/min), 20 µg/ml de GEM (257,14 ± 202,62 ml/min), 100 µg/ml (210 ± 138,92 ml/min) pendant 30 min (p=0,0055) C- Pression moyenne de l'artère pulmonaire gauche (mmHg) avant et après PP avec des macromolécules, 20 µg/ml de GEM et 100 µg/ml de GEM pendant 30 min (p=0,7187).	66
Figure 12: Viabilité des lignées cellulaires après 30 min d'exposition au liquide effluent du circuit pour une dose de GEM de 20 µg ou 100 µg/ml.	67
Figure 13 : Coupes histologiques présentant les différents types de lésions rencontrées en fonction d'une coupe de tissu pulmonaire normal (A). (B) Œdème péri-bronchique. (C) Œdème péri-bronchique et infiltration cellulaire interstitielle légère. (D) Infiltration cellulaire interstitielle modérée. (E) Infiltration cellulaire péri-vasculaire et infiltration cellulaire interstitielle. (F) Infiltration cellulaire alvéolaire, interstitielle et péri-vasculaire. (G) Lésions	

de barotraumatisme et infiltration cellulaire alvéolaire. (H) Lésions de barotraumatisme et infiltration cellulaire interstitielle.....	70
Figure 14 : Saturation artérielle en oxygène en % pendant la procédure de PPI puis au déclampage.....	86
Figure 15 : A- Pression de perfusion du poumon gauche isolé (mmHg) en fonction du temps B- Pression de perfusion du poumon gauche isolé (mmHg) en fonction de la dose de GEM perfusée pendant 30 min	87
Figure 16: A- Débit de perfusion du poumon gauche isolé (ml/min) en fonction du temps B- Débit de perfusion du poumon gauche isolé (ml/min) en fonction de la dose de GEM perfusée pendant 30 min.	88
Figure 17 : Concentration de GEM dans le parenchyme pulmonaire en fin de PPI en fonction de la dose de GEM injectée dans le circuit de CEC.....	90
Figure 18 : Concentration de GEM dans le circuit de CEC en fin de PPI en fonction de la dose de GEM injectée dans le circuit de CEC.....	91
Figure 19: Evolution du score histologique de Chiang modifié en fonction de la dose de GEM administrée : A : Score histologique de Chiang modifié en fin de PPI ; B : Score histologique de Chiang modifié après un mois de survie.	92
Figure 20 : Coupes histologiques présentant les différents types de lésions rencontrées : (A) hétérogénéité de répartition des plaques d'hypercellularité, (B) très légère infiltration interstitielle, (C) & (D) épaissement des cloisons et infiltration polymorphe dans les alvéoles, (E) & (F) infiltration majeure riche en macrophages et condensation du parenchyme pulmonaire.	94
Figure 21 : Score histologique de Chiang modifié en fin de PPI; A : Variation du score histologique du lobe supérieur en fonction de la variation du débit de perfusion de l'APG en ml/min ; B : Variation du score histologique du lobe inférieur en fonction de la variation du débit de perfusion de l'APG en ml/min	95
Figure 22 : Score histologique de Chiang modifié après un mois de survie : A : Variation du score histologique du lobe supérieur en fonction de la variation du débit de perfusion de l'APG en ml/min. B : Variation du score histologique du lobe inférieur en fonction de la variation du débit de perfusion de l'APG en ml/min.	96

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Résumé des études portant sur la PPI menées chez l'homme	28
Tableau 2 : Résumé des études évaluant l'efficacité de la PPI sur les cellules de CCR	31
Tableau 3 : Statut mutationnel des cellules de CCR testées in vitro	40
Tableau 4 : Valeurs de concentrations responsables de l'inhibition de 50 % (IC50) de la croissance cellulaire des différentes chimiothérapies selon les lignées de CCR	45
Tableau 5 : Paramètres hémodynamiques et respiratoires pendant la PPI.....	65
Tableau 6 : Recherche de fuites de GEM dans la circulation systémique en µg/ml.....	68
Tableau 7 : Score histologique de Chiang à la fin de la PPI et à un mois selon la dose de GEM perfusée.	69
Tableau 8 : Paramètres biologiques à la fin de la PPI et à 28 jours	71
Tableau 9 : Plan expérimental de l'étude.....	79
Tableau 10 : Concentration de GEM en fin de PPI dans le parenchyme pulmonaire en fonction de la dose de GEM injectée.....	89
Tableau 11 : Concentration de GEM en fin de PPI dans le circuit de CEC et dans la circulation systémique en fonction de la dose de GEM injectée.....	90
Tableau 12 : Score histologique de Chiang selon la dose de GEM perfusée en fin de PPI et après 28 jours de survie.	93
Tableau 13 : Paramètres biologiques après 28 jours de survie en fonction de la dose de GEM administré.	97

ABBREVIATIONS

APG : Artère Pulmonaire Gauche

BPM : Battements Par Minute

CEC : Circulation Extra-Corporelle

DTM : Dose Maximum Tolérable

EFR : Epreuves Fonctionnelles Respiratoires

FC : Fréquence cardiaque

GEM : Gemcitabine

I/R : Ischémie-Reperfusion

OAP: Œdème Aigu Pulmonaire

PBS: Phosphate Buffered Saline

PEEP: Positive End-Expiratory Pressure

PMAPG : Pression Moyenne de l'Artère Pulmonaire Gauche

PPI : Perfusion Pulmonaire Isolée

PAD : Pression artérielle Diastolique

PAM : Pression artérielle Moyenne

PAP : Pression artérielle Pulmonaire

PAS : Pression artérielle Systolique

PCO2 : Pression partielle en CO2

SaO2 : Saturation artérielle en oxygène

SDRA : Syndrome de Détresse Respiratoire Aigue

THU : TetraHydroUridine

VEMS : Volume Expiratoire Maximal Seconde

VP : Veine Pulmonaire

Ce travail a bénéficié du financement de la Ligue contre le Cancer (comité Grand EST) en 2011, ainsi que des fonds alloués par le Centre Hospitalier Universitaire de Dijon et le Conseil Régional de Bourgogne.

L'auteur remercie particulièrement le Pr Alain Bernard pour son soutien sans faille et sa confiance depuis tant d'années, le Pr François Ghiringhelli pour son encadrement tout au long de ce travail, le Dr Olivier Bouchot pour son enseignement de la rigueur chirurgicale, les Dr Guy Magnin et Philippe Pointaire (Service d'anesthésie Réanimation, CHU de Dijon) sans qui rien n'aurait été possible; le Dr Olivier Facy (Service de Chirurgie Digestive, CHU de Dijon) pour nous avoir initié à la chirurgie porcine et montré la voie de la recherche expérimentale, le Dr Valentin Derangère (laboratoire Inserm 866) pour son aide si précieuse dans les expérimentations; le Dr Céline Charron-Barra (Service d'anatomopathologie, Centre Georges François Leclerc, Dijon) pour la lecture des lames et les photos de microscopie fournies, l'équipe d'Agrosup de Pouilly en Auxois pour nous avoir accueilli pendant toutes ces années, l'équipe Inserm 866 (Faculté de Médecine et de Pharmacie, Dijon).

Ce travail est dédié à Matthieu & Romain....

Introduction

Le poumon est un site métastatique fréquent des cancers du côlon et du rectum. Lors du diagnostic de cancer colo-rectal (CCR), 19% des patients présentent des métastases, parmi lesquelles 11% sont localisées au niveau pulmonaire [1]. La survie à 5 ans des patients présentant un CCR avec des métastases pulmonaires varie de 5 à 50 % en fonction de la possibilité de réaliser une résection carcinologiquement complète [2-7]. Malgré une résection chirurgicale complète, une récurrence pulmonaire survient chez plus de 40% des patients, probablement liée à l'existence de micrométastases déjà présentes lors du geste de résection initial mais non décelables à ce moment-là [3]. Le recours à une chimiothérapie néoadjuvante ou adjuvante associée à la chirurgie des métastases pulmonaires permet d'améliorer la survie sans progression mais n'améliore pas la survie globale [8]. Et le recours à des doses élevées de chimiothérapie est associé à une toxicité systémique majeure [9].

Le contrôle de la tumeur initiale ainsi que des métastases à distance a toujours été la pierre angulaire des traitements à visée curative des cancers. De plus, de récents travaux ont permis de montrer que l'apparition de métastases se fait par un processus multidirectionnel dans lequel les cellules cancéreuses colonisent des sites à distance mais également la tumeur initiale elle-même. Ce processus tardif, connu sous le nom de «self-seeding », a été validé dans divers modèles expérimentaux [10], et constitue un argument fort pour le contrôle local de la maladie métastatique.

Dans le but de diminuer le risque de récurrence des métastases pulmonaires des CCR certains auteurs ont développé la technique de perfusion pulmonaire isolée (PPI) [11], qui permet d'augmenter la dose de chimiothérapie délivrée au poumon sans toxicité systémique. Il s'agit d'une méthode expérimentale basée sur l'exclusion de la circulation pulmonaire par le clampage de l'artère pulmonaire et des deux veines pulmonaires [11], suivie par la perfusion de chimiothérapie par l'artère pulmonaire. La chimiothérapie est alors récupérée par les canules placées dans les veines pulmonaires. Cette technique permet ainsi l'administration de fortes doses de médicaments dans le poumon sans effets secondaires systémiques [11]. Cette technique a montré son efficacité et son innocuité chez des modèles murins présentant des métastases pulmonaires de CCR [12-16].

I-HISTORIQUE DE LA TECHNIQUE :

Les travaux expérimentaux étudiant la technique de PPI ont été menés parallèlement chez l'homme (Tableau 1) et chez l'animal (Tableau 2).

Ia-Chez l'homme :

La perfusion pulmonaire isolée (PPI) fut décrite pour la première fois en 1958 par O. Creech *et al.* [17]. Il perfusa les deux poumons simultanément par l'utilisation de deux circuits de circulation extracorporelle (un pour la circulation pulmonaire et l'autre pour la circulation systémique) (Figure 1). Deux patients décédèrent dans les suites l'intervention, un des patients donna l'impression d'une réponse clinique, mais sans preuve objective [18]. Ce fut le premier essai de PPI chez l'homme dans l'optique du traitement du cancer sans qu'aucune étude préalable n'ait été menée chez l'animal.

Pierpont et Blades en 1960, puis Jacobs en 1961, décrivirent la technique sur un seul poumon isolé (Figure 2). Ils ne mirent pas en évidence de fuites de chimiothérapie dans la circulation systémique grâce à une étude radio-isotopique [19-20].

De 1982 à 1991, Johnston *et al.* conduisirent un essai clinique sur huit patients : quatre présentaient un carcinome bronchiolo-alvéolaire et quatre des métastases pulmonaires d'un sarcome [21]. Trois patients bénéficièrent d'une perfusion seulement à gauche et cinq patients d'une perfusion totale. Ils perfusèrent de l'adriamycine chez six patients, et du cisplatine chez deux patients, pendant une période de 45 min à 1H. En post-opératoire deux patients présentèrent des complications majeures : une pneumopathie et une insuffisance respiratoire aiguë nécessitant une ré-intubation. Aucune réponse complète ni même partielle ne fut observée, probablement en rapport avec les faibles doses de chimiothérapie utilisée et tous les patients décédèrent dans les 23 à 151 jours suivants la procédure.

En 1984, Minchin *et al.* rapportèrent un essai de PPI chez trois patients présentant des métastases pulmonaires non-résécables de sarcome [22]. Ils perfusèrent de la doxorubicine à 25°C et mirent en évidence une augmentation de la captation de la doxorubicine dans le parenchyme pulmonaire par rapport à la tumeur. Aucune réponse ne fut décrite.

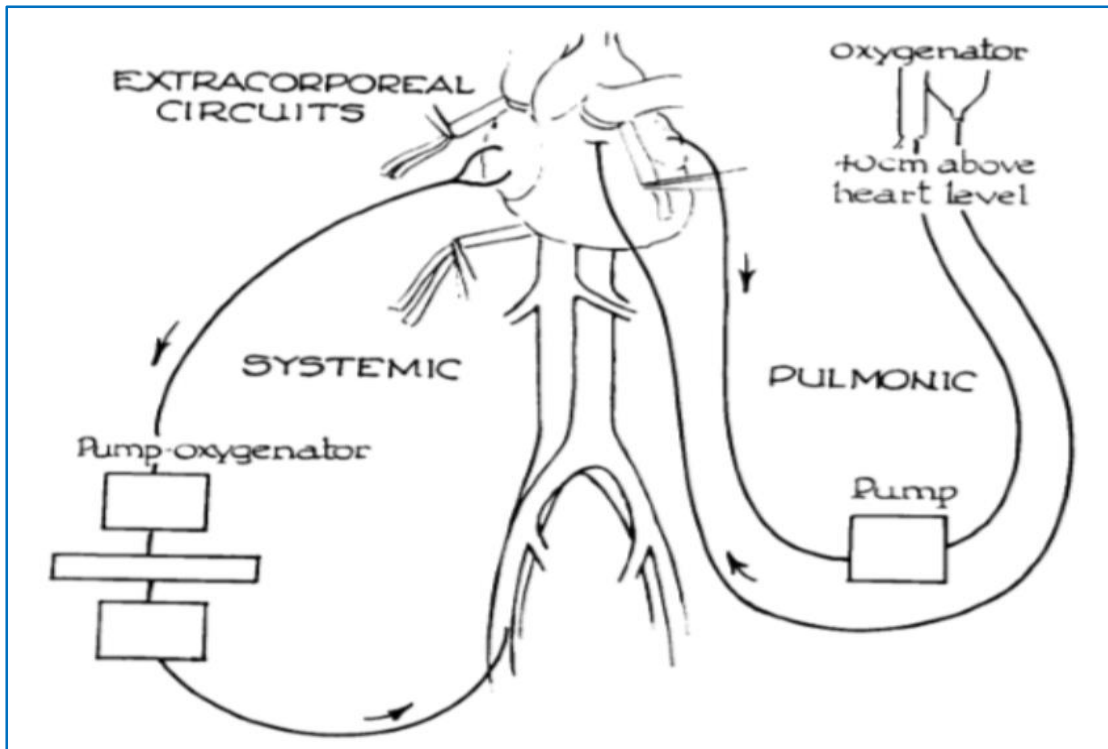


Figure 1 : Technique de canulation permettant la perfusion des deux poumons.
Deux circulations extracorporelles sont nécessaires pour isoler totalement les poumons d'après Creech *et al.* [17].

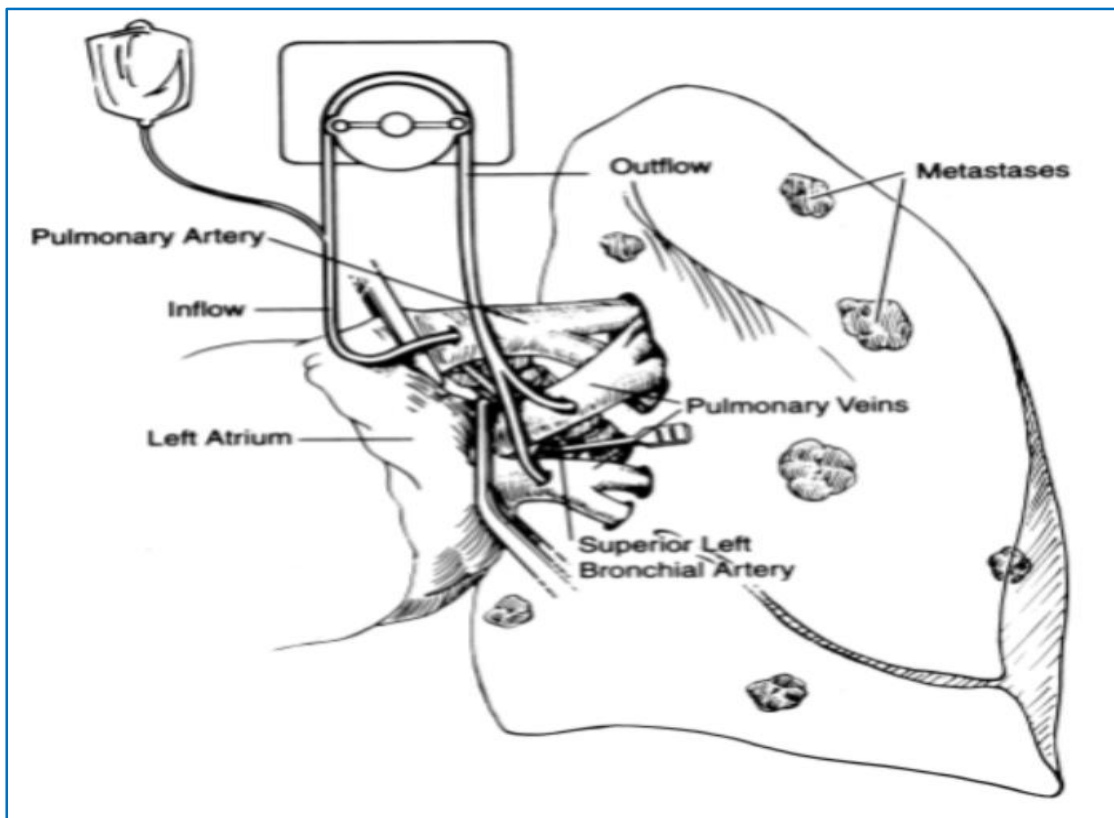


Figure 2 : Technique de canulation pour la PPI sur un seul poumon d'après Burt *et al.* [23]

En 1996, Ratto *et al.* utilisèrent la PPI unilatérale sur six patients présentant des métastases pulmonaires de sarcomes, deux patients bénéficièrent d'une procédure à gauche puis à droite à quatre semaines d'intervalle [24]. Ils perfusèrent du cisplatine pendant une période de 1H, sans fuites systémiques mises en évidence. Aucune complication per-opératoire ne fut décrite. En post-opératoire deux patients développèrent des signes de congestion pulmonaire à l'imagerie mais sans conséquences cliniques.

La même année, Pass *et al.* rapportèrent un essai clinique sur vingt patients présentant des métastases pulmonaires non résécables de sarcome et de mélanome [25]. Ils réalisèrent une PPI unilatérale, en utilisant du TNF- α , de l'interféron- γ et une hyperthermie modérée à 42°C. Aucun décès ne survint en per-opératoire. L'étude des paramètres hémodynamiques mit en évidence une augmentation des pressions de perfusion pulmonaire du côté traité pendant la perfusion avec un retour à l'état antérieur à la fin de la procédure.

En 2000, Burt *et al.* rapportèrent un essai clinique sur huit patients présentant des métastases pulmonaires non résécables de sarcomes, traités par PPI utilisant de la doxorubicine [23]. Les analyses mirent en évidence une relation directe entre la concentration dans le parenchyme pulmonaire et celle dans le perfusat. Ils trouvèrent également des concentrations en doxorubicine significativement plus basses dans les métastases que dans le parenchyme sain. Aucune fuite systémique ne fut décrite. Les épreuves fonctionnelles respiratoires (EFR) post-opératoires montrèrent une diminution significative du volume expiratoire maximal seconde (VEMS) ainsi que de la capacité de diffusion pulmonaire. Il n'y eut aucune réponse partielle ou complète.

La dose maximale tolérable de doxorubicine fut définie à 40 mg/m² du fait de l'apparition d'une pneumopathie sévère chez le patient traité au palier de dose de 80 mg/m².

En 2001, Schröder *et al.* rapportèrent un essai clinique de PPI chez quatre patients présentant des métastases pulmonaires non résécables de sarcome [26]. Ils pratiquèrent une PPI en hyperthermie à 41°C en injectant du cisplatine. Il n'y eut aucune fuite systémique. Tous les patients présentèrent en post-opératoire un œdème aigu pulmonaire (OAP) transitoire. Après un suivi médian de 12 mois trois des patients étaient vivants sans récurrence et le quatrième était décédé de métastases pulmonaires.

En 2002, Putman *et al.* rapportèrent un essai de phase I chez seize patients présentant des métastases pulmonaires non résécables [27]. Ils perfusèrent de la doxorubicine par PPI sans fuite systémique détectable. Deux patients présentèrent une toxicité pulmonaire sévère pour des doses de 75 mg/m², ils définirent ainsi la dose maximale tolérée à 60 mg/m².

En 2004, Hendriks *et al.* rapportèrent les résultats d'un essai de phase I chez vingt-trois patients présentant des métastases pulmonaires résécables de diverses origines [28]. Ils pratiquèrent une PPI avec du melphalan. Deux patients ayant reçu une dose de 60mg présentèrent un OAP. Les auteurs définissent ainsi la dose maximale à 60 mg à 37°C et à 45 mg pour une température de 42°C. Trois des patients ayant bénéficié d'une procédure en hyperthermie développèrent des complications à type d'empyème, de rhabdomyolyse et de saignement post-opératoire.

En 2007, Grootenboers *et al.* rapportèrent les données de pharmacocinétique de l'étude menée en collaboration avec Hendriks *et al.* [29,30]. L'étude porta sur 21 patients ayant bénéficié de 29 procédures de PPI pour des métastases pulmonaires uni ou bilatérales de cancers d'étiologies variables. L'ensemble des patients furent perfusés avec du melphalan. Les résultats mirent en évidence une relation statistiquement significative entre la concentration en melphalan du perfusat et celle retrouvée dans le parenchyme pulmonaire. Ils ne trouvèrent pas de corrélation statistiquement significative entre la concentration en melphalan du perfusat et celle du tissu tumoral. De même ils ne trouvèrent pas de corrélation statistiquement significative entre la concentration en melphalan du parenchyme pulmonaire et du tissu tumoral.

Les résultats à long terme de cet essai multicentrique furent publiés en 2010: 6 patients étaient vivants sans récurrence, seize présentèrent des récurrences parmi lesquels onze étaient décédés, et un patient fut perdu de vue. Le taux de survie global à 5 ans était de 54,8 ± 10,6%, le taux de survie sans récurrence à 5 ans était de 27,5 ± 9,5%, la médiane de survie était de 84 mois [30].

Année de publication	Auteur	Nombre de patients	Drogues de chimiothérapie	Durée de perfusion (min)	Température du poumon (°C)	Histologie des métastases
1958	Creech et al. [17]	24	Moutarde à l'azote	NS	NS	Mélanome, sarcome, carcinomes divers
1984	Minchin et al. [22]	3	Doxorubicine	50	37	Sarcome
1995	Johnston et al. [21]	8	Doxorubicine, Cisplatine	45-60	25-40	Sarcome
1996	Pass et al. [25]	15	TNF α	90	38-39,5	Sarcome d'Ewing, Mélanome
1996	Ratto et al. [24]	6	Cisplatine	60	37	Sarcome
2000	Burt et al. [23]	10	Doxorubicine	20	37	Sarcome
2002	Putman et al. [27]	16	Doxorubicine	NS	37	Sarcome
2002	Schröder et al. [26]	4	Cisplatine	20-40	41	Ostéosarcome, Rhabdomyosarcome
2004	Hendriks et al. [28]	16	Melphalan	30	37-42	CCR, Cancer du rein, Sarcome
2006	Grootenboers et al. [29]	7	Melphalan	30	42	CCR, Cancer du rein, Sarcome

Tableau 1 : Résumé des études portant sur la PPI menées chez l'homme

NS : Non spécifié

En résumé, la PPI est une technique faisable, reproductible, exposant à un risque de complications raisonnables compte-tenu du bénéfice potentiel. Cependant les séries présentes ont de faibles effectifs, avec des taux de réponse mal établis et des méthodes très hétérogènes. Les auteurs se sont focalisés majoritairement sur les métastases pulmonaires des sarcomes, étudiant principalement les effets du melphalan, et très peu de patients présentant des métastases pulmonaires de CCR ont été étudiés. Les études pharmacocinétiques, sont peu nombreuses et montrent des résultats hétérogènes. Cependant plusieurs auteurs rapportent une relation directe entre la concentration en chimiothérapie dans le perfusat et la concentration en chimiothérapie dans le parenchyme pulmonaire sain, avec, cependant, une pénétration tumorale peu satisfaisante.

Enfin, concernant métastases pulmonaires de CCR, il n'existe pas de consensus sur les médicaments à utiliser, ni sur les doses.

Ib-Chez l'animal :

***Chez le rat :**

En 1993, Weksler *et al.* décrivirent le modèle de PPI unilatéral chez le rat [31], qui fut par la suite modifié par Wang *et al.* [32] puis par Hendriks *et al.* [33]. Dans ce modèle, une thoracotomie gauche était réalisée sous anesthésie générale. Un écarteur costal était mis en place, le poumon gauche était basculé vers l'avant et la dissection du hile se faisait de l'arrière vers l'avant. Après avoir clampé l'artère et les veines pulmonaires avec des microclips, un cathéter était introduit dans l'artère pulmonaire à travers la paroi thoracique et maintenu par du prolène 4.0. Une veinotomie était réalisée sur chaque veine pulmonaire pour récupérer le perfusât délivré par l'artère pulmonaire.

Une technique de PPI séquentielle sur le poumon droit puis le gauche, à une semaine d'intervalle fut décrite quelques années plus tard par Nawata *et al.* [34].

Différentes études sur le modèle murin ont été conduites afin d'évaluer l'efficacité de la PPI sur les métastases pulmonaires de sarcome et de carcinome, soit par la diminution du nombre de nodules pulmonaires retrouvés après PPI soit par une amélioration significative de la survie des animaux.

Concernant les métastases pulmonaires des sarcomes, plusieurs drogues de chimiothérapie ont été testées : la doxorubicine, le $\text{TNF}\alpha$, le melphalan et le cisplatine.

Ainsi, Abolhoda *et al.* montrèrent une augmentation significative de la survie des animaux par la doxorubicine [35]. Weksler *et al.* ainsi que Nawata *et al.* mirent en évidence une diminution significative du nombre de nodules pulmonaires après PPI conduites avec de la doxorubicine [36], du $\text{TNF}\alpha$ [37] et du melphalan [38]. Enfin, Tanaka *et al.* montrèrent une diminution significative du nombre de métastases en utilisant du cisplatine combiné à de la digitonine mais pas pour la perfusion de cisplatine seul [39].

Concernant les métastases pulmonaires d'adénocarcinome d'origine colorectale, plusieurs drogues de chimiothérapie ont été testées : le FUDR, le melphalan, le $\text{TNF}\alpha$, le cisplatine et la gemcitabine (GEM). Nous allons nous y intéresser plus en détails.

En 1995 Ng *et al.* étudièrent la PPI et la perfusion intraveineuse de 2'-deoxy-5-fluorouridine (FUDR) sur les métastases pulmonaires d'adénocarcinome colorectal [12]. Le traitement par PPI dura 20 min, à un débit de 1 ml/min, suivi par 5 min de rinçage. Les animaux étaient sacrifiés 26 jours après la procédure. Les poumons traités à la dose de 14 mg de FUDR montraient une diminution significative du nombre de nodules métastatiques par rapport au côté non traité ($455,2 \pm 87,3$ vs $11 \pm 6,4$; $p < 0,0001$). Les animaux traités par voie intraveineuse présentaient un nombre significativement plus faible de nodules par rapport au groupe témoin, mais un nombre significativement plus élevé que dans le groupe traité par PPI (216 ± 93 vs 11 ± 6 ; $p < 0,05$).

En 1998, Hendricks *et al.* étudièrent la PPI sans contrôle de l'effluent veineux et la perfusion intraveineuse de melphalan et de TNF- α chez un modèle murin présentant des métastases pulmonaires d'adénocarcinome colique [13]. Chaque groupe de 10 rats fut traité par l'association des deux drogues soit par PPI soit par perfusion intraveineuse. Les concentrations en melphalan du parenchyme pulmonaire étaient significativement supérieures après la PPI ($40,9$ à $50,5$ $\mu\text{g/g}$) par rapport à l'administration intraveineuse ($0,8$ à $1,7$ $\mu\text{g/g}$). Les concentrations en melphalan dans l'effluent veineux étaient élevées après 5 min de perfusion, et restaient constantes pendant toute la durée de la perfusion. Enfin ces concentrations revenaient à zéro après le rinçage. Aucune trace de melphalan ne fut détectée dans le sérum des rats traités par PPI, contrairement à ceux traités par voie intraveineuse.

En 2003, Van Putte *et al.* étudièrent la PPI et la perfusion intraveineuse de GEM chez le rat [14]. Les groupes traités par PPI bénéficièrent de la procédure à gauche avec des doses croissantes de GEM jusqu'à la dose de 320 mg/kg. Ils existaient une augmentation significative de la survie dans le groupe ILP à 320 mg par rapport au groupe 320 mg intraveineux. Les survivants bénéficièrent d'une pneumonectomie droite vingt et un jours après la PPI afin d'évaluer la fonction respiratoire du poumon traité par PPI. Ils démontrèrent que les concentrations en GEM du parenchyme pulmonaire étaient significativement supérieures après la PPI ($2,5 \pm 1,8$ $\mu\text{g/g}$) par rapport à l'administration intraveineuse ($0,2 \pm 0,1$ $\mu\text{g/g}$). Aucune trace de GEM ne fut détectée dans le sérum des rats traités par PPI, à l'opposé de ceux traités par voie intraveineuse.

En 2005, Van Putte *et al.* étudièrent la PPI chez des rats présentant des métastases pulmonaires d'adénocarcinome en perfusant différentes association de chimiothérapie après étude in vitro

portant sur le cisplatine, la GEM et le melphalan [15]. Ils montrèrent in vitro une synergie d'action du melphalan avec la GEM sur les cellules CC531s. In vivo, les rats traités par PPI avaient une espérance de vie significativement supérieure au groupe témoin ($p < 10^{-4}$). In vivo, la PPI avec du melphalan montrait une augmentation significative de la survie par rapport à la GEM seule ($p = 0,0016$) et au cisplatine seul (0,046). Les rats traités en PPI avec l'association melphalan-GEM présentaient 67% de survie à quatre-vingt-dix jours, alors qu'aucun rat n'était vivant à 90 jours avec les autres chimiothérapies.

Année de publication	Auteur	Nombre de rats	Drogues de chimiothérapie	Durée de perfusion (min)	Histologie des métastases
1995	Ng <i>et al.</i> [12]	28	FUDR	20	Adénocarcinome colorectal
1998	Hendriks <i>et al.</i> [13]	54	Melphalan, TNF α	25	Adénocarcinome colorectal
2003	Van Putte <i>et al.</i> [14]	93	GEM	30	Adénocarcinome colorectal
2005	Van Putte <i>et al.</i> [15]	42	Melphalan GEM Cisplatine	30	Adénocarcinome colorectal

Tableau 2 : Résumé des études évaluant l'efficacité de la PPI sur les cellules de CCR

Concernant les paramètres de perfusion et la pharmacocinétique différentes études furent conduites :

-En 1995, Weksler *et al.* étudièrent la PPI avec de la doxorubicine à des concentrations, des débits et des durées de perfusion variables chez le rat. Ils montrèrent que le débit de perfusion n'influait pas les concentrations tissulaires en doxorubicine [40]. En revanche, ils démontrèrent que plus la durée de perfusion était importante, plus la concentration tissulaire en doxorubicine était élevée, pour une durée maximale de perfusion de seulement 10 min dans cette étude. Ils mirent également en évidence que la concentration tissulaire en doxorubicine s'élevait avec la concentration en doxorubicine du perfusé.

-En 2002, Van Putte *et al.* comparèrent la PPI en un seul passage pulmonaire avec une recirculation par une pompe en utilisant du melphalan [41]. Aucune différence significative de concentration tissulaire en melphalan ne fut mise en évidence entre les deux groupes, ils conclurent que le melphalan pouvait être injecté directement en bolus dans le circuit de perfusion.

-En 2003, Van Putte *et al.* étudièrent la PPI sans contrôle de l'effluent veineux avec de la GEM chez le rat à des débits et des durées de perfusion variables [42]. Ils ne mirent pas en évidence de différence significative de concentration en GEM dans le parenchyme pulmonaire pour les groupes traités à 0,2 ou 0,5 ml/min quel que soit le temps de perfusion. Ils mirent en évidence une saturation du parenchyme pulmonaire en GEM après vingt minutes de perfusion.

-En 2003, Romijn *et al.* étudièrent l'influence du débit, de la durée de la PPI ainsi que de la concentration du perfusat en melphalan sur la concentration finale du parenchyme pulmonaire en melphalan [43]. Ils montrèrent que seule la concentration du perfusat en melphalan influençait la concentration tissulaire finale en melphalan. Il n'y avait pas de différence significative entre les groupes perfusés pendant trente minutes et ceux perfusés pendant soixante minutes, de même pas de différence significative pour les groupes traités avec un débit à 0,5 ml/min ou 1 ml/min.

-En 2012, Den Hengst *et al.* étudièrent la PPI chez des rats présentant des métastases pulmonaires de rhabdomyosarcome traitées par du melphalan [44]. Ils comparèrent trois types d'administration de melphalan : par PPI, par perfusion sélective de l'artère pulmonaire par voie endovasculaire au moyen d'un cathéter et d'un ballon d'occlusion et par perfusion intraveineuse. L'étude pharmacocinétique du poumon perfusé mit en évidence une concentration significativement plus élevée de melphalan dans le poumon pour l'administration par PPI ou par perfusion sélective de l'artère pulmonaire que par voie intraveineuse ($p=0.05$). La PPI et la perfusion sélective de l'artère pulmonaire permirent de réduire significativement le nombre de nodules métastatiques dans le poumon (respectivement 20 ± 9 et 30 ± 22 nodules) par rapport à la perfusion intraveineuse (113 ± 17 nodules) ($p<0,01$). La médiane de survie pour la PPI était similaire à la perfusion sélective de l'artère pulmonaire (respectivement 71 ± 10 et 74 ± 8 jours) et était significativement supérieure à l'administration intraveineuse (54 ± 7 jours) ($p<0,01$).

-La même année, Van Thielen *et al.* étudièrent le retentissement pulmonaire de la PPI avec de la GEM combinée à de la radiothérapie thoracique par rapport à la perfusion intraveineuse de GEM chez des rats sains [45]. La GEM était administrée à la dose de 40 mg/kg et la radiothérapie délivrée sous forme d'une fraction unique de 8 Gy. Ils évaluèrent le pourcentage de fibrose pulmonaire et le pourcentage de macrophages par la coloration de Perls. Ils ne mirent pas en évidence de différence significative entre la perfusion intraveineuse de GEM et la radiothérapie seule. Il existait plus de modification histologique après PPI seule qu'après l'administration intraveineuse de GEM ($p < 0,0001$). L'adjonction de la radiothérapie à la PPI de GEM n'entraînait pas de fibrose pulmonaire excédentaire par rapport à la PPI seule.

En résumé, les travaux menés chez le rat ont permis de mettre en évidence que :

- la PPI permet d'obtenir des concentrations de chimiothérapie dans le parenchyme pulmonaire plus élevées que la perfusion intraveineuse.
- la concentration du parenchyme pulmonaire en chimiothérapie est influencée seulement par la concentration du perfusé en chimiothérapie. Le débit de perfusion n'est pas un facteur influent sur la concentration en chimiothérapie du parenchyme pulmonaire, de même la durée de perfusion au-delà de 20 min ne présente qu'un intérêt mineur puisque le parenchyme pulmonaire semble saturé en chimiothérapie.
- La chimiothérapie peut être injectée en bolus dans le circuit de perfusion.
- La PPI bien conduite, n'entraîne pas de fuites systémiques de chimiothérapie.
- L'adjonction de la radiothérapie à PPI ne provoque pas plus de lésions pulmonaires histologique que la PPI seule.

***Chez le chien :**

De 1983 à 1988, Johnston *et al.* montrèrent que la PPI chez le chien était une technique reproductible [46-48]. Ils perfusèrent de l'adriamycine, sans fuite dans la circulation systémique et démontrèrent que la toxicité pulmonaire dépendait de la concentration du produit perfusé et de la captation par le parenchyme pulmonaire. Cette équipe développa ensuite une technique de perfusion simultanée des deux poumons chez le chien, partant du principe que les tumeurs pulmonaires se développaient le plus souvent de façon bilatérale.

En 1991, Baciewicz *et al.* étudièrent la PPI avec de la doxorubicine chez des chiens [49]. Ils montrèrent également avec de la doxorubicine, que la toxicité pulmonaire du produit dépendait

de la concentration du produit perfusé et de sa captation par le parenchyme pulmonaire. Les lésions pouvaient également s'expliquer par la légère hyperthermie (39°) qui augmentait la captation de la doxorubicine par le parenchyme pulmonaire.

***Chez le porc :**

En 1998, Furrer *et al.* comparèrent la perfusion sélective de l'artère pulmonaire gauche par voie endovasculaire avec une recirculation par une pompe, en utilisant de la doxorubicine pendant 15 min sur un poumon sain [50]. Deux groupes de 7 porcs furent opérés, le premier groupe par perfusion sélective de l'artère pulmonaire gauche par voie endovasculaire de la chimiothérapie, le second par PPI avec recirculation de la chimiothérapie au moyen d'une pompe. Les débits de perfusion étaient de 100 ml/min en moyenne pour des porcs de 20 à 25 kgs. Un groupe contrôle de trois porcs reçut de la doxorubicine par voie intraveineuse. Ils ne mirent pas en évidence de fuites dans la circulation générale. Les concentrations de doxorubicine dans le parenchyme pulmonaire étaient équivalentes pour les deux techniques de PPI et significativement plus élevées que dans le groupe contrôle. Tous les animaux étaient sacrifiés en fin de procédure. Il n'y avait donc pas d'étude de la survie et des paramètres histologiques à distance.

En 2004, Franke *et al.* étudièrent l'influence de la pression de perfusion et de l'hyperthermie sur la morphologie et les fonctions respiratoires d'un poumon sain [51]. Ils pratiquèrent une PPI de 40 min suivi par l'exclusion du poumon droit, afin d'étudier les paramètres fonctionnels respiratoires du poumon perfusé. Ils mirent en évidence sur l'étude de 33 porcs qu'une pression de perfusion supérieure à 25 mmHg conduisait à une dégradation de l'ensemble des paramètres fonctionnels respiratoires ainsi qu'à une dégradation de la structure histologique du poumon perfusé. Les débits de perfusion étaient progressivement augmentés jusqu'à atteindre 800 à 1000 ml/min pour des porcs de 30 à 35 kg. Ils montrèrent également qu'une PPI en hyperthermie modérée à 41,5°C n'avait pas d'effets délétères sur la structure histologique du poumon, et entraînait une réduction significative des résistances vasculaires pulmonaires. Tous les animaux étaient sacrifiés 6H après la fin de procédure, il n'y avait donc pas d'étude de la survie et des paramètres histologiques à distance,

Ils étudièrent également la PPI en perfusant du cisplatine avec et sans hyperthermie modérée pendant 40 min sur un poumon sain chez 25 porcs [52]. La PPI était suivie par l'exclusion du

poumon droit, afin d'étudier les paramètres fonctionnels respiratoires du poumon perfusé. Les débits de perfusion étaient progressivement augmentés jusqu'à atteindre 800 à 1000 ml/min pour des porcs de 30 à 35 kg. Ils montrèrent une corrélation significative entre la concentration en cisplatine du perfusé et du parenchyme pulmonaire. Ils montrèrent que plus la dose de cisplatine perfusée était élevée, plus les lésions tissulaires étaient importantes. Ils mirent également en évidence que l'hyperthermie modérée à 41,5°C pour une même dose de cisplatine entraînait moins d'effets délétères sur la structure histologique du poumon que la normothermie. Tous les animaux étaient sacrifiés 6H après la fin de procédure, il n'y avait donc pas d'étude de la survie et des paramètres histologiques à distance.

En 2008, Van Putte *et al.* rapportèrent une étude de perfusion sélective de l'artère pulmonaire gauche avec occlusion du flux sanguin chez seize porcs sains avec de la GEM [53]. Ils réalisèrent ensuite des prélèvements pulmonaires par thoracotomie. Ils mirent en évidence une augmentation de la concentration du parenchyme pulmonaire en GEM pour le groupe 10 min d'occlusion par rapport au groupe 2 min, lui-même supérieur au groupe perfusion intraveineuse. La réduction du débit de perfusion pulmonaire étant responsable d'une distribution inhomogène du GEM dans le parenchyme pulmonaire.

En 2009, Grootenboers *et al.* étudièrent la perfusion sélective de GEM dans la circulation pulmonaire chez 22 porcs sains [54]. Ils comparèrent la dose de chimiothérapie délivrée au parenchyme pulmonaire selon la dose de GEM perfusée et selon la durée de l'occlusion du flux sanguin pulmonaire. Ils réalisèrent ensuite des prélèvements pulmonaires par thoracotomie. Ils mirent en évidence que la dose de GEM délivrée au parenchyme pulmonaire augmentait avec la dose perfusée et avec la durée d'occlusion du flux sanguin.

En 2009, Van Putte *et al.* menèrent une étude pharmacocinétique de la perfusion pulmonaire par de la gemcitabine et du carboplatine chez 12 porcs sains [55]. Ils réalisèrent ensuite des prélèvements pulmonaires par thoracotomie. Ils comparèrent la dose de chimiothérapie délivrée au poumon gauche par deux voies d'administration : la perfusion sélective par voie endovasculaire de l'artère pulmonaire gauche et la perfusion intraveineuse. Ils retrouvèrent des concentrations plus élevées de chimiothérapie dans le parenchyme pulmonaire.

En conclusion, les travaux menés sur le gros animal donnent des résultats comparables à ceux menés sur le rat en termes de pharmacocinétique. Aucune étude de la survie à distance après PPI n'a été réalisée à ce jour dans la littérature chez le gros animal. Il n'existe donc pas de

données concernant l'hémodynamique et les paramètres fonctionnels respiratoires du poumon perfusé à distance de la PPI.

Les intérêts de continuer à développer un modèle chez le gros animal sont nombreux :

- étudier la pharmacocinétique des différentes drogues sur le parenchyme pulmonaire.
- étudier différents modes d'administration (durée, pression, rinçage).
- étudier l'effet des différentes drogues testé sur le parenchyme pulmonaire sain au moment de la procédure mais également après une durée de survie que l'on peut faire varier ; ceci par une analyse histologique.

II-OBJECTIFS :

Notre travail de thèse se déroulera en trois étapes :

La première étape sera une expérimentation in vitro et consistera en la détermination de la chimiothérapie la plus efficace in vitro en 30 minutes sur un panel de cellules de CCR représentatifs des tumeurs que l'on peut rencontrer en pratique clinique.

La deuxième étape consistera à mettre au point la technique de PPI chez le porc, sur un seul poumon exclu.

Au cours de cette seconde étape, les objectifs seront :

- d'obtenir la survie des animaux pendant 28 jours après la PPI afin d'évaluer la fonctionnalité du poumon perfusé par la réalisation de prélèvements de tissu pulmonaire pour une analyse histologique.

- l'étude pharmacocinétique de la chimiothérapie dans le parenchyme pulmonaire pendant la PPI.

- l'étude pharmacocinétique de la chimiothérapie dans la circulation systémique au cours de la procédure de PPI

- l'étude de l'hémodynamique et des paramètres respiratoires pendant la PPI.

- l'activité anti-tumorale du liquide de fin de perfusion sera également testée in vitro sur les cellules cancéreuses.

La troisième étape sera une étude d'escalade de dose de chimiothérapie par la technique de PPI et aura pour objectif de déterminer la dose maximale tolérable. Le plan expérimental envisagé sera un doublement de la dose à chaque palier jusqu'à obtenir le décès postopératoire systématique des animaux ou la nécrose pulmonaire à l'autopsie (toxicité).

Au cours de cette troisième étape, les objectifs seront identiques à la seconde étape :

- obtenir la survie des animaux pendant 28 jours après la PPI afin d'évaluer la fonctionnalité du poumon perfusé par la réalisation de prélèvements de tissu pulmonaire pour une analyse histologique.

- l'étude pharmacocinétique de la chimiothérapie dans le parenchyme pulmonaire pendant la PPI.

-l'étude pharmacocinétique de la chimiothérapie dans la circulation systémique au cours de la procédure de PPI

-l'étude de l'hémodynamique et des paramètres respiratoires pendant la PPI.

Partie I : **Expérimentations in vitro**

I-MATERIELS ET METHODES :

Ia-Culture cellulaire :

Un panel de cellules d'adénocarcinome colique humain correspondant aux lignées HCT116, HCT8, HT29 et SW480 ont été choisis. Ces lignées représentaient la diversité des statuts mutationnels et des chimio-sensibilité des CCR (Tableau 3). Elles provenaient de la collection Américaine de cellules et de tissu (ATCC®, Rockville, MD, USA) et étaient maintenues en culture dans une étuve à 37°C contenant 5% de CO₂ dans du milieu RPMI1640 (Lonza) complétée avec 10% (vol/vol) de sérum de veau foetal (SVF) (Lonza) et d'un mélange de pénicilline (100 UI/ml), streptomycine (100 µg/ml) et amphotéricine B (0.25 µg/ml) (Lonza). L'absence de contamination par mycoplasmes était régulièrement vérifiée.

Lignée cellulaire	Mutant K-RAS Ex 2	Mutant BRAF exon 15	Mutant PIK3CA exon 9	Mutant PIK3CA exon 20	MSI Status	MSS Status
HT29		+				+
HCT8	+		+		+	
SW480	+					+
HCT116	+			+	+	

Tableau 3 : Statut mutationnel des cellules de CCR testées in vitro

Ib-Traitement des cellules :

L'effet anti-tumoral des drogues de chimiothérapie était déterminé par des tests de cytotoxicité, conduits comme précédemment décrit par Hatok *et al.* [56]. Ainsi les cellules étaient récupérées par trypsination, lavées avec du Phosphate Buffered Saline (PBS) (Lonza) puis incubées 5 min à 37°C dans une solution de trypsine (Lonza), d'EDTA et de PBS. Les cellules étaient ensuite resuspendues dans du milieu de culture puis comptées sur cellules de Malassez et ensemencées dans des plaques 24 puits (Falcon) à la densité de 50 000 cellules par puits. Elles étaient traitées avec les différentes chimiothérapies 24h après l'ensemencement. A chaque niveau de dose de la chimiothérapie, 4 puits étaient traités, permettant ainsi de vérifier l'homogénéité de la viabilité cellulaire pour chaque dose de chimiothérapie.

Après 24h de culture cellulaire, le milieu de culture était éliminé, les cellules étaient rincées avec 500 µl de PBS. Elles étaient ensuite exposées pendant 30 min aux différentes chimiothérapies reconstituées dans du milieu de culture. Après ces 30 min d'exposition, la chimiothérapie était éliminée, les cellules étaient de nouveau rincées avec 500 µl de PBS. Elles étaient ensuite remises en culture pendant 72h avec 1 ml de milieu de culture.

Ic-Test de viabilité du tapis cellulaire :

Après les 72h de culture, le surnageant était éliminé, les cellules étaient rincées avec 200 µl de PBS, puis fixées avec 100 µl d'éthanol absolu pendant 30 min. L'éthanol était éliminé et 100 µl de solution de crystal violet étaient ajoutés. La prise du colorant par les cellules vivantes était instantanée. Le cristal violet excédentaire était ensuite éliminé par plusieurs bains d'eau. Les tapis cellulaires étaient séchés et repris dans 150 µl d'acide acétique 33%. Enfin l'absorbance de chaque puits était mesurée à 590 nm (Spectra-A®, Varian, France).

La viabilité des cellules était analysée par rapport aux puits non traités, dont l'absorbance correspondait à 100% de survie des cellules.

La drogue de chimiothérapie la plus efficace était définie comme la chimiothérapie ayant la plus faible valeur de concentration responsable de l'inhibition de 50 % (IC50) ou de 25% (IC25) de la croissance cellulaire et fut testée avec la seconde drogue la plus efficace [56].

Id-Chimiothérapies :

Les drogues de chimiothérapies suivantes étaient choisies, étant les plus efficaces dans le traitement du CCR dans les essais cliniques [57,58]:

- 5 Fluorouracile (5 Fluorouracile®)
- Gemcitabine (Gemzar®)
- Cisplatine (Cisplatine®)
- Oxaliplatine (Eloxatine®)
- Raltitrexed (Tomudex®)
- Irinotécan (Campto®)

De plus pour nous assurer de l'innocuité des macromolécules dans lesquelles la chimiothérapie choisie serait diluée in vivo, nous avons testé la viabilité des cellules cancéreuses exposées à ces macromolécules seules comparée à l'exposition au milieu de culture seul.

II-METHODE STATISTIQUE :

La viabilité des cellules était analysée par rapport aux puits non traités, dont l'absorbance correspondait à 100% de survie des cellules.

A chaque niveau de dose de la chimiothérapie, 4 puits étaient traités, permettant ainsi de vérifier l'homogénéité de la viabilité cellulaire pour chaque dose de chimiothérapie. La viabilité cellulaire pour chaque niveau de dose était calculée en faisant la moyenne de l'absorbance des 4 puits traités à chaque niveau de dose.

Pour chaque niveau de dose, les écart-types des valeurs d'absorbance étaient rapportés sur le graphique correspondant.

III-RESULTATS :

Les valeurs de concentrations responsables de l'inhibition de 50 % (IC50) ou de 25% (IC25) de la croissance cellulaire des différentes chimiothérapies étaient résumées dans la figure 3 & le tableau 4. Les cellules cancéreuses testées présentaient une faible sensibilité à l'oxaliplatine (figure 4), au 5FU (figure 4), au cisplatine (figure 4), et au Sn38 (métabolite actif de l'irinotécan) (figure 4). Les tests réalisés in vitro sur les différentes lignées cellulaires retrouvaient la GEM et le raltitrexed (figure 4) comme étant les chimiothérapies ayant la plus grande efficacité anti-tumorale pour un traitement de 30 min. L'association de ces deux molécules en traitement de 30 min afin de rechercher un effet synergique a été un échec, seule la GEM avait un effet anti-tumoral lors de l'association des deux molécules (figure 5).

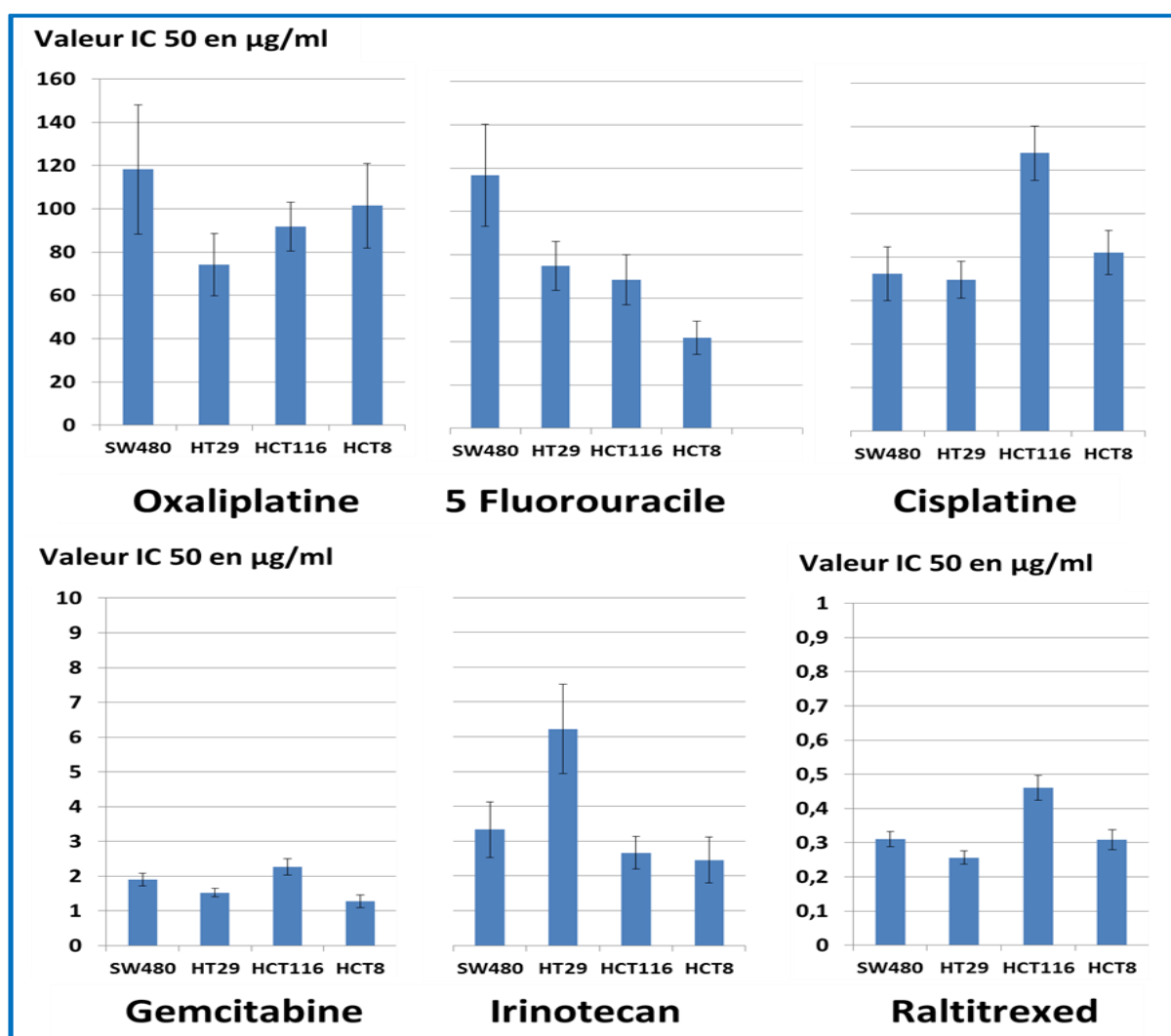


Figure 3 : Valeurs de concentrations responsables de l'inhibition de 50 % (IC50) de la croissance cellulaire des différentes chimiothérapies selon les lignées de CCR

Oxaliplatine	SW480	297,364864 $\mu\text{mol/L}$	0,11813874 g/L
	HT29	186,50684 $\mu\text{mol/L}$	0,074097675 g/L
	HCT116	231,242603 $\mu\text{mol/L}$	0,091870836 g/L
	HCT8	255,365863 $\mu\text{mol/L}$	0,101454814 g/L
5-Fluorouracile	SW480	897,636363 $\mu\text{mol/L}$	0,116762025 g/L
	HT29	576 $\mu\text{mol/L}$	0,074924467 g/L
	HCT116	526,847826 $\mu\text{mol/L}$	0,06853089 g/L
	HCT8	321,076923 $\mu\text{mol/L}$	0,041764916 g/L
Cisplatine	SW480	241,086956 $\mu\text{mol/L}$	0,072338382 g/L
	HT29	232,151899 $\mu\text{mol/L}$	0,069657409 g/L
	HCT116	426,2385321 $\mu\text{mol/L}$	0,127893298 g/L
	HCT8	273,357664 $\mu\text{mol/L}$	0,08202124 g/L
Gemcitabine	SW480	7,217996 $\mu\text{mol/L}$	0,001899762 g/L
	HT29	5,79638752 $\mu\text{mol/L}$	0,001525598 g/L
	HCT116	8,634707 $\mu\text{mol/L}$	0,002272638 g/L
	HCT8	4,82749676 $\mu\text{mol/L}$	0,001270588 g/L
Irinitécan	SW480	8,48314606 $\mu\text{mol/L}$	0,003328787 g/L
	HT29	15,862293 $\mu\text{mol/L}$	0,006224364 g/L
	HCT116	6,77631579 $\mu\text{mol/L}$	0,002659026 g/L
	HCT8	6,2598787 $\mu\text{mol/L}$	0,002456376 g/L
Raltitrexed	SW480	676,666667 nmol/L	0,000310245 g/L
	HT29	558,8764044 nmol/L	0,000256239 g/L
	HCT116	1005,333333 nmol/L	0,000460935 g/L
	HCT8	673,2876712 nmol/L	0,000308696 g/L

Tableau 4 : Valeurs de concentrations responsables de l'inhibition de 50 % (IC50) de la croissance cellulaire des différentes chimiothérapies selon les lignées de CCR

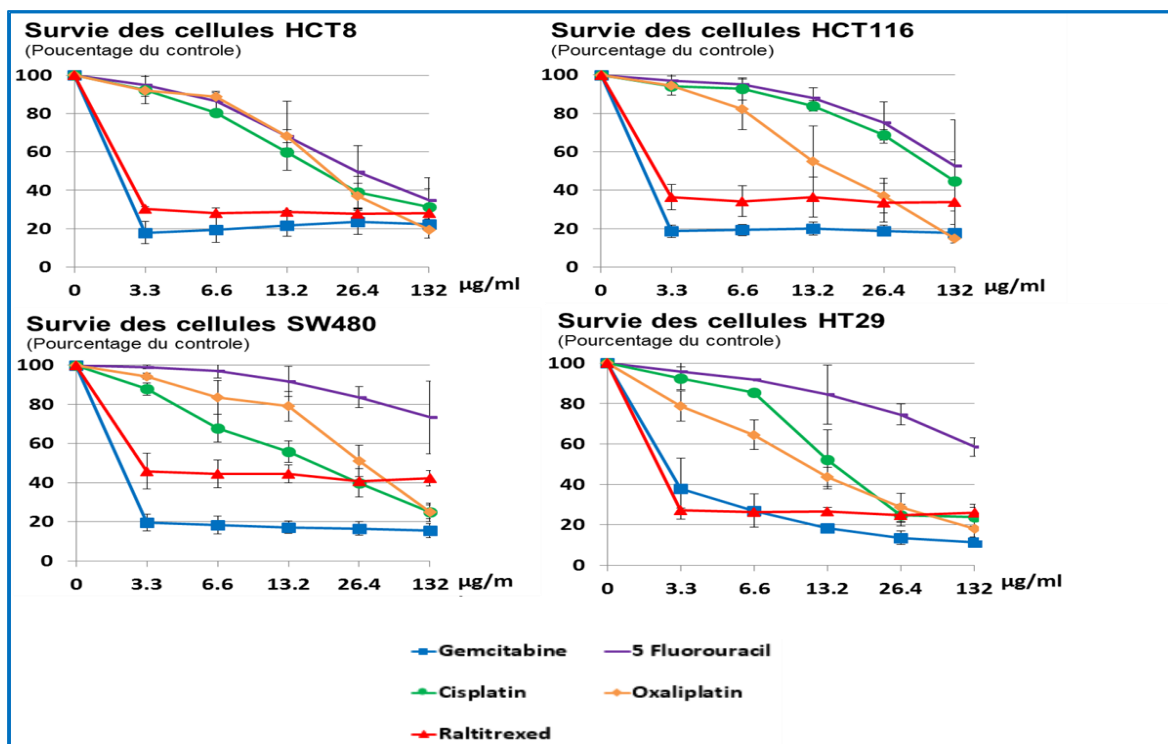


Figure 4 : Test de viabilité cellulaire des différentes drogues de chimiothérapies sur les lignées de cellules de CCR. La viabilité est exprimée en % par rapport au témoin, les concentrations de chimiothérapie sont exprimées en µg/ml.

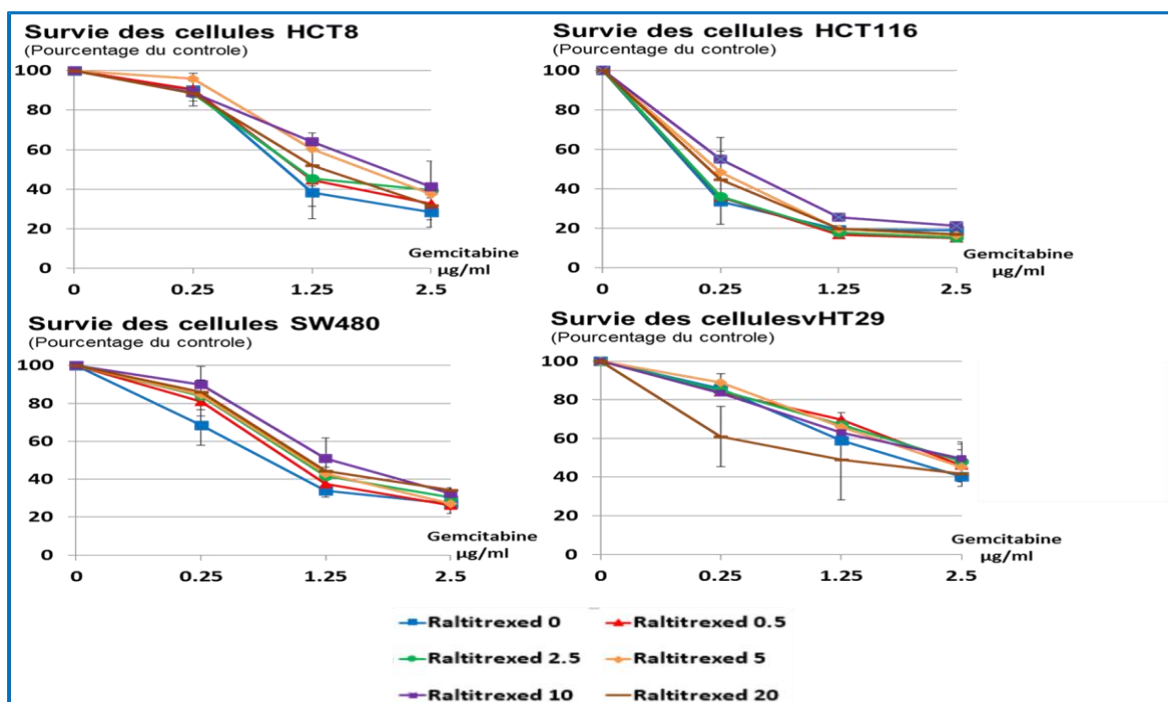


Figure 5 : Test de viabilité cellulaire de l'association Gemcitabine-Raltitrexed sur les lignées de cellules de CCR.

L'exposition aux macromolécules des cellules des quatre lignées pendant 30 min n'avait montré aucune modification de leur viabilité par rapport à une exposition à du milieu de culture seul pendant 30 min.

La molécule la plus efficace étant la GEM, les manipulations avec la GEM ont ensuite été réalisées en utilisant ces macromolécules comme milieu de dilution. Les résultats donnaient des viabilités comparables aux expositions utilisant le milieu de culture cellulaire comme diluant (Figure 6).

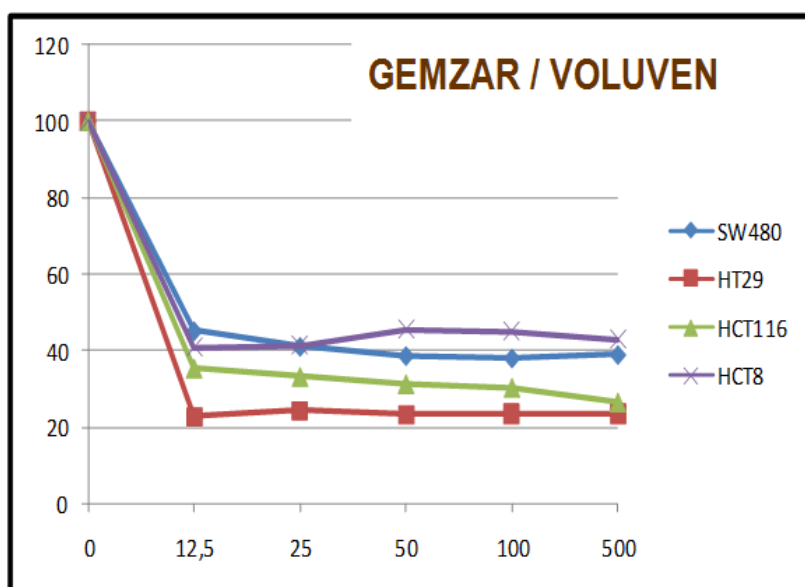


Figure 6 : Test de viabilité de la Gemcitabine sur les différentes lignées de CCR en utilisant des macromolécules comme milieu de dilution.

IV-DISCUSSION :

L'intérêt des tests de cytotoxicité in vitro était de choisir la drogue de chimiothérapie la plus efficace en 30 min pour être utilisée en PPI, comme suggérées par de précédentes études. En effet, Link *et al.* avait démontré que les tests in vitro permettaient d'identifier la chimiothérapie active individuellement pour une perfusion artérielle hépatique [59]. Kornmann *et al.* avait démontré que les patients porteurs de CCR qui avaient montré une sensibilité in vitro pouvaient tirer bénéfice d'une chimiothérapie locorégionale avec de la GEM [60]. En tenant compte de ces tests préliminaires, nous avons choisi un panel de cellules de CCR représentant la diversité des CCR concernant les différentes voies de signalisation cellulaire [61]. Ces voies de signalisation étaient visées dans le cadre du traitement des maladies métastatiques par des thérapies ciblées seules ou en combinaison avec des agents cytotoxiques dont l'oxaliplatine ou l'irinotécan [62]. Cependant ces deux drogues étaient moins efficaces que la GEM pour une exposition courte, probablement lié au fait que la GEM était une drogue avec un effet dose-dépendant alors que l'effet de l'oxaliplatine et de l'irinotécan étaient plus temps-dépendant [63-65].

Jusqu'à présent, la GEM n'était pas le traitement systémique standard du CCR métastatique [62]. Cependant, comme précédemment établi, certaines publications justifiaient l'utilisation des tests de clonogénicité in vitro afin de choisir la chimiothérapie la plus efficace sur les cellules de CCR au cours d'une exposition courte de 30 min [59,60]. Il était à noter que les chimiothérapies utilisées dans la technique de chimiothérapie locorégionale sur un organe, telles que la PPI ou la perfusion hépatique isolée, n'étaient pas nécessairement les mêmes molécules que celles utilisées pour les traitements intraveineux. En oncologie thoracique, Hendriks *et al.* avait rapporté des résultats encourageants dans une étude de phase I utilisant le melphalan au cours d'une procédure de PPI pour le traitement des métastases pulmonaires [28]. Dans cette étude, les cancers primitifs étaient des CCR, des cancers du rein et des sarcomes, alors que le melphalan n'était la chimiothérapie standard pour aucun de ces cancers. De façon similaire, en oncologie hépatique, l'utilisation du melphalan avait été rapportée comme étant associée à de bonne réponse et à une survie prolongée après perfusion hépatique isolée, alors que son efficacité en perfusion intraveineuse était limitée [66]. La perfusion isolée d'organe demeurait une technique expérimentale maîtrisée par peu d'équipes chirurgicales en pratique clinique, et toutes les drogues de chimiothérapie systémique n'avaient pas encore été testées en

perfusion isolée d'organe. L'un des principaux avantages de la perfusion isolée était de permettre l'utilisation de fortes doses de chimiothérapie, en augmentant le nombre de molécules disponibles pour un meilleur effet anti-tumoral. Cependant, jusqu'à présent, aucune publication n'avait évalué l'efficacité de la GEM sur les métastases pulmonaires des CCR dans le cadre d'une étude clinique.

Partie II :
Mise au point de la technique
de perfusion pulmonaire
isolée chez le porc

I-MATERIELS ET METHODES :

Ia-In Vivo :

***Les Animaux :**

Nous avons utilisé des porcs mâles ou femelles de type « Large-white » de 3 mois, pesant entre 50 et 55 Kgs, provenant de l'éleveur Hazotte (Beaumont, France). L'acclimatation des porcs dans leur box se faisait pendant les sept jours précédant l'intervention. Pendant cette période ils avaient un accès libre à l'eau et à la nourriture. Après l'intervention, les porcs étaient gardés dans leur box pendant 28 jours, puis autopsiés. Les expérimentations étaient approuvées par le comité éthique de l'université de Bourgogne (N° de protocole A0809).

***Technique d'Anesthésie :**

L'anesthésie était induite par l'injection intra-musculaire de 4 à 6 g de Kétamine + 1 mg d'atropine et complété par l'injection de kétamine et de sufentanil avant l'intubation endotrachéale. Les animaux étaient maintenus sous anesthésie générale par l'administration d'isoflurane (1,5%), la perfusion continue intraveineuse de fentanyl et de cisatracurium sur une voie centrale en position sous-clavière. La pression artérielle systémique était monitorée par un cathéter artériel introduit dans l'artère humérale. Le rythme cardiaque, l'électrocardiogramme, la température nasale, la saturation en oxygène, le débit cardiaque (L/min) et l'index cardiaque (L/min/m²) étaient mesurés par le système NICO (Novamatrix Medical Systems, Wallingford, CT). Une antibioprophylaxie comprenant 2 g de cycline était injectée avant l'incision.

Le remplissage vasculaire était assuré par du sérum salé, du Ringer lactate, et des macromolécules (Plasmion®, Fresenius Kabi, Sèvres), pour un volume d'environ 2 L. Un bolus d'héparine non fractionnée (100 UI/kg) était injecté avant le clampage des vaisseaux pulmonaires. L'analgésie per-opératoire utilisait 20 ml de ropivacaine (dont 75% était injecté dans la cicatrice), du tramadol et du paracétamol qui étaient également administrés en post-opératoire à intervalle régulier.

En fin de procédure, les animaux étaient réveillés si leur état le permettait (Figure 7).

Après 28 jours de suivi, les porcs étaient sacrifiés par une injection létale de Sufentanil, complétée par une injection intracardiaque de PentoBarbital (Dolethal®, Vetoquinol). On

procédait alors à des prélèvements de parenchyme pulmonaire qui étaient plongés dans le formol pour réaliser une analyse histologique.



Figure 7 : Animal en fin de PPI avec drainage thoracique en place

*** Technique Chirurgicale de PPI :**

Les premiers travaux réalisés ont été basés sur une technique de perfusion en un seul passage en utilisant la gravité, cependant cette méthode ne permettait pas un contrôle satisfaisant des pressions de perfusion. Suite à notre visite à Anvers (Belgique), dans le service du Pr Van Schil où nous avons assisté à une procédure de PPI sur l'homme, nous avons modifié notre technique.

-Méthode initiale

Une thoracotomie latérale droite était réalisée. Le péricarde était ouvert largement. L'artère pulmonaire droite, ainsi que les deux veines pulmonaires droites étaient disséquées et mises sur lac silastic. La bronche souche droite était disséquée et mise sur lacette. Après héparinisation à 100 UI/Kg, une double bourse au prolène 4.0 était réalisée sur l'artère pulmonaire ainsi qu'à la naissance de la veine pulmonaire inférieure droite. La canule artérielle (DLP Left Heart Vent

Catheter, Medtronic®, Minneapolis, USA) était ensuite introduite dans l'artère pulmonaire et serrée sur deux tirettes.

La canule veineuse (DLP Left Heart Vent Catheter, Medtronic®, Minneapolis, USA) était introduite dans l'abouchement de la veine pulmonaire inférieure par l'oreillette gauche.

Un cathéter était branché en dérivation de la canule de sortie afin de mesurer la pression veineuse reflète de la pression capillaire.

Les canules étaient ensuite raccordées à un circuit de perfusion composé d'une poche de perfusion suspendue au-dessus de l'animal. La pression d'entrée était réglée en fonction de la hauteur de la poche au-dessus de l'animal, après mesure par une réglette. L'artère pulmonaire droite et les veines pulmonaires droites étaient clampées. Le poumon était alors ventilé avec une pression de fin d'expiration positive (PEEP) à 10 mmHg. La bronche souche droite était modérément serrée sur une tirette. La perfusion de chimiothérapie durait 30 min suivie par 15 min de rinçage.

La pression capillaire était maintenue à un niveau de 15 mmHg par le serrage d'une pince de more.

Après arrêt de la perfusion, les canules étaient retirées et les vaisseaux réparés au prolène 5.0. si nécessaire puis déclampés, la bronche était desserrée.

La thoracotomie était alors refermée sur un drain thoracique en aspiration, qui était retiré au moment du réveil de l'animal.

-Méthode finale (Figure 8) :

Une thoracotomie latérale gauche était réalisée. Le péricarde était ouvert largement. L'artère pulmonaire gauche, ainsi que les deux veines pulmonaires gauches étaient disséquées et mises sur lac silastic. La bronche souche gauche était disséquée et mise sur lacette. Après héparinisation à 100 UI/Kg, une double bourse au prolène 4.0 était réalisée sur l'artère pulmonaire (Figure 9) ainsi qu'à la naissance de la veine pulmonaire supérieure gauche. La canule artérielle (High Flow Aortic Arch Canula 3.8 mm, Terumo®, Ann Arbor, USA) était ensuite introduite dans l'artère pulmonaire et serrée sur deux tirettes.

La canule veineuse (DLP Left Heart Vent Catheter, Medtronic®, Minneapolis, USA) était introduite dans l'abouchement de la veine pulmonaire inférieure par l'oreillette gauche.

Un cathéter était introduit dans l'origine de l'artère pulmonaire en aval de la canule de perfusion pour mesurer la pression moyenne de l'artère pulmonaire gauche (PMAPG) avant, pendant et après la perfusion (Figure 10).

Les canules étaient ensuite raccordées à un circuit de circulation extra-corporelle (CEC). L'artère pulmonaire était ensuite clampée, l'oreillette gauche était clampée juste en dessous de l'abouchement des deux veines pulmonaires gauches et de la canule veineuse (Figure 8). Le poumon était alors ré-expandu puis ventilé avec une PEEP à 5 mmHg. La bronche souche était modérément serrée sur une tirette.

La perfusion de chimiothérapie durait 30 min suivie par 15 min de rinçage.

Après arrêt de la perfusion les canules étaient retirées et les vaisseaux réparés au prolène 5.0. si nécessaire puis déclampés, la bronche était desserrée.

La thoracotomie était alors refermée sur un drain thoracique en aspiration, qui était retiré au moment du réveil de l'animal.

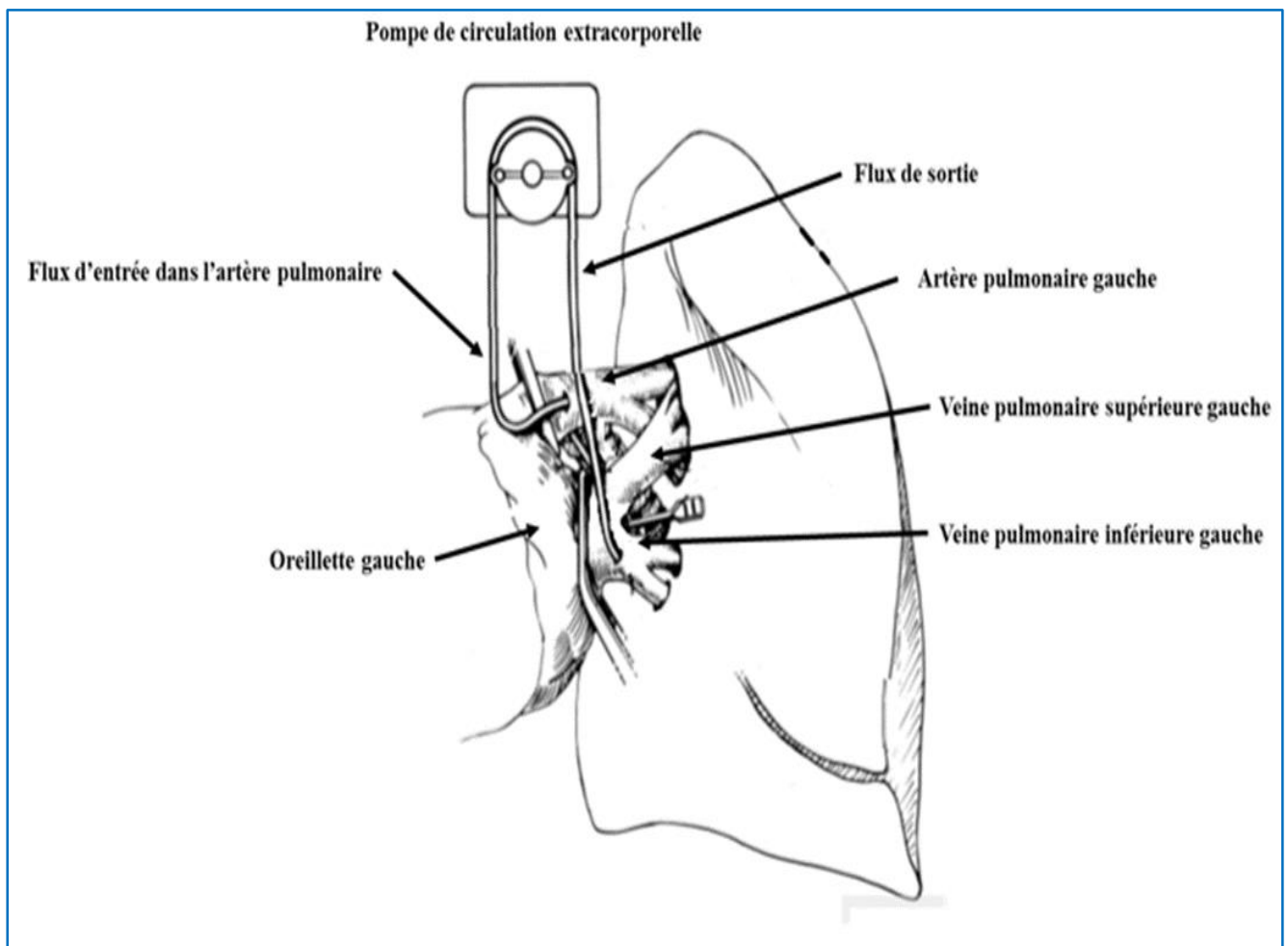


Figure 8 : Technique de canulation finale de la technique de PPI dans notre étude

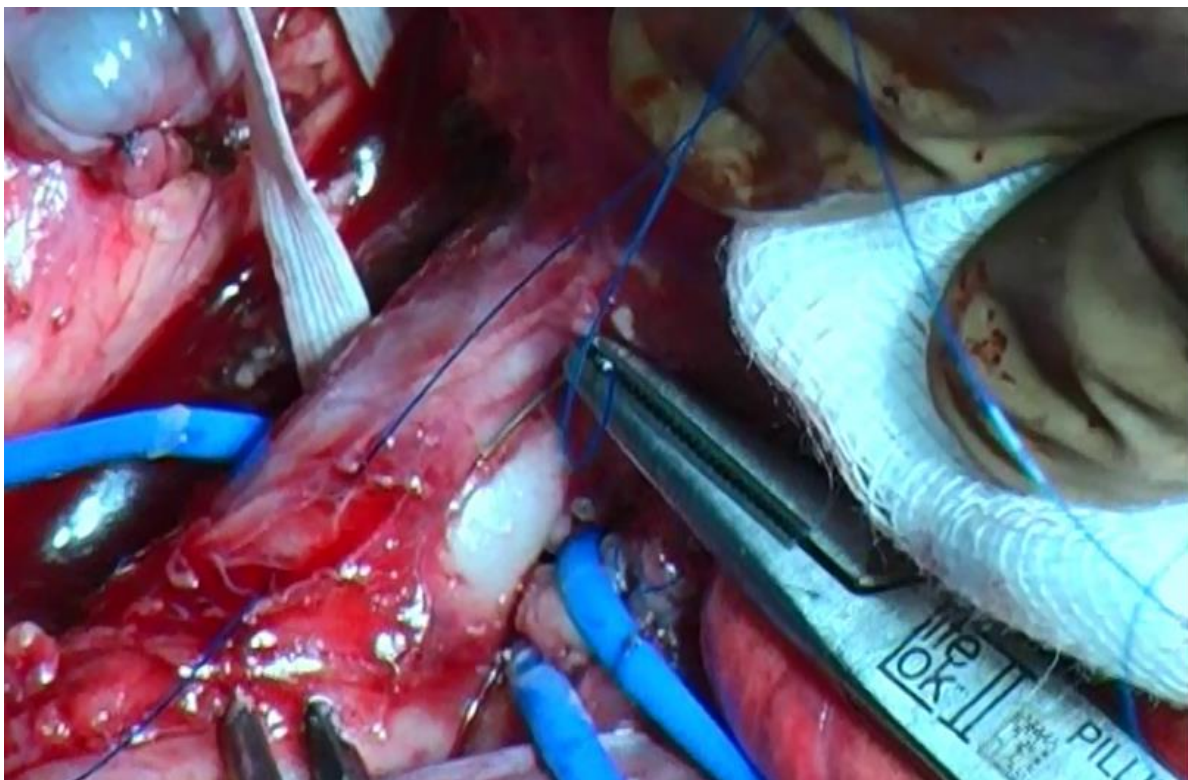


Figure 9 : Vue peropératoire de la constitution de la bourse au prolène® 4.0 sur le tronc de l'APG préalablement disséqué.

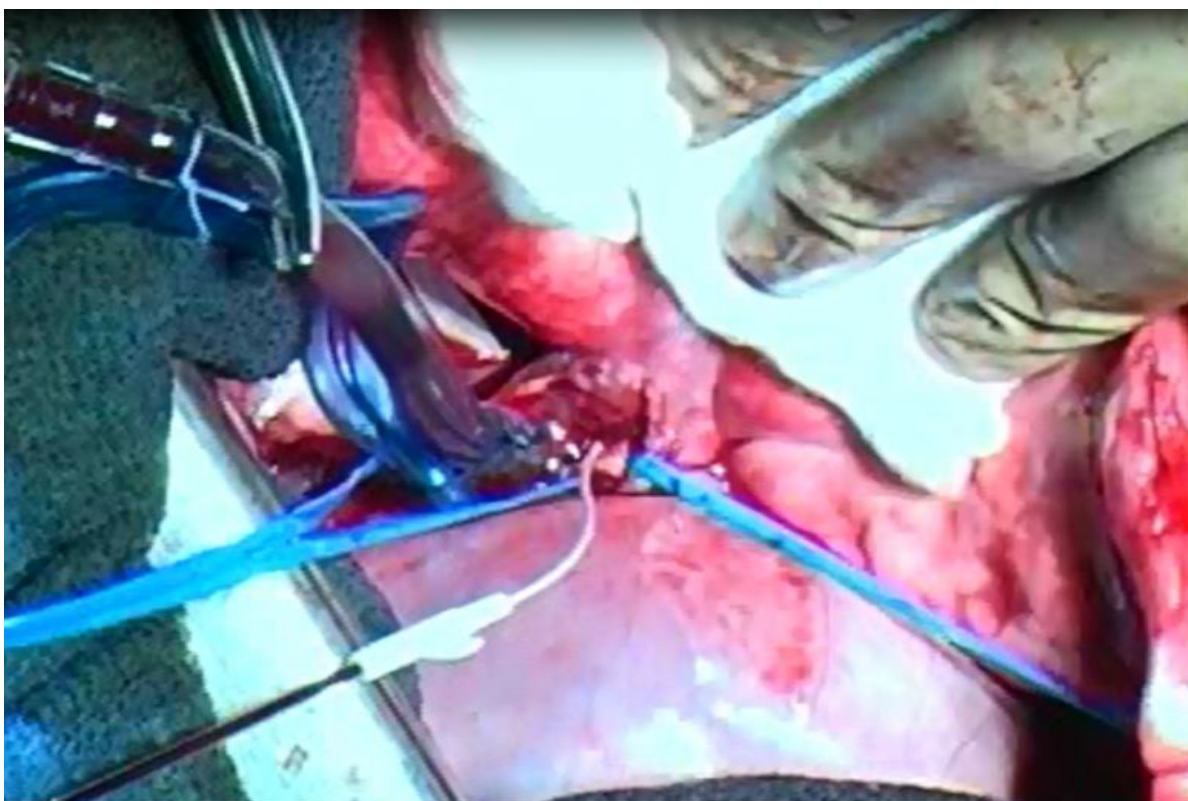


Figure 10: Vue Peropératoire du tronc de l'APG après mise en place de la canule de perfusion artérielle et du cathéter de mesure de la pression artérielle.

***Matériel de Perfusion :**

-Méthode initiale

Le circuit de perfusion était composé d'une tubulure reliée à une poche de perfusion contenant le perfusat. Cette poche était placée au-dessus du porc et la pression de perfusion était évaluée en cm d'H₂O selon la hauteur de la poche.

Le circuit de vidange était constitué d'une tubulure reliée à la canule veineuse qui se vidait dans un bac d'évacuation.

Le volume de perfusat était d'environ 2L en 30 min suivi par 500 ml de rinçage.

Le perfusat était constitué de sérum salé à 9/1000, dans lequel était reconstituée la chimiothérapie.

-Méthode finale

Le circuit de CEC était un modèle pédiatrique pré-hépariné de type Medtronic® de diamètre ¼, monté sur une pompe à galets de type Biomedicus, associé à un réservoir de cardiectomie et à un échangeur thermique.

Le liquide de perfusion était constitué de macromolécules (Voluven®, Fresenius Kabi, Sèvres, France). Le priming (volume de liquide de l'ensemble du circuit CEC) correspondait à un volume de 850 ml qui mélangé au 150 ml de sang de la circulation pulmonaire donnait un volume total dans le circuit de 1000 ml.

Après clamage des vaisseaux et démarrage de la pompe, le débit était augmenté progressivement jusqu'à obtenir une pression de perfusion dans l'artère pulmonaire équivalente à la pression moyenne mesurée pour chaque animal avant le clamage de celle-ci. Le débit d'aspiration était équivalent au débit de perfusion.

Après 5 min de perfusion par des macromolécules seules, la chimiothérapie était injectée en bolus puis la perfusion était poursuivie pendant 30 min, en adaptant le débit afin de ne pas dépasser la pression pulmonaire moyenne enregistrée avant le clamage des vaisseaux.

A la fin de la perfusion de la chimiothérapie, celle-ci était rincée du poumon par 1000 ml de macromolécules.

***Liquide de perfusion :**

Dans le but de limiter la survenue d'un OAP, nous avons utilisé un liquide de perfusion dont l'osmolarité était proche de celle du sang telle que celle des macromolécules. Awad *et al.* dès

1965 avaient mis en évidence par des manipulations de PPI chez des chiens, que la perfusion pulmonaire de macromolécules permettait de réduire la gravité des complications pulmonaires ainsi que la mortalité pour des périodes prolongées de PPI par rapport aux autres solutés [67]. Ils avaient corrélié ces bénéfices aux propriétés anti-coagulantes des macromolécules qui permettaient ainsi de réduire la thrombose intravasculaire des capillaires pulmonaires. Weksler *et al.* avait démontré également la supériorité des macromolécules par rapport aux autres solutés de perfusion: la prise de poids des poumons après perfusion était la plus faible avec les macromolécules, témoignant ainsi d'une moindre extravasation de produit dans les alvéoles pulmonaires [40].

***La pression de perfusion de l'artère pulmonaire pendant la PPI :**

Franke *et al.* avaient démontré chez le porc que la PPI avec des pressions de perfusion supérieures à 25 mmHg (PAP physiologique chez l'homme) entraînait des lésions plus sévères du parenchyme pulmonaire que la PPI avec des pressions inférieures ou égales à 25 mmHg [51]. Les porcs perfusés avec des pressions élevées présentaient une élévation des résistances vasculaires pulmonaires, une baisse de l'index cardiaque, et une dégradation de leur fonction respiratoire [51].

Grootenboers *et al.* avaient proposé de perfuser en PPI les poumons des patients à une pression maximale égale à la PAP systolique mesurée sur chaque patient avant le clampage de l'artère pulmonaire [68].

***Quelle durée de PPI ?**

Nous avons choisi une durée de PPI de 30 min à partir de l'analyse des résultats de l'étude de Vahrmeijer *et al.* dans laquelle du melphalan était perfusé sur un foie isolé présentant des métastases d'un CCR [66]. En effet les résultats montraient une chute de la moitié de la concentration du melphalan perfusé après le premier passage hépatique (environ 10-15 min). De plus la concentration en melphalan s'équilibrait entre le circuit d'entrée et de sortie du foie, indiquant que le foie était rapidement saturé après le premier passage hépatique. Ces données pharmacocinétiques suggéraient qu'une durée de perfusion plus courte (habituellement 1H pour le foie) de l'ordre de 30 min serait suffisante pour la perfusion de melphalan dans un organe isolé. A partir de l'étude de la pharmacocinétique sur le rat, Hendriks *et al.* avaient mis en

évidence que la concentration en melphalan dans l'effluent des veines pulmonaires augmentait rapidement (5 min) puis restait constante pendant toute la durée de la perfusion témoignant de la saturation du parenchyme pulmonaire murin en melphalan [13]. Enfin la concentration en melphalan, dans l'effluent veineux, revenait à 0 après le rinçage.

***Paramètres de ventilation:**

L'œdème aigu du poumon (OAP) correspond à une extravasation de liquide depuis le secteur vasculaire jusque dans l'alvéole pulmonaire. Il était le résultat d'une augmentation de la pression artérielle pulmonaire (PAP) ou d'une diminution de la pression oncotique. Dans le cas de la PPI, le risque d'OAP est principalement lié à l'augmentation de la PAP pendant la perfusion. Afin de lutter contre la sortie de liquide depuis les capillaires pulmonaires vers l'alvéole, le maintien d'une PEEP est utilisé en anesthésie. En effet, Kredel *et al.* avaient mis en évidence que l'utilisation de PEEP élevées (21 cmH₂O) améliorait significativement l'oxygénation sanguine ($PaO_2/FIO_2 = 416 \pm 80$ mmHg vs 189 ± 55 mmHg) comparativement à de faibles PEEP (9 à 12 cmH₂O) [69]. Ils avaient montré également que l'association de PEEP élevées avec de faibles volumes courant permettait de diminuer significativement le score de lésions de la membrane alvéolo-capillaire par rapport à l'utilisation de PEEP élevées et d'un volume courant élevé (0,9 vs 1,6) et par rapport à l'utilisation de faibles PEEP et d'un volume courant élevé (0,9 vs 1,9). De plus, la ventilation des patients présentant une agression pulmonaire aigue par de faibles volumes courant (6ml/kg) améliorait la survie et diminuait la durée de ventilation mécanique par rapport à l'utilisation d'un volume courant traditionnel (12ml/kg) [70].

Ainsi nous avons utilisé une PEEP à 5 mmHg et un volume courant de l'ordre de 8 ml/kg, permettant de minimiser les lésions alvéolo-capillaires.

***Comment lutter contre le mécanisme d'ischémie/reperfusion ?**

Au cours de la PPI, le parenchyme pulmonaire était soumis à un mécanisme d'ischémie au cours du clampage suivi par une reperfusion par le sang circulant au moment du déclampage. Cette séquence d'ischémie-reperfusion (I/R) entraînait la production de radicaux libres dérivés de l'oxygène, ceux-ci provoquant des lésions vasculaires pulmonaires responsables d'une augmentation des résistances vasculaires pulmonaires et de la perméabilité des capillaires

pulmonaires. L'augmentation de ces résistances vasculaires pulmonaires qui en résultait, contribuait au développement d'un OAP [71]. Afin de minimiser les lésions occasionnées par cette séquence, nous avons eu recours à une technique de préconditionnement ischémique. Le principe de cette technique était de préparer l'organe (ici le poumon) afin qu'il tolère mieux les lésions engendrées par la séquence I/R. Cette préparation avait pour objectif de provoquer un mécanisme d'adaptation physiopathologique de l'organe. Elle se définissait par la répétition de brefs épisodes d'ischémie suivie de courtes reperfusions avant une ischémie prolongée. Soncul *et al.* avaient mis en évidence une diminution significative des PAP ainsi que des lésions histologiques du parenchyme pulmonaire en utilisant un préconditionnement avant la procédure de PPI chez le porc [72]. Leur préconditionnement correspondait à une ischémie de 5 min suivi d'une reperfusion de 5 min, cette séquence de préconditionnement étant répétée 2 fois avant le clampage prolongé.

Ib-In vitro :

***Dosage de Gemcitabine :**

-Dans le parenchyme pulmonaire :

Les prélèvements de parenchyme pulmonaire étaient congelés au bloc opératoire par immersion dans de l'azote liquide. De retour au laboratoire, les prélèvements étaient broyés dans un mortier contenant de l'azote liquide à l'aide d'un pilon. La poudre ainsi obtenue était pesée pour chaque échantillon. Afin de doser la GEM intracellulaire en plus de celle présente dans le milieu interstitiel, la poudre de parenchyme était plongée dans 1 ml de Boiling Buffer (substance permettant l'extraction des protéines intra-cellulaires) pendant 10 min. On y ajoutait 40 µl d'anti-protéase et 10 µl de Tetrahydrouridine (THU) (inhibiteur de la dégradation enzymatique de la GEM par la cytidine désaminase). L'ensemble était ensuite soumis aux ultrasons puis centrifugé à 4°C pendant 10 min à 12000 G. Le surnageant était alors récupéré puis congelé à -20°C. Enfin les prélèvements étaient envoyés au Laboratoire de Saint Cloud pour le dosage de la GEM par chromatographie haute-performance comme décrit précédemment [73].

-Dans la circulation systémique :

Les prélèvements de sang total sur la voie veineuse centrale étaient réalisés au bloc opératoire afin de rechercher d'éventuelles fuites de GEM dans la circulation générale puis conservés à

4°C dans la glace. De retour au laboratoire, les prélèvements étaient centrifugés à 4°C pendant 5 min à 4000 tr/min. Le plasma était ensuite mélangé à 10 µl de THU/ml de plasma puis congelé à -20°C. Enfin les prélèvements étaient envoyés au Laboratoire de Saint Cloud pour le dosage de la GEM.

-Dans le circuit de perfusion :

A la fin de la perfusion, 50 ml de liquide était prélevé dans le circuit de perfusion puis conservé à 4°C dans la glace. De retour au laboratoire, les prélèvements étaient centrifugés à 4°C pendant 5 min à 4000 tr/min, le surnageant était congelé à -20°C.

***Tests de Viabilité cellulaire du liquide de fin de perfusion :**

A la fin de chaque procédure, du liquide était prélevé dans le circuit de CEC puis utilisé pour traiter des cellules tumorales après 24H de culture, avec la même technique que pour le screening des chimiothérapies.

***Analyse histologique de parenchyme pulmonaire :**

-En fin de PPI :

A la fin de chaque expérimentation, un échantillon de parenchyme pulmonaire était prélevé au niveau du lobe supérieur et du lobe inférieur. Après fixation dans le formol, les échantillons étaient inclus en paraffine puis préparés en coupe de 5 microns. Deux lames étaient préparées pour chaque échantillon de tissu. Enfin, les lames étaient colorées par hématoxyne-éosine-safran. La sévérité de l'œdème périvasculaire, péribronchique, septal et alvéolaire, ainsi que l'infiltration cellulaire périvasculaire, interstitielle et alvéolaire étaient évaluées par le score de Chiang *et al.* [74].

Ce score évaluait le degré d'agression pulmonaire comme suit :

- œdème périvasculaire = 1
- œdème péribronchique = 2
- œdème interstitiel = 2
- infiltration cellulaire périvasculaire = 2
- œdème alvéolaire = 3
- infiltration cellulaire interstitielle = 3

- infiltration cellulaire alvéolaire = 4

Un score global pour chaque animal était établi par addition des scores des différentes lésions rencontrées, puis par la somme des lobes supérieurs et inférieurs.

- 28 jours après la PPI :

Au 28^{ième} jour postopératoire, les porcs étaient réopérés et des échantillons de parenchyme pulmonaire étaient prélevés au niveau des lobes supérieurs et inférieurs, comme précédemment décrits.

La préparation et l'analyse des résultats se faisaient de la même façon qu'en fin de PPI, avec évaluation de l'agression tissulaire pulmonaire selon le score de Chiang [74].

II-METHODE STATISTIQUE :

Les variables continues étaient rapportées par leur moyenne avec leur écart-type et comparées en utilisant un test de student. Les variables catégorielles étaient rapportées comme des taux ou des proportions et étaient comparées par un test de Chi².

Concernant les paramètres hémodynamiques, nous avons comparé les valeurs moyennes mesurées de façon répétée chez un même animal par une analyse de variance. Lorsque les résultats de l'analyse de variance étaient statistiquement significatifs ($p < 0,05$), nous avons comparé deux à deux les valeurs selon la méthode de Benferroni (réduction du risque α).

Les analyses statistiques étaient menées en utilisant le logiciel de statistiques STATA 12 (StataCorp, College Station, USA)

III-RESULTATS:

Quinze porcs avaient été nécessaires pour l'apprentissage de la technique et avaient dû être sacrifiés. L'étude de phase I de la GEM avait défini la concentration maximale systémique de la GEM après 30 min de perfusion intraveineuse à la dose de 790 mg/m² à 20 µg/ml/h [63].

De ce fait, nous avons réparti les porcs en trois groupes selon la dose de GEM perfusée pendant la PPI : 0 µg/ml (groupe contrôle, n=5 animaux), 20µg/ml (n=7) et 100µg/ml (n=7).

IIIa-In vivo :

***Etude de l'hémodynamique et des paramètres respiratoires pendant la PPI (Tableau 5):**

-La pression artérielle systémique moyenne:

L'analyse statistique des valeurs moyennes de PAS ne montrait pas de différence significative de valeurs moyennes de PAS entre les valeurs avant (97,6 mmHg $\pm$ 13,56), pendant (95,26 mmHg $\pm$ 16,07) et après la PPI (91,33 mmHg $\pm$ 17,94) (p=0,5585).

L'analyse statistique des valeurs moyennes de PAD ne montrait pas de différence significative de valeurs moyennes de PAD entre les valeurs avant (49,8 mmHg $\pm$ 16,47), pendant (49,8 mmHg $\pm$ 15,13) et après la PPI (44,46 mmHg $\pm$ 15,75) (p=0,57).

-La fréquence cardiaque (FC):

L'analyse statistique des valeurs moyennes de la fréquence cardiaque (FC) ne montrait pas de différence significative de valeurs moyennes de FC entre les valeurs avant (102,26 /min $\pm$ 22,20), pendant (107,33 /min $\pm$ 19,60) et après la PPI (104,33 /min $\pm$ 21,21) (p=0,8035).

-La saturation artérielle en oxygène (SaO2):

L'analyse statistique des valeurs moyennes de la saturation artérielle en oxygène (SaO2) ne montrait pas de différence significative de valeurs moyennes de SaO2 entre les valeurs avant (98,6 % $\pm$ 1,72), pendant (98,26 % $\pm$ 2,05) et après la PPI (98,33 % $\pm$ 1,71) (p=0,8714).

-La pression partielle en CO2 dans le gaz expiré (PCO2):

L'analyse statistique des valeurs moyennes de pression partielle en CO2 dans le gaz expiré

(PCO₂) ne montrait pas de différence significative entre les valeurs moyennes de PCO₂ avant (36,66 mmHg $\pm$ 7,41), pendant (34,13 mmHg $\pm$ 7,09) et après la PPI (35,66 mmHg $\pm$ 7,63) (p=0,6420).

Paramètres hémodynamiques et respiratoires étudiés	Avant la PPI	Pendant la PPI	Après la PPI	P-value
Pression Artérielle Systolique (mmHg)	97,60 $\pm$ 13,56	95,226 $\pm$ 16,07	91,333 $\pm$ 17,94	0,5585
Pression Artérielle Diastolique (mmHg)	49,8 $\pm$ 16,47	49,8 $\pm$ 15,13	44,466 $\pm$ 15,75	0,57
Fréquence cardiaque (/min)	102,26 $\pm$ 22,2	107,33 $\pm$ 19,6	104,33 $\pm$ 21,2	0,8035
SaO ₂ (%)	98,6 $\pm$ 1,72	98,266 $\pm$ 2,05	98,33 $\pm$ 1,71	0,8714
PCO ₂ (mmHg)	36,66 $\pm$ 7,41	34,13 $\pm$ 7,09	35,66 $\pm$ 7,63	0,642

Tableau 5 : Paramètres hémodynamiques et respiratoires pendant la PPI

-La pression artérielle pulmonaire moyenne et le débit de perfusion de l'artère pulmonaire (Figure 11):

Avant le clampage de l'artère pulmonaire gauche, des variations individuelles dans les valeurs de la pression moyenne de l'artère pulmonaire gauche (PMAPG) de base avaient été enregistrées, allant de 18 à 34 mmHg. Après clampage de l'artère pulmonaire gauche (APG), le débit de perfusion était progressivement augmenté pour atteindre une valeur aux alentours de 500 à 600 ml/min. Dans le groupe GEM, la PMAPG augmentait progressivement (Figure 11A), entraînant une baisse du débit de perfusion du circuit de CEC afin de maintenir la PMAPG à une valeur équivalente à celle enregistrée avant le clampage de l'APG (Figure 11B). En conséquence, la PMAPG n'était pas significativement différente entre les trois groupes, mais

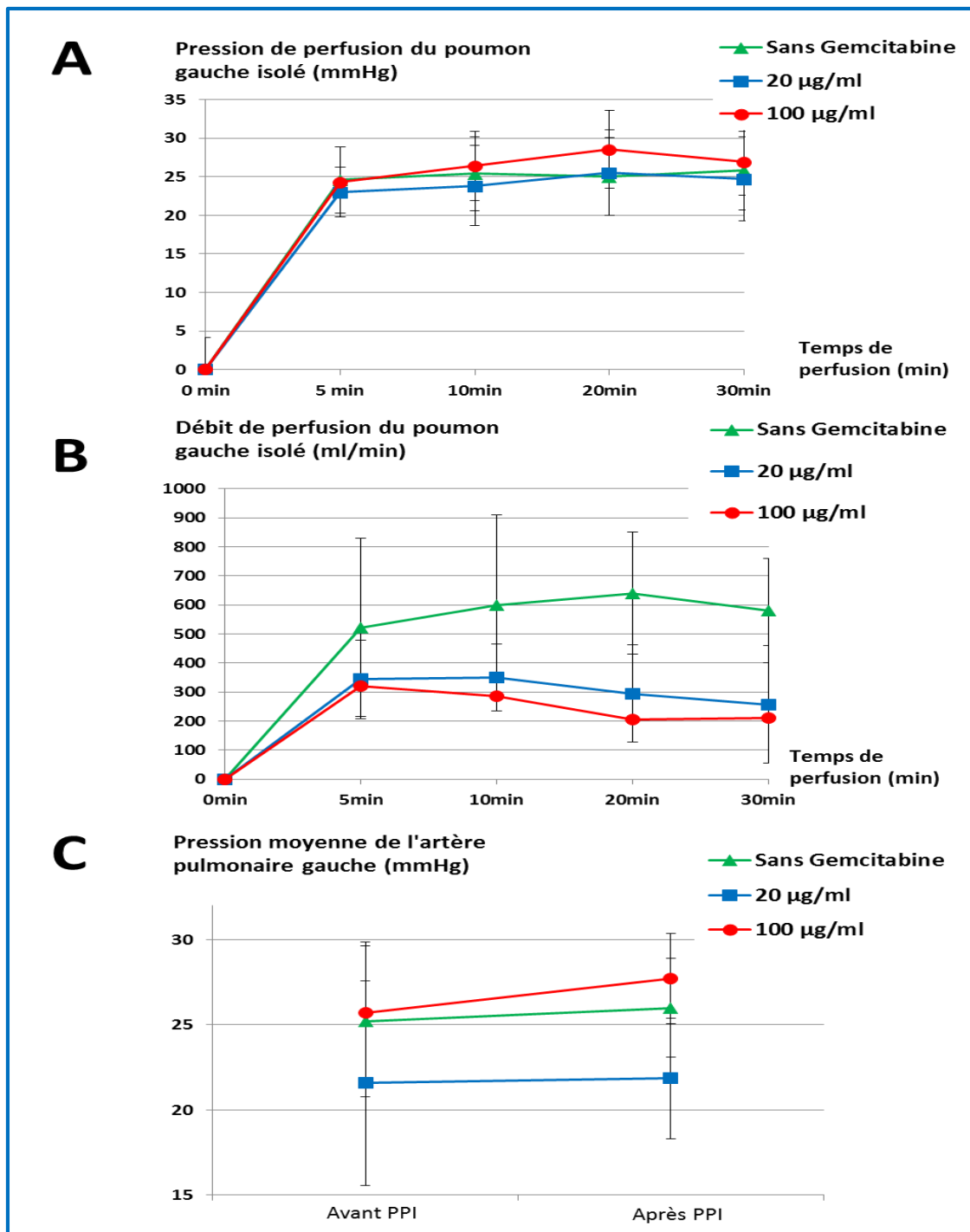


Figure 11: A- Pression de perfusion du poumon gauche isolé (mmHg) avec des macromolécules, 20µg/ml de GEM, 100 µg/ml de GEM pendant 30 min B- Débit de perfusion du poumon gauche isolé (ml/min) avec des macromolécules ($580 \pm 178,88$ ml/min), 20 µg/ml de GEM ($257,14 \pm 202,62$ ml/min), 100 µg/ml ($210 \pm 138,92$ ml/min) pendant 30 min ($p=0,0055$) C- Pression moyenne de l'artère pulmonaire gauche (mmHg) avant et après PP avec des macromolécules, 20 µg/ml de GEM et 100 µg/ml de GEM pendant 30 min ($p=0,7187$).

le débit de perfusion de l'APG à 30 min était plus faible dans le groupe GEM que dans le groupe contrôle. Il existait une corrélation inverse entre la concentration en GEM dans le circuit de perfusion et le débit moyen de perfusion de l'APG à 30 min ($p=0,0158$). Il n'y avait pas de différence significative entre la PMAPG avant et après la procédure de PPI ($p=0,7187$, Figure 12C).

IIIb-In vitro :

*** Etude pharmacocinétique de la chimiothérapie dans le circuit de perfusion et dans le parenchyme pulmonaire :**

Après 30 min de perfusion, la concentration de GEM était plus importante pour le groupe 100 $\mu\text{g/ml}$ que pour le groupe 20 $\mu\text{g/ml}$ lorsqu'elle était mesurée dans le circuit de CEC ($74,29 \pm 18,06$ vs $22,85 \pm 6,51$ $\mu\text{g/ml}$ respectivement, $p=0,0001$) et dans le parenchyme pulmonaire ($141,46 \pm 117,07$ $\mu\text{g/g}$ vs $56,91 \pm 28,06$ $\mu\text{g/g}$ respectivement, $p=0,014$).

***Tests de viabilité cellulaire avec l'effluent du circuit de perfusion :**

Les tests de viabilité cellulaire menés sur les lignées de CCR avec le liquide effluent du circuit de perfusion prélevé après 30 min de perfusion montraient la persistance d'une activité cytotoxique de l'effluent pulmonaire à la fin de la procédure de PPI. Il n'existait pas de différence d'activité cytotoxique entre les deux groupes de perfusion du GEM, respectivement 20 et 100 $\mu\text{g/ml}$ (Figure 12).

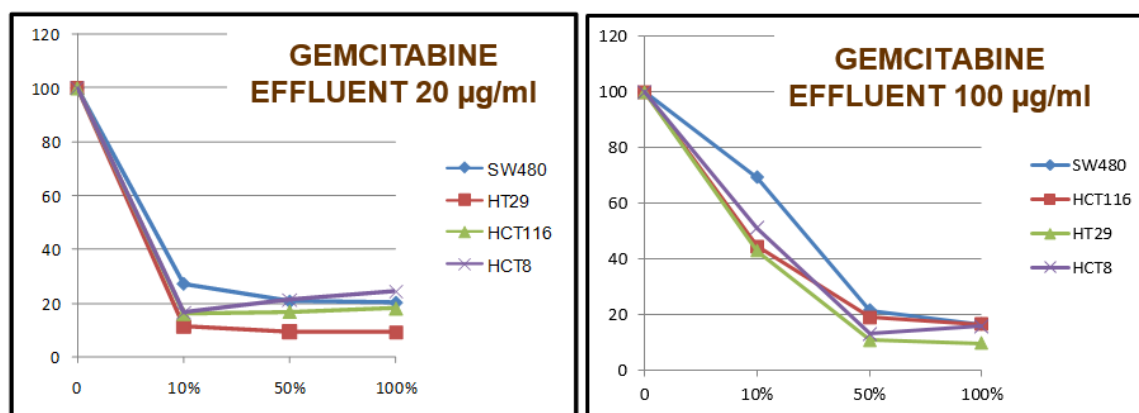


Figure 12: Viabilité des lignées cellulaires après 30 min d'exposition au liquide effluent du circuit pour une dose de GEM de 20 μg ou 100 $\mu\text{g/ml}$.

***Etude pharmacocinétique de la chimiothérapie dans la circulation systémique :**

Dans la circulation systémique, le pic maximum de concentration de la GEM après la PPI était de $0,638 \pm 0,27$ µg/ml pour le groupe 100 µg/ml et de $0,248 \pm 0,15$ /ml pour le groupe 20 µg/ml (Tableau 6).

Durée de perfusion (min)	Fuites de Gemcitabine dans la circulation systémique	
	20 µg/ml	100 µg/ml
0	0	0
5	$0,248 \pm 0,15$	$0,638 \pm 0,27$
10	$0,219 \pm 0,11$	$0,598 \pm 0,23$
20	$0,212 \pm 0,1$	$0,540 \pm 0,21$
30	$0,208 \pm 0,11$	$0,510 \pm 0,17$

Tableau 6 : Recherche de fuites de GEM dans la circulation systémique en µg/ml

***Analyse histologique de parenchyme pulmonaire :**

-En fin de PPI (Figure 13):

L'analyse histologique des prélèvements de parenchyme pulmonaire en fin de PPI ne retrouvait pas de nécrose pulmonaire ni de fibrose, que ce soit macroscopiquement ou microscopiquement. Les lésions les plus fréquemment mises en évidence étaient l'œdème péri-bronchique (Figure 13 B & C) et de l'infiltration interstitielle (Figure 13 C & D).

Des lésions tissulaires plus sévères à type d'infiltration cellulaire alvéolaire (Figure 13 F) avaient été retrouvées pour les trois premiers animaux du groupe contrôle. Ils avaient présenté un OAP en fin de PPI lié à une augmentation trop rapide du débit de perfusion de l'APG avec une hyperpression dans l'APG.

Le score de Chiang moyen était de $5,05 \pm 3,52$ dans le groupe contrôle, sans différence significative avec les deux autres groupes. Il n'existait pas non plus de corrélation entre le score

de Chiang et la dose de GEM perfusée ($p= 0,7491$), et entre le score de Chiang et la concentration de GEM dans le parenchyme pulmonaire ($p=0,7278$)(Tableau 7).

NB : Lors de la mise au point, des lésions de barotraumatisme (Figure 13 G & H) avaient été retrouvées pour les animaux opérés selon la première technique (sans pompe de CEC) avec une régulation moins précise du débit de perfusion de l'APG et de la PMAPG.

-28 jours après la PPI :

Il n'existait pas de corrélation entre la dose de GEM perfusée et le score histologique de Chiang ($p=0,0846$) (Tableau 7).

	Concentration de la gemcitabine dans le perfusat pulmonaire ($\mu\text{g/ml}$)	Score moyen d'agression tissulaire de Chiang sur le poumon gauche	P-value
A la fin de la procédure de PPI	0	5.05 ± 3.52	0.7491
	20	4.14 ± 3.10	
	100	5.46 ± 3.28	
Après un mois de survie	0	10 ± 2.29	0.0846
	20	6 ± 1.66	
	100	6.12 ± 1.94	

Tableau 7 : Score histologique de Chiang à la fin de la PPI et à un mois selon la dose de GEM perfusée.

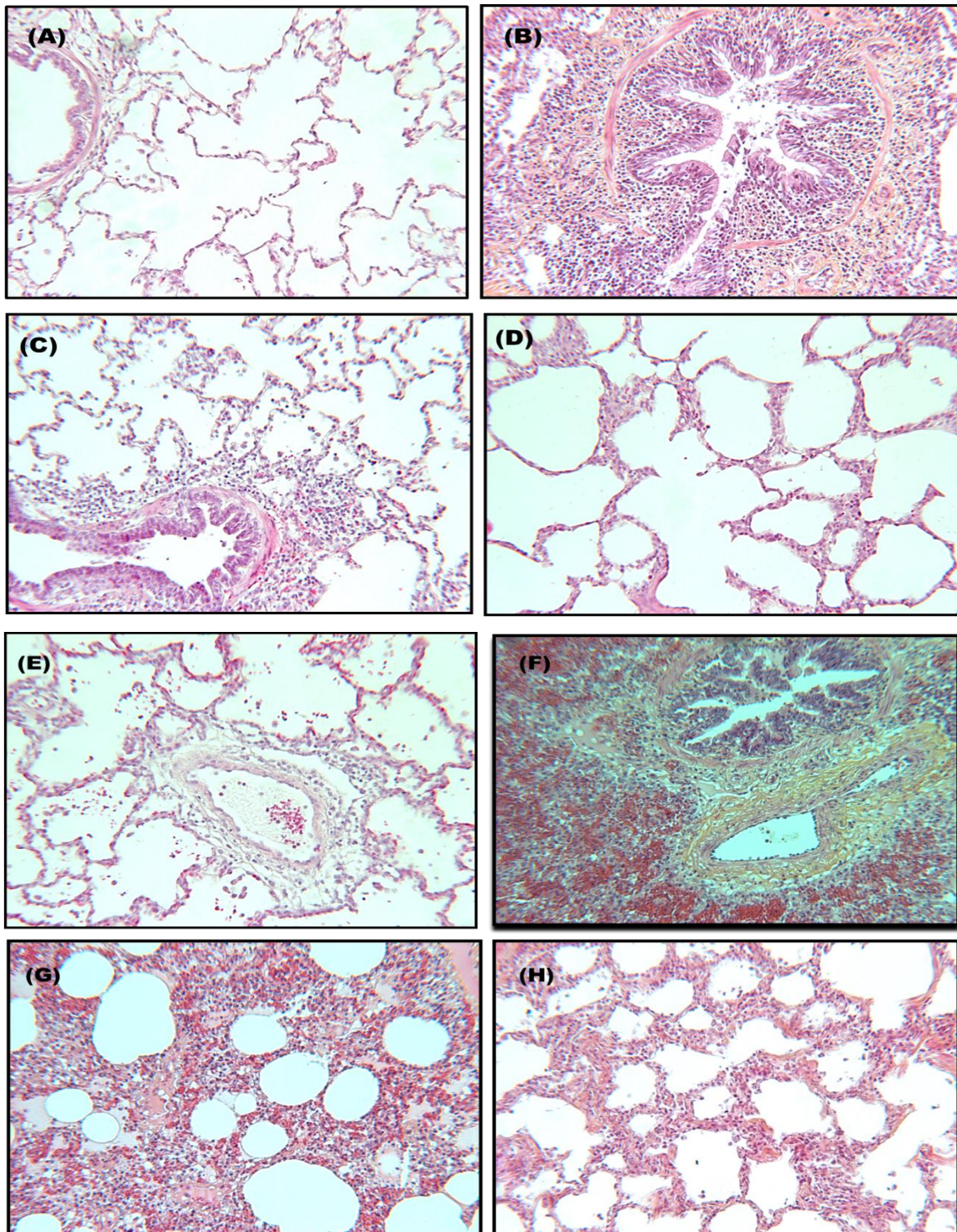


Figure 13 : Coupes histologiques présentant les différents types de lésions rencontrées en fonction d'une coupe de tissu pulmonaire normal **(A)**. **(B)** Œdème péri-bronchique. **(C)** Œdème péri-bronchique et infiltration cellulaire interstitielle légère. **(D)** Infiltration cellulaire interstitielle modérée. **(E)** Infiltration cellulaire péri-vasculaire et infiltration cellulaire interstitielle. **(F)** Infiltration cellulaire alvéolaire, interstitielle et péri-vasculaire. **(G)** Lésions de barotraumatisme et infiltration cellulaire alvéolaire. **(H)** Lésions de barotraumatisme et infiltration cellulaire interstitielle.

***Etude des fonctions hépatique et rénale :**

Aucune toxicité hépatique ou rénale n'avait été mise en évidence en fin de PPI ou à 28 jours.

	Concentration de la gemcitabine dans le perfusat pulmonaire (µg/ml)	Paramètres Biologiques			
		ALAT (U/L)	ASAT (U/L)	PAL (U/L)	Créat mg/L)
Valeurs moyennes préopératoire		30 ± 7	50 ± 11	108 ± 20	14,2 ± 3,4
A la fin de la procédure de PPI	0	38 ± 19	68,33 ± 54,3	87,33 ± 15,5	17,56 ± 0,66
	20	53,2 ± 39,62	69 ± 64,07	103,2 ± 21,95	13,03 ± 2,39
	100	23,75 ± 7,54	30,25 ± 7,63	115,75 ± 15,08	14,27 ± 4,92
Après un mois de survie	0	25,33 ± 3,21	30,35 ± 7,63	115,75 ± 15,08	14,27 ± 3,48
	20	24 ± 4,12	23 ± 8,86	114,4 ± 21,81	16,56 ± 4,14
	100	27,25 ± 4,34	26,5 ± 12,39	126,25 ± 18,11	16,56 ± 3,87

Tableau 8 : Paramètres biologiques à la fin de la PPI et à 28 jours

ALAT alanine aminotransferase, *Alk Ph* phosphatase alcaline, *ASAT* aspartate aminotransferase, *Creat* créatinémie

IIIC-Problèmes rencontrés pendant la mise au point de la technique:

Les difficultés concernant l'expérimentation animale avaient été nombreuses :

- Les premières manipulations avaient été l'objet de décès per-opératoires par hémorragies majeures liées à une connaissance insuffisante de l'anatomie porcine par l'opérateur et à l'apprentissage de la technique.
- La totalité de la procédure, dont la dissection, était réalisée sur un poumon ventilé. Cela conduisait à des difficultés d'exposition ainsi qu'à la constitution de brèches pulmonaires par les écarteurs, avec deux conséquences majeures : des fuites de liquide dans le thorax au moment de la perfusion et des fuites aériennes rendant difficile le réveil de l'animal. Ce problème avait

été réglé par la mise en place d'une exclusion pulmonaire au moyen de Bloqueurs placés sous contrôle fibroscopique.

- La technique initiale était dérivée directement de celle pratiquée chez l'homme, utilisant une canulation séparée de chaque veine pulmonaire. Cependant, chez le porc, la veine pulmonaire supérieure était de taille insuffisante pour être canulée séparément. La démarche initialement adoptée était de canuler uniquement la veine pulmonaire inférieure et de clamber les deux veines à cheval sur l'oreillette gauche.

- La méthode de perfusion initiale utilisait une simple perfusion par gravité. Cependant cette technique était trop imprécise et les pressions de perfusion certainement trop élevées responsables d'OAP majeur et de lésions de barotraumatisme.

- Le monitoring de la pression de perfusion se faisait au niveau post-capillaire et non au niveau de l'entrée dans l'artère pulmonaire. Les pressions étaient maintenues par une canule de More qui limitait le retour veineux. Les pressions n'étaient pas spécifique de chaque animal et certainement trop élevées dans bon nombre de cas, conduisant à un OAP majeur.

Suite à notre visite à Anvers (Belgique) dans le service du Pr Van Schil où nous avons assisté, sur un jeune homme présentant des métastases pulmonaires d'un ostéosarcome à une procédure de PPI, nous avons modifié notre technique :

- utilisation d'une canule de perfusion métallique à angle droit.
- mise en place d'une tête de pression dans l'artère pulmonaire, afin de monitorer la pression avant, pendant et après la PPI.
- utilisation d'un circuit et d'une pompe de CEC.

Concernant la mise au point technique lors des premières procédures le poumon perfusé n'était pas reventilé, or les PAM de perfusion étaient élevées. Il était apparu que la ré-expansion du poumon avant le début de la perfusion permettait d'obtenir des débits de perfusion plus élevés pour une PMAPG de perfusion identique. Cette ré-expansion du poumon permettait d'assurer une perfusion plus homogène et physiologique du produit dans l'ensemble du parenchyme pulmonaire.

Enfin, une partie des prélèvements expédiés au laboratoire de Saint-Cloud pour le dosage de la GEM dans le sang, le circuit de CEC et le parenchyme pulmonaire avaient été égarés par le transporteur, conduisant à la perte d'une partie des données de pharmacocinétique.

IV-DISCUSSION :

Initialement développée comme traitement adjuvant des métastases pulmonaires des sarcomes, la PPI avait généré un intérêt considérable du fait du taux élevé de récurrence pulmonaire et de la diminution de la survie à long-terme dans cette pathologie, même après résection chirurgicale complète [3]. Les avantages potentiels de la PPI étaient la possibilité de délivrer une dose élevée de chimiothérapie au poumon, conduisant à une rapide saturation du parenchyme pulmonaire et limitant les fuites systémiques [13,29,66,75]. Ainsi une perfusion pendant plus de 30 min n'apportait pas de bénéfice en termes de dose de chimiothérapie délivré au parenchyme pulmonaire.

Concernant la perfusion isolée d'organe, le design classique d'escalade de dose était inutile si l'on utilisait un circuit de CEC avec une concentration de chimiothérapie stable exposant le parenchyme de l'organe à des concentrations actives de chimiothérapie associée à une saturation tissulaire normale [52]. Dans notre série, la concentration de GEM utilisée durant la PPI était entre 18 et 40 fois supérieure à l'IC 50 retrouvé in vitro, conduisant à une concentration stable de GEM dans le circuit pendant toute la perfusion, pour des fuites systémiques minimales. Pour les deux groupes, les concentrations de GEM dans le circuit de perfusion étaient largement plus élevées (entre 3 et 20 fois) que celles retrouvées dans le plasma des patients traités par de la GEM par voie intraveineuse, comme l'avait mise en évidence l'étude de phase I de la GEM [63]. De plus, l'activité cytotoxique de l'effluent pulmonaire démontrait la persistance de concentrations élevées de GEM et qui maintenaient l'activité cytotoxique. Ces 3 éléments indiquaient une saturation du parenchyme pulmonaire dans son ensemble pendant la PPI, cependant la répartition de la GEM dans le parenchyme pulmonaire était plus douteuse.

Durant la PPI, la pression de perfusion était maintenue équivalente à la PMAPG mesurée avant le clamping afin de prévenir la survenue d'un OAP ou de lésions histologiques aiguës [51,68]. L'adjonction de GEM dans le circuit de perfusion était associée à une augmentation des résistances vasculaires pulmonaires et par conséquent de l'augmentation de la PMAPG. Cette toxicité vasculaire transitoire avait déjà été rapportée à la suite de l'administration systémique de GEM, et décrite comme une vasoconstriction temporaire associée à un syndrome de fuite capillaire systémique [76]. Nous avons mis en évidence que durant la PPI, ce phénomène vasculaire était dose-dépendant et réversible, responsable d'une baisse du débit de perfusion afin de contrôler la pression de perfusion de l'APG.

Au final, nous avons trouvé des concentrations hétérogènes de GEM dans le parenchyme pulmonaire selon la localisation du prélèvement et quel que soit la concentration de GEM

perfusé, comme précédemment décrit pour la perfusion par PPI d'autres agents cytotoxiques [77]. Cette hétérogénéité pouvait être interprétée comme une conséquence de la vasoconstriction aléatoire induite par la GEM et pourrait être contrebalancée par l'adjonction de vasodilatateurs à fortes doses dans le circuit de CEC pendant la PPI avec la GEM.

Des scores histologiques de Chiang élevés avaient été retrouvés dans le groupe contrôle et dans les groupes GEM que ce soit en fin de procédure de PPI ou après un mois de survie. Franke *et al.* ont démontré que l'augmentation de la PMAPG au cours de la procédure de PPI avait des effets délétères sur le parenchyme pulmonaire [51]. Cependant dans notre série la pression de perfusion était significativement différente dans le groupe contrôle par rapport aux groupes GEM. La seule différence significative sur le plan hémodynamique entre les groupes était un débit de perfusion plus élevé dans le groupe contrôle par rapport aux deux autres. Cette augmentation du débit de perfusion pourrait être responsable des effets délétères sur le parenchyme pulmonaire.

Ainsi cette étape mettait en évidence que la technique de PPI avec la GEM est sûre et reproductible, permettant de délivrer de fortes doses de GEM au parenchyme pulmonaire avec des fuites systémiques très limitées. Cependant, la vasoconstriction transitoire et dose-dépendante induite par la GEM fut responsable d'une distribution hétérogène de la GEM dans le parenchyme pulmonaire.

A la lumière de cette étape de mise au point de la technique de PPI avec de la GEM, il nous est paru intéressant, dans l'objectif de réaliser une étude de faisabilité chez l'homme dans le cadre du traitement adjuvant de la résection chirurgicale des métastases pulmonaires des CCR, de conduire une étude d'escalade de dose de la GEM afin de déterminer la dose maximale toxique administrable en PPI pour la GEM, d'autant plus que cette drogue a un effet cytotoxique dépendant de la dose administrée [63,64].

Les travaux menés au cours de ces deux premières parties ont permis :

-trois communications orales lors de congrès français :

-Perfusion pulmonaire temporairement isolée de la circulation générale: mise au point chez le porc. PB Pagès, O Facy, H Abbou Hanna, P Ortega-Deballon, G Magnin, S Ladoire, F Ghiringhelli, A Bernard. 64ème Congrès de la SFCTCV, Lyon, juin 2011.

-La gemcitabine a-t-elle une toxicité vasculaire au cours de la perfusion pulmonaire isolée ? Pagès PB, Ladoire S, Malapert G, Abbou Hanna H, Magnin G, Benard T, Ghiringhelli F, Bernard A. 65ème Congrès de la SFCTCV, Nice, mai 2012.

-Perfusion pulmonaire isolée pour le traitement des métastases pulmonaires des cancers colorectaux : mise au point chez le porc. Pagès PB, Facy O, Ladoire S, Magnin G, Lokiec F, Ghiringhelli F, Bernard A. Eurocancer, Paris, Juin 2012.

-une publication dans une revue internationale :

Pagès PB, Facy O, Mordant P, Ladoire S, Magnin G, Lokiec F, Ghiringhelli F, Bernard A. Isolated lung perfusion as an adjuvant treatment of colorectal cancer lung metastases: a preclinical study in a pig model. Plos One 2013;8(3):e59485. (Annexe)

Partie III :
Etude d'escalade de dose de
chimiothérapie administrée
par perfusion pulmonaire
isolée chez le porc

I-MATERIELS ET METHODES :

L'objectif de cette troisième étape était de déterminer la dose maximale tolérée (DMT) et la toxicité limitant la dose (TLD) de GEM administrable en PPI. Pour cela nous avons réalisé des paliers de dose: la dose seuil de départ était de 40 µg/ml, ensuite nous avons doublé la dose de GEM administrée à chaque palier jusqu'à obtenir le décès postopératoire systématique des animaux ou des lésions pulmonaires majeures à l'autopsie après 28 jours de survie.

Ia-In Vivo :

***Plan expérimental de l'étude (Tableau 9):**

Lors de l'étude de phase I de la GEM, Abbruzzese *et al.* avaient mis en évidence qu'à la dose de 1000 mg/m² de GEM, le pic maximal de GEM retrouvé dans la circulation systémique était de 108 µmol/l soit 28,42 µg/ml [63]. La conclusion de cette étude était que la DMT de la GEM était de 790 mg/m² : à cette dose de GEM la concentration moyenne maximale mise en évidence dans la circulation était de 20 µg/ml [63].

Dans nos précédents travaux [78], nous avons montré que la dose de 20 µg/ml délivrée en PPI chez le porc ne provoquait pas de lésions histologiques majeures sur le poumon perfusé. Nous avons donc conduit une étude de tolérance de dose de la GEM administrée en PPI sur un seul poumon chez le porc, en doublant la dose à chaque palier. La dose de départ était donc 40 mg/L (soit 40 µg/ml) puis cette dose était doublée à chaque palier comme suit.

Niveau de dose en µg/ml	Nombre d'animaux opérés	Nombre d'animaux survivants après 28 jours
40	3	3
80	6	2
160	2	2
320	4	2
640	6	2
1280	3	0
Total	24	11

Tableau 9 : Plan expérimental de l'étude

***Les Animaux :**

Nous avons utilisé les mêmes porcs mâles ou femelles de type « Large-white » de 3 mois, pesant entre 50 et 55 Kgs, provenant de l'éleveur Hazotte (Beaumont, France). Les expérimentations étaient approuvées par le comité éthique de l'université de Bourgogne (N° de protocole A0809).

***Technique d'Anesthésie :**

L'anesthésie était conduite de la même façon que lors de la mise au point de la technique de PPI.

En fin d'intervention, un bloc paravertébral était réalisé par l'injection de Ropivacaine (Naropéine®, Vetoquinol). Puis les animaux étaient réveillés si leur état le permettait, extubés puis remis dans leur box. Une surveillance était effectuée pendant 2 à 3 h avant de laisser pour la nuit dans un box chauffé avec accès à l'eau et à la nourriture. Un traitement antalgique était administré régulièrement pendant une semaine.

Après 28 jours de suivi, les porcs étaient sacrifiés. Dans un premier temps une injection létale de Sufentanil était réalisée, complétée ensuite par l'injection intracardiaque de PentoBarbital (Dolethal®, Vetoquinol). On procédait alors à des prélèvements de parenchyme pulmonaire qui étaient plongés dans le formol pour réaliser une analyse histologique.

*** Technique Chirurgicale de PPI :**

La technique chirurgicale était identique à celle décrite précédemment : une thoracotomie latérale gauche était réalisée après exclusion pulmonaire gauche par un bloqueur mis en place sous fibroscopie. Le péricarde était ouvert en regard de l'oreillette gauche. La veine azygos était disséquée puis liée au ras de l'oreillette droite. L'artère pulmonaire gauche, ainsi que les deux veines pulmonaires gauches, étaient disséquées et mises sur lac silastic. La bronche souche gauche était disséquée et mise sur lacette avec une tirette. Après héparinisation à 100 UI/Kg, une double bourse au prolène 4.0 était réalisée sur l'artère pulmonaire ainsi qu'à la naissance de la veine pulmonaire inférieure gauche à cheval sur l'oreillette gauche. Après avoir été rincée par de l'héparine, la canule artérielle (High Flow Aortic Arch Canula 3.8 mm, Terumo®, Ann Arbor, USA) était ensuite introduite dans l'artère pulmonaire gauche, qui avait été clampée temporairement au préalable, et serrée sur deux tirettes.

Un cathéter était introduit dans l'origine de l'artère pulmonaire en aval de la canule de perfusion pour mesurer la PMAPG avant, pendant et après la perfusion.

Après avoir été rincée par de l'héparine, la canule veineuse (DLP Left Heart Vent Catheter, Medtronic®, Minneapolis, USA) était introduite dans l'abouchement de la veine pulmonaire inférieure par l'oreillette gauche.

Les canules étaient ensuite raccordées à un circuit de circulation extra-corporelle (CEC). L'artère pulmonaire était ensuite clampée, l'oreillette gauche était clampée juste en dessous de l'abouchement des deux veines pulmonaires gauches et de la canule veineuse. Le poumon était alors ré-étendu puis ventilé sans PEEP. La bronche souche était modérément serrée sur sa tirette.

La perfusion de chimiothérapie durait 30 min suivi par un rinçage de 1000ml de macromolécules.

Après arrêt de la perfusion, les canules étaient retirées et les bourses étaient serrées sur les vaisseaux puis déclampées, la bronche était desserrée.

La thoracotomie était alors refermée sur un drain thoracique en aspiration, qui était retiré au moment du réveil de l'animal.

***Matériel de Perfusion :**

Le circuit de CEC était identique à celui utilisé lors de la mise au point de la technique de PPI.

Le liquide de perfusion était constitué de macromolécules (Voluven®, Fresenius Kabi, Sèvres, France). Le priming correspondait à un volume de 850 ml qui mélangé au 150 ml de sang de la circulation pulmonaire donnait un volume total dans le circuit de 1000 ml.

Après clampage des vaisseaux et démarrage de la pompe, le débit était augmenté progressivement jusqu'à obtenir une pression de perfusion dans l'artère pulmonaire équivalente à la pression moyenne mesurée pour chaque animal avant le clampage de celle-ci. Le débit d'aspiration était équivalent au débit de perfusion.

Après 5 min de perfusion par des macromolécules seules, la chimiothérapie était injectée en bolus puis la perfusion était poursuivie pendant 30 min, en adaptant le débit de perfusion du poumon gauche afin de ne pas dépasser la pression pulmonaire moyenne enregistrée avant le clampage des vaisseaux.

A la fin de la perfusion de la chimiothérapie, celle-ci était rincée du poumon par 1000 ml de macromolécules.

Ib-In vitro :

***Dosage de Gemcitabine :**

-Dans le parenchyme pulmonaire :

Comme précédemment décrit, les prélèvements de parenchyme pulmonaire étaient congelés au bloc opératoire, par immersion dans de l'azote liquide. De retour au laboratoire, les prélèvements étaient broyés dans un mortier contenant de l'azote liquide à l'aide d'un pilon. La poudre ainsi obtenue était pesée pour chaque échantillon. Afin de doser la GEM intracellulaire en plus de celle présente dans le milieu interstitiel, la poudre de parenchyme était plongée dans 1 ml de Boiling Buffer (substance permettant l'extraction des protéines intra-cellulaires) pendant 10 min. On y ajoutait 40 µl d'anti-protéase et 10 µl de Tetrahydrouridine (THU) (inhibiteur de la dégradation enzymatique de la GEM par la cytidine désaminase). L'ensemble était ensuite soumis aux ultrasons puis centrifugé à 4°C pendant 10 min à 12000 G. Le surnageant était alors récupéré puis congelé à -20°C. Enfin les prélèvements étaient envoyés au Laboratoire de Saint Cloud pour le dosage de la GEM par chromatographie haute-performance comme décrit précédemment [73].

-Dans la circulation systémique :

Les prélèvements de sang total sur la voie veineuse centrale étaient réalisés au bloc opératoire afin de rechercher d'éventuelles fuites de GEM dans la circulation générale puis conservés à 4°C dans la glace. De retour au laboratoire, les prélèvements étaient centrifugés à 4°C pendant 5 min à 4000 tr/min. Le plasma était ensuite mélangé à 10 µl de THU/ml de plasma puis congelé à -20°C. Enfin les prélèvements étaient envoyés au Laboratoire de Saint Cloud pour le dosage de la GEM.

-Dans le circuit de perfusion :

A la fin de la perfusion, 50 ml de liquide était prélevé dans le circuit de perfusion puis conservé à 4°C dans la glace. De retour au laboratoire, les prélèvements étaient centrifugés à 4°C pendant 5 min à 4000 tr/min, le surnageant était congelé à -20°C.

***Analyse histologique de parenchyme pulmonaire :**

-En fin de PPI :

A la fin de chaque expérimentation, un échantillon de parenchyme pulmonaire était prélevé au niveau du lobe supérieur et du lobe inférieur. Après fixation dans le formol, les échantillons étaient inclus en paraffine puis préparés en coupe de 5 microns. Deux lames étaient préparées pour chaque échantillon de tissu, puis colorées par hématoxyne-éosine-safran. La sévérité de l'œdème périvasculaire, péribronchique, septal et alvéolaire, ainsi que l'infiltration cellulaire périvasculaire, interstitielle et alvéolaire étaient évaluées par le score de Chiang *et al.* [74]. A la lumière de la mise au point de la technique de PPI, ce score nous est paru imprécis, notamment concernant l'étendu des lésions visualisées sur les coupes. Ainsi, nous avons modifié le score comme suit :

- œdème périvasculaire : focalisé = 0,5 ; peu étendu = 1 ; disséminé=1,5
- œdème péribronchique : focalisé = 1,5 ; peu étendu = 2 ; disséminé=2,5
- œdème interstitiel : focalisé = 1,5 ; peu étendu = 2 ; disséminé=2,5
- infiltration cellulaire périvasculaire : focalisé = 1,5 ; peu étendu = 2 ; disséminé=2,5
- œdème alvéolaire : focalisé = 2,5 ; peu étendu = 3 ; disséminé=3,5
- infiltration cellulaire interstitielle : focalisé = 2,5 ; peu 3 ; disséminé=3,5
- infiltration cellulaire alvéolaire : focalisé = 3,5 ; peu étendu = 4 ; disséminé=4,5

Un score global pour chaque animal était établi par addition des scores des différentes lésions rencontrées, puis par la somme des lobes supérieurs et inférieurs.

- 28 jours après la PPI :

Au 28^{ième} jour postopératoire, les porcs étaient réopérés et des échantillons de parenchyme pulmonaire étaient prélevés au niveau des lobes supérieurs et inférieurs, comme précédemment décrits.

La préparation et l'analyse des résultats se faisaient de la même façon qu'en fin de PPI, avec évaluation de l'agression tissulaire pulmonaire selon le score de Chiang modifié.

***Immunomarquage du parenchyme pulmonaire :**

Il existe deux voies majeures de l'apoptose cellulaire, la voie intrinsèque et la voie extrinsèque, qui sont gouvernées par le système des caspases, une famille de protéases, divisée en initiateur ou exécuteurs de l'apoptose. La caspase 3 est considérée comme étant la protéine effectrice du mécanisme de l'apoptose. Ainsi sa détection par immunomarquage sur les prélèvements pulmonaires en fin de PPI et après 28 jours de survie a été réalisée.

Les tissus pulmonaires porcins ont été prélevés soit en fin de PPI soit après 28 jours de survie, puis fixés en formol et inclus en paraffine. Le démasquage antigénique avait été fait en utilisant un tampon citrate à 10mM (pH=6) à 95°C pendant 20 minutes. Après 3 lavages en TBST, les peroxydases endogènes avaient été inhibées par 2 bains de H₂O₂ 3% pendant 8 minutes. Les échantillons avaient ensuite été rincés puis saturés en utilisant une solution de PBS-BSA 3% pendant 20 minutes. L'anticorps caspase 3 clivée (Cell Signalling, 9661, 1/300) a été incubé pendant 1 heure à température ambiante. L'anticorps secondaire couplé à une activité peroxydase (Jackson Immunoresearch, 111-036-045, 1/500) a ensuite été incubé pendant 45 minutes puis rincé 3 fois dans du TBST. L'immunomarquage avait été révélé en utilisant le réactif NovaRed (Vector Labs, SK4800) pendant 5 minutes suivi de 3 lavages d'eau distillée et d'un contremarquage à l'hématoxyline (Leica, 3801562E) pendant 45 secondes puis de 3 nouveaux lavages dans de l'eau distillée. La déshydratation des lames avait été réalisée en utilisant deux bains consécutifs d'éthanol et de xylène. Pour finir, le milieu de montage Eukitt (VWR, 361894G) avait été appliqué avant de continuer l'analyse des échantillons par microscopie.

II-METHODE STATISTIQUE :

Les variables continues sont rapportées par leur moyenne avec leur écart-type, et comparées en utilisant un test de student. Les variables catégorielles étaient rapportées comme des taux ou des proportions et étaient comparées par un test de Chi².

Concernant les paramètres hémodynamiques, nous avons comparé les valeurs moyennes mesurées de façon répétée chez un même animal par une analyse de variance. Lorsque les résultats de l'analyse de variance étaient statistiquement significatifs ($p < 0,05$), nous avons comparé deux à deux les valeurs selon la méthode de Benferroni (réduction du risque α).

Les analyses statistiques étaient menées en utilisant le logiciel de statistiques STATA 12 (StataCorp, College Station, USA)

III-RESULTATS:

IIIa-In vivo :

***Etude de l'hémodynamique et des paramètres respiratoires pendant la PPI :**

-La pression artérielle systémique moyenne:

L'analyse statistique des valeurs moyennes de PAS pendant la procédure de PPI ne montrait pas de modification de leurs valeurs en fonction du temps ($p=0,2752$), ni en fonction de la dose de GEM ($p=0,5239$). Il n'existe par ailleurs pas d'interaction entre la dose de GEM et le temps ($p=0.1411$).

L'analyse statistique des valeurs moyennes de PAD pendant la procédure de PPI montrait une diminution significative des valeurs en fonction du temps ($p=0,0006$), mais pas d'effet de la dose de GEM ($p=0,1933$). Il n'existait par ailleurs pas d'interaction entre la dose de GEM et le temps ($p=0.4775$).

-La fréquence cardiaque (FC) :

L'analyse statistique des valeurs moyennes de la fréquence cardiaque (FC) montrait une augmentation significative des valeurs moyennes de FC en fonction du temps ($p<10^{-5}$), mais pas d'effet de la dose de GEM ($p=0,9911$). Il n'existait par ailleurs pas d'interaction entre la dose de GEM et le temps ($p=0.4457$).

-La saturation artérielle en oxygène (SaO2):

L'analyse statistique des valeurs moyennes de la SaO2 montrait une diminution significative des valeurs moyennes de SaO2 en fonction du temps ($p<10^{-5}$), mais pas d'effet de la dose de GEM ($p=0,0539$). Cependant, on notait des désaturation à moins de 70% de SaO2 pour les animaux traités à la dose est de 1280mg de GEM en fin de PPI puis au déclampage de l'APG. Il existait par contre une interaction entre la dose de GEM et le temps ($p<10^{-5}$) (Figure 14).

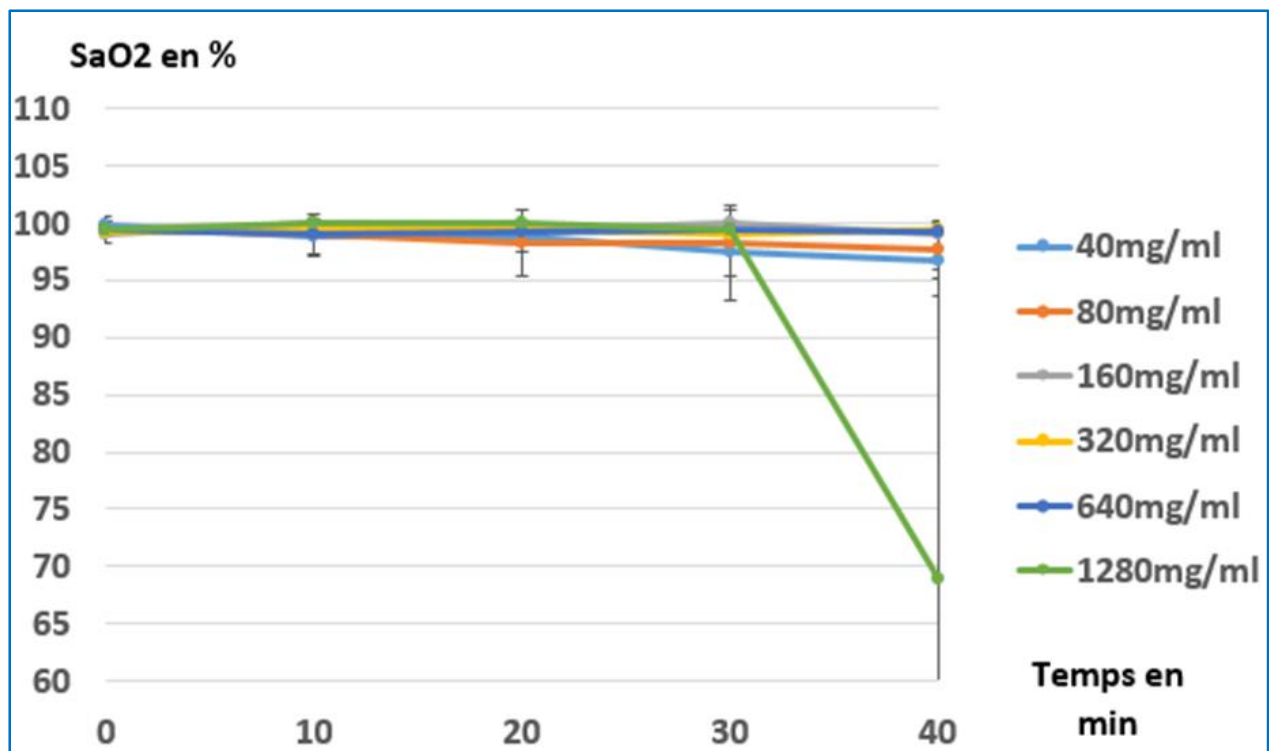


Figure 14 : Saturation artérielle en oxygène en % pendant la procédure de PPI puis au déclampage

-La pression artérielle pulmonaire moyenne et le débit de perfusion de l'artère pulmonaire (Figure 15 & 16):

Avant le clampage de l'artère pulmonaire gauche, nous avons mis en évidence des variations individuelles dans les valeurs de la pression moyenne de l'artère pulmonaire gauche (PMAPG) de base allant de 18 à 29 mmHg. Après clampage de l'APG, le débit de perfusion était progressivement augmenté pour atteindre une valeur aux alentours de 500 ml/min. On observait alors une augmentation significative de la PMAPG en fonction du temps de perfusion ($p < 10^{-5}$) (Figure 15A), et une augmentation non significative de la PMAPG en fonction de la dose ($p = 0,2297$) (Figure 15B). Il n'existait par ailleurs pas d'interaction de la dose et du temps ($p = 0,1514$).

On observait également une diminution significative du débit de perfusion de l'APG en fonction du temps de perfusion ($p < 10^{-4}$) (Figure 16A) mais également en fonction de la dose de GEM injectée dans le circuit (Figure 16B). Plus la dose de GEM injecté dans le circuit de CEC était importante plus la baisse du débit de perfusion de l'APG se majorait. Il existait par ailleurs une interaction de la dose de GEM et du temps ($p < 10^{-5}$).

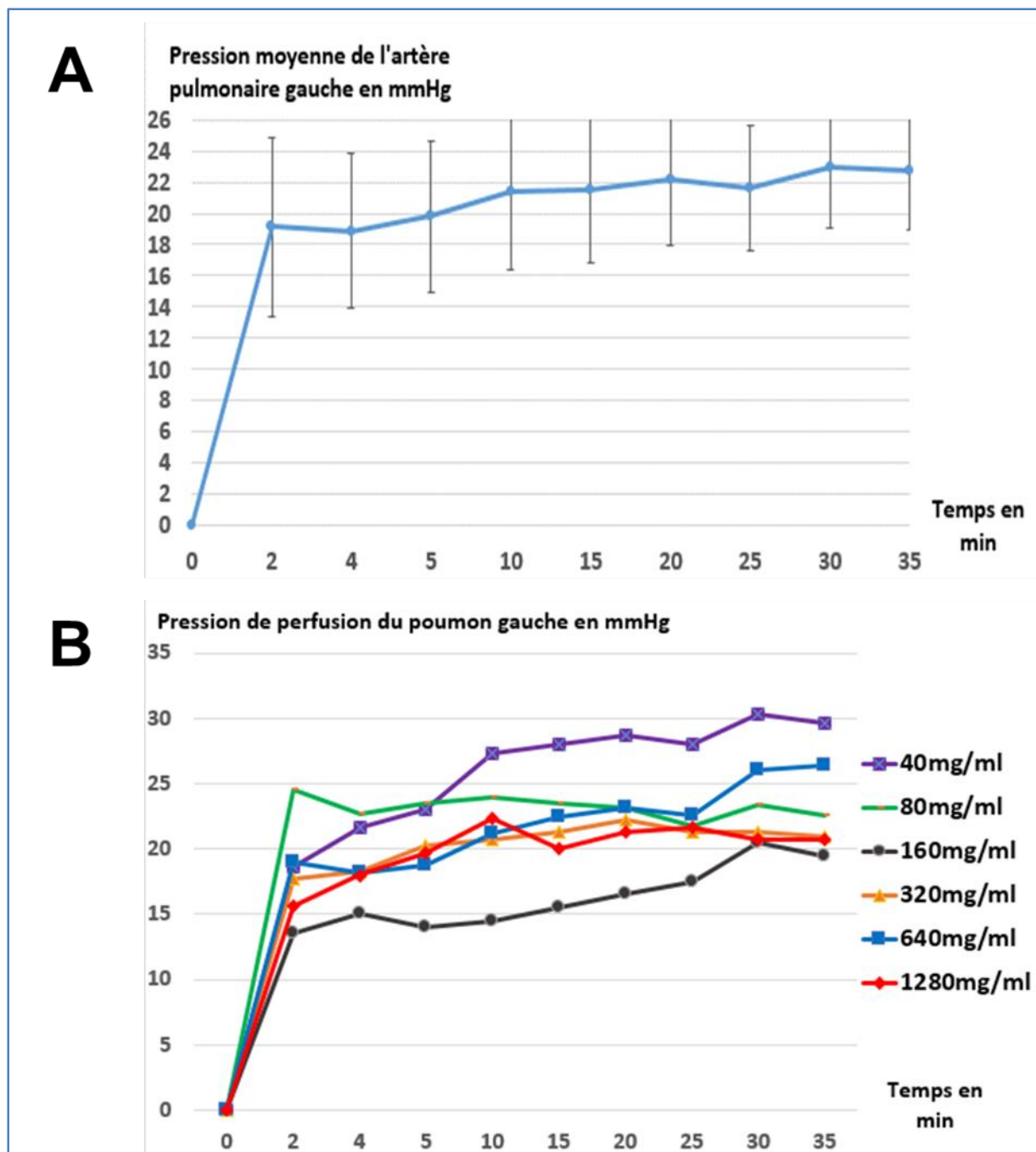


Figure 15 : A- Pression de perfusion du poumon gauche isolé (mmHg) en fonction du temps
 B- Pression de perfusion du poumon gauche isolé (mmHg) en fonction de la dose de GEM perfusée pendant 30 min

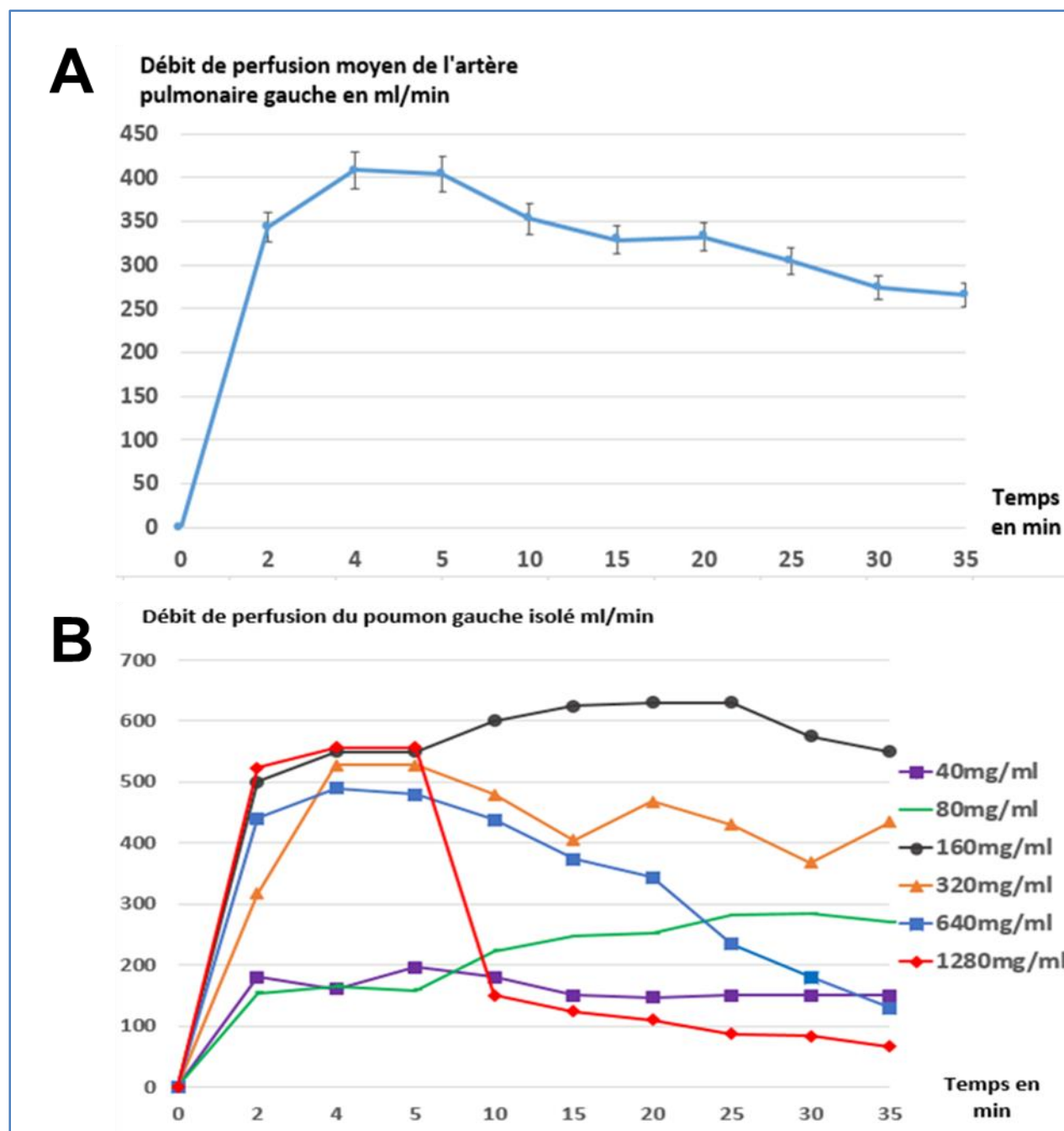


Figure 16: A- Débit de perfusion du poumon gauche isolé (ml/min) en fonction du temps
 B- Débit de perfusion du poumon gauche isolé (ml/min) en fonction de la dose de GEM perfusée pendant 30 min.

IIIb In vitro :

*** Etude pharmacocinétique de la chimiothérapie dans le parenchyme pulmonaire et dans le circuit de perfusion:**

-Dans le parenchyme pulmonaire :

Après 30 min de perfusion, la concentration de GEM était d'autant plus importante dans le parenchyme pulmonaire du lobe inférieur que la dose de GEM perfusée était élevée ($p=0,0539$). Il n'existait pas d'augmentation significative de la concentration de GEM dans le lobe supérieur avec la dose de GEM perfusée ($p=0,6426$), probablement liée à l'hétérogénéité de perfusion induite par la GEM (Tableau 10 & Figure 17).

Dose de GEM injectée dans le circuit de CEC en mg	Concentration de GEM dans le parenchyme pulmonaire en fin de PPI en $\mu\text{g/ml}$	
	Lobe supérieur	Lobe inférieur
40	56,79	18
80	44,21 $\pm$ 4,21	27 $\pm$ 15,55
160	38,25 $\pm$ 0,219	47,5 $\pm$ 14,84
320	35,11 $\pm$ 20,62	69,75 $\pm$ 23,38
640	114,01 $\pm$ 116,71	152,04 $\pm$ 97,37
1280	65,65 $\pm$ 37,41	344,76 $\pm$ 217,34
P Value	0,6426	0,0539

Tableau 10 : Concentration de GEM en fin de PPI dans le parenchyme pulmonaire en fonction de la dose de GEM injectée.

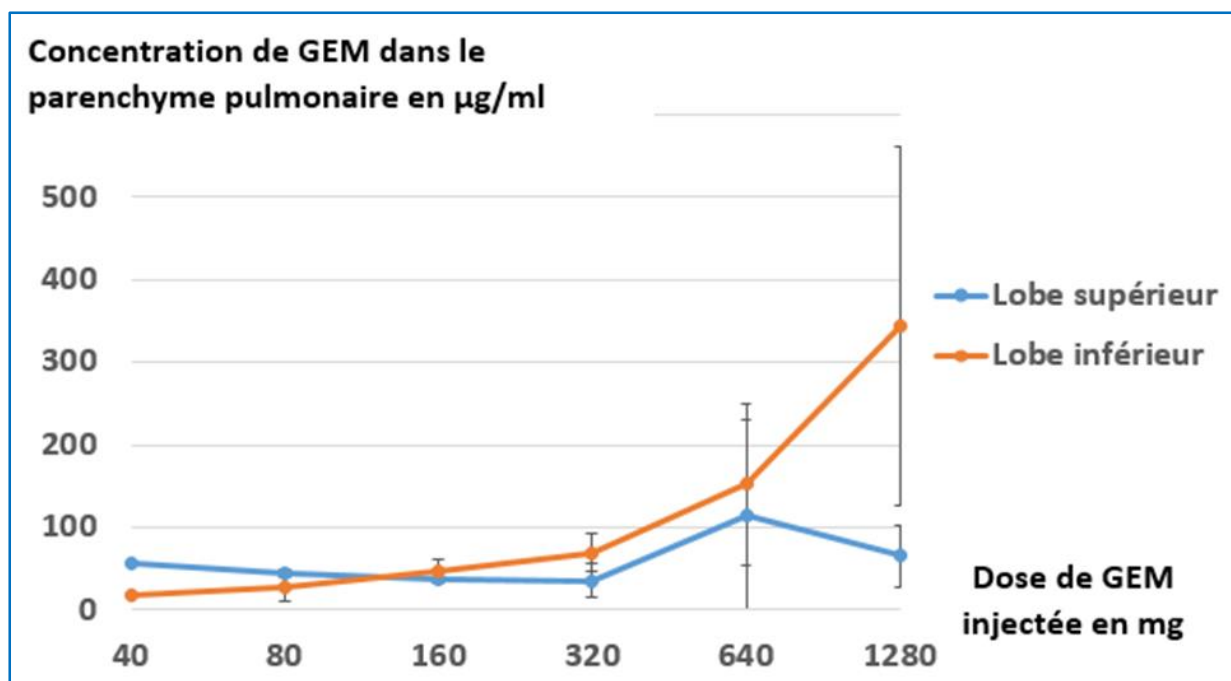


Figure 17 : Concentration de GEM dans le parenchyme pulmonaire en fin de PPI en fonction de la dose de GEM injectée dans le circuit de CEC.

-Dans le circuit de perfusion :

Après 30 min de perfusion, la concentration en GEM dans le circuit de CEC était d'autant plus importante que la dose de GEM injectée était importante ($p=0.0103$) (Tableau 11 & Figure 18).

Dose de GEM injectée dans le circuit de CEC en mg	Concentration de GEM dans le circuit de CEC en fin de PPI en $\mu\text{g/ml}$	
	Dans la circulation systémique	Dans le circuit de CEC
40	0,14	42
80	$0,041 \pm 0,058$	$79,5 \pm 67,17$
160	$0,18 \pm 0,25$	$223,5 \pm 31,81$
320	$0,285 \pm 0,35$	$386 \pm 46,26$
640	$0,0275 \pm 0,032$	$443,75 \pm 192,83$
1280	$0,173 \pm 0,302$	$512,66 \pm 92,04$
P Value	0,7623	0,0103

Tableau 11 : Concentration de GEM en fin de PPI dans le circuit de CEC et dans la circulation systémique en fonction de la dose de GEM injectée.

***Etude pharmacocinétique de la chimiothérapie dans la circulation systémique :**

Dans la circulation systémique, le pic maximum de concentration de la GEM après la PPI était de $0,285 \pm 0,353 \mu\text{g/ml}$ sans interaction avec la dose de GEM injectée ($p=0,7623$) (Tableau 11).

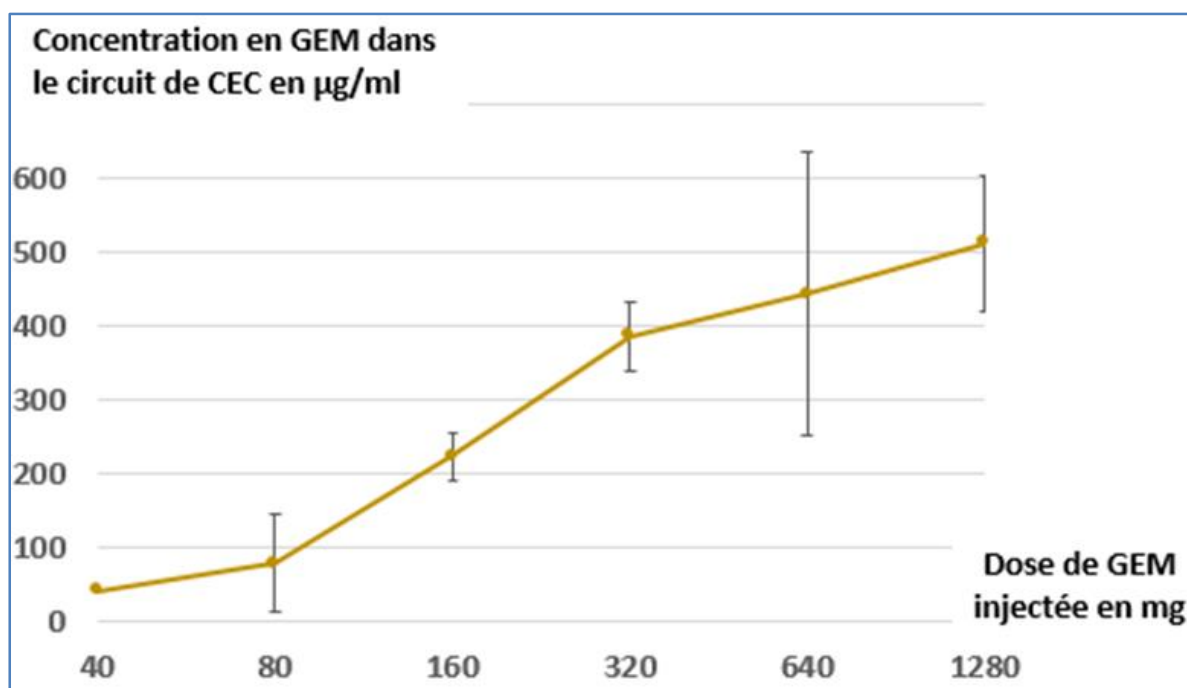


Figure 18 : Concentration de GEM dans le circuit de CEC en fin de PPI en fonction de la dose de GEM injectée dans le circuit de CEC.

***Analyse histologique de parenchyme pulmonaire :**

-En fin de PPI:

L'analyse histologique des prélèvements de parenchyme pulmonaire en fin de PPI, ne retrouvait pas de nécrose pulmonaire que ce soit macroscopiquement ou microscopiquement.

Pour l'analyse des prélèvements du lobe supérieur et du lobe inférieur, il existait une augmentation du score de Chiang modifié en fonction de la dose de GEM délivrée (Figure 19A & Tableau 12).

Ainsi l'analyse histologique des prélèvements de parenchyme pulmonaire mettait en évidence une hétérogénéité de répartition des lésions (Figure 19A). On retrouvait des lésions à type d'infiltration alvéolaire légère (Figure 19B), et des lésions plus sévères à type d'épaississement des cloisons et infiltration polymorphe dans les alvéoles (Figure 20 C & D), voir des lésions

majeures à type d'infiltration majeure riche en macrophages et de condensation du parenchyme pulmonaire (Figure 20 E & F). L'étendue des lésions augmentait avec la dose de GEM administrée et étaient prédominantes à partir de la dose de 640 mg.

Lorsque l'on analysait le score histologique en fonction du delta de débit dans l'APG entre le début et la fin de la procédure de PPI, on mettait en évidence une augmentation non significative du score histologique d'autant plus élevée que la chute du débit était importante (Figure 21). Les pentes des courbes de tendances étaient respectivement de $-0,000929 \pm 0,0006976$ pour le lobe supérieur, et de $-0,003198 \pm 0,0021299$ pour le lobe inférieur (Figure 21).

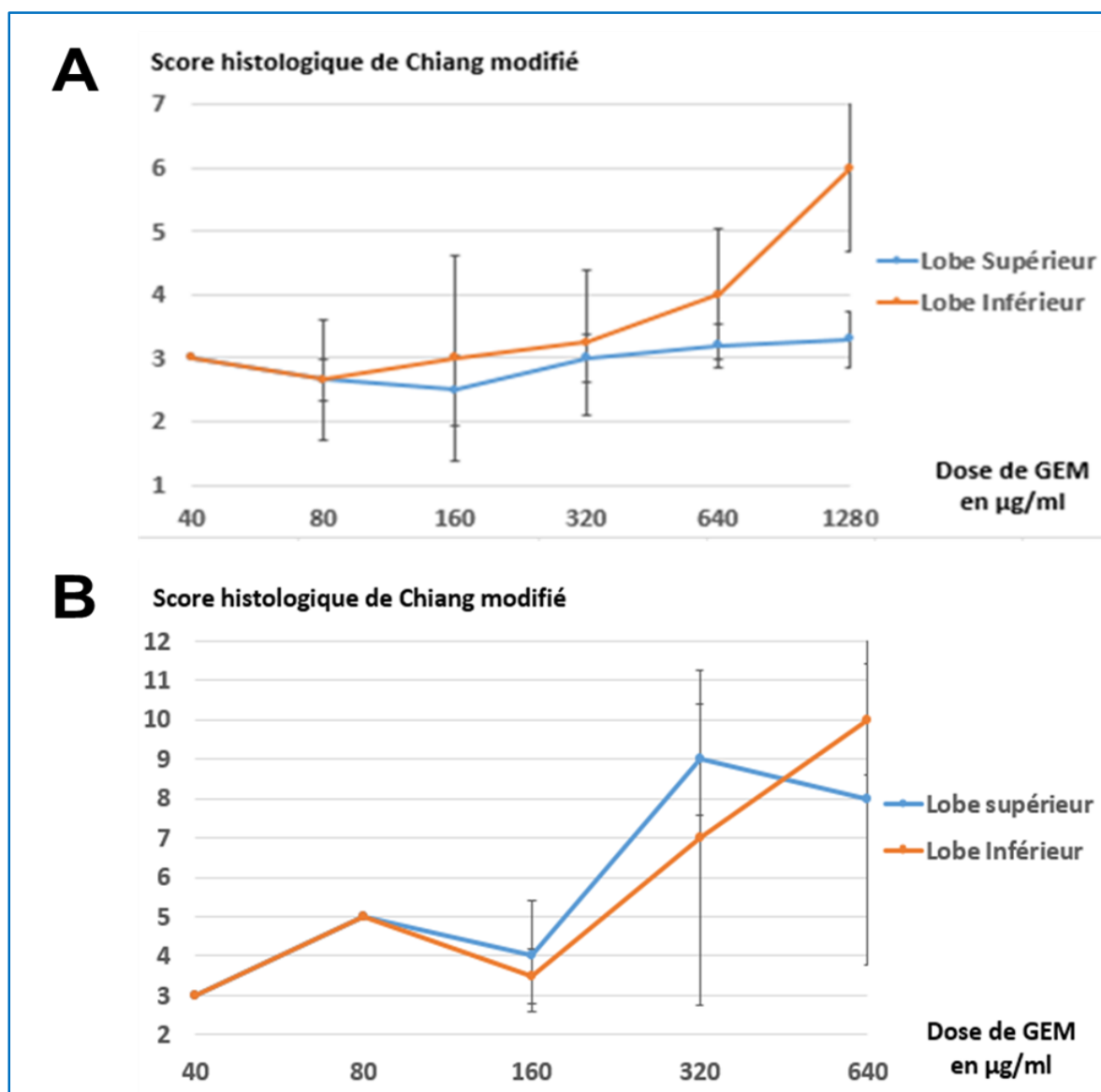


Figure 19: Evolution du score histologique de Chiang modifié en fonction de la dose de GEM administrée : **A** : Score histologique de Chiang modifié en fin de PPI ; **B** : Score histologique de Chiang modifié après un mois de survie.

-28 jours après la PPI :

Pour l'analyse des prélèvements du lobe supérieur et du lobe inférieur, il existait une augmentation du score de Chiang modifié en fonction de la dose de GEM délivrée (Figure 19B & Tableau 12).

Ainsi l'analyse histologique des prélèvements de parenchyme pulmonaire mettait en évidence des lésions majeures à type d'infiltration interstielle et alvéolaire dont l'étendue augmentait avec la dose de GEM administrée et commençaient à apparaître à la dose de 320 mg (Figure 19B).

Lorsque l'on analysait le score histologique après 28 jours de survie en fonction du delta de débit dans l'APG entre le début et la fin de la procédure de PPI, on mettait en évidence une augmentation non significative du score histologique d'autant plus élevée que la chute du débit était importante (Figure 22). Les pentes des courbes de tendance étaient respectivement de $-0,2844378 \pm 0,2270339$ pour le lobe supérieur, et de $-0,0618019 \pm 0,2751092$ pour le lobe inférieur (Figure 22).

	Concentration de la gemcitabine dans le perfusat pulmonaire (µg/ml)	Score moyen d'agression tissulaire de Chiang modifié sur le poumon gauche			
		Lobe supérieur	P Value	Lobe inférieur	P Value
A la fin de la procédure de PPI	40	3		3	
	80	2,66 ± 0,32		2,66 ± 0,94	
	160	2,5 ± 0,55	0,799	3 ± 1,63	0,862
	320	3 ± 0,39	0,522	3,25 ± 1,15	0,701
	640	3,2 ± 0,35	0,281	4 ± 1,03	0,356
	1280	3,3 ± 0,45	0,250	6 ± 1,33	0,059
Après un mois de survie	40	3		3	
	80	5	0,638	5	0,626
	160	4 ± 1,41	0,783	3,5 ± 0,70	0,886
	320	9 ± 1,41	0,168	7 ± 4,24	0,300
	640	8 ± 4,24	0,229	10 ± 1,41	0,117

Tableau 12 : Score histologique de Chiang selon la dose de GEM perfusée en fin de PPI et après 28 jours de survie.

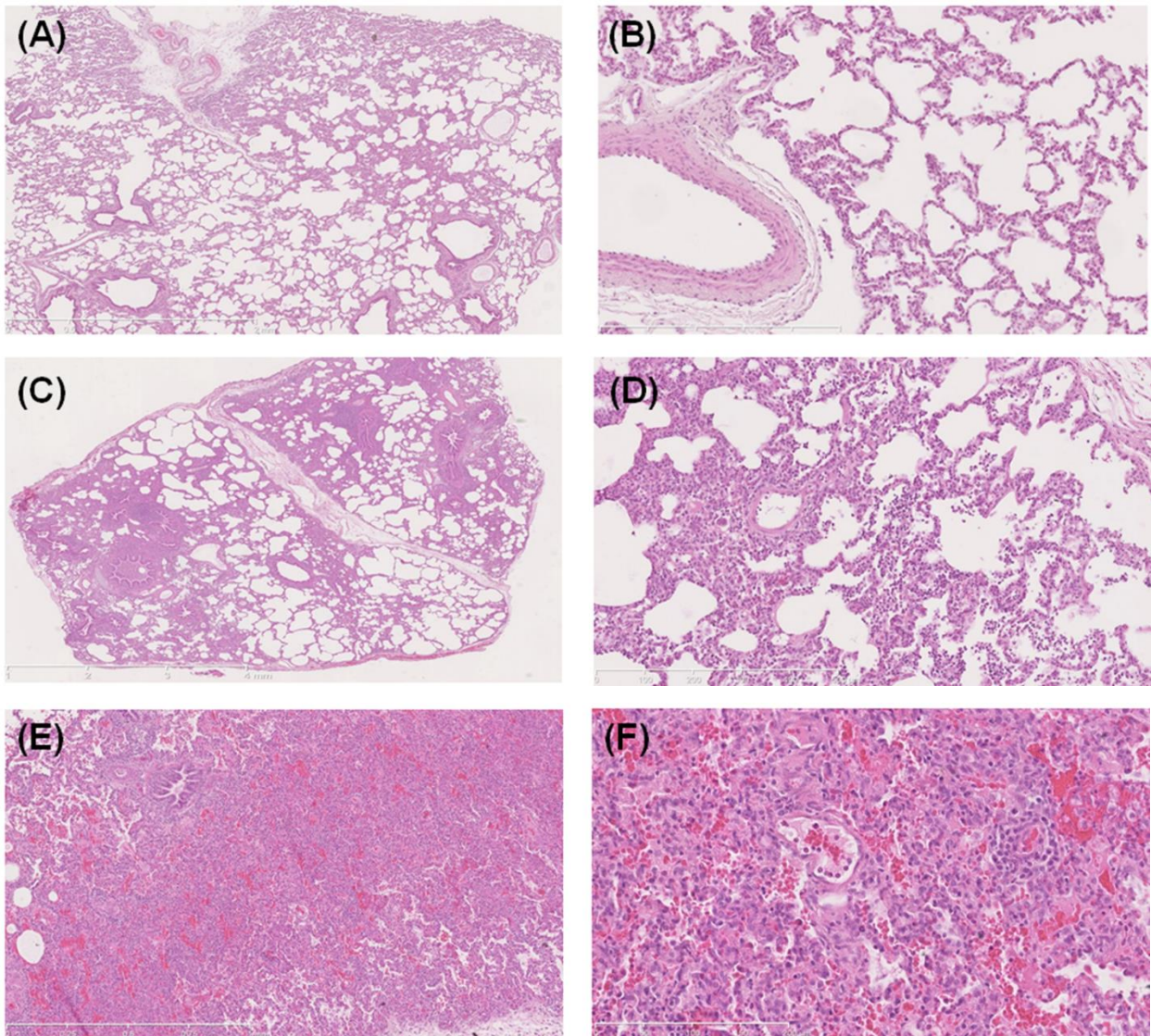


Figure 20 : Coupes histologiques présentant les différents types de lésions rencontrées : **(A)** hétérogénéité de répartition des plages d’hypercellularité, **(B)** très légère infiltration interstitielle, **(C) & (D)** épaississement des cloisons et infiltration polymorphe dans les alvéoles, **(E) & (F)** infiltration majeur riche en macrophages et condensation du parenchyme pulmonaire.

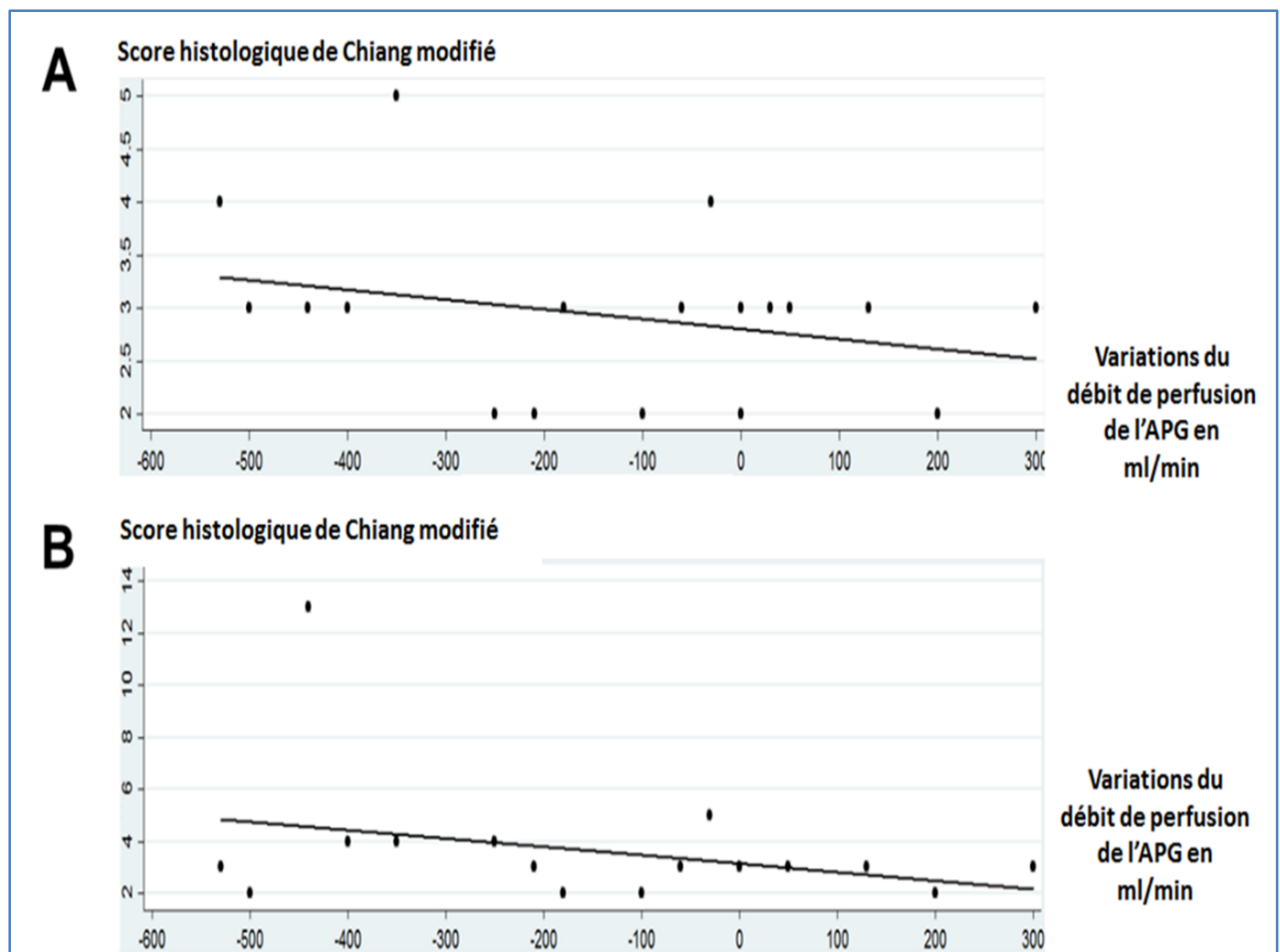


Figure 21 : Score histologique de Chiang modifié en fin de PPI; **A** : Variation du score histologique du lobe supérieur en fonction de la variation du débit de perfusion de l'APG en ml/min ; **B** : Variation du score histologique du lobe inférieur en fonction de la variation du débit de perfusion de l'APG en ml/min

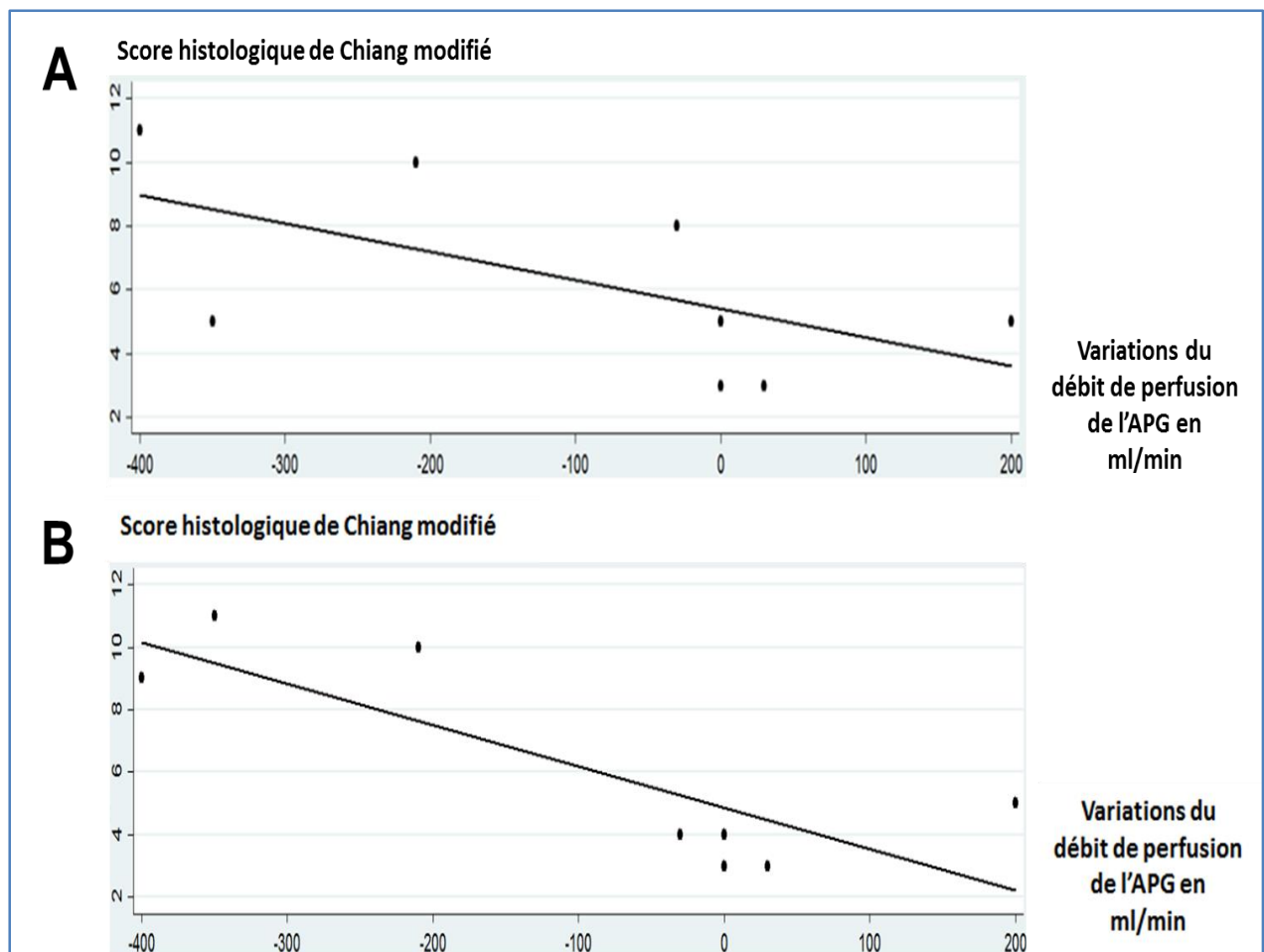


Figure 22 : Score histologique de Chiang modifié après un mois de survie : **A :** Variation du score histologique du lobe supérieur en fonction de la variation du débit de perfusion de l'APG en ml/min. **B :** Variation du score histologique du lobe inférieur en fonction de la variation du débit de perfusion de l'APG en ml/min.

***Immunomarquage du parenchyme pulmonaire :**

En de PPI :

L'analyse de l'ensemble des lames n'avait pas permis de mettre en évidence de marquage caspase 3 aussi bien pour les lames ne présentant pas de modification histologique, que pour les lames présentant des modifications sévères.

-28 jours après la PPI :

L'analyse de l'ensemble des lames n'avait pas permis de mettre en évidence de marquage caspase 3 aussi bien pour les lames ne présentant pas de modification histologique, que pour les lames présentant des modifications sévères.

***Etude des fonctions hépatique et rénale :**

Aucune toxicité hépatique ou rénale n'avait été mise en évidence à 28 jours.

	Concentration de la gemcitabine dans le perfusat pulmonaire (µg/ml)	Paramètres Biologiques			
		ALAT (U/L)	ASAT (U/L)	PAL (U/L)	Créat (mg/L)
Valeurs moyennes préopératoire		30 ± 7	50 ± 11	108 ± 20	14,2 ± 3,4
Après 28 jours de survie	40	27 ± 2	37 ± 5	93 ± 33	11,6 ± 1,2
	80	43 ± 3	54 ± 14	100 ± 29	12,7 ± 0,5
	160	30 ± 6	37 ± 8	111 ± 20	15,6 ± 3,9
	320	50 ± 5	48 ± 2	148 ± 63	12,8 ± 2,2
	640	33 ± 3	44 ± 5	115 ± 5	15,7 ± 1,3

Tableau 13 : Paramètres biologiques après 28 jours de survie en fonction de la dose de GEM administré.

IIIc-Problèmes rencontrés pendant l'étude d'escalade de dose de chimiothérapie :

Lors de cette troisième partie, nous pensions avoir résolu la totalité des problèmes pouvant survenir pendant les expérimentations sur les porcs. Cependant de nouvelles complications étaient survenues lors des premières manipulations à la dose de 40 µg/ml. Dès le début de la perfusion, il existait un retour veineux de mauvaise qualité responsable d'une augmentation rapide des PMAPG et de ce fait de lésions histologiques importantes. Lors de la décanulation, il existait une thrombose partielle de la canule veineuse possiblement en rapport avec la concentration élevée en GEM [79]. Ce problème a été résolu par le rinçage des canules avec une plus forte dose d'héparine (15000UI pour 500ml).

D'autre part, d'autres problèmes de retour veineux sont survenus lors que la croissance du débit de perfusion était trop rapide, entraînant un OAP lésionnel à minima avec baisse du retour veineux et augmentation des résistances capillaires pulmonaires. De ce fait la PPI était impossible sans une augmentation majeure des pressions de perfusion aggravant encore le mécanisme d'OAP lésionnel.

En fin, il est apparu que l'adjonction d'une PEEP proche de 10 mmHg était responsable d'une gêne au retour veineux dans les capillaires pulmonaires. En effet la pression veineuse pulmonaire que nous avons mesurée chez le porc est de l'ordre de 5 à 6 mmHg, et l'augmentation de la PEEP dans le but d'augmenter le recrutement des alvéoles était en fait délétère pour la PPI, responsable cette fois-ci d'un OAP hémodynamique par blocage du retour veineux. Nous avons donc ventilé les animaux avec une PEEP à 0.

IV-DISCUSSION :

Basée sur les résultats intéressants obtenus au cours de la mise au point de la technique de PPI chez le porc avec la GEM [78], l'objectif de cette troisième partie était de déterminer la dose maximale tolérée (DMT) et la toxicité limitant la dose (TLD) par une étude d'escalade de dose. La TLD a été définie comme étant une toxicité inacceptable, elle était décrite de façon consensuelle par les critères de toxicité du National Cancer Institute [80]. Dans le cadre de la PPI, cette toxicité était principalement d'ordre pulmonaire, représentée par le risque de survenue d'un syndrome de détresse respiratoire aigu (SDRA) et du décès systématique des animaux. La DMT quant à elle correspondait à la dose pour laquelle un certain pourcentage de patients présente une TLD. Lors de l'étude de phase I de la GEM, la DMT fut définie pour la dose de 790 mg/m² [63], la TLD décrite était une insuffisance médullaire avec thrombocytopénie et anémie, la toxicité non hématologique fut considérée comme minimale. Dasanu *et al.* [79], dans une revue récente de la littérature concernant les études portant sur les effets indésirables de la GEM avaient mis en évidence une toxicité vasculaire et des risques de thrombose imputables à la GEM, dont notamment le syndrome de fuite capillaire systémique.

Corroborant les résultats de la 2^{ème} partie de notre travail, l'analyse des résultats des paramètres de perfusion montrait la persistance d'une toxicité vasculaire transitoire de la GEM sur les capillaires pulmonaires quel que soit la dose de GEM administrée, avec une augmentation de la PMAPG et une baisse du débit de perfusion de l'APG significatives en fonction du temps. On remarquait par ailleurs que cette toxicité était d'autant plus marquée que la dose perfusée était importante. En effet, plus la dose de GEM perfusée était importante, plus la baisse des débits de perfusion dans l'APG était marquée. Cependant malgré la baisse volontaire des débits de perfusion de l'APG, les pressions de perfusion avaient tendance à augmenter en fonction du temps, signant ainsi la probable existence d'un mécanisme de vasoconstriction des capillaires pulmonaires sous l'effet de la GEM [79]. De plus au cours du rinçage du poumon par des macromolécules, on observait une nette amélioration de la qualité du retour veineux pulmonaire permettant l'élévation à nouveau du débit de perfusion de l'APG en fin de rinçage par les macromolécules seules avant le déclampage de l'APG. On ne notait par ailleurs pas d'augmentation significative de la PMAPG après déclampage.

Les doses de GEM délivrées au parenchyme pulmonaire avaient tendance à augmenter avec la dose de GEM administrée, cependant il existait une importante hétérogénéité des résultats. Tout

d'abord nos effectifs de porcs étaient faibles et les résultats étaient difficilement interprétables. Cependant, on retrouvait une grande variabilité de concentration de la GEM au sein du même lobe pulmonaire pour une même dose de GEM administrée entre les différents animaux. Cette hétérogénéité dans la distribution d'un produit cytotoxique dans un parenchyme pulmonaire sain avait déjà été rapportée que ce soit après administration par PPI de chimiothérapie chez le rat [81], le chien [82] ou le porc [77]. D'une part, West *et al.* [83], dès 1964 avaient montré que la distribution du flux artériel pulmonaire était corrélée aux variations de pression artérielle pulmonaire, de pression veineuse pulmonaire mais également aux pressions de ventilation. D'autre part, cette hétérogénéité de distribution de la GEM était possiblement attribuable à la toxicité vasculaire de la GEM en elle-même, décrite sous le nom de « syndrome de fuite capillaire systémique », dans lequel il existait une hyperperméabilité réversible des capillaires pulmonaires, avec une rapide extravasation de plasma du secteur intra-vasculaire vers le secteur interstitiel. Ce phénomène en augmentant les résistances capillaires pulmonaires limitait le retour veineux pulmonaire, permettant ainsi d'expliquer la baisse du débit de perfusion pour une pression de perfusion donnée [79], ainsi que les anomalies de distribution dans le parenchyme pulmonaire. Plusieurs auteurs, impliquaient également l'impact de l'hypothermie induite par les manipulations chirurgicales peropératoire du poumon comme étant à l'origine de variations dans la distribution du flux sanguin pulmonaire [84-86]. Enfin, cette hétérogénéité de distribution dans le parenchyme pulmonaire avait également été décrite chez le porc pendant l'administration de la chimiothérapie par voie endovasculaire [53,54,77] ou par voie intraveineuse [53,77] et n'était pas propre à la technique de PPI.

Concernant l'hétérogénéité de concentration de la GEM entre le lobe supérieur et le lobe inférieur pour même dose de GEM perfusée, plusieurs explications étaient possibles : tout d'abord chez le porc, le lobe inférieur était prédominant par rapport au lobe supérieur avec une vascularisation plus importante pour le lobe inférieur. D'autre part, les prélèvements du lobe supérieur étaient réalisés plus en périphérie du parenchyme que pour le lobe inférieur expliquant une moindre concentration de la GEM dans le lobe supérieur que dans le lobe inférieur [77].

Comme précédemment rapporté par de nombreux auteurs, la PPI permettait dans notre étude une exclusion complète de la circulation pulmonaire, ainsi les fuites de chimiothérapie dans la circulation systémique étaient minimales, n'entraînant pas de toxicité hépatique ou rénale [21,23-28].

Dans notre étude, les doses de GEM administrée par PPI permettaient d'obtenir des concentrations stabilisées en fin de PPI dans le circuit de CEC allant jusqu'à 512 µg/ml. Lors de l'étude de phase I de la GEM, Abbruzzese *et al.* avaient mis en évidence une concentration

moyenne de la GEM dans la circulation allant de 3,5 à 20 µg/ml [63]. Ainsi, la PPI permet d'obtenir des concentrations entre 25 et 150 fois supérieure à la concentration systémique maximale retrouvé lors du traitement intraveineux. De plus cette concentration de GEM en fin de PPI dans le circuit de CEC était entre 200 et 420 fois supérieure à l'IC 50 retrouvé in vitro. Ces concentrations majeures obtenues par PPI, laissaient à penser que pour la dose de 320 mg, une réponse clinique sur les métastases pulmonaires des CCR est à espérer comme précédemment décrit par Van Putte *et al.* chez le rat [14].

L'analyse du score histologique de fin de PPI mettait en évidence une toxicité immédiate sur le parenchyme pulmonaire à partir de la dose de 640 mg de GEM et au-delà. En effet, l'analyse histologique montrait des lésions majeures à type d'infiltration interstielle et alvéolaire dont l'étendue augmentait avec la dose de GEM administrée. D'autre part, l'augmentation des scores histologiques en fin de PPI était corrélée avec l'importance de la baisse du débit de perfusion induite par la dose de GEM administrée dans le circuit de CEC. Ainsi, un double mécanisme semblait être à l'origine des lésions parenchymateuses pulmonaires: d'une part l'impact de la toxicité directe de la GEM sur les cellules pulmonaires, d'autre part la toxicité hémodynamique induite par la GEM responsable d'un effet délétère sur le parenchyme pulmonaire par l'élévation importante de la PMAPG qu'elle induisait. En effet Franke *et al.* avait mis en évidence que la PPI sans chimiothérapie délivrée avec une hyperpression prolongée était responsable en elle-même de lésions pulmonaires majeures [51]. De plus la PPI même sans chimiothérapie conduisait toujours à des lésions pulmonaires mêmes mineures par rapport au groupe contrôle [52].

Plusieurs études concernant la perfusion de GEM chez le porc avaient été rapportées, cependant le mode d'administration était endovasculaire [53,54]. Van Putte *et al.* rapportaient le traitement par voie endovasculaire de porcs avec de la GEM à la dose de 1000 mg/m² [53]: les analyses histologiques mettaient en évidence l'existence d'une infiltration alvéolaire modérée dans le sous-groupe où la perfusion avait été stoppée pendant 10 minutes à cette dose. Ces résultats montraient que la toxicité peut être directement causée par la GEM sur le parenchyme pulmonaire sans influence de la pression de perfusion [53].

Pour les trois animaux traités à la dose de 1280 mg, une chute significative de la SaO₂ au déclampage conduisait au décès systématique des animaux dans les minutes suivants le déclampage de l'APG permettant d'établir la présence d'une TLD de la GEM à ce niveau de dose. Le mécanisme le plus probable était l'apparition d'un OAP lésionnel majeure secondaire au mécanisme d'ischémie-reperfusion secondaire à l'agression pulmonaire par cette dose

élevée de GEM. Les lésions vasculaires engendrées étant alors responsables d'une augmentation des résistances vasculaires pulmonaires, de la perméabilité des capillaires pulmonaires qui entraînaient un œdème pulmonaire responsable d'anomalies dans les échanges gazeux avec une inadéquation de la ventilation et de la perfusion après la reperfusion pulmonaire [71].

On pouvait ainsi définir, pour ces faibles effectifs, une toxicité pulmonaire aigüe de la GEM administrée par PPI par une TLD à 1280 mg et une DMT de 640 mg.

L'analyse du score histologique des animaux survivants 28 jours après la PPI mettait en évidence une toxicité retardée sur le parenchyme pulmonaire à partir de la dose de 320 mg de GEM et au-delà. En effet, l'analyse histologique montrait des lésions majeures à partir de cette dose. D'autre part, l'augmentation des scores histologiques après 28 jours de survie était corrélée avec l'importance de la baisse du débit de perfusion induite par la dose de GEM administrée dans le circuit de CEC, par le même double mécanisme que pour la toxicité pulmonaire immédiate.

Aucun travail sur la survie de gros animaux après PPI n'avait jusque-là été rapporté, hormis l'article reprenant les travaux des deux premières étapes de ce travail [78]. Il existait par contre des données de survie à long terme sur les rats, notamment après perfusion de GEM par PPI sur des modèles de métastases pulmonaires de CCR. Les animaux étaient traités avec de niveaux de dose de GEM allant de 160 à 320 mg/kg en PPI : les analyses histologiques conduites après 90 jours de survie mettaient en évidence un pourcentage de fibrose pulmonaire deux fois plus élevé dans le groupe PPI par rapport au groupe traitement intraveineux, que ce soit pour la dose de 160 ou 320 mg/kg [16]. De plus Ueda *et al.* [87] étudièrent la toxicité à long terme du melphalan sur des rats. Ils avaient mis en évidence que les lésions d'œdème et d'infiltrations interstitielles observées après 30 jours avaient tendance à disparaître et à être remplacées par un tissu conjonctif mais sans évolution vers la fibrose pulmonaire après 180 jours. Enfin, Den Hengst *et al.* [30], rapportaient les résultats à 5 ans de patients traités par du Melphalan en PPI, et montraient une baisse moyenne du VEMS à 1 an entre 9 et 16% de la valeur de départ, témoignant d'une faible toxicité sur le parenchyme pulmonaire traité qui avait également subi des résections limitées pour les métastases traitées.

L'analyse de l'ensemble des prélèvements pulmonaires en fin de PPI mais également après un mois de survie n'avait pas permis de mettre en évidence de marquage caspase 3 activée. Plusieurs explications étaient envisageables. Nabhan *et al.* dans une étude sur l'activation de la

caspase 3 après traitement de cellules de myélome multiple par la GEM, avaient montré que l'apoptose cellulaire induite par l'activité de la GEM passait par l'activation du système des caspases et notamment la caspase 3 [88]. Cette étude n'avait permis de détecter la caspase 3 active qu'après 4 heures d'incubation des cellules avec la GEM. Or dans cette troisième étape, les prélèvements de parenchyme pulmonaire après la PPI avec de la GEM avaient lieu environ 50 min après le démarrage de la perfusion pulmonaire. De ce fait, l'apoptose induite par la GEM n'était pas détectable au stade précoce de fin de PPI. Concernant les prélèvements après un mois de survie, le mécanisme apoptotique étant terminé, la caspase 3 active n'était pas non plus détectable.

Ainsi cette troisième étape, compte tenu des résultats histologiques immédiat et après un mois de survie, avait permis de définir la DMT à 320 mg/ml pour la GEM administrée en PPI chez le porc sain.

Conclusions & **Perspectives:**

L'ensemble des expérimentations conduites au cours de ce travail a permis de choisir la GEM comme étant la drogue de chimiothérapie ayant le meilleur profil effet-dose pour le traitement in vitro des cellules de lignées de CCR humains pendant une durée de 30 min. A partir de ces résultats, une étape de mise au point de la technique de PPI chez le porc sain avait pu être conduite permettant de mettre en évidence : l'existence d'une toxicité vasculaire pulmonaire de la GEM, mais également de montrer la faisabilité et la reproductibilité de la technique de PPI, nous ayant permis d'obtenir la survie des animaux traités pendant un mois. Enfin, l'étude de tolérance de dose avait permis, à partir des analyses histologiques du parenchyme pulmonaire immédiates et après un mois de survie, de définir la dose de 320 mg de GEM comme étant la dose maximale tolérable administrable en PPI.

Fort de ces résultats sur le gros animal, nous envisageons des travaux complémentaires. D'une part de compléter nos travaux expérimentaux par une étude s'intéressant à l'évaluation de l'efficacité de la prise en charge des métastases pulmonaires des CCR KRAS mutés par perfusion pulmonaire isolée de GEM chez un modèle murin. La présence de mutation KRAS étant un facteur prédictif de mauvaise réponse aux biothérapies type anti-EGFR, le traitement des cancers colorectaux KRAS positifs repose donc sur une chimiothérapie, type Folfox ou FOLFIRI en 1ère ligne [89]. D'autre part, je souhaiterais travailler sur l'optimisation des paramètres pharmacocinétiques de la PPI avec la GEM, avec pour objectif d'améliorer distribution pulmonaire et la pénétration intraparenchymateuse de la GEM. Pour cela un projet de travail s'intéressant à l'adjonction dans le circuit de perfusion de molécules vasodilatrices est à l'étude, comparant les inhibiteurs de l'enzyme de conversion, les calciums bloqueurs et les molécules utilisées dans le traitement de l'hypertension artérielle pulmonaire primitive, telles que les antagonistes des récepteurs de l'endothéline [90] et les inhibiteurs de la phosphodiesterase de type 5 [91].

Enfin, dans un avenir proche, je souhaiterais démarrer une étude de faisabilité chez l'homme portant sur des patients présentant des métastases pulmonaires de CCR. A la vue de la DMT de 320 mg décrite dans ce travail, deux doses de traitement pourraient être utilisées : 160 mg et 320 mg. Les patients inclus dans cette étude seraient des patients chez qui, au cours du suivi d'un traitement chirurgical d'un CCR, seraient apparues des métastases pulmonaires en nombre limité. Ils bénéficieraient alors du traitement séquentiel des métastases pulmonaires homolatérales puis controlatérales à 1 mois d'intervalle. Après thoracotomie, les métastases seraient recherchées par palpation puis repérées à l'aide de fils. La procédure de PPI serait

alors menée avec injection de GEM. En fin de PPI, les canules seraient retirées puis les métastases pulmonaires seraient réséquées manuellement.

Bibliographie :

1. Mitry E, Guiu B, Coscinea S, Jooste V, Faivre J, Bouvier A-M. Epidemiology, management and prognosis of colorectal cancer with lung metastases: a 30-year population-based study. *Gut*. 2010 Oct;59(10):1383–8.
2. Poon MA, O’Connell MJ, Moertel CG, Wieand HS, Cullinan SA, Everson LK, et al. Biochemical modulation of fluorouracil: evidence of significant improvement of survival and quality of life in patients with advanced colorectal carcinoma. *J Clin Oncol*. 1989 Oct;7(10):1407–18.
3. Long-term results of lung metastasectomy: prognostic analyses based on 5206 cases. The International Registry of Lung Metastases. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1997 Jan;113(1):37–49.
4. Pfannschmidt J, Dienemann H, Hoffmann H. Surgical resection of pulmonary metastases from colorectal cancer: a systematic review of published series. *Ann Thorac Surg*. 2007 Jul;84(1):324–38.
5. Lee W-S, Yun SH, Chun H-K, Lee W-Y, Yun H-R, Kim J, et al. Pulmonary resection for metastases from colorectal cancer: prognostic factors and survival. *Int J Colorectal Dis*. 2007 Jun;22(6):699–704.
6. Joosten J, Bertholet J, Keemers-Gels M, Barendregt W, Ruers T. Pulmonary resection of colorectal metastases in patients with or without a history of hepatic metastases. *Eur J Surg Oncol*. 2008 Aug;34(8):895–9.
7. Welter S, Jacobs J, Krbek T, Krebs B, Stamatis G. Long-term survival after repeated resection of pulmonary metastases from colorectal cancer. *Ann Thorac Surg*. 2007 Jul;84(1):203–10.
8. Mitry E, Fields ALA, Bleiberg H, Labianca R, Portier G, Tu D, et al. Adjuvant chemotherapy after potentially curative resection of metastases from colorectal cancer: a pooled analysis of two randomized trials. *J Clin Oncol*. 2008 Oct 20;26(30):4906–11.
9. Gurney H, Dodwell D, Thatcher N, Tattersall MH. Escalating drug delivery in cancer chemotherapy: a review of concepts and practice--Part 2. *Ann Oncol*. 1993 Feb;4(2):103–15.
10. Kim M-Y, Oskarsson T, Acharyya S, Nguyen DX, Zhang XH-F, Norton L, et al. Tumor self-seeding by circulating cancer cells. *Cell*. 2009 Dec 24;139(7):1315–26.

11. Van Schil PE, Hendriks JM, van Putte BP, Stockman BA, Lauwers PR, Ten Broecke PW, et al. Isolated lung perfusion and related techniques for the treatment of pulmonary metastases. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2008 Mar;33(3):487–96.
12. Ng B, Lenert JT, Weksler B, Port JL, Ellis JL, Burt ME. Isolated lung perfusion with FUDR is an effective treatment for colorectal adenocarcinoma lung metastases in rats. *Ann Thorac Surg*. 1995 Jan;59(1):205–8.
13. Hendriks JM, Van Schil PE, De Boeck G, Lauwers PR, Van Oosterom AA, Van Marck EA, et al. Isolated lung perfusion with melphalan and tumor necrosis factor for metastatic pulmonary adenocarcinoma. *Ann Thorac Surg*. 1998 Nov;66(5):1719–25.
14. Van Putte BP, Hendriks JM, Romijn S, Pauwels B, Friedel G, Guetens G, et al. Isolated lung perfusion with gemcitabine in a rat: pharmacokinetics and survival. *J Surg Res*. 2003 Feb;109(2):118–22.
15. Van Putte BP, Hendriks JMH, Romijn S, Pauwels B, Vermorken JB, Van Schil PEY. Combination chemotherapy with gemcitabine with isolated lung perfusion for the treatment of pulmonary metastases. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2005 Jul;130(1):125–30.
16. Van Putte BP, Hendriks JMH, Romijn S, De Greef K, Van Schil PEY. Toxicity and efficacy of isolated lung perfusion with gemcitabine in a rat model of pulmonary metastases. *Thorac Cardiovasc Surg*. 2006 Mar;54(2):129–33.
17. Creech O Jr, Krementz ET, Ryan RF, Winblad JN. Chemotherapy of cancer: regional perfusion utilizing an extracorporeal circuit. *Ann Surg*. 1958 Oct;148(4):616–32.
18. Krementz ET. Lucy Wortham James lecture. Regional perfusion. Current sophistication, what next? *Cancer*. 1986 Feb 1;57(3):416–32.
19. Pierpont H, Blades B. Lung perfusion with chemotherapeutic agents. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1960 Feb;39:159–65.
20. Jacobs JK, Flexner JM, Scott HW Jr. Selective isolated perfusion of the right or left lung. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1961 Oct;42:546–52.
21. Johnston MR, Minchen RF, Dawson CA. Lung perfusion with chemotherapy in patients with unresectable metastatic sarcoma to the lung or diffuse bronchioloalveolar carcinoma. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1995 Aug;110(2):368–73.
22. Minchin RF, Johnston MR, Aiken MA, Boyd MR. Pharmacokinetics of doxorubicin in isolated lung of dogs and humans perfused in vivo. *J Pharmacol Exp Ther*. 1984 Apr;229(1):193–8.

23. Burt ME, Liu D, Abolhoda A, Ross HM, Kaneda Y, Jara E, et al. Isolated lung perfusion for patients with unresectable metastases from sarcoma: a phase I trial. *Ann Thorac Surg.* 2000 May;69(5):1542–9.
24. Ratto GB, Toma S, Civalleri D, Passerone GC, Esposito M, Zaccheo D, et al. Isolated lung perfusion with platinum in the treatment of pulmonary metastases from soft tissue sarcomas. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1996 Sep;112(3):614–22.
25. Pass HI, Mew DJ, Kranda KC, Temeck BK, Donington JS, Rosenberg SA. Isolated lung perfusion with tumor necrosis factor for pulmonary metastases. *Ann Thorac Surg.* 1996 Jun;61(6):1609–17.
26. Schröder C, Fisher S, Pieck AC, Müller A, Jaehde U, Kirchner H, et al. Technique and results of hyperthermic (41 degrees C) isolated lung perfusion with high-doses of cisplatin for the treatment of surgically relapsing or unresectable lung sarcoma metastasis. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2002 Jul;22(1):41–6.
27. Putnam JB Jr. New and evolving treatment methods for pulmonary metastases. *Semin Thorac Cardiovasc Surg.* 2002 Jan;14(1):49–56.
28. Hendriks JMH, Grootenboers MJJH, Schramel FMNH, van Boven WJ, Stockman B, Seldenrijk CA, et al. Isolated lung perfusion with melphalan for resectable lung metastases: a phase I clinical trial. *Ann Thorac Surg.* 2004 Dec;78(6):1919–1926; discussion 1926–1927.
29. Grootenboers MJH, Hendriks JMH, van Boven WJ, Knibbe CAJ, van Putte B, Stockman B, et al. Pharmacokinetics of isolated lung perfusion with melphalan for resectable pulmonary metastases, a phase I and extension trial. *J Surg Oncol.* 2007 Dec 1;96(7):583–9.
30. Den Hengst WA, Van Putte BP, Hendriks JMH, Stockman B, van Boven W-JP, Weyler J, et al. Long-term survival of a phase I clinical trial of isolated lung perfusion with melphalan for resectable lung metastases. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2010 Nov;38(5):621–7.
31. Weksler B, Schneider A, Ng B, Burt M. Isolated single lung perfusion in the rat: an experimental model. *J Appl Physiol.* 1993 Jun;74(6):2736–9.
32. Wang HY, Port JL, Hochwald SN, Burt ME. Revised technique of isolated lung perfusion in the rat. *Ann Thorac Surg.* 1995 Jul;60(1):211–2.
33. Hendriks JM, van Schil PE, Eyskens EJ. Modified technique of isolated left lung perfusion in the rat. *Eur Surg Res.* 1999;31(1):93–6.

34. Nawata S, Abolhoda A, Ross HM, Brooks A, Burt ME. Sequential bilateral isolated lung perfusion in the rat: an experimental model. *Ann Thorac Surg.* 1997 Mar;63(3):796–9.
35. Abolhoda A, Brooks A, Nawata S, Kaneda Y, Cheng H, Burt ME. Isolated lung perfusion with doxorubicin prolongs survival in a rodent model of pulmonary metastases. *Ann Thorac Surg.* 1997 Jul;64(1):181–4.
36. Weksler B, Lenert J, Ng B, Burt M. Isolated single lung perfusion with doxorubicin is effective in eradicating soft tissue sarcoma lung metastases in a rat model. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1994 Jan;107(1):50–4.
37. Weksler B, Blumberg D, Lenert JT, Ng B, Fong Y, Burt ME. Isolated single-lung perfusion with TNF-alpha in a rat sarcoma lung metastases model. *Ann Thorac Surg.* 1994 Aug;58(2):328–331; discussion 332.
38. Nawata S, Abecasis N, Ross HM, Abolhoda A, Cheng H, Sachar KS, et al. Isolated lung perfusion with melphalan for the treatment of metastatic pulmonary sarcoma. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1996 Dec;112(6):1542–1547; discussion 1547–1548.
39. Tanaka T, Kaneda Y, Li TS, Matsuoka T, Zempo N, Esato K. Digitonin enhances the antitumor effect of cisplatin during isolated lung perfusion. *Ann Thorac Surg.* 2001 Oct;72(4):1173–8.
40. Weksler B, Ng B, Lenert JT, Burt ME. Isolated single-lung perfusion: a study of the optimal perfusate and other pharmacokinetic factors. *Ann Thorac Surg.* 1995 Sep;60(3):624–9.
41. Van Putte BP, Hendriks JMH, Romijn S, Guetens G, De Boeck G, De Bruijn EA, et al. Single-pass isolated lung perfusion versus recirculating isolated lung perfusion with melphalan in a rat model. *Ann Thorac Surg.* 2002 Sep;74(3):893–898; discussion 898.
42. Van Putte BP, Hendriks JMH, Romijn S, Pauwels B, De Boeck G, Guetens G, et al. Pharmacokinetics after pulmonary artery perfusion with gemcitabine. *Ann Thorac Surg.* 2003 Oct;76(4):1036–1040; discussion 1040.
43. Romijn S, Hendriks JMH, Van Putte BP, Guetens G, De Bruijn EA, Van Schil PEY. Variations in flow, duration, and concentration do not change the final lung concentration of melphalan after isolated lung perfusion in rats. *Eur Surg Res.* 2003 Feb;35(1):50–3.
44. Den Hengst WA, Hendriks JMH, Van Hoof T, Heytens K, Guetens G, de Boeck G, et al. Selective pulmonary artery perfusion with melphalan is equal to isolated lung perfusion but superior to intravenous melphalan for the treatment of sarcoma lung

- metastases in a rodent model. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2012 Aug;42(2):341–347; discussion 347.
45. Van Thielen J, Wittock A, Hendriks J, den Hengst W, De Pooter C, Van den Weyngaert D, et al. Isolated lung perfusion with gemcitabine combined with radiotherapy: no additional lung toxicity in an experimental model. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2012 Oct;42(4):712–8.
46. Johnston MR, Minchin R, Shull JH, Thenot JP, McManus BM, Terrill R, et al. Isolated lung perfusion with Adriamycin. A preclinical study. *Cancer*. 1983 Aug 1;52(3):404–9.
47. Johnston MR, Christensen CW, Minchin RF, Rickaby DA, Linehan JH, Schuller HM, et al. Isolated total lung perfusion as a means to deliver organ-specific chemotherapy: long-term studies in animals. *Surgery*. 1985 Jul;98(1):35–44.
48. Minchin RF, Johnston MR, Schuller HM, Aiken MA, Boyd MR. Pulmonary toxicity of doxorubicin administered by in situ isolated lung perfusion in dogs. *Cancer*. 1988 Apr 1;61(7):1320–5.
49. Baciewicz FA Jr, Arredondo M, Chaudhuri B, Crist KA, Basilius D, Bandyopadhyah S, et al. Pharmacokinetics and toxicity of isolated perfusion of lung with doxorubicin. *J Surg Res*. 1991 Feb;50(2):124–8.
50. Furrer M, Lardinois D, Thormann W, Altermatt HJ, Betticher D, Cerny T, et al. Isolated lung perfusion: single-pass system versus recirculating blood perfusion in pigs. *Ann Thorac Surg*. 1998 May;65(5):1420–5.
51. Franke UFW, Wittwer T, Lessel M, Liebing K, Albert M, Becker V, et al. Evaluation of isolated lung perfusion as neoadjuvant therapy of lung metastases using a novel in vivo pig model: I. Influence of perfusion pressure and hyperthermia on functional and morphological lung integrity. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2004 Oct;26(4):792–9.
52. Franke UFW, Wittwer T, Kaluza M, Albert M, Becker V, Roskos M, et al. Evaluation of isolated lung perfusion as neoadjuvant therapy of lung metastases using a novel in vivo pig model: II. High-dose cisplatin is well tolerated by the native lung tissue. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2004 Oct;26(4):800–6.
53. Van Putte BP, Grootenboers M, van Boven W-J, Hendriks JMH, van Schil PEY, Guetens G, et al. Pharmacokinetics of gemcitabine when delivered by selective pulmonary artery perfusion for the treatment of lung cancer. *Drug Metab Dispos*. 2008 Apr;36(4):676–81.
54. Grootenboers MJJH, Schramel FMNH, van Boven WJ, Hendriks JMH, van Schil PEY, De Wit PEJ, et al. Selective pulmonary artery perfusion followed by blood flow

- occlusion: new challenge for the treatment of pulmonary malignancies. *Lung Cancer*. 2009 Mar;63(3):400–4.
55. Van Putte BP, Grootenboers M, van Boven W-J, van Oosterhout M, Pasterkamp G, Folkerts G, et al. Selective pulmonary artery perfusion for the treatment of primary lung cancer: Improved drug exposure of the lung. *Lung Cancer*. 2009 Aug;65(2):208–13.
 56. Hatok J, Babusikova E, Matakova T, Mistuna D, Dobrota D, Racay P. In vitro assays for the evaluation of drug resistance in tumor cells. *Clin Exp Med*. 2009 Mar;9(1):1–7.
 57. Chang AY, Lopes G, Hsin KW, Lim R, Fong FK, Wong J. Phase II trial of 5-fluorouracil/leucovorin/gemcitabine/cisplatin as second-line treatment in patients with metastatic or recurrent colorectal carcinoma: a cancer therapeutics research group study. *Clin Colorectal Cancer*. 2007 Sep;6(9):646–51.
 58. Hind D, Tappenden P, Tumor I, Eggington S, Sutcliffe P, Ryan A. The use of irinotecan, oxaliplatin and raltitrexed for the treatment of advanced colorectal cancer: systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess*. 2008 May;12(15):iii–ix, xi–162.
 59. Link KH, Kornmann M, Leder GH, Butzer U, Pillasch J, Staib L, et al. Regional chemotherapy directed by individual chemosensitivity testing in vitro: a prospective decision-aiding trial. *Clin Cancer Res*. 1996 Sep;2(9):1469–74.
 60. Kornmann M, Butzer U, Blatter J, Beger HG, Link KH. Pre-clinical evaluation of the activity of gemcitabine as a basis for regional chemotherapy of pancreatic and colorectal cancer. *Eur J Surg Oncol*. 2000 Sep;26(6):583–7.
 61. Jhawer M, Goel S, Wilson AJ, Montagna C, Ling Y-H, Byun D-S, et al. PIK3CA mutation/PTEN expression status predicts response of colon cancer cells to the epidermal growth factor receptor inhibitor cetuximab. *Cancer Res*. 2008 Mar 15;68(6):1953–61.
 62. Edwards MS, Chadda SD, Zhao Z, Barber BL, Sykes DP. A systematic review of treatment guidelines for metastatic colorectal cancer. *Colorectal Dis*. 2012 Feb;14(2):e31–47.
 63. Abbruzzese JL, Grunewald R, Weeks EA, Gravel D, Adams T, Nowak B, et al. A phase I clinical, plasma, and cellular pharmacology study of gemcitabine. *J Clin Oncol*. 1991 Mar;9(3):491–8.
 64. Caffo O, Fallani S, Marangon E, Nobili S, Cassetta MI, Murgia V, et al. Pharmacokinetic study of gemcitabine, given as prolonged infusion at fixed dose rate,

- in combination with cisplatin in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2010 May;65(6):1197–202.
65. Houghton PJ, Cheshire PJ, Hallman JC, Bissery MC, Mathieu-Boué A, Houghton JA. Therapeutic efficacy of the topoisomerase I inhibitor 7-ethyl-10-(4-[1-piperidino]-1-piperidino)-carbonyloxy-camptothecin against human tumor xenografts: lack of cross-resistance in vivo in tumors with acquired resistance to the topoisomerase I inhibitor 9-dimethylaminomethyl-10-hydroxycamptothecin. *Cancer Res*. 1993 Jun 15;53(12):2823–9.
 66. Vahrmeijer AL, van Dierendonck JH, Keizer HJ, Beijnen JH, Tollenaar RA, Pijl ME, et al. Increased local cytostatic drug exposure by isolated hepatic perfusion: a phase I clinical and pharmacologic evaluation of treatment with high dose melphalan in patients with colorectal cancer confined to the liver. *Br J Cancer*. 2000 May;82(9):1539–46.
 67. Awad JA, Chénard J, Lemieux JM, Lou W. Evaluation of various fluids for the perfusion of the canine pulmonary lobes. *Dis Chest*. 1965 Sep;48(3):269–77.
 68. Grootenboers MJJH, Heeren J, van Putte BP, Hendriks JMH, van Boven WJ, Van Schil PEY, et al. Isolated lung perfusion for pulmonary metastases, a review and work in progress. *Perfusion*. 2006 Dec;21(5):267–76.
 69. Kredel M, Muellenbach RM, Schlegel N, Wunder C, Klingelhöfer M, Lange M, et al. Pulmonary effects of positive end-expiratory pressure and fluid therapy in experimental lung injury. *Exp Lung Res*. 2011 Feb;37(1):35–43.
 70. Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. The Acute Respiratory Distress Syndrome Network. *N Engl J Med*. 2000 May 4;342(18):1301–8.
 71. Den Hengst WA, Gielis JF, Lin JY, Van Schil PE, De Windt LJ, Moens AL. Lung ischemia-reperfusion injury: a molecular and clinical view on a complex pathophysiological process. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010 Nov;299(5):H1283–1299.
 72. Soncul H, Oz E, Kalaycioglu S. Role of ischemic preconditioning on ischemia-reperfusion injury of the lung. *Chest*. 1999 Jun;115(6):1672–7.
 73. Faivre S, Le Chevalier T, Monnerat C, Lokiec F, Novello S, Taieb J, et al. Phase I-II and pharmacokinetic study of gemcitabine combined with oxaliplatin in patients with advanced non-small-cell lung cancer and ovarian carcinoma. *Ann Oncol*. 2002 Sep;13(9):1479–89.

74. Chiang CH, Yu CP, Wu CP, Yan HC, Perng WC. Cytokine up-regulation in ischaemic/reperfused lungs perfused with University of Wisconsin solution and normal saline. *Clin Sci*. 2001 Sep;101(3):285–94.
75. Van Putte BP, Hendriks JMH, Guetens G, de Boeck G, de Bruijn EA, van Schil PEY, et al. Modified approach of administering cytostatics to the lung: more efficient isolated lung perfusion. *Ann Thorac Surg*. 2006 Sep;82(3):1033–7.
76. De Pas T, Curigliano G, Franceschelli L, Catania C, Spaggiari L, de Braud F. Gemcitabine-induced systemic capillary leak syndrome. *Ann Oncol*. 2001 Nov;12(11):1651–2.
77. Krueger T, Kuemmerle A, Kosinski M, Denys A, Magnusson L, Stupp R, et al. Cytostatic lung perfusion results in heterogeneous spatial regional blood flow and drug distribution: evaluation of different cytostatic lung perfusion techniques in a porcine model. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2006 Aug;132(2):304–11.
78. Pagès P-B, Facy O, Mordant P, Ladoire S, Magnin G, Lokiec F, et al. Isolated lung perfusion as an adjuvant treatment of colorectal cancer lung metastases: a preclinical study in a pig model. *PLoS ONE*. 2013;8(3):e59485.
79. Dasanu CA. Gemcitabine: vascular toxicity and prothrombotic potential. *Expert Opin Drug Saf*. 2008 Nov;7(6):703–16.
80. National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events: NCI CTCAE version 3.0
<http://ctep.cancer.gov/protocol/Development/electronic/applications/docs/ctcae3.pdf>
81. Romijn S, Hendriks JMH, Van Putte BP, Weyler J, Guetens G, De Boeck G, et al. Regional differences of melphalan lung levels after isolated lung perfusion in the rat. *J Surg Res*. 2005 May 15;125(2):157–60.
82. Hakim TS, Dean GW, Lisbona R. Quantification of spatial blood flow distribution in isolated canine lung. *Invest Radiol*. 1988 Jul;23(7):498–504.
83. West JB, Dollery CT, Naimark A. Distribution of blood flow in isolated lung; relation to vascular and alveolar pressures. *J Appl Physiol*. 1964 Jul;19:713–24.
84. Glenny RW, Polissar NL, McKinney S, Robertson HT. Temporal heterogeneity of regional pulmonary perfusion is spatially clustered. *J Appl Physiol*. 1995 Sep;79(3):986–1001.
85. Walther SM, Domino KB, Glenny RW, Hlastala MP. Pulmonary blood flow distribution in sheep: effects of anesthesia, mechanical ventilation, and change in posture. *Anesthesiology*. 1997 Aug;87(2):335–42.

86. Melsom MN, Flatebø T, Nicolaysen G. Hypoxia and hyperoxia both transiently affect distribution of pulmonary perfusion but not ventilation in awake sheep. *Acta Physiol Scand*. 1999 Jun;166(2):151–8.
87. Ueda K, Sugi K, Li TS, Saeki K, Nawata S, Esato K. The long-term evaluation of pulmonary toxicity following isolated lung perfusion with melphalan in the rat. *Anticancer Res*. 1999 Feb;19(1A):141–7.
88. Nabhan C, Gajria D, Krett NL, Gandhi V, Ghias K, Rosen ST. Caspase activation is required for gemcitabine activity in multiple myeloma cell lines. *Mol Cancer Ther*. 2002 Nov;1(13):1221–7.
89. Di Fiore F, Michel P. [Prognostic role of KRAS mutation in colorectal cancer]. *Bull Cancer*. 2009 Dec;96 Suppl:S23–30.
90. Fuso L, Baldi F, Di Perna A. Therapeutic strategies in pulmonary hypertension. *Front Pharmacol*. 2011;2:21.
91. Archer SL, Michelakis ED. Phosphodiesterase type 5 inhibitors for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med*. 2009 Nov 5;361(19):1864–71.

Annexes: